

13

CAPÍTULO

MÉTODO SIMPLES E RÁPIDO PARA DETECÇÃO DE RNA DO VÍRUS DA DENGUE A PARTIR DE MEIO DE CULTURA

Thyago Leal Calvo¹

Rívia Aparecida R. Arruda²

Adriana Freitas Neves¹

Agradecimentos: Ao CNPq pelo financiamento do projeto (Processo No. 485463/2012-1) e das bolsas aos autores, tais como do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (CNPq/PIBIC-graduação) e Capes/nível mestrado.

1 Unidade Acadêmica Especial de Biotecnologia, Universidade Federal de Goiás - Regional Catalão, Catalão, Brasil.

2 Unidade Acadêmica Especial de Física e Química, Universidade Federal de Goiás - Regional Catalão, Catalão, Brasil.

E-mail de contato: thyagoleal@yahoo.com, riviaarruda@gmail.com, neves.af@gmail.com

Resumo: Dentre os métodos que podem ser utilizados para a detecção dos tipos virais do vírus causador da dengue (DENV), destaca-se a Transcrição Reversa (RT) seguida da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). No presente trabalho demonstrou-se uma metodologia alternativa para a conversão de RNA viral em cDNA, utilizando-se o meio de cultura celular diretamente na RT. Os sorotipos DENV (1, 2, 3 e 4) foram propagados em meio de cultura contendo células C6/36 da larva do mosquito *Aedes albopictus*, o qual foi utilizado diretamente na RT, tendo como preparo prévio apenas uma agitação vigorosa em aparelho tipo vórtex, do meio de cultura contaminado, e incubação da amostra a 95 °C por 10 min. O cDNA obtido foi submetido à PCR, analisado por eletroforese em gel de agarose 1,2% (m/v) e fotodocumentado. A extração com Trizol Reagent® também foi utilizada, de acordo com as recomendações do fabricante, para fins de comparação entre métodos. Os dados obtidos demonstraram que o método direto de detecção viral por RT-PCR foi igualmente eficiente quando comparado à extração por Trizol, apresentando a vantagem de ser mais rápido, ter menores custos e ainda diminuir a possibilidade de degradação do RNA por contaminação, uma vez que reduz o manuseio da amostra.

Palavras-chave: RNA viral. Transcrição Reversa. Dengue. cDNA.

Abstract: Among the methods that can be used for viral type's detection is Reverse Transcription (RT) followed by Polymerase Chain Reaction (PCR). In this work we have demonstrated an alternative methodology to convert the viral RNA in cDNA by using cell culture media directly in the RT. The four Dengue virus serotypes (DENV-1, -2, -3 and -4) were propagated in culture medium containing C6/36 cells of *Aedes albopictus*' larvae, which was used directly in the RT, whose preparation just prior vigorous agitation of the contaminated medium in vortex type device, and incubating the sample at 95 °C for 10 min. The obtained cDNA was subjected to PCR and analyzed by agarose gel electrophoresis 1.2% (w/v) and photodocumented. The extraction with Trizol Reagent® was also used according to the manufacturer's recommendations, for comparison between methods. The data demonstrated that direct viral detection method by RT-PCR was also efficient when compared to Trizol extraction, and presented advantages as faster, have lower cost and yet diminishes the possibility of RNA degradation by contamination, since which reduces sample handling.

Keywords: Viral RNA. Reverse transcription. Dengue. cDNA.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos históricos e epidemiológicos da dengue

A dengue é uma doença infecciosa humana causada pela infecção por um dos quatro sorotipos do vírus da Dengue antígenicamente distintos (DENV-1, -2,

-3 e -4). A infecção pode provocar a forma clássica ou hemorrágica da doença (WESTAWAY et al., 1997). De tal forma, estima-se que 50 milhões de pessoas em aproximadamente 100 países, distribuídos entre Ásia Tropical, África, Austrália, América Central e América do Sul, são afetadas por alguma forma da doença (WHO, 2010).

O DENV pertence ao grupo das arboviroses (vírus transmitidos por vetores artrópodes), membro da família Flaviridae e gênero *Flavivirus*, sendo que a transmissão ocorre através da picada de mosquitos hematófagos fêmeas do gênero *Aedes*, particularmente o *Aedes aegypti*, presente nas áreas tropicais e subtropicais mais povoadas do mundo (WESTAWAY, 1985). O isolamento do vírus da dengue foi realizado pela primeira vez a partir de amostras de sangue coletadas de soldados japoneses acometidos de doença febril no Japão (KIMURA; HOTTA, 1944) e de soldados americanos provenientes do Havaí, sendo denominado DENV-1. Outro sorotipo foi identificado em Nova Guiné (SABIN; SCHLESINGER, 1945), o qual foi denominado DENV-2. Os sorotipos DENV-3 e o DENV-4 foram isolados em 1956, nas Filipinas (HAMMON et al., 1960). Para realização do isolamento dos sorotipos do DENV, foram inoculadas amostras de sangue dos indivíduos que apresentavam a doença em camundongos.

