



Universidade Federal de São João Del Rei – UFSJ

CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

TRABALHO DE COCNLUSÃO DE CURSO

**PRODUÇÃO DE CONJUGADO IgY - Ns1 ESPECÍFICA – PEROXIDASE DE
RABANETE PARA UTILIZAÇÃO EM ENSAIOS DE ELISA (ENSAIO DE
IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICA)**

Manoéle Alegiance Fernandes Pereira

Orientador: Prof. Dr. Antônio Helvécio Tótola

Ouro Branco

2017



Universidade Federal de São João Del Rei - UFSJ

CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

TRABALHO DE COCNLUSÃO DE CURSO

**PRODUÇÃO DE CONJUGADO IgY - Ns1 ESPECÍFICA – PEROXIDASE DE
RABANETE PARA UTILIZAÇÃO EM ENSAIOS DE ELISA (ENSAIO DE
IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICA)**

Manoéle Alegiance Fernandes Pereira

Trabalho de conclusão de curso apresentado
na Universidade Federal de São João Del Rei,
Campus Alto Paraopeba, para o título de
bacharel em Engenharia de Bioprocessos.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Helvécio Tótola

Ouro Branco

2017

MANOÉLE ALEGIANCE FERNANDES PEREIRA

**PRODUÇÃO DE CONJUGADO IgY - Ns1 ESPECÍFICA – PEROXIDASE DE RABANETE
PARA UTILIZAÇÃO EM ENSAIOS DE ELISA (ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO
ENZIMÁTICA)**

BANCA EXAMINADORA:

Orientador Professor Dr. Antônio Helvécio Tótola (UFSJ)

Professora Alessandra Costa Vilaça (UFSJ)

Professor Edson Romano Nucci (UFSJ)

Ouro Branco

2017

“Eu gostaria de dizer duas coisas, uma intelectual e uma moral. O conselho intelectual que eu gostaria de dar é o seguinte: quando você está estudando um assunto, ou considerando alguma filosofia. Pergunte a si mesmo, somente, quais são os fatos? E qual é a verdade que os fatos revelam? Nunca se deixe divergir pelo que você gostaria de acreditar, ou pelo que você acha que trará benefícios às crenças sociais se fosse acreditado. Olhe apenas e somente para quais são os fatos. Esse foi o conselho intelectual que eu gostaria de dar. O conselho moral que eu gostaria de dar é muito simples. Eu diria: o amor é sábio, o ódio é tolo. Nesse mundo que está ficando mais interconectado, nós temos que aprender a tolerar uns aos outros, nós temos que aprender a aceitar o fato de que algumas pessoas dizem coisas que não gostamos. Nós só podemos viver juntos dessa forma, se nós vivermos juntos e não morrermos juntos. Nós precisamos aprender a bondade da caridade e da tolerância. O que é absolutamente vital para a continuação da vida humana nesse planeta.” filósofo Bertrand Russell 1959

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu pai Sebastião Edson Pereira, que sempre me apoiou e incentivou á prosseguir rumo ao conhecimento e ao sonho de tornar o mundo um lugar melhor para todos, sempre respeitando as diferenças e absorvendo destas, ideias e novos entendimentos da vida.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao meu orientador Antônio Helvécio Tótola por toda sua dedicação e receptibilidade. Sua frugalidade, eupatia e curiosidade me inspiraram a todo dia. Sinto-me honrada por poder aprender com este mestre.

RESUMO

A dengue é um dos principais problemas de saúde no mundo. Para o desenvolvimento de ensaios de ELISA, faz-se necessária a produção de anticorpos capazes de reconhecer os antígenos a serem detectados com sensibilidade e especificidade e a conjugação destes anticorpos com um sistema de detecção. O presente trabalho teve como objetivo produzir, purificar e conjugar anticorpos IgY (imunoglobulina Y, encontrada em aves) específicos para a proteína NS1 do Vírus da Dengue com a Enzima Peroxidase de rabanete, para utilização como sistema de detecção em ensaios de ELISA direto específico para diagnóstico de Dengue. Desta forma, os resultados obtidos comprovam que a purificação e marcação das IgY específicas para NS1 com peroxidase de rabanete foi eficiente, onde pode-se observar a presença de forte marcação na amostra conjugada com peroxidase de rabanete (CP) e a inexistência de marcação no controle negativo (CN).

Palavras-chave: dengue; diagnóstico; ELISA; IgY; NS1.

ABSTRACT

Dengue is one of the major health problems in the world. For the development of ELISA assays, it is necessary to produce antibodies capable of recognizing the antigens to be detected with sensitivity and specificity and the conjugation of these antibodies with a detection system. The present work aimed to produce, purify and conjugate specific IgY antibodies to the NS1 protein of the Dengue Virus with the Radish Peroxidase Enzyme for use as a detection system in specific direct ELISA tests for Dengue diagnosis. Thus, the results obtained prove that the purification and labeling of NS1-specific IgY with radish peroxidase was efficient, in which the presence of strong labeling in the radish peroxidase-conjugated sample (CP) and absence of labeling in the negative control (CN).

Keywords: dengue; diagnosis; ELISA; IgY; NS1.

