

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**Diagnóstico molecular de dengue e zika por transcrição reversa
seguida da amplificação isotérmica mediada por *loop* (RT-LAMP)
em dispositivo a base de papel**

THIAGO HENRIQUE MOREIRA DA FÉ

Orientadora: Profa. Dra. Gabriela Rodrigues Mendes Duarte

Goiânia-GO
2018

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS
DE TESES E
DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ [x] Dissertação ☐ [] Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

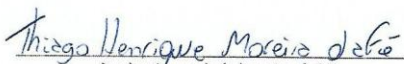
Nome completo do autor: Thiago Henrique Moreira da Fé

Título do trabalho: Diagnóstico molecular de dengue e zika por transcrição reversa seguida da amplificação isotérmica mediada por *loop* (RT-LAMP) em dispositivo a base de papel

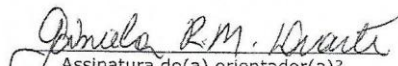
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ [x] SIM ☐ [] NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

04/06/2018

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente
- Submissão de artigo em revista científica
- Publicação como capítulo de livro
- Publicação da dissertação/tese em livro

²A assinatura deve ser escaneada.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**Diagnóstico molecular de dengue e zika por transcrição reversa
seguida da amplificação isotérmica mediada por *loop* (RT-LAMP)
em dispositivo a base de papel**

THIAGO HENRIQUE MOREIRA DA FÉ

Dissertação apresentada ao instituto de
Química da Universidade Federal de
Goiás como exigência para obtenção do
título de Mestre em Química

Orientadora: Profa. Dra. Gabriela Rodrigues Mendes Duarte

**Goiânia-GO
2018**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Henrique Moreira da Fé, Thiago

Diagnóstico molecular de dengue e zika por transcrição reversa
seguida da amplificação isotérmica mediada por loop (RT-LAMP) em
dispositivo a base de papel [manuscrito] / Thiago Henrique Moreira da
Fé. - 2018.

8, 67 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Gabriela Rodrigues Mendes Duarte.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, ,
Programa de Pós-Graduação em Química, Goiânia, 2018.
Bibliografia.

Inclui abreviaturas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. RT-LAMP. 2. Diagnostico molecular. 3. Dengue. 4. Zika. 5.
Papel. I. Rodrigues Mendes Duarte, Gabriela , orient. II. Título.

CDU 54



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ-IQ)

Ata da defesa de Dissertação de Mestrado de
Thiago Henrique Moreira da Fé, aluno
regularmente matriculado no Programa de Pós-
Graduação em Química do Instituto de Química da
Universidade Federal de Goiás, para a obtenção do
título de Mestre em Química.

Aos dias 13 (treze) de abril do ano de 2018 (dois mil e dezoito), com início às 14:00 hs (catorze horas) no Instituto de Química da UFG, reuniu-se a Banca Examinadora designada pela Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação em Química da UFG, composta pelos seguintes doutores: Gabriela Rodrigues Mendes Duarte (UFG), Alexandre Melo Bailão (UFG) e Andréa Rodrigues Chaves (UFG), sob a presidência da primeira, para julgar a dissertação de Thiago Henrique Moreira da Fé intitulada: "Diagnóstico molecular de dengue e zika por transcrição reversa seguida da amplificação isotérmica mediada por loop (RT-LAMP) em dispositivo a base de papel". A presidente da Banca Examinadora abriu a sessão prestando esclarecimentos sobre os trâmites da avaliação e, em seguida, passou a palavra ao candidato para que o mesmo fizesse uma exposição do seu trabalho. Terminada a exposição, o candidato foi arguido pelos membros da Banca Examinadora e, após as arguições, foi determinado um intervalo de tempo para que a banca, em sessão fechada, procedesse ao julgamento do trabalho. O resultado do julgamento foi o seguinte:

Prof. Dra. Gabriela Rodrigues Mendes Duarte: Aprovado
Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão: Aprovado
Prof. Dra. Andréa Rodrigues Chaves: Aprovado

A seguir, na presença do público e do candidato, a presidente da Banca Examinadora declarou que Thiago Henrique Moreira da Fé, candidato ao título de Mestre em Química foi: Aprovado (X); Reprovado (). Este resultado deverá ser homologado pela Coordenadoria de Pós-Graduação do Programa de Pós-Graduação em Química do IQ/UFG. Nada mais havendo a tratar, a senhora presidenta cumprimentou o candidato e encerrou os trabalhos. E para constar, eu, Lídia dos Santos Ferreira de Freitas, lavrei a presente ata que segue assinada pelos membros da banca examinadora. Goiânia, 13 de abril de 2018.


Prof. Dra. Gabriela Rodrigues Mendes Duarte (UFG)


Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão (UFG)


Prof. Dra. Andréa Rodrigues Chaves (UFG)

Aos meus pais Ademir e Eliete

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por todas suas bênçãos, pelas portas que permitiu serem abertas para que eu chegasse até aqui e por ter sido meu fiel amigo nos momentos mais difíceis pelos quais enfrentei nessa jornada acadêmica.

Agradeço aos meus pais por me colocarem no caminho correto, incentivando-me à busca de conhecimento desde criança. Agradeço seus esforços, embora tenham passado por dificuldades nunca desistiram de acreditar nas minhas capacidades, pelo contrário, sempre me incentivaram a ser melhor e por isso até hoje dedico todas as minhas vitórias a essas duas pessoas (Ademir e Eliete), pois eles são os responsáveis pelas minhas formações pessoais e profissionais.

Agradeço aos companheiros de trabalho Kézia, Geovana, Renata e, principalmente, ao Paulo por terem compartilhado comigo todo esse desafio da pesquisa, dando-me suporte quando era necessário.

À professora Gabriela Duarte pela orientação e paciência comigo nessa caminhada e por todo convívio que forneceu ao nosso grupo fora do ambiente de trabalho.

Ao professor Alexandre Bailão, pelos esclarecimentos e conhecimentos compartilhados, afim de que o trabalho pudesse tomar os rumos corretos, possibilitando a solução dos problemas.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular (LBM), pelas diversas dúvidas que foram sanadas sobre aspectos biológicos.

À Elisa pela paciência que teve comigo pelas vezes que cheguei em casa frustrado por não conseguir bons resultados, mas mesmo assim estava sempre a minha esperava com um lindo sorriso no rosto.

À CAPES pela bolsa concedida para que a pesquisa fosse realizada em sua totalidade.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	v
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Dengue	2
1.2 Zika	4
1.3 Estrutura do DENV e ZIKV	6
1.3.1 Infecção e transmissão dos vírus.....	7
1.3.2 Métodos diagnósticos	9
1.4 Amplificação Isotérmica mediada por “Loop” (LAMP)	12
1.4.1 Etapa não-cíclica	14
1.4.2 Etapa cíclica.....	15
1.5 Transcrição Reversa seguida da Amplificação Isotérmica Mediada por Loop (RT-LAMP).....	17
1.6 Detecção dos Produtos Amplificados	18
1.7 Miniaturização dos sistemas analíticos.....	21
1.7.1 O Papel como substrato para as reações LAMP	23
2. OBJETIVOS	25
2.1 Objetivos gerais	25
2.2 Objetivos específicos	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 Materiais e Reagentes	26

3.2 Amostras	26
3.2.1 Extração de RNA viral	27
3.3 Desenvolvimento dos dispositivos de poliéster-toner para acomodação do papel	27
3.3.1 Dispositivo provisório	27
3.3.2 Dispositivo de fita deslizante	28
3.4 Transcrição reversa seguida pela Amplificação Isotérmica Mediada por <i>Loop</i> (RT-LAMP) em única etapa.....	30
3.5 Extração dos fragmentos de DNA do papel.....	31
3.6 Detecção dos fragmentos de DNA amplificados por RT-LAMP	31
3.6.1 Eletroforese em gel de agarose	31
3.6.2 Detecção visual <i>on-chip</i> com SYBR Green	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 Estudo do tipo de papel utilizado como substrato para a reação de amplificação isotérmica de DNA.....	32
4.2 RT-LAMP no papel FTA.....	33
4.2.1 Modificações na solução do intercalador	36
4.2.2 Verificação da ocorrência resultados falso-positivos	38
4.2.4 Otimização da concentração de dNTP's.....	39
4.2.5 Avaliação sobre o tipo de <i>Bst</i> DNA polimerase	40
4.3 Avaliação do dispositivo de Fita Deslizante para realização da RT-LAMP.....	43
4.3.1 Realização da RT-LAMP no dispositivo de fita deslizante	45
4.3.2 Detecção <i>off-chip</i> – Eletroforese em Gel	47
4.3.3 Sensibilidade da RT-LAMP em papel	48
4.3.4 RT-LAMP com amostras complexas.....	50
5. CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Incidência da Dengue nos Pan-americanos. Adaptado de PAHO 2017.....	3
Figura 2 – Distribuição da ocorrência dos sorotipos DENV nas zonas tropicais e subtropicais do mundo. Adaptado de Guzman et al., 2010.	4
Figura 3 – Distribuição dos países e territórios com transmissão ativa do ZIKV e casos relatados. Adaptado de Statista, 2016.	5
Figura 4 – Estrutura Flavivírus, destacando a presença da fita simples de RNA no interior do capsídeo (C), envolto pela camada lipídica, constituída pela membrana (M) e as glicoproteínas do envelope (E). Fonte: HENCHAL & PUTNAK, 1990.	6
Figura 5 – Genoma Flavivírus. Fonte: Virus Pathogen Database and Analysis Resource (ViPR), 2017.....	7
Figura 6- Ciclo de replicação viral em células hospedeiras. Adaptado de LINDENBACH 2007.....	8
Figura 7 – Métodos diagnósticos utilizados para confirmação de infecções virais, adaptado de WHO 2009.	9
Figura 8 – Representação dos iniciadores utilizados na LAMP e suas regiões de hibridização no gene de interesse. FIP contem a região F1c, um espaçamento constituído por 4 timinas (TTTT) e a sequência F2, que é complementar à F2c. BIP contém a região B1c, complementar à B1, um espaçamento TTTT e a sequência B2. Os iniciadores externos correspondem às regiões F3 e B3, que são complementares às regiões F3c e B3c, respectivamente. Os iniciadores de loop FLP e BLP são constituídos por sequências que são complementares às regiões F1-F2 e B1-B2, respectivamente. Fonte: PARIDA et al. (2008).	13
Figura 9 – Mecanismo de amplificação por LAMP na etapa não cíclica. (1) Hibridização do iniciador FIP a sua região complementar, direcionando a enzima para realização da síntese da fita complementar (2). (3) Hibridização do iniciador F3 à sua região complementar, provocando a síntese de uma nova fita complementar (4) e deslocamento da fita gerada na etapa 2 (5). (6) Hibridização dos iniciadores BIP e B3 na extremidade 3', e formação de loop na extremidade 5', devido à	

complementaridade entre F1 e F1c. (7) Formação dupla fita de DNA. (8) Formação de loops nas extremidades 3' e 5', devido à complementaridade entre F1-F1c e B1-B1c, respectivamente. Adaptado de PARIDA et al. (2008).15

Figura 10 – Mecanismo de amplificação na LAMP pela etapa cíclica. (8) Anelamento de FIP ao loop na extremidade 3', que atua como auto-iniciador, ativando a enzima para realização da síntese das fitas complementares, originando a estrutura (9). O loop presente na estrutura (9) atua como autoiniciador, direcionando a enzima à realização da síntese complementar e deslocando a fita formada anteriormente, originando as estruturas (10) e (11), respectivamente. A formação das estruturas (10) e (11) permite o anelamento do iniciador BIP a sua região complementar, no qual mediante sucessivas etapas de síntese e deslocamento, origina estrutura de variadas formas e tamanhos. Adaptado de PARIDA et al. (2008).16

Figura 11 – Mecanismo de atuação dos iniciadores FLP e BLF. Adaptado de PARIDA et al., 2008.17

Figura 12 – Esquema de conversão de RNA a DNA complementar (cDNA). O RNA é utilizado como molde para a síntese de uma fita de cDNA, formando uma estrutura híbrida RNA-cDNA. Posteriormente uma nova fita de cDNA é sintetizada, dando origem à dupla fita de cDNA. Adaptado de ThermoFischer 2018.18

Figura 13 – Comparação entre análises em gel de agarose realizada para os ensaios de PCR e LAMP. Em (A) observa-se o marcador de tamanhos de DNA (M) e os produtos de amplificação obtidos pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (1), apresentando fragmentos de um mesmo tamanho, enquanto que em (B), observa-se também o marcador de tamanhos de DNA (M) e os produtos de amplificação obtidos por meio da LAMP (1), apresentando diferentes tamanhos de fragmentos devido atuação das etapas não cíclica e cíclica. Adaptado de Liu et al., 201319