A partir da Segunda Guerra Mundial, devido à perturbação ecológica decorrente do desenvolvimento da economia e urbanização no sudeste da Ásia, houve um grande aumento de doenças transmitidas por vetores artrópodes, o que gerou condições favoráveis para o início da pandemia global de dengue. Desse modo, observa-se que o padrão epidêmico dessa doença foi alterado pelas mudanças ocorridas no mundo após a Segunda Guerra Mundial, uma vez que, antes da guerra acontecer, não era comum a ocorrência de epidemia em uma mesma localidade e as pandemias de dengue só aconteciam a cada 10-30 anos (GUBLER, 1997; RIGAU-PÉREZ et al., 1998).

No Brasil, foram documentados os primeiros casos de dengue, com confirmação clínica e laboratorial, em Boa Vista, Roraima, em 1982, durante uma epidemia que identificou os sorotipos DENV-1 e DENV-4 (OSANAI et al., 1983). Posteriormente, em 1986, houve a reintrodução do DENV-1 no país, mais precisamente pelo Rio de Janeiro, resultando na disseminação pelo Brasil (SCHATZMAYR; NOGUEIRA; ROSA, 1986).

A ressurgência das epidemias no final do século XX configura atualmente um problema global de saúde pública e está associada ao crescimento da população mundial e urbanização das cidades, que geralmente acontece sem prévio planejamento e controle. A falta de controle efetivo do vetor antropofílico, *Aedes aegypti*, nas áreas endêmicas gerou um aumento na densidade populacional do mosquito e a expansão do comércio e das viagens internacionais contribuiu para a disseminação da doença, resultando em uma constante movimentação dos agentes infectantes,

garantindo repetidas introduções de novas cepas virais e novos sorotipos em regiões onde o mosquito vetor ocorre (CHEN; VASILAKIS, 2011).

O mosquito transmissor da dengue encontra condições altamente favoráveis para se reproduzir no *habitat* humano. As larvas são encontradas principalmente em água limpa parada contida em recipientes plásticos, pneus, vasos de plantas, latas, cisternas, bromélias, buracos em árvores, troncos de palmeiras, dentre outros (RIGAU-PÉREZ et al., 1998). O mosquito é mais ativo durante o dia com picos de atividade entre 2 e 3 horas após o nascer do dia e algumas horas antes do anoitecer. Uma única fêmea, a qual é responsável pela transmissão da doença, pode dispersar vários sorotipos do DENV e infectar vários indivíduos (GUBLER, 1997). O vetor se infecta ao ingerir sangue de um indivíduo durante o período de viremia (cerca de 5 dias) e pode transmitir a doença para outro indivíduo susceptível depois de um período de incubação extrínseca de 8 a 12 dias (RIGAU-PÉREZ et al., 1998). Uma vez infectado, o mosquito transmite o vírus pelo resto de sua vida (HALSTEAD, 1970).

1.2 Características do vírus

Assim como outros *Flavivirus*, as partículas virais do DENV são esféricas e relativamente pequenas, com 50 a 55nm de diâmetro, constituídas por *core* de ribonucleoproteínas e um envelope de lipoproteínas de formato icosaédrico. São compostas de 6% de RNA, 66% de proteína, 9% de carboidratos e 17% de lipídios (RUSSEL; BRANDT; DALRYMPLE, 1980).

O genoma é composto de RNA fita simples, polaridade positiva, e contém aproximadamente 11 kilobases (Kb) de comprimento. Possui uma região codificante flanqueada por duas regiões denominadas 5' e 3' UTRs (regiões não traduzidas), com aproximadamente 100 e 600 nucleotídeos (nt), respectivamente. A região 5' terminal do genoma de *Flavivirus* apresenta uma estrutura *cap* tipo 1 (m7GpppAm) seguida por uma sequência de nucleotídeos conservada 5'-AG-3'. A 3'UTR apresenta uma estrutura de *stem-loop* muito conservada que é necessária para a multiplicação viral (ZHOU et al., 2007). A partir da região codificante, é sintetizada pela RNA polimerase uma grande poliproteína (Figura 1) que é posteriormente clivada por proteases celulares e serino-proteases, codificadas pelo vírus em três proteínas estruturais (capsídeo, C; membrana, M; e envelope, E) e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5), importantes para a replicação viral e processamento do polipeptídeo (ALESHIN et al., 2007; CHAMBERS et al., 1990).