SUMÁRIO

1.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.0 INTRODUÇÃO	12
3.0 OBJETIVO	15
4.0 METODOLOGIA	15
4.1 PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS IGY NS1 ESPECÍFICOS	15
4.1.1 Imunização das galinhas	15
4.1.2 Purificação dos IgY	15
4.1.3 Análise da pureza dos anticorpos IgY anti NS1	16
4.1.4 Verificação da reatividade dos anticorpos IgY ao antígeno Ns1	16
4.2 MARCAÇÃO DOS ANTICORPOS IGY ANTI-NS1 COM PEROXIDASE DE RABANETE	18
4.2.1 Conjugação com peroxidase de rabanete	18
4.2.2 Verificação da eficiência da marcação	18
5.0 RESULTADOS	19
5.1 ANÁLISE DA PUREZA E ESPECIFICIDADE DOS ANTICORPOS IGY ANTI-NS1	19
5.2 ANÁLISE DA EFICIÊNCIA DA CONJUGAÇÃO DE ANTICORPOS IGY NS1 ESPECÍFICOS COM A ENZIMA PEROXIDASE	22
6.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS	23
7.0 BIBLIOGRAFIA	24

1 Revisão bibliográfica

A dengue é um dos principais problemas de saúde no mundo. Estima-se que cerca de 100 milhões de pessoas se infectem anualmente em todos os continentes exceto Europa, e destes até 500.000 podem desenvolver febre hemorrágica do dengue (FHD) ou síndrome de choque da dengue (SCD) (Leong et al. 2007). A incidência mundial da febre do Dengue vem aumentando desde a Segunda Guerra mundial, tendo como principais fatores à expansão das populações urbanas, à urbanização desordenada, o aumento da densidade do Aedes, além do aumento dos viajantes via aérea e o rápido deslocamento de pessoas virêmicas (Gubler, 1998a; Gubler, 1998b; RigauPerez Et al.(1997). Aliados a estes fatores constam ainda a ausência de infraestrutura básica de saneamento, a coleta de lixo inadequada, o aumento da produção de descartáveis, a insuficiência de recursos para programas de combate ao vetor e o surgimento de resistência dos mosquitos aos inseticidas (FUNASA, 2001).

No Brasil condições sócio-ambientais favorecem a disseminação do transmissor e a cada ano presenciamos o aumento no número de casos da doença atingindo milhares de brasileiros e elevando significativamente os gastos no combate à doença (Mondini & Chiaravalloti,2007; Lefevre et al.(2007). Nos últimos 20 anos, o Brasil sofreu várias epidemias de dengue. O vírus e o vetor se disseminaram no país e epidemias ocorreram em todas as regiões incluindo as regiões mais populosas (Lima et al. 2007). A incidência da Dengue no Brasil teve um crescimento significativo na década de noventa, atingindo o nível mais elevado em 1998, quando foram oficialmente registrados cerca de 530 mil casos. Houve uma redução acentuada em 1999, com 210 mil casos, e um pequeno crescimento em 2000, quando foram notificados 240 mil casos (FUNASA, 2002).Em 2002, o número de mortes causadas pela FHD excedeu o número de mortes por malária, pela primeira vez no Brasil(Nogueira et al. (2007); Nogueira et al.(2005); Morato et al. (2005); Mondini et al. (2005); Schatzmayr, (2001); Schatzmayr, (2000).

Os sintomas da dengue são inespecíficos para diferenciá-la de outras doenças febris e não existem vacinas e/ou terapias alternativas contra esse vírus. A Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece como estratégia essencial no processo de otimização dos sistemas de saúde pública e no controle de epidemias o desenvolvimento de diagnósticos rápidos, práticos, sensíveis, específicos e de baixo custo para detecção dos casos de Dengue. O diagnóstico sorológico da dengue pode ser realizado em dois estágios distintos: no estágio inicial da doença, com a presença de febre e viremia acentuada, sendo acompanhado por

altos níveis de NS1 no sangue dos pacientes e no segundo estágio, após o período febril até algumas semanas após o período de infecção quando os títulos de anticorpos IgM e IgG específicos para proteínas virais estão presentes em maiores concentrações (HU et al., 2011; HUANG et al., 2012). A confirmação do diagnóstico da dengue é rotineiramente realizado pelo método *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA), visando a detecção de anticorpos do tipo IgM em amostras coletadas uma semana após o início do sintomas. Tal técnica pode ser considerada como uma análise "a posteriori", de utilização limitada para o diagnóstico rápido do doente durante o início da fase sintomática (BORGES et al., 2010).

Para o desenvolvimento de ensaios de ELISA, faz-se necessária a produção de anticorpos capazes de reconhecer os antígenos a serem detectados com sensibilidade e especificidade e a conjugação destes anticorpos com um sistema de detecção. Os mamíferos como coelhos, cabras e camundongos são tradicionalmente utilizados na obtenção de anticorpos. O inconveniente ao se trabalhar com estes animais é a necessidade de retirada de sangue, em intervalos frequentes, para obtenção de anticorpos, sendo ainda necessário o sacrifício dos mesmos para obtenção de volumes maiores de soro. Uma alternativa ao uso destes animais é a produção de anticorpos em galinhas. As aves apresentam as vantagens de maior facilidade na coleta e o maior rendimento dos anticorpos. Enquanto nos mamíferos é necessário realizar a sangria para coletar o soro, nas aves isso não é necessário. Na produção de anticorpos em aves, após a imunização os anticorpos predominam no soro. Após duas semanas, uma maior quantidade de anticorpos é encontrada nas gemas. O título dos anticorpos aumenta com os reforços. MUNENE (2004) utilizou reforços no intervalo de 15 dias para a produção de anticorpos. WOOLEY & LANDON (1995), BOLLEN et al. (1996) a cada mês fizeram um reforço com inoculação do antígeno distribuído entre quatro e seis pontos. Já HANSEN et al. (1998) utilizaram intervalos de três semanas. Para isolar IgY das gemas a maioria dos métodos utilizam Sulfato de Amônio ou PEG(polietiloglicol). Ambas as técnicas são baseadas na precipitação proteica diferencial, seguida de centrifugação, para obtenção de anticorpos purificados. A conjugação de anticorpos para utilização em ensaios de ELISA pode ser feita com uma série de sistemas de detecção, dependendo das necessidades do ensaio a ser desenvolvido. Os anticorpos podem ser conjugados com enzimas tais como Peroxidase de rabanete, Fosfatase alcalina ou Biotina-Avidina, que convertem os substratos específicos, gerando um composto de cor detectável por espectrometria, permitindo assim a mensuração nos ensaios de ELISA.