Figura 14 – Representação mecanismo de detecção visual. (A) Corante de detecção indireta, baseados na interação com o Mg^{2+} em solução. (B) Corante de detecção direta, baseado na intercalação à dupla fita do DNA produzido. Adaptado de Fischbach et al., 2015.....21

Figura 15 – Esquema de fabricação do dispositivo utilizado inicialmente nos testes da RT-LAMP diretamente no papel. (A) filme de poliéster utilizado como base; (B) filmes de poliéster recobertos com toner, com interior recortado para acomodação do disco de papel; (C) filme de poliéster utilizado como topo. As camadas foram alinhadas juntamente com o disco de papel e submetidas à laminação, gerando o dispositivo pronto para uso.....28

Figura 16 – Esquema de fabricação do dispositivo de fita deslizante. (A) base do dispositivo; (B) camadas de poliéster recobertas com toner, com corte no interior para inserção da fita deslizante; (C) topo do dispositivo; (D) composição da fita

deslizante e (E) dispositivo pronto, obtido após alinhamento e laminação das camadas (A), (B) e (C) com posterior inserção da fita deslizante.29

Figura 17 – Avaliação da interação do intercalador SYBR Green com diferentes tipos de papeis. (1) papel cromatográfico 1 Chr, (2) papel FTA e papeis filtro-quantitativo JP 40, 41 e 42, correspondendo à (3), (4 e (5).....33

Figura 18 – Comportamento intensidade da fluorescência mediante adição do intercalador SYBR Green ao disco de papel contendo DNA amplificado.....35

Figura 19 – Avaliação do efeito do aumento da viscosidade da solução do intercalador SYBR Green na detecção visual, por meio da alteração na proporção PEG/água. Imagem obtida imediatamente após a adição do intercalador.36

Figura 20 – Comportamento intensidade da fluorescência mediante adição do intercalador SYBR Green, diluído em PEG, ao disco de papel contendo DNA.37

Figura 21 – Avaliação da influência da concentração de betaína na diminuição de falsos-positivos para o DENV-1.39

Figura 22 – Comportamento das reações negativas e positivas no papel, mediante a variação na concentração dos dNTP's, para o DENV-1.40

Figura 23 – Estudo da utilização das enzimas Bst 2.0 e Bst 3.0 em tempos de reação de 30, 45 e 60 minutos no substrato de papel.42

Figura 24 – Esquema das posições do dispositivo de fita deslizante. Posição 1 refere-se à região de adição dos reagentes e a posição 2 à região de prevenção da evaporação durante o aquecimento da reação.43

Figura 25 – Resistência à evaporação pelo dispositivo de fita deslizante ao ser submetido a 65°C por 45 minutos, permitindo a retenção de aproximadamente 75% da massa de água adicionada inicialmente (n=5).45

Figura 26 – Resultados da RT-LAMP no dispositivo de fita deslizante para detecção do DENV-1.46

Figura 27 - Resultados da RT-LAMP no dispositivo de fita deslizante, para detecção do ZIKV.46

Figura 28- Análise da extração pós-amplificação por eletroforese em gel de agarose. M- marcador; 1-3 ensaios positivos.47

Figura 29- Limite de detecção do ZIKV por RT-LAMP nos dispositivos de fita deslizante.49

Figura 30 – Confirmação da possibilidade de utilização de amostras complexas, como o soro de pacientes infectados pelo DENV-1, para realização da RT-LAMP. ..51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência dos iniciadores utilizados na RT-LAMP para do DENV-1 e para o ZIKV.....	30
Tabela 2 - Condições experimentais para as enzimas Bst 2.0 e Bst 3.0 na mistura reacional	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- μTAS** – *Micro total analysis systems* (Microsistemas para análises totais)
- BSA** – *Bovine serum albumine* (Albumina de soro bovina)
- cDNA** – DNA complementar
- CO₂** – Dióxido de carbono
- DENV** – Vírus da Dengue
- DF** – Febre da dengue
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico
- dNTP's** – Desoxirribonucleotídeos fosfatados
- DTT** – Ditioneitol
- EDTA** – ácido etilenodiaminotetracético
- ELISA** – *Enzyme-linked immunosorbent assay*
- FHD** – Febre Hemorrágica da Dengue
- FTA** – *Flinders Technology Associates*
- GuHCl** – Hidroclorato de guanidina
- IgG** – Imunoglobulina G
- IgM** – Imunoglobulina M
- IPTSP** – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
- Kb** – Quilobases
- KCl** – Cloreto de potássio
- LAMP** – *Loop-mediated isothermal amplification* (Amplificação isotérmica mediada por *loop*)
- mRNA** – RNA mensageiro
- PAHO** – Organização Pan-Americana da Saúde
- pb** – Pares de bases
- PCR** – *Polymerase chain reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

PEG – Polietilenoglicol

PeT – Poliéster-toner

RNA – Ácido ribonucleico

RT-LAMP – *Reverse transcription-loop mediated isothermal amplification*

(Transcrição reversa seguida da amplificação isotérmica mediada por *loop*)

SCH – Síndrome do Choque Hemorrágico

TE – Tris-EDTA

UV – Ultravioleta

RESUMO

A dengue e a zika são doenças infecciosas virais de ocorrência nos países de clima tropical e subtropical no qual vivem cerca de 3,6 bilhões de pessoas, estimando-se, no caso da dengue, que 50 a 100 milhões de novos casos da doença ocorram anualmente, gerando impactos econômicos, sociais e de saúde pública. A dengue e a zika têm sido usualmente diagnosticadas por métodos sorológicos que são em geral de baixa confiança, pois podem gerar resultados falso-positivos, que estão relacionados à presença de anticorpos produzidos contra infecções anteriores do vírus. Os métodos moleculares são mais precisos, porém o método molecular mais utilizado atualmente (PCR) requer longo tempo de realização e necessita de instrumentação sofisticada e de alto custo, dificultando sua aplicação no ponto de atendimento, especialmente em países em desenvolvimento. Este trabalho apresenta o desenvolvimento de uma metodologia de diagnóstico molecular em uma plataforma a base de papel que permitiu a detecção do vírus por meio da reação de transcrição reversa seguida pela amplificação isotérmica mediada por *loop* (RT-LAMP). As reações foram realizadas em discos de papel FTA com 6 mm de diâmetro, confinado em dispositivo multicamadas de poliéster-toner, incubados à 65 °C por 45 minutos em banho seco e posteriormente realizado a detecção visual *on-chip*, através da utilização do intercalador SYBR Green. As reações positivas foram identificadas pela fluorescência verde emitida após a adição do intercalador. Os resultados foram registrados por meio da captura das imagens por uma fotodocumentadora e/ou por câmera de celular e posteriormente analisados pelo software ImageJ, permitindo a comparação entre reações negativas e positivas. A metodologia desenvolvida para a detecção do vírus por RT-LAMP em substrato de papel apresentou-se sensível, sendo capaz de detectar o vírus em concentrações iniciais de 0,1 pg μL^{-1} de RNA na mistura reacional. Além disso, foi possível detectar o vírus diretamente em amostras complexas (soro de pacientes infectados) sem a necessidade da etapa prévia de extração do RNA viral. A eliminação da etapa de extração do RNA juntamente com a realização da detecção visual no próprio papel proporcionou a obtenção do resultado final em 46 minutos. Os resultados demonstraram que a detecção do vírus por RT-LAMP em substrato de papel é uma importante ferramenta para o diagnóstico molecular de doenças infecciosas, apresentando grande potencial para aplicações no ponto de atendimento tanto para diagnósticos quanto para estudos epidemiológicos, especialmente em países em desenvolvimento.

ABSTRACT

Dengue and zika are viral infectious diseases occurring in countries with a tropical and subtropical climate in which around 3.6 billion people live. It is estimated that in 50 to 100 million new cases of dengue occur annually, generating economic, social and public health impacts. Dengue and zika have usually been diagnosed by serological methods which are generally of low confidence, as they can generate false-positive results, which are related to the presence of antibodies produced against previous infections of the virus. The molecular methods are more accurate, however the molecular method most commonly used (PCR) requires a long time of reaction and requires sophisticated instrumentation and high cost, making point of care applications difficult, especially in developing countries. This work presents the development of a molecular diagnostic methodology in a paper-based platform that allowed the detection of the virus through the reverse transcription -loop mediated isothermal amplification (RT-LAMP). The reactions were carried out on 6 mm diameter FTA paper discs, confined in a multi-layered polyester-toner device, incubated at 65 ° C for 45 minutes in a dry bath and then performed visual detection using the SYBR Green intercalator. Positive reactions were identified by the green fluorescence emitted after the addition of the intercalator. The results were recorded through the capture of the images by a photodocumentator and/or by smartphone and later analyzed by the software ImageJ, allowing the comparison between negative and positive reactions. The methodology developed for the detection of the virus by RT-LAMP in paper substrate was sensitive, being able to detect the virus in initial concentrations of 0.1 pg μL^{-1} of RNA in the master mixture. In addition, it was possible to detect the virus directly in complex samples (serum of infected patients) without the need of previous viral RNA extraction step. Elimination of the RNA extraction step together with the visual detection on the paper produce the final result in 46 minutes. The results demonstrated that the detection of the virus by RT-LAMP in paper substrates is a valuable tool for the molecular diagnosis of infectious diseases, presenting great potential for point-of-care applications for both diagnostics and epidemiological studies, especially in developing countries.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Dengue

A dengue é uma doença infecciosa viral, de elevada importância mundial, transmitida por mosquitos do gênero *Aedes*, como o *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* (LU *et al.*, 2012) e *Aedes polynesiensis* (GURUGAMA *et al.*, 2010) que são vetores primários e mantêm-se por meio do ciclo humano-mosquito-humano, embora também tenha sido relatado a participação de primatas no ciclo infeccioso (GUBLER, 1998; WHO, 2016). As infecções pelo vírus da dengue (DENV) podem ser assintomáticas, mas também podem apresentar um amplo quadro clínico incluindo sintomas simples como febre, cefaleia, mialgia e náuseas (HENCHAL & PUTNAK, 1990), mas que podem evoluir para casos mais graves e fatais como a Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) e a Síndrome do Choque Hemorrágico (SCH) (TEOH *et al.*, 2013).

Os primeiros casos epidêmicos da dengue no Brasil foram relatados no estado do Rio de Janeiro em 1845-46 (FIGUEIREDO, 2003; FARES *et al.*, 2015), porém o vetor já era considerado um problema pois era também responsável pela transmissão da temível febre amarela, que só foi controlada por medidas realizadas pela Organização Pan-Americana da Saúde (PAHO) entre os anos de 1947–1970, erradicando o vetor *Aedes aegypti* do país e extinguindo os casos de dengue nesse período (MACIEL *et al.*, 2008; DICK *et al.*, 2012; MURRAY *et al.*, 2013). Contudo, no início da década de 1970 houve a queda do programa gerido pelo PAHO, ocasionando a reintrodução do vetor no país o que levou a epidemias no estado de Roraima e Rio de Janeiro e, posteriormente, a disseminação da doença para todos estados brasileiros (SERUFO *et al.*, 1996; FIGUEIREDO, 2003; TEIXEIRA *et al.*, 2013; FARES *et al.*, 2015).

De acordo com os dados disponibilizados pela PAHO em 2017, o Brasil se encontrou entre os países com os maiores números de casos da dengue, totalizando aproximadamente 460 mil casos da doença, que corresponde a uma incidência de 217,4 casos da doença para cada 100 mil habitantes (Figura 1), gerando impactos sociais e econômicos (GUBLER, 2012).