Considerando que a superfície viral seja composta principalmente pelas proteínas M e E entrelaçadas, estes antígenos são capazes de induzir resposta por anticorpos. A interação entre C, M e E resulta na própria conformação estrutural do vírus (CHANG, 1997).

Uma peptidase derivada do hospedeiro é responsável pelas clivagens ao nível das junções das proteínas C/prM, prM/E, E/NS1 e próxima da região carboxi-terminal da NS4A (CHAMBERS et al., 1990; STADLER et al., 1997). Uma serino-protease, codificada pelo vírus, é responsável pelas clivagens entre as junções das proteínas NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A, NS4A/NS4B E NS4B/NS5; a enzima responsável pela clivagem da NS1/NS2A até o momento é desconhecida (LINDENBACH; RICE, 2003).



Figura 1. Organização do genoma do DENV. Fonte: Guzman et al. (2010).

A replicação do genoma ocorre nas membranas intracelulares. A montagem do vírion ocorre na superfície do retículo endoplasmático (RE) quando as proteínas estruturais e RNA recém-sintetizados ocupam o lúmen do RE. As partículas virais imaturas e partículas subvirais, ambas não infecciosas, são transportadas pela rede trans-Golgi. Partículas virais imaturas são clivadas pela furina protease do hospedeiro, resultando em partículas maduras (infecciosas). Partículas subvirais também são clivadas pela furina e juntamente com as partículas maduras são subsequentemente liberadas por exocitose (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005).

Além de serem classificados em quatro sorotipos, de acordo com a variabilidade antigênica, baseada na capacidade de neutralização do vírus pelo soro, também é possível classificar o vírus DENV em genótipos, baseando-se na variação genômica entre os sorotipos. Essas diferenças genotípicas parecem estar associadas com a diferença na virulência (KURANE; TAKASAKI, 2001; PIRES NETO et al., 2005). A classificação genética depende da região do genoma estudada, do método e da análise utilizados no estudo (CORDEIRO, 2008).

1.3 Isolamento e purificação do RNA viral

Um diagnóstico rápido e preciso da dengue é de suma importância para a detecção e controle eficaz de epidemias dessa doença. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) pode ser citada como a técnica mais empregada no diagnóstico molecular. A PCR foi originalmente descrita por Saiki e colaboradores (1985) e desde então tem sido utilizada em vários campos da ciência. Esta técnica permite a identificação do agente patogênico através da amplificação de porções pré-de-

terminadas do genoma e quantificação da porção amplificada em gel de agarose, poliacrilamida ou sistemas fluorescentes. Para garantia no resultado final, a quantidade e qualidade do RNA utilizado na reação é essencial para que a detecção viral por PCR seja executada com sucesso. Dessa forma, a extração e purificação do RNA do vírus deve ser realizada (XIANG et al., 2001).

O isolamento do vírus da dengue é uma prática consolidada, sendo utilizada para detecção e sorotipagem do DENV em níveis elevados de sensibilidade. Na pesquisa e em laboratórios clínicos, os vírus isolados são caracterizados e sequenciados ou utilizados para uma variedade de experimentos de investigação. A fonte desse material pode ser o sangue, soro ou amostras de plasma oriundas de pacientes infectados. Todavia, o DENV não atinge concentrações tão elevadas como outros vírus nessas amostras, o que seria desejável para viabilizar sua utilização em ensaios biológicos. Assim, os vírus provenientes de amostras clínicas devem, muitas vezes, ser propagados e titulados em laboratório. Para isso, utilizam-se muitas linhagens de células derivadas de vertebrados e invertebrados, sendo que as mais comuns utilizadas para o isolamento do DENV são as células C6/36 da larva do mosquito *Aedes albopictus* (MEDINA et al., 2012). Após a propagação e a titulação, os vírus provenientes das culturas são submetidos ao processo de extração de RNA para que esse seja utilizado como molde na reação de Transcrição Reversa (RT), na qual ocorre a conversão de RNA em DNA Complementar (cDNA) e, por fim, o cDNA é amplificado por PCR.

Alguns métodos para extração de RNA foram descritos nos últimos anos (PAYTON; PINTER, 1999, PÉREZ et al., 1999; NUYTS et al., 2001), mas a maioria destes emprega reagentes tóxicos caros e métodos que consomem tempo ou de alta complexidade. Por isso, tem-se buscado métodos mais simples e diretos, melhorando a velocidade e eficiência do processo (XIANG et al., 2001, RIVAS et al., 2001).