2 INTRODUÇÃO

Segundo Rigau-Perez et all. (1997), a dengue é uma doença viral aguda, transmitida por mosquito, caracterizada por febre, dor de cabeça, artralgia, mialgia, erupção cutânea, náuseas e vômitos. As infecções são causadas por qualquer dos quatro serótipos de vírus (DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4). A incidência de dengue está aumentando na maioria das áreas tropicais em todo o mundo. Embora a dengue não seja endêmica nos Estados Unidos continentais, no Havaí ou no Alasca, mais de 500 casos de dengue foram relatados de 1977 a 1994 em residentes dos EUA que visitaram áreas endêmicas de dengue em todo o mundo. O aumento da atividade da dengue na Ásia, África e nas Américas representa uma pandemia que está sendo facilitada pelo aumento da viagem aérea, urbanização global, crescimento populacional, maior abundância de recipientes descartáveis e não degradáveis que podem servir como sítios de produção do *Aedes*, e a falta de programas eficazes de controle de mosquitos.

Os motivos do ressurgimento da febre hemorrágica da dengue após o século 20 segundo Gluber, (1998), são complexos e não são totalmente compreendidos, mas as mudanças demográficas, societárias e de infraestrutura de saúde pública nos últimos 30 anos contribuíram grandemente para tal fato. Ainda segundo este autor, um grande desafio para funcionários de saúde pública em todas as áreas tropicais do mundo é desenvolver e implementar programas de prevenção e controle sustentáveis que reverterão a tendência da dengue hemorrágica emergente. Segundo Mondini et all. (2007), a ausência de associação encontrada entre risco de ocorrência de dengue e níveis socioeconômicos na quase totalidade dos anos estudados mostra que esta é uma questão que precisa ser mais bem estudada e, talvez, dependa da realidade de cada município. É importante que sejam verificadas as relações espaciais entre a transmissão de dengue e outras variáveis, como o grau de imunidade da população, a efetividade das medidas de controle, o grau de infestação pelo vetor, os hábitos e atitudes da população, entre outros. Ainda com base nos trabalhos de Mondini, a característica endêmica da transmissão e a ocorrência diferenciada segundo áreas devem ser levadas em conta na estruturação de estratégias para o controle de dengue.

Segundo Lefevre et all. (2007), que teve intuito de conseguir avanços concretos no controle da dengue e do vetor, a população não está conseguindo discriminar adequadamente o tipo de água mais propícia à criação do mosquito e que esta desconhece as fases de desenvolvimento do vetor. Ainda neste trabalho, o autor observou consciência

inadequada de vários elementos da biologia do vetor, bem como da necessária integração entre poder público e população. Com base nisto, o autor sugere que as atividades educativas adotem os resultados de sua pesquisa como insumo, visando ao incremento da eficiência das ações participativas de combate ao dengue e controle do vetor.

Estudos patológicos em seres humanos são incomuns, e um modelo animal adequado de DHF (febre hemorrágica do dengue) / DSS (síndrome de choque da dengue) não existe. O tratamento atual de DHF / DSS é sintomático e a prevenção é através do controle vetorial. Como tal, há um grande impulso para o desenvolvimento de vacinas e novas moléculas terapêuticas para impedir a replicação viral em células infectadas ou neutralizar os efeitos de mediadores inflamatórios específicos em células alvo segundo Leong et al. (2007). Segundo Schatzmayr (2000) uma vacina potente tetravalente parece ser a única maneira possível de controlar a doença no futuro, além de um rápido diagnóstico clínico e laboratorial, a fim de oferecer tratamento de apoio às infecções clínicas mais graves. Desta forma torna-se justificável o desenvolvimento de um método de diagnóstico de baixo custo, sensível e específico para o antígeno do vírus da dengue.

No presente trabalho utilizou-se aves na produção de anticorpos específicos para o antígeno dos quatro serótipos da dengue (Ns1). Com base no trabalho de Wooley et al. (1995), que estudou a utilização de anticorpos de frango fornecendo uma excelente alternativa aos seus homólogos de mamíferos para imunodiagnóstico. A partir do desenvolvimento de um imunoenensaio para medir a interleucina-6 humana (hIL-6), por meio da comparação das respostas de anticorpos séricos de ovelhas e galinhas à imunização com IL-6 humana recombinante (rhIL-6) e do estudo da transferência de anticorpos de soro de frango para a gema do ovo. Observou-se que tanto as galinhas como as ovelhas produziram anticorpos de alta avididade, com frangos produzindo uma resposta de avididade invulgarmente alta após uma única imunização. Com base nos resultados obtidos no trabalho de Wooley pode-se corroborar que a utilização destes IgY seria viável e sustentável.