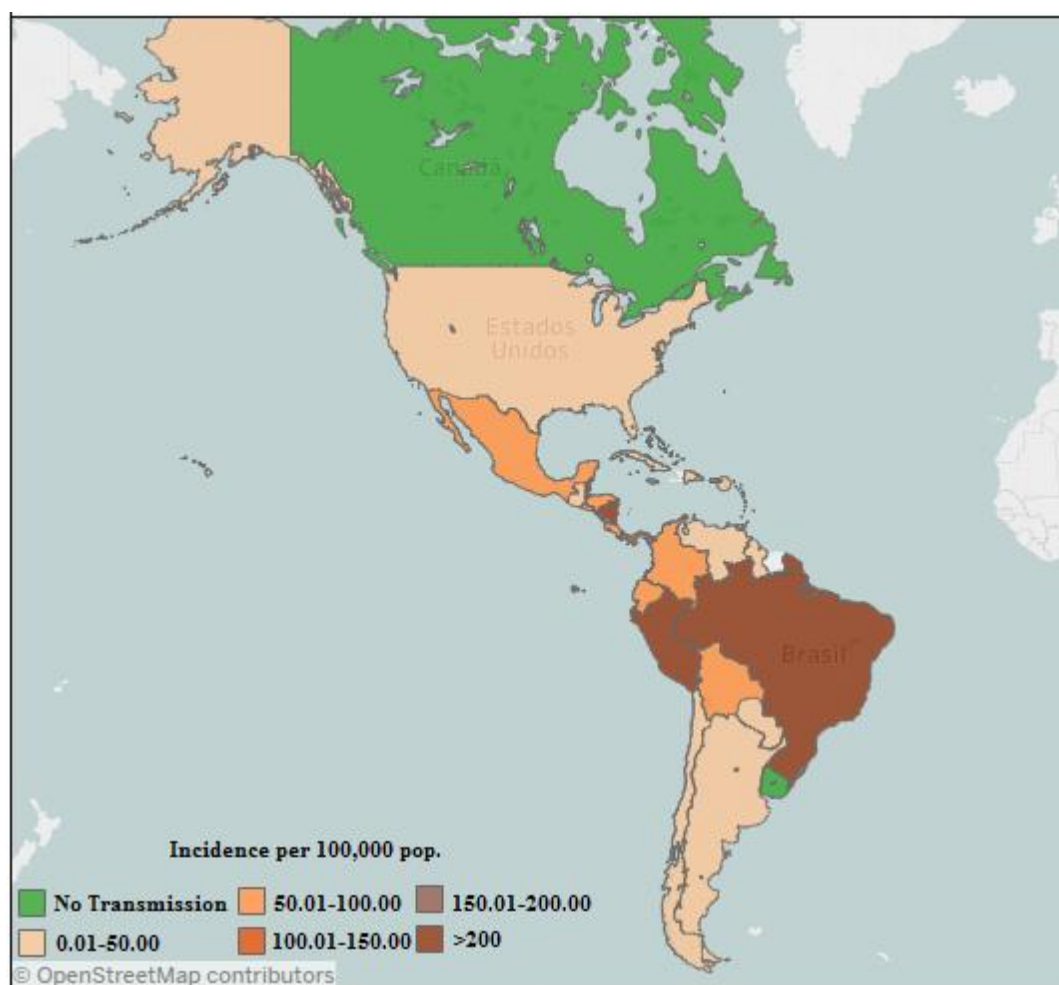


Figura 1- Incidência da Dengue nos Pan-americanos. Adaptado de PAHO 2017.

Atualmente, estima-se que no mundo 50-100 milhões de novos casos da dengue ocorram anualmente, pois cerca de 3,6 bilhões de pessoas vivem em países endêmicos (GUBLER, 2012; WHO, 2016). Em 2012 a Organização Mundial de Saúde (OMS) classificou a dengue como a doença infecciosa viral de maior importância mundial (WHO, 2012; ANNE *et al.*, 2013), devido o elevado número de casos da doença e aos aproximados 9 bilhões de dólares gastos anualmente com hospitalizações, atendimentos ambulatoriais, medicamentos e programas de prevenção à doença (SHEPARD *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2018).

O DENV é um arbovírus do gênero *Flavivírus* e família *Flaviridae*, existindo sob a forma de quatro sorotipos, DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (TEOH *et al.*, 2015), que se diferem quanto ao comprimento genômico viral (AÑEZ, *et al.*, 2016). Estes sorotipos não se restringem a uma região específica, mas tem livre circulação nas zonas tropicais e subtropicais do mundo (Figura 2) (WHO, 2016). No Brasil, os primeiros sorotipos identificados foram o DEN-1 e o DENV-4 no estado de Roraima em 1981, seguido pelo DENV-2 (1990) e DENV-3 (2000) no estado do Rio de Janeiro e, posteriormente, em 2010 foram identificados simultaneamente todos os sorotipos pelo país, prevalecendo majoritariamente o DENV-1 (83,3%), seguido pelo DENV-4 (15,1%), DENV-2 (1,3%) e DENV-3 (0,3%) (FIGUEIREDO, 2003; FARES *et al.*, 2015).

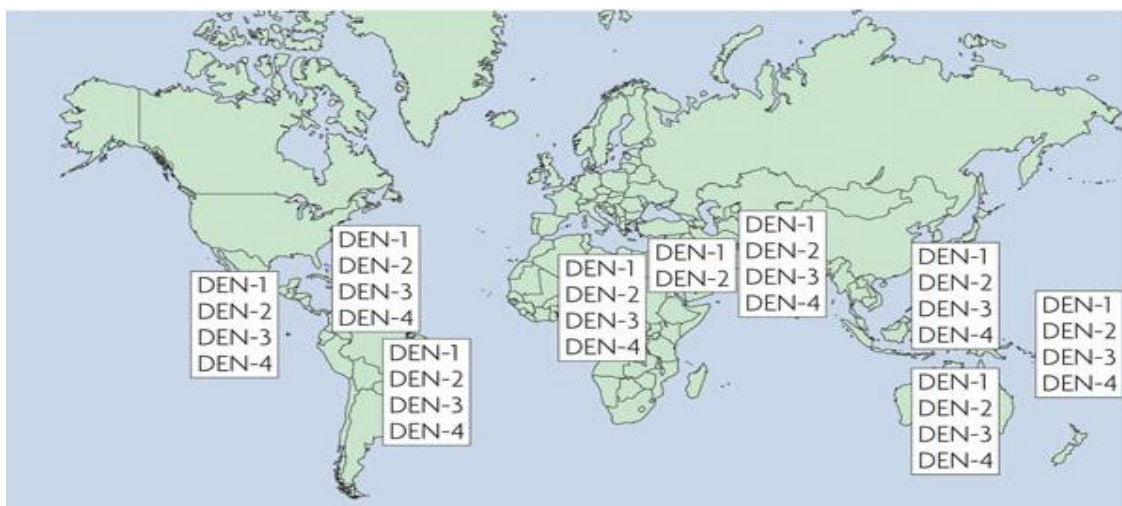


Figura 2 – Distribuição da ocorrência dos sorotipos DENV nas zonas tropicais e subtropicais do mundo. Adaptado de Guzman *et al.*, 2010.

1.2 Zika

A zika, assim como a dengue, é uma doença infecciosa viral transmitida por mosquitos do gênero *Aedes* (WINKLER; PETERSON, 2017), porém também pode ser transmitido sexualmente e *in útero*, ou seja, da mãe para o feto (GANGULI *et al.* 2017). O zika vírus (ZIKV) pertence ao gênero *Flavivírus* e família *Flaviridae* e foi isolado pela primeira vez em 1947 em Uganda, na África, durante um estudo sobre a febre amarela (CALVERT *et al.*, 2017). Assim como a dengue, a zika não se restringe

apenas uma região específica, mas também circula pelos países de clima tropical e subtropical, que favorecem o desenvolvimento do mosquito vetor da doença (Figura 3). No Brasil, os primeiros relatos sobre a ocorrência da zika foram no ano de 2015, o qual rapidamente se disseminou para os países vizinhos, circulando simultaneamente com outras arboviroses como a dengue, a febre amarela e a chikungunya (CHOTIWAN et al., 2017; YAREN et al., 2017).

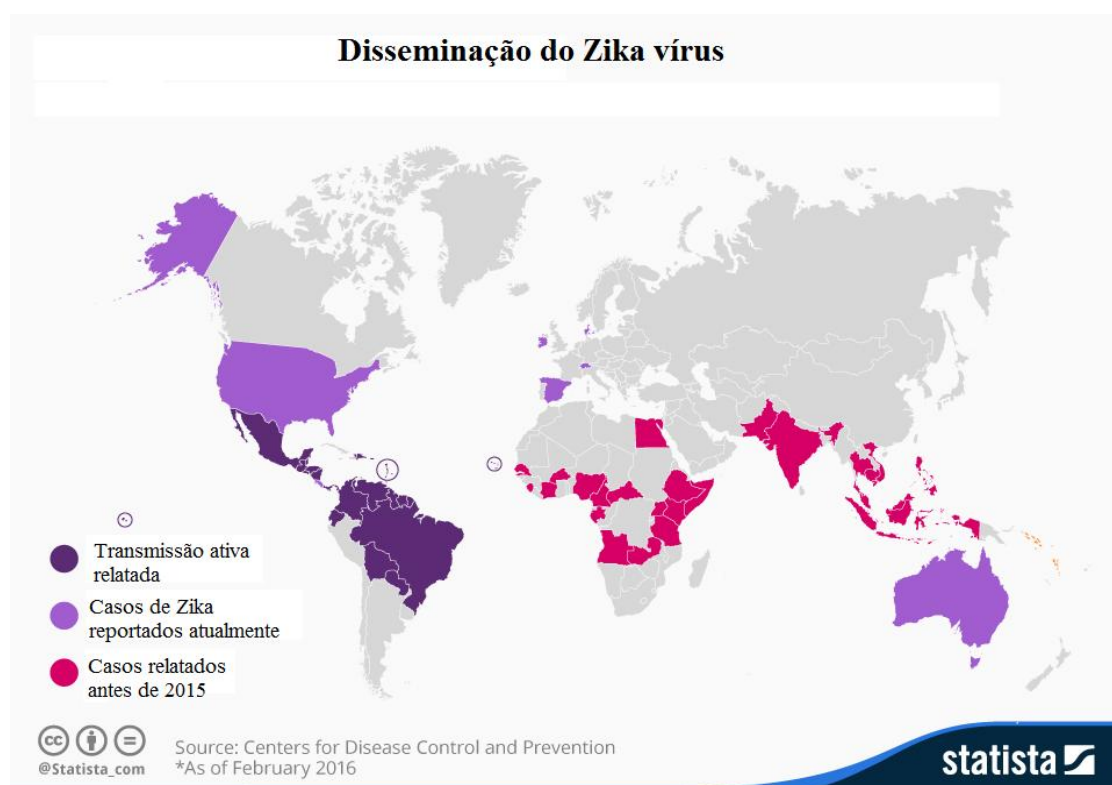


Figura 3 – Distribuição dos países e territórios com transmissão ativa do ZIKV e casos relatados. Adaptado de Statista, 2016.

As manifestações clínicas da infecção pelo ZIKV não são específicas e por vezes são confundidas com os sintomas de doenças como a dengue e chikungunya. A maioria dos casos da zika não apresentam sintomas (80% dos casos) e os sinais típicos são febre, dores nas articulações, mialgia e dores de cabeça (WINKLER; PETERSON, 2017; YAREN et al, 2017). Contudo o surto da zika ocorrido em 2015 no Brasil revelou ligação entre ZIKV com casos mais graves ocasionando anormalidades fetais (como microcefalia), cegueira congênita e síndrome de Guillain-Barré (CÁRDENAS et al., 2017).

1.3 Estrutura do DENV e ZIKV

As partículas virais maduras (*víriões*) (Figura 4) são esferas de 40-50 nm de diâmetro, constituídas por uma fita simples de RNA positivo, cercado por um nucleocapsídeo icosaédrico ou isométrico (HENCHAL & PUTNAK, 1990; GURUGAMA *et al.*, 2010), envolto por uma bicamada lipídica (TEOH *et al.*, 2013, GUZMAN *et al.*, 2010) com projeções na superfície, de 5-10 nm, onde se encontram glicoproteínas do envelope (E) (CHAMBERS *et al.*, 1990).

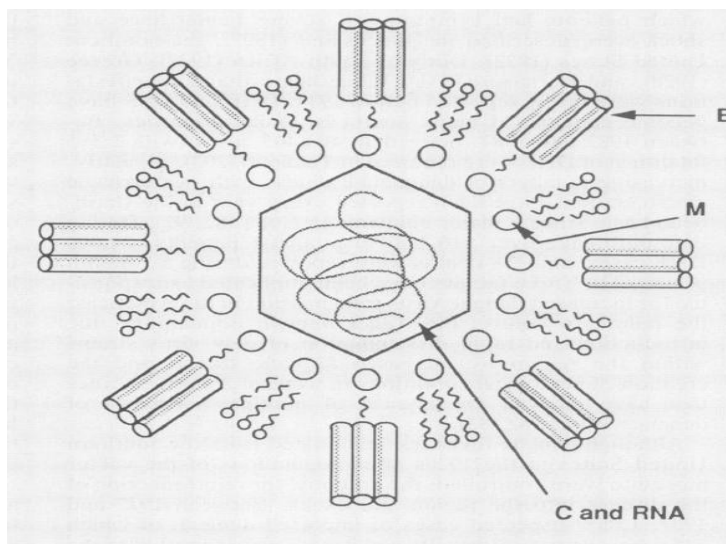


Figura 4 – Estrutura *Flavivírus*, destacando a presença da fita simples de RNA no interior do capsídeo (C), envolto pela camada lipídica, constituída pela membrana (M) e as glicoproteínas do envelope (E). Fonte: HENCHAL & PUTNAK, 1990.