Os métodos mais comuns utilizados para a extração de RNA viral são: fenol-guanidina, Trizol® e similares, Cloreto de Lítio/Ureia, kits de extração e purificação de ácidos nucleicos, entre outros. Através desses métodos ocorre uma intensa manipulação da amostra, além do grande consumo de tempo e reagentes. Dito isso, ressalta-se que o trabalho com RNA exige mais cuidados do que o trabalho com DNA, tendo em vista a instabilidade química dessa molécula e a existência de RNases no ambiente, manipulador, soluções e equipamentos. Essas enzimas, ao contrário das DNases, não necessitam de íons metálicos como cofatores e são ativas mesmo após limpeza comum e autoclavagem (MEDINA et al., 2012). Portanto, é desejável a utilização de métodos de isolamento de RNA viral cuja manipulação da amostra seja mínima. Diante do exposto, este trabalho demonstra uma metodologia rápida, de baixo custo e que permite a obtenção de RNA viral diretamente para ser utilizado na Reação de Transcriptase Reversa, dispensando

uma extração do ácido nucleico previamente e mantendo um rendimento equivalente aos métodos convencionais.

2 OBJETIVO

O objetivo deste texto é demonstrar uma metodologia alternativa na qual a conversão de RNA viral em DNA complementar (cDNA) dispensa uma extração de RNA previamente à reação de Transcrição Reversa.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura de células: clone C6/36 – larva de *Aedes albopictus*

A propagação dos quatro sorotipos do vírus da dengue (DENV1-4) foi realizada através da infecção em monocamada de células C6/36 aderentes em cultura. Essa linhagem foi cedida pelo Prof. Dr. Jonny Yokosawa (ICBIM-UFU), assim como as cepas virais do DENV. As células foram semeadas em garrafas de 25 cm², contendo 5 mL de meio Leibovitz 15 (L-15), na concentração 5% de Soro Fetal Bovino (SFB) e suplementado com Penicilina/Estreptomicina a 10.000U/mL e 10.000µg/mL, respectivamente; e, ainda, Anfotericina B (2mg/mL). As culturas foram incubadas a 29 °C em atmosfera-padrão, sem suplementação de CO₂.

3.2 Inoculação do vírus da dengue (DENV): sorotipos 1-4 em C6/36

As C6/36 foram semeadas em garrafas de 25 cm², com 5 mL de meio L15 a 10% de SFB até atingirem uma monocamada com confluência aproximada de 80-90%. Atingida essa quantidade, a monocamada foi lavada duas vezes com Tampão Fosfato Salino (PBS) em temperatura ambiente. Em seguida, 1 mL da amostra de cada sorotipo viral foi diluída em 2 mL de PBS e todo o volume adicionado à monocamada. As garrafas foram incubadas a 29 °C por 1 hora com agitação suave a cada 15 minutos. Após esse período, adicionou-se 5 mL de meio L15 a 2% de SFB em cada garrafa e incubou-se a 28 °C, até visualização de efeito citopático (ECP) ou totalização de 7 dias após infecção (DAI).

As células foram analisadas utilizando um microscópio ótico invertido com um aumento de 400x. Após a visualização do efeito citopático, ou totalizados os sete dias após a infecção, o meio de cultura foi removido das garrafas, armazenado em criotubos de 2 mL e estocado a -70 °C diretamente, sendo que uma alíquota de cada sorotipo viral produzida anteriormente foi inoculada por, no mínimo, três vezes sucessivamente em novas culturas com a finalidade de obter-se um maior título viral.

3.3 Extração e Transcrição Reversa do RNA viral em DNA complementar (cDNA)

Uma amostra de cada tipo viral foi descongelada em temperatura ambiente (aproximadamente 28 °C). Em seguida, uma alíquota de 50 µL do meio de cultura contendo as partículas virais foi submetida ao seguinte tratamento: agitação rápida em vórtex, por 20 segundos para promover a homogeneização do material, seguido de uma incubação a 95 °C por 10 minutos; e, por fim, uma nova agitação em vórtex por 10 segundos.

Para a reação de Transcrição Reversa foi utilizado 10 µL do meio de cultura, 2 µL de tampão 1X da M-MLV (*Moloney Murine Leukemia Virus - Reverse Transcriptase*, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), 126 pmoles de hexâmeros randômicos, 1U de M-MLV (*Sigma Aldrich*, St. Louis, MO, USA), 0,2 mM de dNTPs, água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato) para completar um volume final de 20 µL. A reação foi incubada a 37 °C por 1h20min em banho-seco.