Outro estudo que embasou a utilização dos IgY em detrimento dos IgG foi o de Munene (2004), que centra-se na obtenção e comparação de anticorpos IgY (produzidos a partir de gemas de ovos de galinha) e IgG (produzidos a partir de soro de coelho) que tinham sido hiperimunizados com a respectiva proteína conjugada contra o ácido indolacético (IAA), zeatina (Z) e isopenteniladenina (2iP), testificou que os anticorpos IgY revelaram-se adequados para quantificação dos hormônios das plantas. O ensaio imunoenzimático usando

IgY alcançou um limite de detecção de 3,4 nanomoles (3,4 ppb) para zeatina, 6 picomoles (6 ppt) para 2iP e 480 pmoles (480 ppt) para IAA, enquanto a IgG apresentou limites de detecção na faixa micromolar (ppm) e apresentaram resultados variáveis e baixas especificidade perto do limite de detecção.

O início da produção dos IgY deu-se pela imunização das aves, esta ocorreu pela aplicação de antígeno de dengue (Ns1) com FCA (adjuvante completo de Freund), segundo Bollen et al. (1996), que estudou a eficácia na produção de anticorpos em coelhos e galinhas imunizadas com imunoglobulina G humana com a utilização de três tipos de adjuvantes: FCA, adjuvante incompleto de Freund (FIA) e Hunter's TiterMax adjuvante (HTM); Os títulos obtidos em coelhos foram aproximadamente um fator 1,5-2,0 maior do que nos grupos de frango correspondentes. No entanto, a produtividade de anticorpos do frango, ao usar a gema de ovo como fonte de anticorpos, foi um fator 5-10 maior que o do coelho, dependendo do adjuvante utilizado. Em galinhas, a FCA resultou inicialmente na maior avidéz do anticorpo no soro e na gema de ovo.

3 OBJETIVO

Produzir, purificar e conjugar anticorpos IgY específicos para a proteína NS1 do Vírus da Dengue com a Enzima Peroxidase de rabanete, para utilização como sistema de detecção em ensaios de ELISA direto específico para diagnóstico de Dengue.

4 METODOLOGIA

4.1 PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS IGY NS1 ESPECÍFICOS

4.1.1 Imunização das galinhas

O protocolo nº 25/2012, para uso de animais para experimentação neste trabalho esta de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, dispostos na Lei Federal nº 11.794, de 08 de outubro de 2008 e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA - UFSJ no dia 31 de outubro de 2012. A imunização das galinhas foi realizada injetando-se 200 µg de antígeno NS1 recombinante, produzido no Laboratório de Bioquímica e Imunologia Celular e Molecular (LABICEM) membro do INCT em Dengue situado no Campus Alto Paraopeba (CAP) da UFSJ, diluído na proporção de 1:1 com adjuvante completo de Freud - Sigma® no músculo das aves por via intraperitoneal. Três aves foram utilizadas para os procedimentos de imunização. Com intervalos de 21 dias, aplicou-se mais dois reforços da imunização.

4.1.2 Purificação dos IgY

Os ovos foram coletados desde a primeira postura e as IgY anti- NS1 foram purificadas empregando-se o método de precipitação por polietileno glicol (PEG) descrito por Pauly et al.(2011) com adaptações. O método se divide em três etapas. O processo de purificação foi iniciado com o descarte da clara e vertendo-se todo conteúdo da gema em um tubo falcon de 50 ml. Em seguida, foi adicionada uma solução de precipitação A na proporção de 2:1, composta por PBS e PEG 6000 (Sigma®- Alemanha) 5,2% (m/v). A mistura foi homogeneizada e incubada por dez minutos em temperatura ambiente sob agitação mecânica sendo então centrifugada a 4°C por 20 minutos a 2500 x g (Centrífuga Rotina 38-R Hettich® - Alemanha). Nesta etapa do processo obteve-se como produto da purificação uma suspensão em duas fases, uma fase líquida contendo as proteínas de interesse e uma fase densa, composta por particulados da gema e substâncias lipídicas. Filtrou-se a fase líquida para um novo tubo falcon e a fase densa foi descartada. Ao tubo falcon adicionou-se na proporção de

1:4 da solução B, composta por PBS e PEG 6000 (Sigma®- Alemanha) 42,5% (m/v). A mistura foi homogeneizada e incubada novamente por dez minutos em temperatura ambiente sob agitação mecânica sendo então centrifugadas nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi solubilizado cuidadosamente em 5 ml de solução C, PBS e PEG 6000 (Sigma®- Alemanha) 24% (m/v) e repetiu-se as etapas de homogeneização, incubação e centrifugação. Ao final do processo o sobrenadante foi descartado e solubilizou-se o precipitado em 5 ml de PBS. A solução contendo IgY foi dialisada utilizando-se membranas de diálise Spectra/Por® (Estados Unidos) com tamanho de poro de 12-14,000 KDa. O objetivo desta diálise é a retirada de resíduos de PEG 6000 (Sigma®- Alemanha) e sais remanescentes. As amostras obtidas da purificação foram dialisadas inicialmente contra uma solução de cloreto de sódio (NaCl 0,01 Milimolar – mM), sob agitação magnética e refrigeração a 4°C e posteriormente contra PBS (pH 7,4) mantendo-se as mesmas condições de agitação e refrigeração.