O RNA genômico do DENV e do ZIKV contém aproximadamente 11 kb (quilobases) de comprimento, com única fase aberta de leitura (ORF, do inglês *open reading frame*) (Figura 5), que codifica cerca de 3400 aminoácidos residuais em uma poliproteína precursora (LO *et al.*, 2013). Esta poliproteína é clivada, por proteólise, dando origem a 10 produtos virais (FALGOUT & MARKOFF, 1995), sendo três proteínas estruturais – o capsídeo (C), proteína de membrana (M) e glicoproteínas do envelope (E) – e sete proteínas não-estruturais (NS – nonstructural) (NS1, NS2A,

NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (GUZMAN *et al.*, 2010; WEI & LI, 2017) (GURUGAMA *et al.*, 2010).

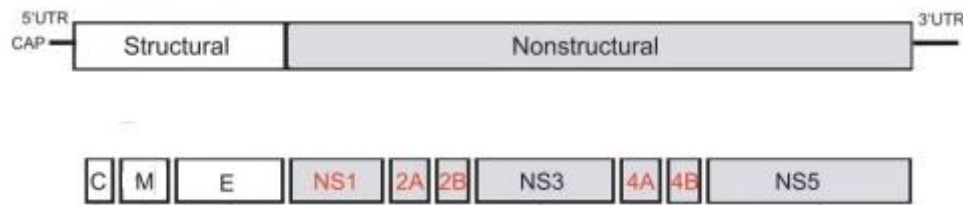


Figura 5 – Genoma *Flavivírus*. Fonte: Virus Pathogen Database and Analysis Resource (ViPR), 2017.

1.3.1 Infecção e transmissão dos vírus

A infecção das células saudáveis pelo DENV e ZIKV ocorre devido à adsorção dos *vírions* por meio da ligação da glicoproteína do envelope (E) ao receptor celular, e posteriormente a penetração à célula por endocitose (SMIT *et al.*, 2011) (Figura 6). Depois de inserido na célula, o baixo pH fagossomal provoca a fusão das membranas do vírus e da célula hospedeira, liberando o nucleocapsídeo viral e consequentemente o RNA genômico, no citoplasma celular. O RNA genômico liberado apresenta três funções básicas, como atuar como RNA mensageiro (mRNA) para tradução das proteínas virais, molde para replicação e material genético para as novas partículas virais formadas (LINDENBACH *et al.*, 2007).

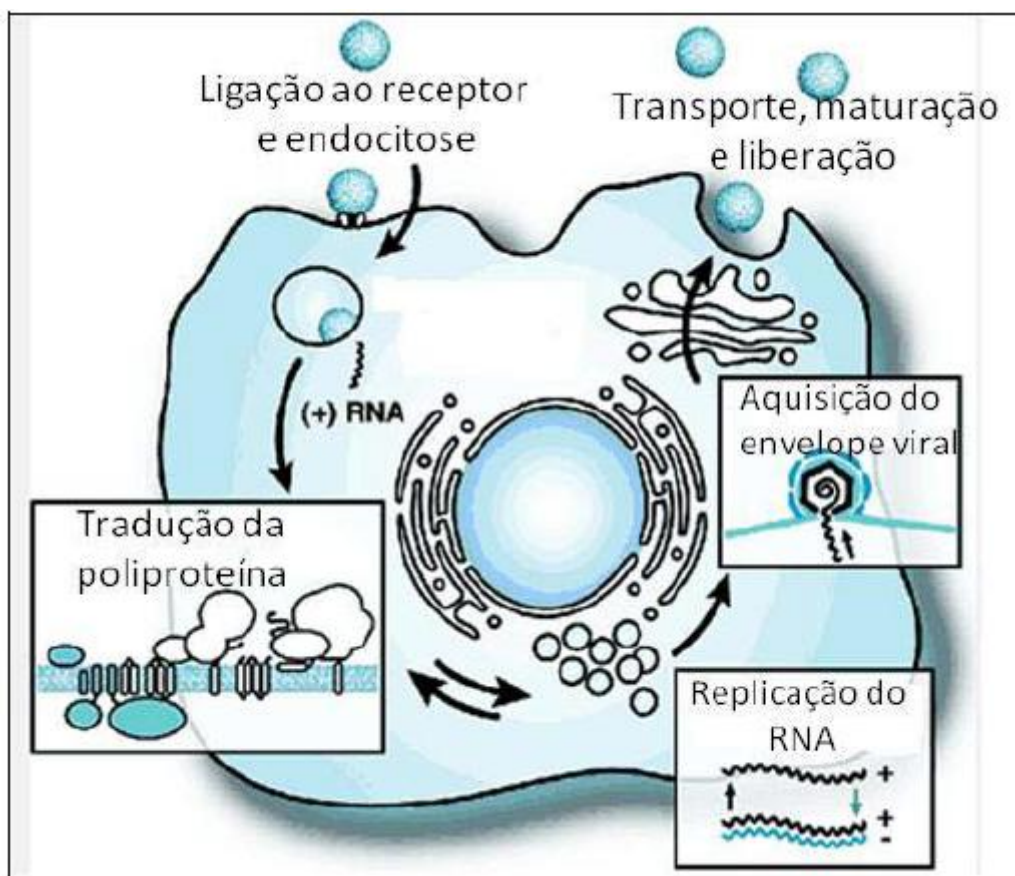


Figura 6- Ciclo de replicação viral em células hospedeiras. Adaptado de LINDENBACH 2007.

Quando os *vírions* são expelidos, a infecção se prolifera afetando sucessivamente as células saudáveis até a infecção geral do organismo, causando a viremia (presença do vírus no sangue) (MS, 2002). Após se alimentar do sangue de um humano infectado, os mosquitos fêmeas *Aedes* contraem o vírus, que se multiplica no intestino médio, e posteriormente, num período de 4-10 dias (período de incubação) (WHO, 2009), se espalha por outros tecidos celulares até chegar às glândulas salivares. A partir deste momento, enquanto viver, o mosquito transmitirá o vírus a outro humano ao se alimentar, completando o ciclo de transmissão viral (GURUGAMA *et al.*, 2010).

1.3.2 Métodos diagnósticos

Diagnósticos eficientes e precisos de doenças infecciosas como a dengue e a zika são de extrema importância para permitir a detecção precoce de casos graves, a diferenciação de sorotipos de um mesmo vírus e a diferenciação de doenças que apresentam quadros clínicos semelhantes como dengue febre amarela, chikungunya, encefalite japonesa, entre outras (WHO, 2009). Após o período de incubação (4-5 dias) os vírus podem ser detectados no soro, plasma, sangue e outros tecidos por métodos diretos como isolamento viral, detecção genômica e antigênica, ou indiretos como os sorológicos (Figura 6) e pode ainda ser detectado através da combinação de diferentes métodos (GUZMAN & KOURÍ, 2004; WHO, 2009; PEELING *et al.*, 2010).

Em geral, quanto mais acessível é o método diagnóstico menor a confiabilidade nos resultados, como mostrado na Figura 7.

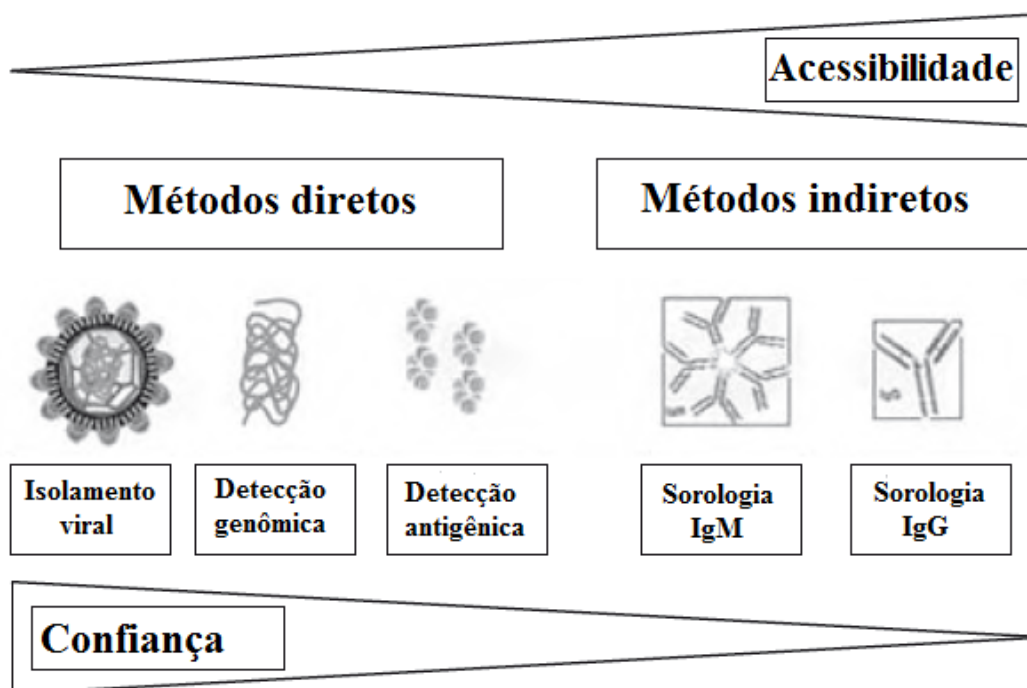


Figura 7 – Métodos diagnósticos utilizados para confirmação de infecções virais, adaptado de WHO 2009.

O isolamento viral é utilizado principalmente para a identificação de sorotipos do vírus, usando amostras de sangue, soro ou plasma, coletados na fase virêmica da doença, primeiros 3-5 dias de febre. Os vírus podem ser isolados pela inoculação em linhagem celular C6/36 (células dos mosquitos *Aedes albopictus*) ou LLC-MK2 (células de mamíferos) e pela inoculação intracerebral nos ratos em lactação (GUZMAN & KOURÍ, 2004; WHO, 2009; GUZMAN *et al.*, 2010; PEELING *et al.*, 2010). Após um período de inoculação que permita a replicação viral, a identificação é feita por imunofluorescência, utilizando anticorpos monoclonais específicos para os quatro sorotipos e por ensaios de PCR (GUZMAN & KOURÍ, 2004; GUZMAN *et al.*, 2010; PEELING *et al.*, 2010). O tempo necessário para obtenção de resultados, compreendendo desde o isolamento viral à imunofluorescência, é de 1-2 semanas, desde que o armazenamento e transporte tenham sido feitos corretamente, preservando a viabilidade do vírus (WHO, 2009).

Os métodos sorológicos consistem na realização de ensaios imunoadsorventes enzimáticos (ELISA) para a detecção das imunoglobulinas (IgG, IgM e IgA), que são produzidas como resposta imune à infecção pelo DENV e pelo ZIKV e são específicas para a proteína do envelope (E) viral (PEELING *et al.*, 2010). A resposta imune geralmente é obtida de 5-14 dias após o início dos sintomas e está diretamente relacionada ao tipo de infecção, primária ou secundária (DAUNER *et al.*, 2015). Infecções primárias têm, como resposta, maiores níveis de IgM em relação a IgG, porém durante infecções secundárias os níveis de IgG são superiores e podem ser explicados pelos estímulos gerados nas células de memória B (GUZMAN *et al.*, 2010). São métodos rápidos (15-90 minutos), baratos e identificam prováveis casos da doença, porém os testes sorológicos são de baixa confiança, pois geram resultados falso-positivos, que estão relacionados à presença de anticorpos produzidos contra infecções anteriores (PEELING *et al.*, 2010; LAU *et al.*, 2015) ou até mesmo pelos grupos comuns de epítomos, presentes nos flavivírus e que favorecem as reações cruzadas (GUBLER, 1998).

A detecção de antígenos por muito tempo foi comprometida em pacientes com infecções secundárias, devido à preexistência de imunocomplexos vírus-IgG. Como alternativa, foram desenvolvidos novos ensaios ELISA baseados na detecção do antígeno à proteína não-estrutural 1 (NS1), sendo possível a detecção de altas

concentrações deste antígeno no soro dos pacientes, na fase aguda das infecções primárias e secundárias, até o nono dia após início da doença. Os testes antigênicos são rápidos (15-30 min) (PAL *et al.*, 2014), altamente sensíveis e específicos, mas também podem ser comprometidos devido à preexistência de complexos, neste caso os imunocomplexos NS1-IgG presentes em infecções secundárias (NEERAJA *et al.*, 2015).