3.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Três microlitros da reação de Transcrição Reversa foram utilizados para a amplificação do cDNA obtido na etapa anterior. Os componentes da reação foram: 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 7 pmoles de cada primer (FOR e REV), 2,5 U de Taq DNA polimerase, 1X tampão da Taq e água ultrapura para completar um volume final de 20 µL. Para a amplificação, o programa utilizado foi desnaturação inicial por 3 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos (94 °C por 30 seg, 55 °C por 45 seg e 72 °C por 10 min) e uma extensão final de 10 min a 72 °C. O produto obtido nessa etapa foi avaliado em eletroforese em gel de agarose 1,2% (m/v), corado com brometo de etídio (EtBr) e fotodocumentado em transiluminador (L-Pix/Loccus Biotecnologia).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Inoculação do vírus da dengue em cultura de células C6/36

Os vírus, quando inoculados em culturas celulares, iniciam a sua multiplicação logo após entrar na célula. Esta multiplicação viral irá provocar uma série de alterações fisiológicas e morfológicas na célula infectada que podem ser visualizadas por microscopia óptica. As alterações morfológicas que ocorrem nas células em cultura quando infectadas por vírus são denominadas de efeito citopático (BVS, 2015).

Essas mudanças são decorrentes da inibição da síntese de ácidos nucleicos e proteínas celulares, da fusão de células, da liberação de enzimas lisossômicas, das

modificações na permeabilidade celular e nas estruturas intracelulares e também aberrações cromossômicas. As alterações que ocorrem nas células, observadas ao microscópio, consistem na desorganização celular, aparecimento de espaços vazios, devido à lise e agregamento das células, aumento de tamanho etc. Por causa da morte celular, pode-se observar que células em monocamada, aderidas ao vidro ou plástico da parede da garrafa, passam a ser observadas em suspensão. Além disso, vários vírus induzem apoptose (morte celular programada) nas células infectadas (ALBERTS et al., 2002).

A cultura de células C6/36 foi realizada, resultando na multiplicação das mesmas. Após ser observada uma confluência aproximada de 80-90%, obtida após 1-2 dias incubadas a 28 °C, os 4 sorotipos virais do DENV foram inoculados. Os efeitos citopáticos (Figura 2) começaram a ser observados após 5 dias e os vírus foram coletados após 7 dias de infecção.

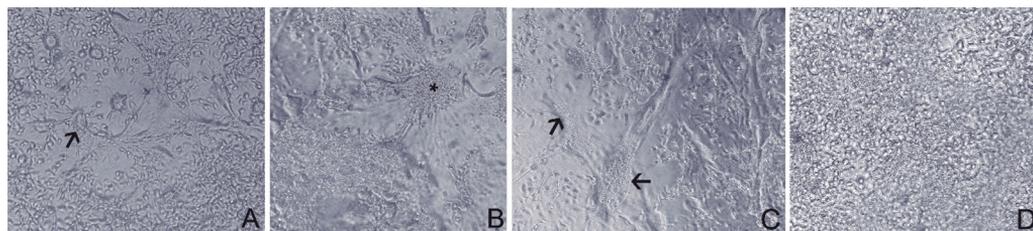


Figura 2. Fotomicrografia da cultura de células C6/36 em um aumento de 400 x. A), B) e C) Células com efeito citopático proveniente da inoculação do DENV. D) Células não infectadas.

A Figura 2 demonstra as alterações celulares provocadas pela infecção das células com o vírus DENV. Nas imagens A, B e C, pode-se observar a formação de vacúolos que são espaços vazios devido à morte e agregação celular e a formação de sincícios, que se refere à presença de células gigantes, multinucleadas, resultantes da fusão de várias células infectadas pelo vírus.

Esse resultado foi observado para todos os sorotipos do DENV. Os efeitos observados nas células indicaram a presença dos vírus, o que permitiu a coleta para extração do RNA viral de cada sorotipo.

4.2 Extração do RNA viral e PCR

Atualmente, as técnicas moleculares são indispensáveis para o diagnóstico e a detecção de micro-organismos, principalmente patogênicos, devido à sua alta sensibilidade e, sobretudo especificidade. Entretanto, todas estas técnicas dependem da obtenção dos ácidos nucléicos dos micro-organismos presentes nas amostras.

A técnica de PCR requer a extração do material genético do agente patogênico. Existem diversos protocolos de extração genômica, geralmente exclusi-

vos para cada espécie. Este material genético, produto da extração, deve estar presente na forma mais pura possível. O ideal é que esteja livre de impurezas (proteínas, lipídeos, outro ácido nucleico, reagentes de extração etc.) e em uma concentração mínima de 5 µg/mL para facilitar a realização das técnicas posteriores, assim como para aumentar a confiabilidade dos resultados obtidos (DEGEN et al., 2006).