4.1.3 Análise da pureza dos anticorpos IgY anti NS1

Para confirmação do grau de pureza dos anticorpos IgY, os mesmos foram analisados através de cromatografia líquida de filtração molecular em cromatógrafo NGC (Biorad corporation-USA). Para os ensaios cromatográficos, 200 µl de anticorpos IgY purificados, na concentração de 1mg/ml, foram aplicados na coluna cromatográfica de exclusão molecular em tampão fosfato de sódio, pH 7,2 com fluxo de 1ml/minuto durante 30 minutos. A cromatografia foi monitorada com detector a 280nm e as frações correspondentes aos picos foram coletadas (1ml/tubo) em tubos de 2ml. Os picos obtidos foram analisados através de ensaio de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 12%, em que a amostra de IgY foi desnaturada por 5 minutos a 95°C em um tampão de desnaturação com β-mercaptoetanol . Um padrão de peso molecular de 260-10 kDa (Espectra™ Multicolor, Fermentas®) também foi aplicado no gel como referência das massas moleculares.

4.1.4 Verificação da reatividade dos anticorpos IgY ao antígeno Ns1

Realizou-se o teste em uma placa de poliestireno de 96 poços (Becton, Dickinson and Company®), na qual aplicaram-se 100 µl do antígeno NS1 diluído em tampão carbonato/bicarbonato na concentração final de 2 µg por poço e incubou-se durante 2 horas a 37°C. Em seguida, lavou-se a placa com PBS-T 0,05% por cinco vezes na lavadora de

microplaca ELX 50 (Biotek) e aplicou-se 300 µl de solução de bloqueio contendo PBS-T 0,05% BSA 5% em cada poço e incubou-se durante 12 horas temperatura de 4°C. Novamente, lavou-se a placa durante cinco vezes com PBS-T 0,05% na lavadora de microplaca ELX 50. Adicionou-se o anticorpo primário (IgY) na diluição 1:250, em PBS-T 0,05% e incubou - se por duas horas na estufa a temperatura de 37°C. Sendo que em três poços foram aplicados IgY purificadas de ovos de galinha não imunizada (controle negativo) e em outros três poços foram aplicados IgY de ovos de galinhas imunizadas com antígeno Ns1. Posteriormente, lavou-se a placa com PBS-T 0,05% na lavadora de microplaca durante cinco vezes. Nesse momento aplicou-se o anticorpo secundário conjugado com HRP (anti-IgY, Sigma®) na diluição 1:5000 em PBS-T 0,05% e incubou-se na estufa a temperatura de 37°C durante duas horas. Decorrido o tempo de incubação, lavou-se a placa como descrito anteriormente e adicionaram-se 100 µl de 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) em cada poço. Incubou-se a placa por 30 minutos em temperatura ambiente. A reação de revelação foi interrompida adicionandose 100 µl de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 1M). Logo depois, analisou-se a leitura das absorbâncias em 480 nm na leitora microplaca Sinergy/HT(Biotek®).

A capacidade de reconhecimento do anticorpo purificado foi avaliada também pelo método de Dot Blot. Para o teste de Dot Blot, a membrana de nitrocelulose (Westran® General Electric – GE, Estado Unidos) foi imersa em metanol (Sigma®- Alemanha), e com auxílio de uma pipeta foram aplicados 2 µL de da proteína NS1 recombinante na concentração de 1mg/mL, em vários pontos de membrana. A membrana foi seca por uma hora em estufa a 37°C e cortada e acondicionada em placas em 24 poços. Os sítios inespecíficos foram bloqueados pela imersão da membrana em uma solução de tampão salina fosfato contendo 5% de albumina (I.D. Bio®, França) e polissorbato (Tween-20 Sigma®- Alemanha) 0,05% (PBS-T-BSA). A membrana foi incubada na solução por uma hora em temperatura ambiente mantendo-se uma leve agitação mecânica. Em seguida, a membrana foi lavada por três vezes (3x 5 minutos) com PBS-Tween-20 a 0,05% (Sigma®- Alemanha). O anticorpo primário (IgY anti-NS1) na concentração de 1mg/mL, foi diluído para 1:250 em solução de PBS-T-BSA e aplicado sobre as membranas, que foram em seguida incubadas com a solução por uma hora em temperatura ambiente, mantendo-se leve agitação. Após o período de incubação a membrana foi novamente lavada por três vezes (3x 5 minutos) com PBS-Tween-20 a 0,05% (Sigma®- Alemanha). O anticorpo secundário (Anti-IgY conjugado com peroxidase de rabanete – HRP, Sigma®- Alemanha) foi diluído na proporção de 1:5000 em solução de PBS-T-BSA, e aplicado sobre as membranas e incubado

novamente por uma hora em temperatura ambiente, mantendo-se leve agitação. Então a membrana foi lavada por mais três vezes (3x 5 minutos) com PBS-Tween-20 a 0,05% (Sigma®- Alemanha). O reagente para revelação do teste foi preparado com 3,3'Diaminobenzidina (DAB - Sigma®- Alemanha) com adição de 40 µL peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 10% ao volume final de 15mL de solução tampão TrisNaCl (50 mM de Tris-Cl, 150 mM NaCl, pH 7,6) e em seguida, foi aplicado sobre as membranas até o aparecimento de cor nas áreas onde foram aplicadas amostras de NS1. A reação de revelação foi parada com a adição de água Mili-Q® (Millipore Corporation – Estados Unidos).