O diagnóstico da dengue e da zika também pode ser realizado utilizando metodologias de biologia molecular. Criada em 1983, a PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction*) é a principal técnica utilizada na realização de diagnósticos moleculares, sendo uma importante ferramenta para diagnóstico de doenças infecciosas, como a hepatite e tuberculose, doenças hereditárias, mas foi empregada principalmente no uso clínico em testes genéticos (CAO *et al.*, 2017). A PCR se baseia na utilização de dois iniciadores, que hibridizam nas regiões complementares do DNA alvo, e da enzima *Taq* DNA Polimerase, que por meio de ciclos sucessivos de desnaturação, hibridização e extensão, são capazes de gerar milhões de cópias da sequência alvo (ARROYO *et al.*, 2008; NOTOMI *et al.*, 2015).

No entanto, associado à PCR, há um elevado custo envolvido devido à necessidade de utilização de ciclos precisos de aquecimento e resfriamento, utilizados para garantir as etapas de desnaturação, hibridização e extensão, conseguidos em escala convencional por meio de termocicladores (MA *et al.*, 2017 a). Além disso, a PCR apresenta desvantagens relacionadas ao preparo da amostra, sendo necessárias etapas de extração e purificação do material genético (DNA ou RNA) de forma a eliminar a presença de substâncias que ocasionam sua inibição como etanol, ureia, hemoglobina, melanina, proteinases, entre outros. Em adição, a PCR requer uma etapa de eletroforese confirmar o resultado.

Em alternativa ao uso da PCR, recentemente tem surgido os métodos de amplificação isotérmica, que tem grande potencial para simplificar os diagnósticos moleculares. Dentre os métodos isotérmicos, um tem se destacado, a LAMP (*Loop-Mediated Isothermal Amplification*), descrita pela primeira vez, no ano de 2000 por Notomi e colaboradores. A LAMP é técnica de amplificação de menor custo, simples, rápida, eficaz e específica e essas vantagens são conseguidas devido à

utilização da enzima *Bacillus stearothermophilus* (*Bst*) DNA Polimerase, que possui atividade de deslocamento de cadeia, e um conjunto de 4-6 iniciadores, que reconhecem de 6-8 regiões do DNA alvo. A LAMP é realizada em condições isotérmicas (60-65°C), não havendo necessidade da utilização de termocicladores e consequentemente, apresenta potenciais para aplicações em testes em campo (ou *point-of-care*) (HUANG *et al.*, 2017; LU *et al.*, 2017; TEGEGNE *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2017).

1.4 Amplificação Isotérmica mediada por “Loop” (LAMP)

A LAMP baseia-se no deslocamento da dupla fita de DNA e síntese complementar, proporcionado pela ação da enzima *Bst* DNA polimerase que atua em temperatura constante (60-65°C), capaz de amplificar o alvo com concentrações tão baixas como 1 atomolar (TIAN, *et al.*, 2016) e produzir ao término da reação , aproximadamente 10^9 - 10^{10} cópias do DNA alvo (NOTOMI *et al.*, 2000; KALVATCHEV *et al.*, 2010; LU *et al.*, 2017).

Para a realização das reações de amplificação por LAMP é necessário a utilização de um conjunto de 4-6 iniciadores (*primers*): 2 iniciadores externos F3 (*forward outer primer*) e B3 (*backward outer primer*); 2 iniciadores internos FIP (*forward internal primer*) e BIP (*backward internal primer*); e, opcionalmente, 2 iniciadores de loop FLP (*forward loop primer*) e BLP (*backward loop primer*) (Figura 8), que reconhecem seis ou oito regiões distintas do gene ao qual se deseja amplificar (NAGAMINE *et al.*, 2002).

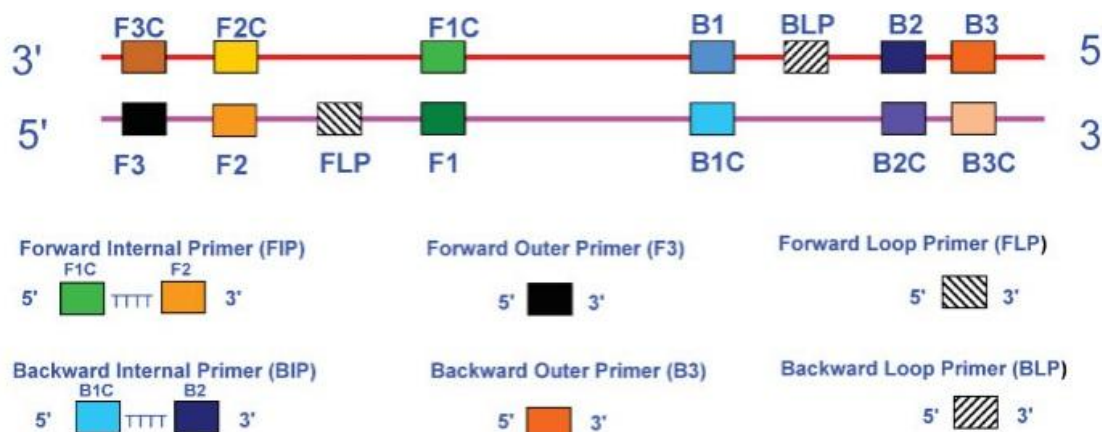


Figura 8 – Representação dos iniciadores utilizados na LAMP e suas regiões de hibridização no gene de interesse. FIP contém a região F1c, um espaçamento constituído por 4 timinas (TTTT) e a sequência F2, que é complementar à F2c. BIP contém a região B1c, complementar à B1, um espaçamento TTTT e a sequência B2. Os iniciadores externos correspondem às regiões F3 e B3, que são complementares às regiões F3c e B3c, respectivamente. Os iniciadores de loop FLP e BLP são constituídos por sequências que são complementares às regiões F1-F2 e B1-B2, respectivamente. Fonte: PARIDA *et al.* (2008).

Os iniciadores utilizados na LAMP devem ser desenhados de forma a evitar a formação de estruturas secundárias. Dessa forma a extremidade 3' não deve ser rica em Adenina e Timina (AT) e também não deve conter uma sequência que seja complementar com os outros iniciadores. A constituição dos iniciadores deve ser de 50-60% de Guanina e Citosina (GC) e 40-50% de AT. Tipicamente as distâncias entre a extremidade 5' de F2 até B2 deve ser de 120-180 pares de bases (pb), enquanto que as distâncias entre F2 e F3, assim como B2 e B3, devem ser de 0-20 pb. As distâncias para formação dos *loops*, que compreendem desde 5' de F2 a 3' de F1, ou 5' de B2 a 3' de B1, devem ser de 40-60 pb (PARIDA *et al.*, 2008; SÁNCHEZ *et al.*, 2014).

Após a adição da enzima *Bst* DNA polimerase à solução contendo os iniciadores e o DNA inicia-se a reação de amplificação, a temperatura constante. Nesta fase, as hibridizações dos iniciadores às regiões complementares proporcionam o direcionamento da enzima para o deslocamento da fita dupla e, posteriormente da síntese das fitas complementares. Os produtos de amplificação gerados pela reação LAMP são obtidos por duas etapas, sendo elas a etapa não-cíclica e a cíclica (GILL & GHAEMI, 2008; PARIDA *et al.*, 2008; TOMITA *et al.*, 2008; ZANOLI & SPOTO, 2013; LI *et al.*, 2016).

1.4.1 Etapa não-cíclica

É nessa etapa do processo de amplificação que são formados os *loops*, que atuarão como estrutura de partida, garantindo a continuidade da reação durante a etapa cíclica. Inicialmente, devido ao equilíbrio dinâmico proporcionado pela temperatura constante, o iniciador FIP é capaz de hibridizar-se com sua região complementar F2c no DNA alvo, Figura 9 (1), direcionando a *Bst* DNA polimerase para que possa realizar o deslocamento da dupla fita de DNA e síntese da nova fita, sempre na direção 5'→3', com sequência complementar (2). O iniciador F3 hibridiza com sua região complementar F3c (3), ocasionando o deslocamento da fita formada anteriormente, pela hibridização do iniciador FIP. A síntese provocada pela hibridização do iniciador F3 faz com que novamente o DNA tenha aspecto de dupla fita (4).

A fita simples gerada pelo iniciador FIP (5) contém, em sua extremidade 5', zonas que se complementam (F1c e F1), ocasionando a formação de um *loop* (6). Ainda na estrutura (6), ocorre a hibridização do iniciador BIP, à região B2c, com posterior síntese complementar. O iniciador B3 hibridiza com sua região complementar B3c, ocasionando o deslocamento da fita formada anteriormente, pela hibridização do iniciador BIP (8). A síntese provocada pela hibridização do iniciador B3 também faz com que novamente o DNA tenha aspecto de dupla fita (7).

O produto final obtido na etapa (8) possui nas extremidades 3' e 5' a presença de regiões complementares, permitindo a formação de *loops* e atuação como estrutura de partida na etapa cíclica (NOTOMI *et al.*, 2000; EIKEN CHEMICAL, 2005; PARIDA *et al.*, 2008; SÁNCHEZ *et al.*, 2014).

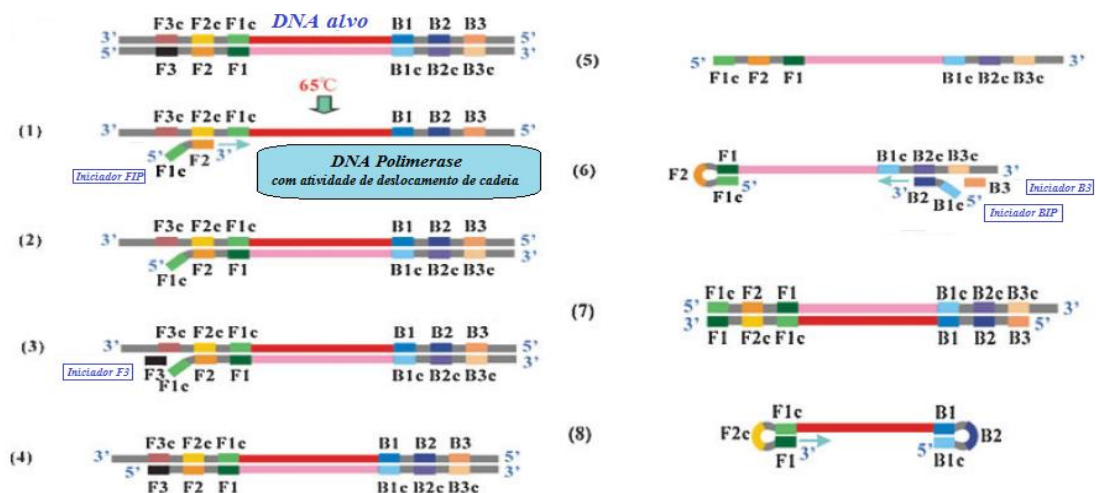


Figura 9 – Mecanismo de amplificação por LAMP na etapa não cíclica. (1) Hibridização do iniciador FIP a sua região complementar, direcionando a enzima para realização da síntese da fita complementar (2). (3) Hibridização do iniciador F3 à sua região complementar, provocando a síntese de uma nova fita complementar (4) e deslocamento da fita gerada na etapa 2 (5). (6) Hibridização dos iniciadores BIP e B3 na extremidade 3', e formação de loop na extremidade 5', devido à complementaridade entre F1 e F1c. (7) Formação dupla fita de DNA. (8) Formação de loops nas extremidades 3' e 5', devido à complementaridade entre F1-F1c e B1-B1c, respectivamente. Adaptado de PARIDA *et al.* (2008).

1.4.2 Etapa cíclica

Esta etapa inicia-se a partir das estruturas de *loops* formadas na etapa não cíclica. Inicialmente, o iniciador FIP anela-se ao *loop* da fita simples por meio da complementaridade entre F2 e F2c, Figura 10 (8), direcionando a enzima para realização da síntese. Ao mesmo tempo, a região F1, que se encontra na extremidade 3' do molde, atua como autoiniciador, induzindo a enzima para realização da síntese complementar, originando um novo *loop*, na extremidade 3', devido à presença das regiões B1 e B1c (9). A região B1, presente no *loop* formado anteriormente, atuará também como autoiniciador, direcionando a enzima para a síntese de uma nova sequência complementar (10), e deslocando a fita formada anteriormente pela hibridização do iniciador FIP (11).