O RNA viral extraído pelo método de extração direta proposto, após ser convertido em cDNA pela reação RT, foi amplificado por PCR e avaliado por eletroforese. A eletroforese em gel de agarose permitiu a identificação por meio do perfil eletroforético de migração do produto de PCR, de cadeia dupla, dos quatro sorotipos virais (DENV1-4) que neste caso possui aproximadamente 150 pares de bases (pb) (Figura 3).

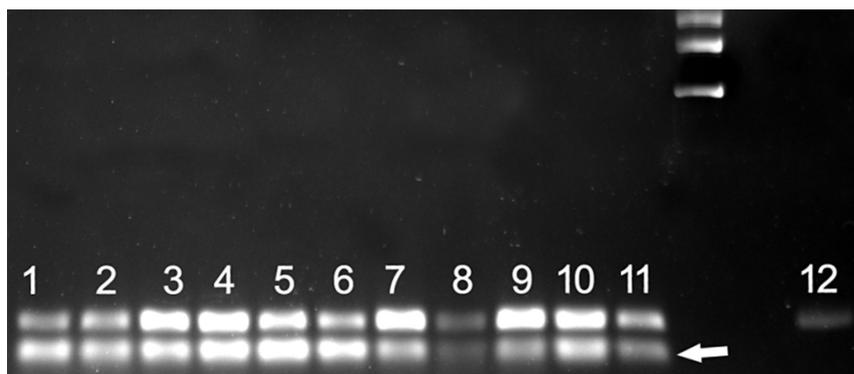


Figura 3. RT-PCR do RNA do vírus da dengue a partir de células C6/36 contaminadas e mantidas em meio de cultura L15. 1,2) DENV1; 3,4) DENV2; 5,6) DENV3; 7,9) DENV4; 8,10,11) extração de RNA com Trizol Reagent®; 12) controle positivo (150 pb). Seta: dímeros de primers.

Para fins de comparação, o RNA viral do meio de cultura celular foi extraído utilizando o método do Trizol Reagent® (*Life Technologies*), de acordo com as instruções do fabricante. Como é possível observar, não foram verificadas diferenças na PCR utilizando o método direto ou extraíndo o RNA total do meio de cultura. Portanto, a metodologia descrita aqui apresenta uma alternativa mais barata, rápida, que requer menor manipulação da amostra e possui rendimento equivalente ao método convencional.

Entretanto, o processo de extração apresentado ainda precisa ser otimizado, considerando que não apresenta bom resultado após o congelamento do cDNA. Ao realizar a PCR num período aproximado de 24 horas após conversão do RNA em cDNA, o qual foi imediatamente congelado, foi observado que a amplificação do material só foi possível utilizando o produto da RT imediatamente após a

síntese do cDNA não congelado e obtido no mesmo dia. Dessa forma, acredita-se que o cDNA sofreu algum tipo de alteração depois de um tempo de estocagem, o que pode indicar alguma instabilidade química proveniente do método de extração, não fornecendo um produto livre de debris celulares. Independentemente do tipo de estudo molecular, as preparações de ácidos nucleicos devem produzir amostras que não inibam as ações das enzimas da RT-PCR e que não causem interferência nos padrões de migração em gel de eletroforese (MARTINS; QUEIROZ; SOUSA, 2014), o que foi obtido nesse estudo.

O isolamento e a purificação de RNA são passos críticos devido ao RNA ser susceptível à degradação, consequência da sua estrutura química altamente reativa, o que pode prejudicar a estabilidade química e funcionalidade biológica e pode limitar o sucesso de investigações subsequentes do RNA (MARTINS; QUEIROZ; SOUSA, 2014). Para o processo de extração, algumas considerações são importantes na obtenção de ácido nucléico. Independentemente do método utilizado, esse processo envolve: (a) lise física ou bioquímica da partícula viral, com o objetivo de liberar o material genético; (b) purificação do ácido nucléico, etapa que envolve desnaturação, inativação e separação de proteínas e, (c) precipitação, em que se tem o material genético purificado e pronto para ser utilizado em etapas subsequentes (FREITAS et al., 2014). Dessa forma, uma etapa de precipitação do material genético poderia ser acrescentada no processo, para garantir a pureza do mesmo e evitar a ação de interferentes.