4.2 MARCAÇÃO DOS ANTICORPOS IGY ANTI-NS1 COM PEROXIDASE DE RABANETE

4.2.1 Conjugação com peroxidase de rabanete

Após confirmação da reatividade dos anticorpos purificados, os mesmos foram conjugados com peroxidase de rabanete, seguindo o protocolo do fabricante do kit de marcação (Thermo Scientific, cat. Nr. 31487). Para a conjugação foram preparadas as soluções de Cianoborohidrito de sódio 5M, etanolamina 3M em tampão carbonato-Bicarbonato 0,2M. pH 9,0 e tampão Carbonato-Bicarbonato 0,2M, pH 9,4. Para a marcação, as amostras de IgY foram dialisadas contra tampão Carbonato-Bicarbonato 0,2 M, pH 9,4. Em seguida, a concentração de proteínas foi ajustada para 2mg/ml. 500ul da amostra de IgY foi adicionada ao frasco contendo peroxidase ativada e a reação foi incubada por uma hora à temperatura ambiente. Em uma capela de exaustão foram adicionados 10 µl de Cianoborohidrito de sódio, 5M e a reação foi incubada por 15 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação foram adicionados 20 µl de etanolamina em tampão carbonato-Bicarbonato 0,2M. pH 9,0 e a reação foi incubada por mais 15 minutos à temperatura ambiente. Após este tempo, as amostras foram divididas em alíquotas de 50 µl e armazenadas em freezer a -20 C.

4.2.2 Verificação da eficiência da marcação

Para testar a eficiência da marcação, foi realizado um ensaio de Dot blot direto. Para isso, a membrana de nitrocelulose (Westran® General Electric – GE, Estado Unidos) foi imersa em metanol (Sigma®- Alemanha), e com auxílio de uma pipeta foram aplicados 2 µL de da proteína NS1 recombinante na concentração de 1 mg/mL, em vários pontos de

membrana. A membrana foi seca por uma hora em estufa a 37°C e cortada e acondicionada em placas em 24 poços. Os sítios inespecíficos foram bloqueados pela imersão da membrana em uma solução de tampão salina fosfato contendo 5% de albumina (I.D. Bio®, França) e polissorbato (Tween-20 Sigma®- Alemanha) 0,05% (PBS-T-BSA). A membrana foi incubada na solução por uma hora em temperatura ambiente mantendo-se uma leve agitação mecânica. Em seguida, a membrana foi lavada por três vezes (3x por 5 minutos) com PBS-Tween-20 a 0,05% (Sigma®- Alemanha). Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo IgY não marcado (controle negativo) e IgY conjugado com peroxidase (controle positivo) diluídos 100 vezes em tampão salina fosfato contendo 5% de albumina. Então a membrana foi lavada por mais três vezes (3x 5 minutos) com PBS-Tween-20 a 0,05% (Sigma®- Alemanha). O reagente para revelação do teste foi preparado com 3,3'Diaminobenzidina (DAB - Sigma®- Alemanha) com adição de 40 µl peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 10% ao volume final de 15 ml de solução tampão TrisNaCl (50 mM de Tris-Cl, 150 mM NaCl, pH 7,6) e em seguida, foi aplicado sobre as membranas até o aparecimento de cor nas áreas onde foram aplicadas amostras de NS1. A reação de revelação foi parada com a adição de água Mili-Q® (Millipore Corporation – Estados Unidos).

5 RESULTADOS

5.1 ANALISE DA PUREZA E ESPECIFICIDADE DOS ANTICORPOS IGY ANTI-NS1

Os anticorpos IgY purificados foram submetidos à cromatografia de filtração molecular e os resultados são apresentados na Figura 1. Pode-se observar a presença de um único pico a 280nm, correspondente à IgY purificada.

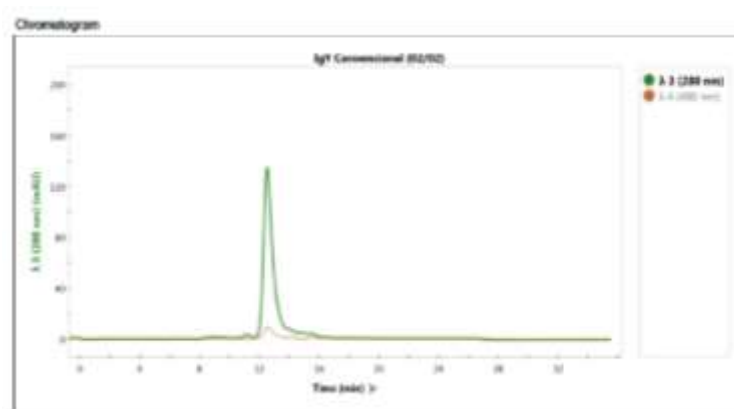


Figura1 :Cromatografia de exclusão molecular, apresentando um único pico correspondente à IgY purificada.

Para confirmação do grau de pureza, as frações correspondentes ao pico foram aplicadas em gel de poliacrilamida a 10% e coradas com comassie. A caracterização por eletroforese das IgY purificadas apresentou resultados semelhantes aos obtidos no método descrito por Tan et al. (2012), que extraiu IgY através de um método alternativo, baseado na mistura de k-carragenina, pectina e CaCl_2 , como agente redutor de lipídios, combinado com sulfato de amônio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$. Podemos observar na Figura 2 as bandas correspondentes às cadeias leve e pesada da IgY, com massas moleculares correspondentes ao descrito na bibliografia.