A formação da estrutura da etapa (10) permite que o iniciador BIP se anele à sua região complementar, B2c, fazendo com que a enzima continue sintetizando e deslocando, sequencialmente, as fitas de DNA. Com isso, múltiplas estruturas com formas e tamanhos variados são formadas.. A estrutura originada na etapa (11) é

similar àquela formada na etapa (8) e também atua como matriz de partida para a etapa cíclica. Porém, nesta estrutura, BIP é o iniciador que atua para promover o direcionamento da enzima, com realização da síntese complementar, gerando, neste caso, estruturas semelhantes à das etapas (9) e (10).

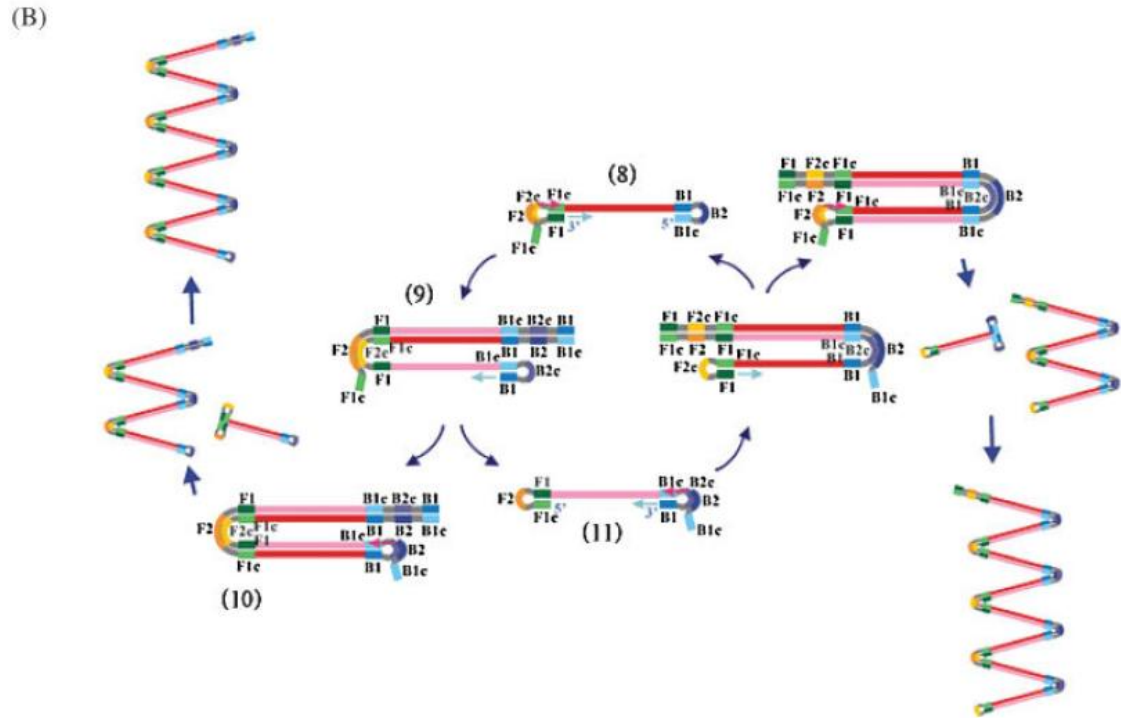


Figura 10 – Mecanismo de amplificação na LAMP pela etapa cíclica. (8) Anelamento de FIP ao *loop* na extremidade 3', que atua como auto-iniciador, ativando a enzima para realização da síntese das fitas complementares, originando a estrutura (9). O *loop* presente na estrutura (9) atua como autoiniciador, direcionando a enzima à realização da síntese complementar e deslocando a fita formada anteriormente, originando as estruturas (10) e (11), respectivamente. A formação das estruturas (10) e (11) permite o anelamento do iniciador BIP a sua região complementar, no qual mediante sucessivas etapas de síntese e deslocamento, origina estrutura de variadas formas e tamanhos. Adaptado de PARIDA *et al.* (2008).

A etapa cíclica envolve também a utilização dos iniciadores adicionais, os iniciadores de *loop*, FLP e BLP, que se hibridizam apenas nos *loops* onde não estejam presentes os iniciadores internos, FIP e BIP (Figura 11). A utilização de FLP e BLP promove a aceleração da reação de amplificação, pois provocam o aumento do número de *loops* nos quais os iniciadores internos podem atuar, reduzindo o tempo reacional para menos de 30 minutos em alguns casos (NAGAMINE *et al.*, 2002; PARIDA *et al.*, 2008).

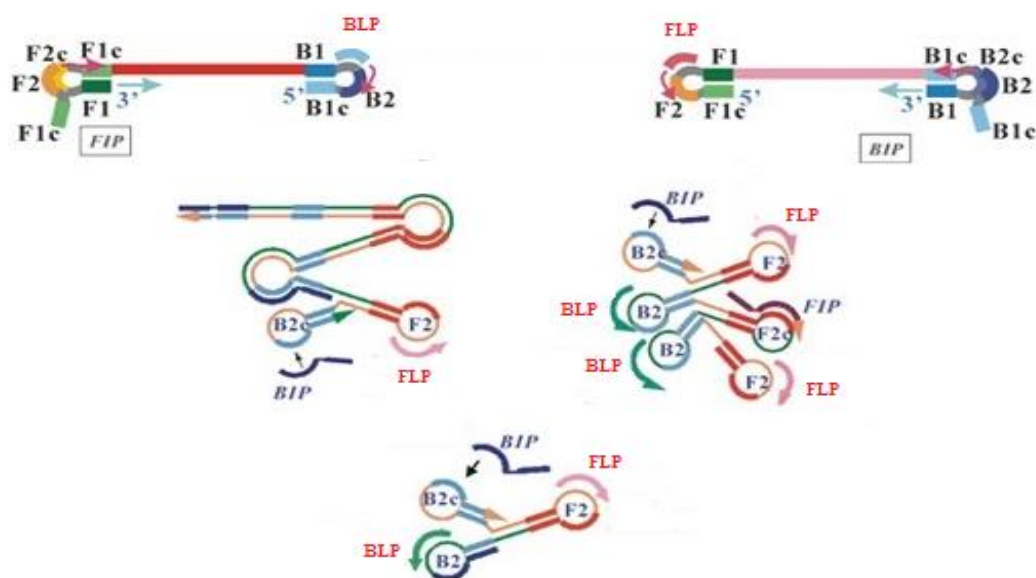


Figura 11 – Mecanismo de atuação dos iniciadores FLP e BLF. Adaptado de PARIDA *et al.*, 2008.

1.5 Transcrição Reversa seguida da Amplificação Isotérmica Mediada por Loop (RT-LAMP)

A LAMP é uma técnica de amplificação de DNA, porém pode ser aplicada em amostras que contêm RNA como material genético, por meio da conversão do RNA a cDNA através da utilização de uma enzima de transcrição reversa, denominando-se a técnica de Transcrição Reversa seguida da Amplificação Isotérmica mediada por Loop (RT-LAMP, do inglês *Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification*) (NOTOMI *et al.*, 2000; MORI & NOTOMI,

2009; OCWIEJA *et al.*, 2015). Neste caso, o mRNA atua como molde para atuação da enzima transcriptase reversa, que sintetiza uma fita de DNA complementar (cDNA) ao molde (Figura 12). Posteriormente tem-se a atuação da enzima DNA polimerase, que sintetiza outra fita complementar ao cDNA, dando aspecto de dupla fita da DNA (THERMOFISHER, 2018).

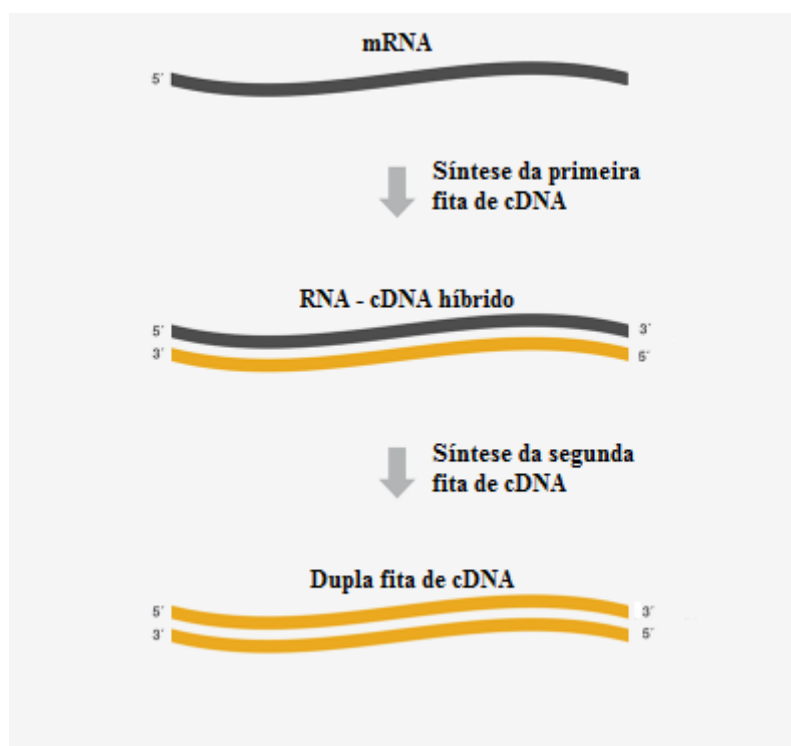


Figura 12 – Esquema de conversão de RNA a DNA complementar (cDNA). O RNA é utilizado como molde para a síntese de uma fita de cDNA, formando uma estrutura híbrida RNA-cDNA. Posteriormente uma nova fita de cDNA é sintetizada, dando origem à dupla fita de cDNA. Adaptado de ThermoFischer 2018.

1.6 Detecção dos Produtos Amplificados

Tipicamente, assim como na PCR, os produtos amplificados na LAMP são detectados por meio da eletroforese em gel (MONAZAH *et al.*, 2017; LU *et al.*, 2018). Essa técnica baseia-se na separação dos fragmentos de DNA, quando submetidos a um campo elétrico que faz com que os fragmentos de DNA tenham diferentes mobilidades na matriz porosa do gel, de acordo com o peso molecular de cada fragmento (MAGNÚSDÓTTIR *et al.*, 1994; STELLWAGEN, 2009; LEE *et al.*, 2012).

Diferentemente da PCR, que amplifica fragmentos de DNA de tamanho específicos (Figura 13 A), os fragmentos de DNA obtidos pela LAMP apresentam diferentes tamanhos devido à atuação das etapas não cíclica e cíclica, fazendo com que os géis utilizados para detecção dos fragmentos exibam resultados singulares, como representado na Figura 13 B (CHIARI, 2010). Desta forma, um gel de eletroforese da LAMP tem um aspecto diferente de um gel de eletroforese da PCR, como ilustra a Figura 13.

A detecção dos fragmentos por eletroforese em gel de agarose demonstra algumas desvantagens devido à necessidade de utilização de equipamentos próprios para sua realização, custo relativamente alto do gel de agarose e pelo elevado tempo necessário para obtenção dos resultados, (aproximadamente 60 minutos) (TAN *et al.*, 2007).