5 CONCLUSÃO

A dificuldade de trabalhar com RNA no laboratório, por causa da susceptibilidade estrutural dessa macromolécula devido à ação das enzimas RNAses presentes em extratos celulares, bem como no meio ambiente, e as impurezas presentes nas amostras de células ou preparações sintéticas, resultam em numerosos desafios para a extração e purificação seletiva de moléculas de RNA e em custos mais elevados para os laboratórios e indústrias biofarmacêuticas. Desse modo, é necessária a busca por novas metodologias que contornem esses desafios, a fim de se obter um procedimento eficiente e economicamente viável para a extração de RNA viral.

O método de extração de RNA do vírus DENV, feito diretamente do meio de cultura apresentado nesse trabalho, se mostrou promissor, uma vez que apresentou rendimento equivalente ao método tradicional, com a vantagem de ser um procedimento mais rápido, requerendo uma menor manipulação da amostra, além de ser mais barato. Contudo, essa técnica ainda precisa ser melhor padronizada, uma vez que não apresentou padrão de repetição utilizando cDNA congelado.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Isolating cells and growing them in culture** – Molecular Biology of the Cell. 4. ed. Nova York: Garland Science, 2002.
- ALESHIN, A. E.; SHIRYAEV S. A.; STRONGIN, A. Y.; LIDDINGTON, R. C. Structural evidence for regulation and specificity of flaviviral proteases and evolution of the *Flaviviridae* fold. **Protein Science**, v. 16, n. 5, p. 795-806, jan. 2007.
- BVS. Biblioteca Virtual em Saúde. DECS – Descritores em Ciência da Saúde. Disponível em: <<http://decs.bvs.br/cgi-bin/wxis1660.exe/decsserver>>. Acesso em: 4 out. 2015.
- CHAMBERS, T. J.; HAHN, C. S.; GALLER, R.; RICE, C. M. Flavivirus genome, organization, expression and replication. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 44, p. 649- 688, 1990.
- CHANG, G. J. Molecular biology of Dengue virus. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. (Ed.) **Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever**. Nova York: CAB International. 1997. p. 175-197
- CHEN, R.; VASILAKIS, N. Dengue - Quo tu et quo vadis? **Viruses**, Basel, v. 3, p. 1562-1608, set. 2011.
- CORDEIRO, M. T.; SILVA, A. M.; BRITO, C. A. A.; NASCIMENTO, E. J. M.; MAGALHÃES, M. C. F.; GUIMARÃES, G. F.; LUCENA-SILVA, N.; CARVALHO, E. M. F., MARQUES, E. T. A. Characterization of a dengue patient cohort in Recife, Brazil. **Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 6, p. 1128-1134, 2007.
- DEGEN, H. J.; DEUFEL, A.; EISEL D.; GRÜNEWALD-JANHO, S.; KEESEY, J. PCR Applications Manual. 3. ed. Penzberg: **Roche Diagnostics GmbH**, 2006.
- FREITAS, T. K.; DESCHAMPS, J. C.; SOUZA, A. L.; CLAUS, M. P. Extração de RNA de rotavírus a partir de fezes de suínos. **Sinergia**, São Paulo, v.15, n.4, p.292-297, out/ dez. 2014.
- GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. (Ed) **Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever**. Nova York: CAB International, 1997. p. 1-22.
- GUZMAN, M. G.; HALSTEAD, S. B.; ARTSOB, H.; BUCHY, P.; FARRAR, J.; GUBLER, D. J.; HUNSPERGER, E.; KROEGER, A.; MARGOLIS, H. S.; MARTÍNEZ, E.; NATHAN, M. B.; PELEGRINO, J. L.; SIMMONS, C.; YOKSAN, S.; PEELING, R. W. Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**, Londres, p. S7-S16, 2010.
- HALSTEAD, S. B. Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. VI Hypothesis and discussion. **Yale Journal of Biology and Medicine**, New Haven, v. 42, p. 350, 1970.
- HAMMON, W. M.; RUDNICK A.; SATHER, G.; ROGERS, K. D.; MORSE, L. J. New hemorrhagic fevers of children in the Philippines and Thailand. **Transactions of the Association of American Physicians**, Filadélfia, v. 73, p. 140-155, 1960.
- KIMURA, R.; HOTTA, S. Studies on dengue virus (VI). On the inoculation of dengue virus into mice. **Nippon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi**, Tóquio, v. 3379, p. 629-633, 1944.