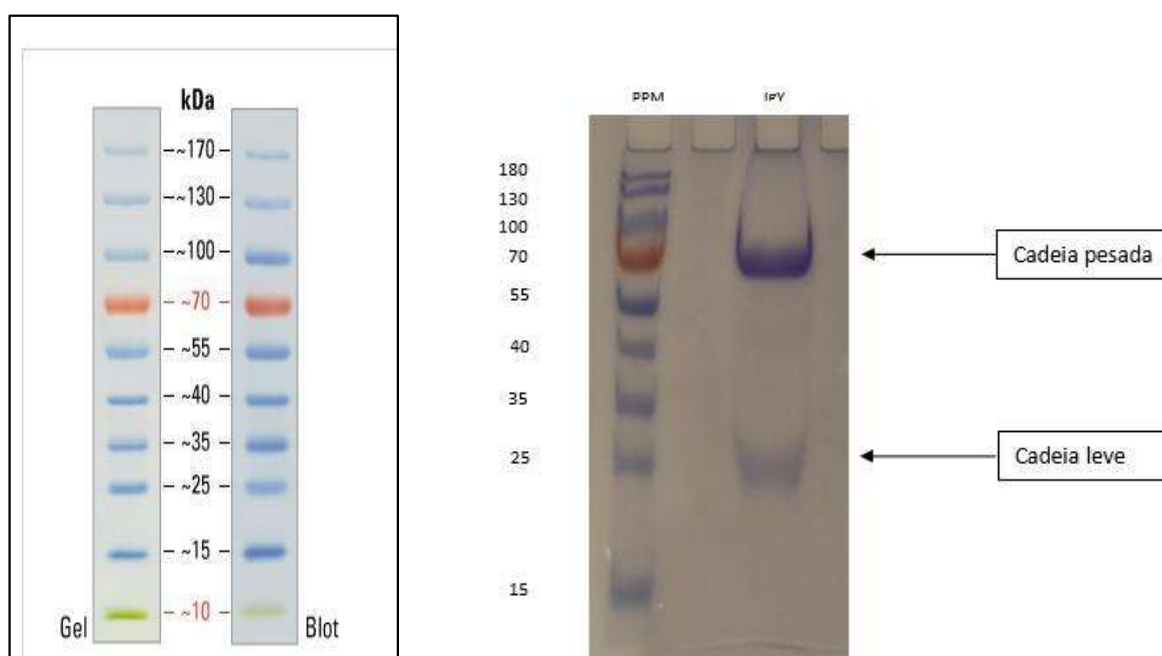


Figura 2 - Eletroforese em gel de acrilamida 10% (SDS-PAGE) de amostra contendo IgY purificada a partir da gema dos ovos de galinha. PPM - Padrão de peso molecular de 180-15 kDa (Espectra™ Multicolor, Fermentas -USA). E do lado esquerdo um padrão de peso molecular

O método de Dot Blot permite a análise, detecção, identificação e a semiquantificação de proteínas. O método é semelhante à técnica de Western Blotting. As proteínas reconhecidas são vistas como pontos circulares sobre a membrana após a aplicação do substrato de revelação e o aparecimento de cor. Os anticorpos purificados (IgY anti-NS1)

foram utilizados como anticorpos primários e foram capazes de detectar o antígeno (proteína recombinante NS1) conforme podemos visualizar na Figura 3. O controle negativo utilizado neste teste, anticorpos do tipo IgY purificados a partir dos ovos das aves antes das imunizações, não reconheceu a proteína, demonstrando assim que o mesmo não reage inespecificamente com o antígeno.

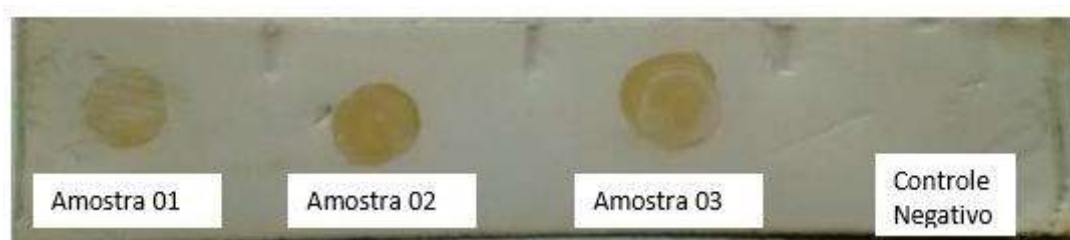


Figura 3 - Teste de Dot Blot em amostras aleatórias de IgY purificadas

As amostras purificadas foram ainda avaliadas através de ensaio de ELISA para confirmação da reatividade das mesmas com o antígeno NS1. Os resultados são apresentados na Quadro 1. A partir desta, pode-se observar que os títulos obtidos foram significativamente maiores para a IgY purificada obtida a partir de ovos de galinhas imunizadas (controle positivo), quando comparadas com os títulos obtidos com a IgY purificada a partir de ovos de galinhas não imunizadas (Controle negativo).

A - IgY controle Negativo - IgY 1:250						
	[NS1]	1	2	3	Médias	Desvio
A	10	0,061	0,097	0,109	0,089	0,025

B - IgY Cotrole Positivo 1:250						
	[NS1]	4	5	6	Médias	Desvio
B	10	0,373	0,323	0,362	0,353	0,026

Quadro 1 - Ensaio de Elisa para proteína recombinante NS1. (A: IgY purificada de ovos de galinhas não imunizadas; B: IgY purificada de ovos de galinhas imunizadas com NS1).