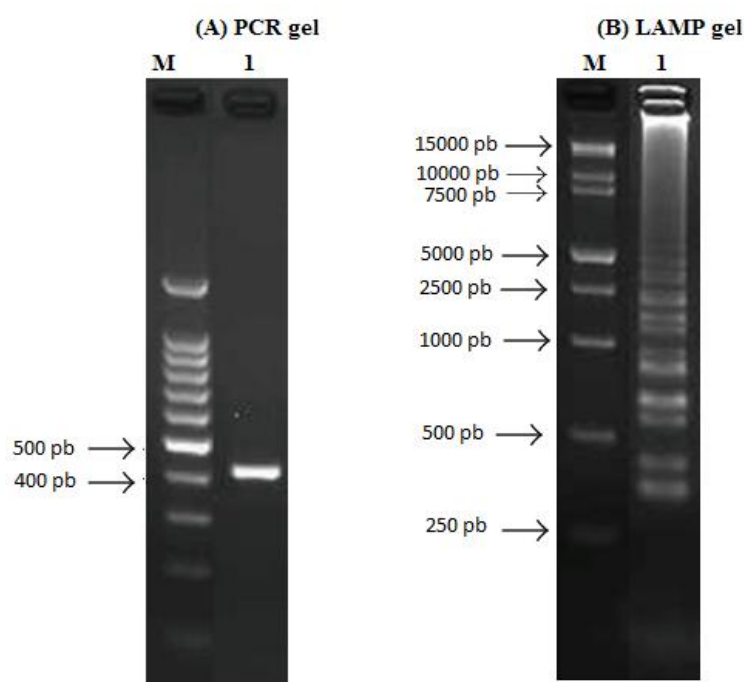
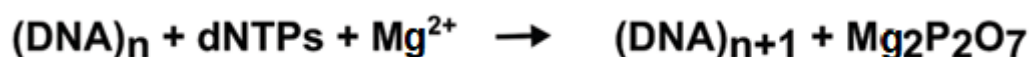


Figura 13 – Comparação entre análises em gel de agarose realizada para os ensaios de PCR e LAMP. Em (A) observa-se o marcador de tamanhos de DNA (M) e os produtos de amplificação obtidos pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (1), apresentando fragmentos de um mesmo tamanho, enquanto que em (B), observa-se também o marcador de tamanhos de DNA (M) e os produtos de amplificação obtidos por meio da LAMP (1), apresentando diferentes tamanhos de fragmentos devido atuação das etapas não cíclica e cíclica. Adaptado de Liu *et al.*, 2013

Além da detecção convencional por eletroforese em gel, a LAMP permite também a detecção visual dos produtos amplificados. A detecção visual simplifica a

obtenção do resultado final e apresenta vantagens de economia de tempo e reagentes e pode ser integrada com a etapa de amplificação. A detecção visual pode ser feita através de intercaladores fluorescentes de DNA ou com o uso de indicadores fluorescentes de íons metálicos.

O uso de indicadores fluorescentes de íon metal baseiam-se no fato de que a LAMP produz, além da grande quantidade de fragmentos de DNA, o pirofosfato que é liberado durante a incorporação dos desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP's) na síntese das novas fitas de DNA. Na presença do íon magnésio (Mg^{2+}), o pirofosfato se precipita sob a forma de pirofosfato de magnésio, diminuindo a concentração desse íon na sua forma livre (KUBOKI *et al.*, 2003; MORI *et al.*, 2001; FISCHBACH *et al.*, 2015), como representado abaixo:



Com o intuito de realizar a detecção dos produtos de amplificação de forma mais rápida e simples, corantes colorimétricos baseados na detecção da alteração da concentração de Mg^{2+} foram desenvolvidos. Esses corantes, designados corantes de detecção indireta possuem a capacidade de alteração da coloração da solução, perceptíveis a olho nu, quando se encontram quelatados ou não com o Mg^{2+} , como é o caso do Azul de Hidroxinaftol (HNB) que apresenta coloração violeta quando complexado com o íon magnésio e coloração azul celeste conforme ocorre a formação do pirofosfato de magnésio (Figura 14 A) (FISCHBACH *et al.*, 2015; SAFAVIEH *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2017).

Os produtos amplificados na LAMP também podem ser detectados mediante utilização de corantes de detecção direta. Esses corantes são assim chamados, pois se baseiam na intercalação do corante diretamente com os fragmentos de DNA produzidos durante a reação e provocam, após a intercalação, a emissão de fluorescência da solução quando submetida à radiação ultravioleta (UV) (Figura 14 B) (FISCHBACH *et al.*, 2015). O SYBR Green I é um exemplo de corante fluorescente utilizado para detecção direta dos produtos amplificados na LAMP (SAFAVIEH *et al.*, 2016). A utilização desse corante permite a visualização dos resultados imediatamente após a sua adição à solução, apresentando coloração verde

fluorescente na presença dos fragmentos de DNA amplificados na LAMP (ZIPPER, *et al.*, 2004; KALVATCHEV *et al.*, 2010; SALANT *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2014; OSCORBIN *et al.*, 2016).

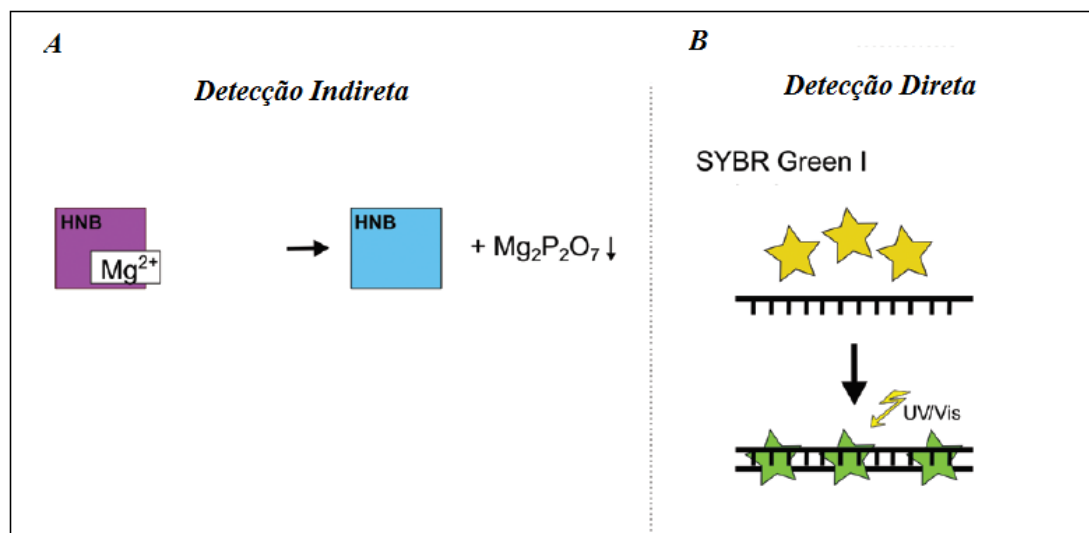


Figura 14 – Representação mecanismo de detecção visual. (A) Corante de detecção indireta, baseados na interação com o Mg^{2+} em solução. (B) Corante de detecção direta, baseado na intercalação à dupla fita do DNA produzido. Adaptado de Fischbach *et al.*, 2015.

1.7 Miniaturização dos sistemas analíticos

A miniaturização dos sistemas analíticos proporcionou inúmeros benefícios em biologia molecular como a redução no volume de amostras e reagentes, redução do risco de contaminação da amostra, curtos tempos de análises, redução de custos por análise, separações e detecções com alta resolução e sensibilidade (LINDSTRÖM & SVAHN, 2011). Esses fatores contribuíram para o desenvolvimento de microdispositivos com capacidade de realização de múltiplas etapas de análise, sendo conhecidos como μ TAS (microsistemas de análises totais) ou *lab-on-a-chip* (laboratório no chip), tornando possível a aplicação da análise em campo (*point-of-care*) (WHITESIDES 2006; YAGER *et al.*, 2006; MARK *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2015).

A utilização dos μ TAS para a realização de análises biológicas demonstrou ser uma importante ferramenta de diagnóstico molecular, principalmente para análise de ácidos nucleicos (CULBERTSON *et al.*, 2014). Existe uma infinidade de informações que se pode obter através dos ácidos nucleicos já que estes estão presentes em vários processos biológicos como a progressão de doenças (FRIEDRICH *et al.*, 2016). O grande sucesso dos μ TAS para o diagnóstico molecular de doenças infecciosas foi conseguido pela possibilidade de integração de várias etapas de análise como extração, purificação, amplificação e detecção dos ácidos nucleicos, reduzindo a possibilidade de contaminação durante o processo de análise devido ao mínimo contato que se requer do operador com as amostras e os reagentes (ZHANG; XING, 2007; TOMITA *et al.*, 2008).

Outro fator que contribuiu para grande utilização dos μ TAS para análises genéticas e, conseqüentemente, facilitou sua aplicação no *point-of-care* foi a combinação com técnicas isotérmicas de amplificação dos ácidos nucleicos, destacando-se a LAMP (AHMAD & HASHSHAM, 2012). LAMP tem sido empregada na amplificação de vários tipos de patógenos como *Escherichia coli* (WANG *et al.*, 2012), Influenza A (H1N1) (LEE *et al.*, 2010), *Mycobacterium tuberculosis* (IWAMOTO *et al.*, 2003), vírus da Dengue (SHANI *et al.*, 2013; LAU *et al.*, 2015), Zika vírus (CALVERT *et al.*, 2017) entre outros.

Desde o desenvolvimento da LAMP, em 2000, vários tipos de materiais tem sido utilizados como substratos para realização da reação de amplificação, dentre eles polipropileno (IWAMOTO *et al.*, 2003; NAHAR *et al.*, 2015), polimetilmetacrilato (PMMA) (HATAOKA *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2007), vidro (WU *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2014), vidro/polidimetilsiloxano (PDMS) (GUO *et al.*, 2015; XIA *et al.*, 2016), poliéster-toner (OLIVEIRA *et al.*, 2017) e, tendo grande destaque a utilização do papel (CONNELLY *et al.*, 2015; RODRIGUEZ *et al.*, 2015).

1.7.1 O Papel como substrato para as reações LAMP

O papel é um material bastante conhecido e de grande utilização cotidiana, principalmente na escrita, impressão e fabricação de embalagens. Contudo é também considerado um substrato promissor para o desenvolvimento de dispositivos descartáveis para diagnóstico molecular, por ser de baixo custo, descartável, biodegradável, compatível com amostras biológicas, insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos (CONNELLY *et al.*, 2015; RODRIGUEZ *et al.*, 2015).

O papel é constituído principalmente por celulose, uma macromolécula linear composta por repetições de monômeros de glicose, que se arranjam sob a forma de fibras. A agregação das fibras hidrofílicas, na constituição do papel, provoca a formação de poros, que permitem o movimento de fluidos, sem a necessidade da ação de forças externas, apenas devido à ação da capilaridade. Essa característica proporciona ao papel vantagens como o armazenamento seco de reagentes, disponibilização dos reagentes em etapas, mistura de amostras e processamento de múltiplas etapas (RODRIGUEZ *et al.*, 2015; CHOI *et al.*, 2016).

A elevada área superficial do papel permite a realização de processos de funcionalização, alterando propriedades como hidrofobicidade, por meio da deposição de agentes hidrofóbicos à superfície do papel; a permeabilidade, por meio do bloqueio físico dos poros do papel; e a reatividade, por meio da adição de agentes reativos na matriz fibrosa (LIANA *et al.*, 2012; HU *et al.*, 2014; ROZAND, 2014; CHOI *et al.*, 2015; MEREDITH *et al.*, 2016).

Neste cenário, a funcionalização permitiu o desenvolvimento de tecnologias aplicadas ao papel, destacando-se o papel FTA[®] (Flinders Technology Associates), produzido pela Whatman, utilizado para coleta, transporte e armazenamento de amostras biológicas (DOBBS *et al.*, 2002; NDUNGURU *et al.*, 2005). O papel FTA[®] possui em suas fibras celulósicas a presença de reagentes químicos, imobilizados, que permitem a realização da lise celular, desnaturação de proteínas e proteção dos ácidos nucleicos contra a degradação, via nucleases, oxidação ou danos provocados pela radiação UV (GUSTAVSSON *et al.*, 2009; BUSH, 2011; SHAW *et al.*, 2012).

Vários tipos de amostras biológicas podem ser adicionados ao papel FTA[®], como sangue, células cultivadas, saliva, partículas virais, tecidos sólidos de animais ou plantas, entre outros. Após um curto período de secagem as mostras podem ser transportadas ou armazenadas, a temperatura ambiente, por longos períodos de tempo, podendo ser processadas a qualquer momento, mediante extração dos ácidos nucleicos aprisionados nas fibras de celulose com tampões, solventes orgânicos ou kits comerciais (SMITH & BURGOYNE, 2004; GE HEALTHCARE, 2010; GE HEALTHCARE, 2015; RAHIKAINEN *et al.*, 2016).

A possibilidade de armazenamento de amostras e reagentes, na matriz de celulose, faz do papel FTA[®] um importante material para aplicação em testes de diagnósticos moleculares no *point-of-care*, pois os reagentes necessários para a realização da LAMP podem ser armazenados a seco no papel e ativados mediante adição da amostra e aquecimento da solução, à faixa de temperatura requerida. A detecção dos produtos de amplificação produzidos pela reação LAMP no papel, pode ser realizada mediante o uso de corantes de detecção direta como o SYBR Green, que apresenta fluorescência quando intercalado ao DNA e submetido à radiação UV/Vis (SAMEENOI *et al.*, 2013; DOU *et al.*, 2014; CHOI *et al.*, 2015; LINNES *et al.*, 2016).