- KURANE, I.; TAKASAKI, T. Dengue fever and dengue haemorrhagic fever: challenges of controlling an enemy still at large. **Reviews in Medical Virology**, v. 11, p. 301-311, out. 2001.
- LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular Biology of Flavivirus. In: CHAMBERS T. J.; MONATH T. P. Advances in virus research: The Flavivirus: structure, replication and evolution. California, Academic Press, v. 59, p. 23-61, 2003.
- MARTINS, R.; QUEIROZ, J. A.; SOUSA, F. Review: Ribonucleic acid purification. **Journal of Chromatography A**, 1355, p. 1-14, jun. 2014.
- MEDINA, F.; MEDINA, J. F.; COLÓN, C.; VERGNE, E.; SANTIAGO, G. A.; JORDÁN, J. L. M. Dengue virus: isolation, propagation, quantification, and storage. **Current Protocols in Microbiology** 15D.2.1-15D.2.24, nov. 2012.
- MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the Flavivirus life cycle. **Nature Reviews Microbiology**, Londres, v. 3, p. 13-22, jan. 2005.
- NUYTS, S.; VAN MELLAERT, L.; LAMBIN, P.; ANNÉ, J. Efficient isolation of total RNA from Clostridium without DNA contamination. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, p. 235-238, jan. 2001.
- OSANAI, C. H.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P.; TANG, A. T.; AMARAL, R. S.; PASSOS, A. D.; TAUIL, P. L. Dengue outbreak in Boa Vista Roraima preliminary report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 25, p. 53-54, 1983.
- PAYTON, M.; PINTER, K. A rapid novel method for the extraction of RNA from wild-type and genetically modified kanamycin resistant mycobacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 180, p. 141-146, nov. 1999.
- PEREZ, J. A.; ARAGÓN, Z.; PIÑERO, J. E.; del CASTILLO, A.; de ARMAS, F.; VALLADARES, B. Validation of a rapid method for extraction of total RNA applied to Leishmania promastigotes. **Journal Parasitology**, v. 85, p. 757-758, 1999.
- PIRES NETO, R. J.; LIMA, D. M.; de PAULA, S. O.; LIMA, C. M.; ROCCO, I. M.; FONSECA, B. A. L. Molecular epidemiology of type 1 and 2 dengue viruses in Brazil from 1988 to 2001. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 38, p. 843- 852, jun. 2005.
- RIGAU-PÉREZ, J. G.; CLARK, G. G.; GUBLER, D. J.; REITER, P.; SANDERS, E. J.; VORNDAM A. V. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **The Lancet**, Londres, v. 352, p. 971-977, 1998.
- RIVAS, R.; VIZCAÍNO, N.; BUEY, R. M.; MATEOS, P. F.; MOLINA, E. M.; VELÁZQUEZ, E. An effective, rapid and simple method for total RNA extraction from bacteria and yeast. **Journal of Microbiological Methods**, v. 47, p. 59-63, 2001.
- RUSSEL, P. K.; BRANDT, W. E.; DALRYMPLE, J. M. Chemical and antigenic structure of *Flaviviruses*. In: Schlesinger, R. W. (Ed) *The Togaviruses: biology structure, replication*. Nova York: Academic Press, 1980. p. 503-529.
- SABIN, A. B.; SCHLESINGER, M. C. Production of immunity to dengue with virus modified by propagation in mice. **Science**, Washington, v. 101, p. 640-642, 1945.

SCHATZMAYR, H. G.; NOGUEIRA, R. M. R.; ROSA, A. P. A. T. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro – 1986. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 81, n. 2, p. 245-246, 1986.

SAIKI, R. K.; SCHARE, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. v. 230, p. 1350-1354, dez. 1985.

STADLER, K.; ALLISON, S. L.; SCHALICH, J.; HEINZ, F. X. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *Journal of Virology*, v. 71, n. 11, p. 8475-8481, nov. 1997.

XIANG, X.; QIU, D.; HEGELE, R. D.; TAN, W. C. Comparison of different methods of total RNA extraction for viral detection in sputum. *Journal of Virological Methods*, v. 94, p.129-135, fev. 2001.

WESTAWAY, E. G. Flaviviridae. *Intervirology*, v. 24, p. 183-189, 1985.

WESTAWAY, E. G.; BLOK, J. Taxonomy and evolutionary relationships of flaviviruses. In: GUBLER, D. J. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. Londres: CAB International, 1997. p. 147-173.

WHO. World Health Organization. **Impact of Dengue**. Disponível em: <<http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/>>. Acesso em: 13 mai. 2015.

ZHOU, Y.; RAY, D.; ZHAO, Y.; DONG, H.; REN, S.; LI, Z.; GUO, Y.; BERNARD, K., A.; SHI, P.; LI, H. Structure and function of *Flavivirus* NS5 methyltransferase. *Journal Virology*, v. 81, n. 8, p. 3891-903, abr. 2007.