5.2 ANÁLISE DA EFICIÊNCIA DA CONJUGAÇÃO DE ANTICORPOS IGY NS1 ESPECÍFICOS COM A ENZIMA PEROXIDASE

Após a confirmação da pureza e da especificidade das IgY purificadas, as mesmas foram conjugadas com a enzima peroxidase de rabanete e a eficiência da conjugação foi avaliada através de Dot blot direto. Os resultados são apresentados na Figura 4, onde pode-se observar a presença de forte marcação na amostra conjugada com peroxidase de rabanete (CP) e a inexistência de marcação no controle negativo (CN).



Figura 4 – Dot blot da IgY conjugada com peroxidase de rabanete.(CN : controle negativo
CP: controle positivo

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível observar que a imunização das aves com o a proteína NS1 recombinante foi eficaz, resultando na produção de altos títulos de anticorpos; que o anticorpo purificado através do método desenvolvido no LABICEM foi capaz de reconhecer a proteína NS1 nos testes de Dot Blot e ELISA; que o resultado obtido pela conjugação com peroxidase de rabanete, para utilização em ensaios de ELISA é uma alternativa promissora para o diagnóstico da Dengue .

Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que a obtenção de anticorpos IgY - específicos a partir da gema do ovo é um método mais adequado aos padrões de bem-estar animal uma vez que reduz o número de animais utilizados, já que essas produzem maior quantidade de anticorpo quando comparados aos animais utilizados comumente (camundongos e coelhos); as sucessivas sangrias são substituídas pela extração do anticorpo a partir da gema do ovo, minimizando assim o sofrimento animal.

7 BIBLIOGRAFIA

1. BOLLEN, L. S.; CROWLEY, A.; STODULSKI, G.; HAU, J. Antibody production in rabbits and chickens immunized with human IgG: A comparison of titre and avidity development in rabbit serum, chicken serum and egg yolk using three different adjuvants. *Journal of immunological methods*. v. 191. p.113-120, 1996.
2. GUBLER D.J. (1998a) Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin.Microbiol.Rev.* 11, 480-496.
3. GUBLER D.J. (1998b) The global pandemic of dengue/dengue haemorrhagic fever: current status and prospects for the future. *Ann.Acad.Med.Singapore* 27, 227-234.
4. HANSEN, P.; SCOBLE, J. A.; HANSON, B.; HOOGENRAAD, N. J. Isolation and purification of immunoglobulins from chicken eggs using thiophilic interaction chromatography. *Journal of immunological methods*. v. 215, p. 1-7, 1998.
5. LEONG A.S., WONG K.T., LEONG T.Y., TAN P.H. & WANNAKRAIROT P. (2007) The pathology of dengue hemorrhagic fever. *Semin.Diagn.Pathol.* 24, 227-236.
6. LEFEVRE A.M., RIBEIRO A.F., MARQUES G.R., SERPA L.L. & LEFEVRE F. (2007) [Social representations concerning dengue, dengue vectors, and control activities among residents of Sao Sebastiao on the northern coast of Sao Paulo State, Brazil]. *Cad.Saude Publica* 23, 1696-1706.
7. LIMA V.L., RANGEL O., ANDRADE V.R., SILVEIRA N.Y., OLIVEIRA S.S. & FIGUEIREDO L.T. (2007) [Dengue: sero-epidemiological survey and virological surveillance in Campinas, Sao Paulo, Brazil]. *Cad.Saude Publica* 23, 669-680.
8. MONDINI A. & CHIARAVALLOTI N.F. (2007) [Socioeconomic variables and dengue transmission]. *Rev.Saude Publica* 41, 923-930.
9. MONDINI A., CHIARAVALLOTI N.F., SANCHES M. & LOPES J.C. (2005) [Spatial analysis of dengue transmission in a medium-sized city in Brazil]. *Rev.Saude Publica* 39, 444-451.
10. MORATO V.C., TEIXEIRA M.G., GOMES A.C., BERGAMASCHI D.P. & BARRETO M.L. (2005) Infestation of *Aedes aegypti* estimated by oviposition traps in Brazil. *Rev.Saude Publica* 39, 553-558.

11. MUNENE, C. N. Development of chicken polyclonal and mouse monoclonal-based enzyme immunoassays for the detection of β -cyclocitral in catfish pond water. Dissertation. Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College. 2004. 118 p.
12. NOGUEIRA R.M., DE ARAUJO J.M. & SCHATZMAYR H.G. (2007) Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. *Rev.Panam.Salud Publica* 22, 358-363.
13. NOGUEIRA R.M., SCHATZMAYR H.G., DE FILIPPIS A.M., DOS SANTOS F.B., DA CUNHA R.V., COELHO J.O., DE SOUZA L.J., GUIMARAES F.R., DE ARAUJO E.S., DE SIMONE T.S., BARAN M., TEIXEIRA G., Jr. & MIAGOSTOVICH M.P. (2005) Dengue virus type 3, Brazil, 2002. *Emerg.Infect.Dis.* 11, 1376-1381.
14. RIGAU-PEREZ J.G., GUBLER D.J., VORNDAM A.V. & CLARK G.G. (1997) Dengue: A Literature Review and Case Study of Travelers from the United States, 1986-1994. *J.Travel.Med.* 4, 65-71.
15. SCHATZMAYR H.G. (2001) [Emerging and reemerging viral diseases]. *Cad.Saude Publica* 17 Suppl, 209-213.
16. SCHATZMAYR H.G. (2000) Dengue situation in Brazil by year 2000. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* 95 Suppl 1, 179-181.
17. WOOLEY, J.; LANDON, J. Comparison of antibody production to human interleukin-6 (IL-6) by sheep and chickens. *Journal of immunological methods.* v. 178, p. 253-265, 1995.