Levando em consideração os benefícios da utilização do papel como substrato, em 2015, Connelly e colaboradores descreveram em seu trabalho o desenvolvimento de um dispositivo multicamadas, a base de papel, utilizado para a detecção do gene *malB* de *Escherichia coli* em amostras de plasma humano. O dispositivo integrou as etapas de preparação da amostra, amplificação isotérmica de DNA por LAMP e detecção visual no ponto final da reação pela adição de SYBR Green diretamente na matriz de papel, apresentando limite de detecção de 5 células de *E. coli* por reação

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Este trabalho tem por objetivo o desenvolvimento de metodologias para diagnóstico molecular da dengue e zika por transcrição reversa seguida da amplificação isotérmica de DNA (RT-LAMP) em uma plataforma a base de papel capaz de realizar várias etapas do processo de diagnóstico molecular, permitindo a detecção visual e obtenção rápida do resultado final.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a detecção visual diretamente no papel utilizando um intercalador de DNA
- Otimizar as condições experimentais para amplificação do DENV e ZIKV em papel.
- Desenvolver um dispositivo multicamadas com fita deslizante de simples operação e capaz de conter a evaporação da solução durante o aquecimento da reação de amplificação.
- Reduzir o tempo da reação utilizando a enzima *Bst* 3.0.
- Realizar a RT-LAMP diretamente em amostras complexa (soro de pacientes infectados com o vírus), eliminando a necessidade da etapa de extração do RNA viral.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais e Reagentes

O papel Whatman FTA[®] e a albumina de soro bovina (BSA) foram obtidos junto à GE Healthcare (Amersham, UK). As folhas de poliéster foram adquiridas junto à 3 M (São Paulo, SP, Brasil). As enzimas SuperScript[™] III *Reverse Transcriptase* e RNase Out, o reagente DTT (ditiotreitól) e o marcador de tamanhos de DNA 100 pb DNA *ladder* foram obtidos junto à Invitrogen/Life Technologies (Foster City, CA). As enzimas *Bst* 2.0 e *Bst* 3.0, sulfato de magnésio (MgSO₄) e o tampão foram obtidos junto à New England Biolabs (Ipswich, MA). Água ultrapura (Progard[®]2 Millipore) foi utilizada no preparo das soluções. Os dNTP's foram obtidos junto à Ludwig Biotech (Alvorada, RS). A betaína, o etanol, o Hidroclorato de Guanidina (GuHCl), a água milipore, o Tris(hidroximetil)aminometano (Tris) e o etilenodiaminotetracético (EDTA) foram obtidos junto à Vetec/Sigma-Aldrich (St Louis, MO). As partículas de sílica magnéticas (Magnesil[®]) foram obtidas junto à Promega (Madison, WI). A Proteínase K (20 mg mL⁻¹) foi obtida junto à Qiagen (Valência, CA). Triton X-100 foi adquirido junto à Usb Corporation (Cleveland, OH).

3.2 Amostras

As amostras positivas de soro provenientes de indivíduos com suspeita de infecção pelo DENV e ZIKV, em investigação epidemiológica de 2010 a 2013, foram cedidas pelo laboratório de Virologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás (UFG). Os casos positivos foram previamente confirmados por Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR)

3.2.1 Extração de RNA viral

Os experimentos iniciais foram realizados utilizando RNA pré-purificado de DENV e ZIKV, obtido por meio da extração dinâmica em fase sólida em microtubo. Inicialmente realizou-se a lise celular, no qual 3 μL de soro foram pipetados e transferidos para um microtubo e posteriormente pipetou-se também 2,5 μL de proteinase K (20 mg mL^{-1}) e 8 μL da solução GuHCl 6 mol L^{-1} pH 6,0 com 1 % de triton X-100. A solução resultante foi submetida à agitação em vórtex e incubada a 56°C por 10 minutos. Posteriormente, neste tubo foram adicionados 12 μL de partículas de sílica magnéticas em solução de GuHCl 6 mol L^{-1} pH 6,0 e 10 μL da solução de GuHCl 6 mol L^{-1} pH 6,0 e submetido a agitação em vórtex. Após a agitação, com o auxílio de um ímã as partículas magnéticas foram retidas e o sobrenadante foi removido e descartado com o auxílio de uma micropipeta. As partículas foram lavadas com etanol 80% por duas vezes e submetidas ao aquecimento a 56°C , com o microtubo aberto, para a remoção de resíduos de etanol. Na sequência 15 μL de água ultrapura foram adicionadas às partículas magnéticas, que foram agitadas em vórtex por 3 minutos e com o auxílio do ímã o sobrenadante, contendo o RNA purificado, foi coletado com uma micropipeta, transferido para um novo microtubo e quantificado com a utilização do espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

3.3 Desenvolvimento dos dispositivos de poliéster-toner para acomodação do papel

3.3.1 Dispositivo provisório

Inicialmente para a realização da RT-LAMP para detecção do vírus foi desenvolvido um dispositivo de poliéster-toner capaz de acomodar o papel em seu interior, de modo a evitar a evaporação da solução, permitindo a realização dos primeiros testes. Os dispositivos foram fabricados seguindo a metodologia proposta

no trabalho de Duarte e colaboradores (2011), no qual utilizam impressora a laser (HP laser Jet P4014n) para depositar toner sob a superfície das folhas de poliéster e também faz uso de uma cortadora a laser de CO₂ (Red Sail laser, modelo M500) para recortar a estrutura necessária à fabricação do dispositivo.

Na Figura 15 observa-se a composição do dispositivo proposto, sendo a camada (A) referente à base do dispositivo, constituída pelo filme de poliéster. Em (B) tem-se a presença de 3 filmes de poliéster recobertos com toner. Nessas camadas, uma área central de 64 mm² foi recortada com o auxílio de uma cortadora a laser de CO₂, permitindo a inserção do disco de papel. Em (C) tem-se a tampa do dispositivo constituído também de poliéster e contendo um orifício para permitir que a mistura reacional seja adicionada ao papel. Após o alinhamento das diferentes camadas, o disco de papel foi introduzido no local apropriado e então efetuou-se a laminação, a 180 °C.

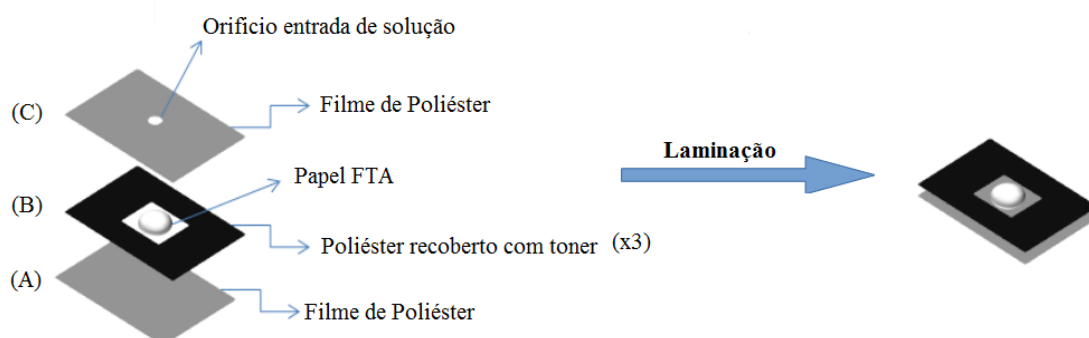


Figura 15 – Esquema de fabricação do dispositivo utilizado inicialmente nos testes da RT-LAMP diretamente no papel. (A) filme de poliéster utilizado como base; (B) filmes de poliéster recobertos com toner, com interior recortado para acomodação do disco de papel; (C) filme de poliéster utilizado como topo. As camadas foram alinhadas juntamente com o disco de papel e submetidas à laminação, gerando o dispositivo pronto para uso.

3.3.2 Dispositivo de fita deslizante

Para facilitar a operação do microdispositivo, foi desenvolvido posteriormente um dispositivo de fita deslizante. A fabricação do dispositivo de fita deslizante foi seguido à metodologia de fabricação proposta por Duarte e colaboradores (2011), necessitando de uma impressora a laser, para depositar o toner nos filmes de poliéster, e de uma cortadora a laser de CO₂, para recortar a área

necessária à fabricação do dispositivo. As camadas representadas em (B) são filmes de poliéster recobertos com toner. Essas camadas foram recortadas com o auxílio da cortadora a laser de CO₂ para criar o canal para inserção da fita deslizante. Por fim, a camada (C) corresponde ao topo do dispositivo, constituído por um filme de poliéster com um orifício em sua superfície, para permitir a adição dos reagentes. A fita deslizante representada em (D) é constituída por um filme de poliéster, fixado em sua extremidade a um disco de papel FTA com 6 mm de diâmetro, onde será realizada a reação de amplificação de DNA. As camadas (A), (B) e (C) são alinhadas e submetidas ao processo de laminação a 180 °C e, posteriormente, a fita deslizante é adicionada ao espaçamento gerado pelas camadas em (B), sendo representado em (E) o dispositivo pronto.

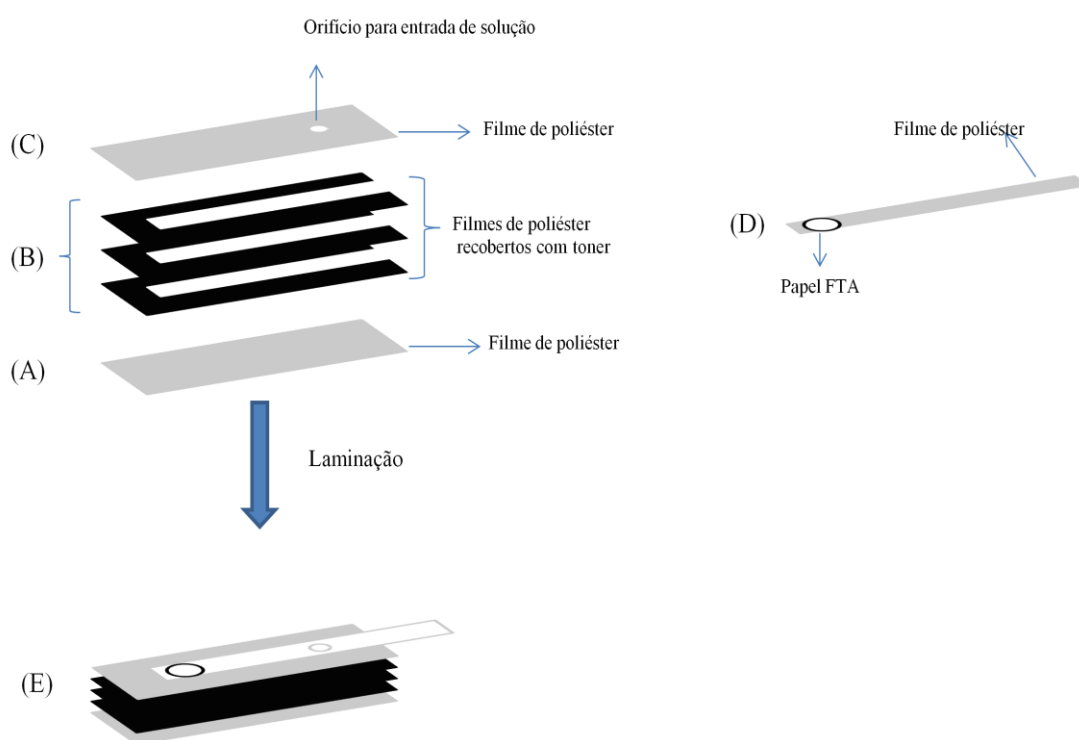


Figura 16 – Esquema de fabricação do dispositivo de fita deslizante. (A) base do dispositivo; (B) camadas de poliéster recobertas com toner, com corte no interior para inserção da fita deslizante; (C) topo do dispositivo; (D) composição da fita deslizante e (E) dispositivo pronto, obtido após alinhamento e laminação das camadas (A), (B) e (C) com posterior inserção da fita deslizante.

3.4 Transcrição reversa seguida pela Amplificação Isotérmica Mediada por *Loop* (RT-LAMP) em única etapa

A sequência dos iniciadores utilizados na realização da RT-LAMP para detecção do vírus DENV-1 foi baseada no trabalho de Parida e colaboradores (2005), enquanto que a sequência dos iniciadores para o ZIKV se baseou no trabalho de Tian e colaboradores (2016), que descrevem os iniciadores externos, interno e de *loop*, como apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 – Sequência dos iniciadores utilizados na RT-LAMP para do DENV-1 e para o ZIKV

<u>DENV-1</u>	
Iniciador	Sequência 5' → 3'
F3	GAGGCTGCAAACCATGGAA
B3	CAGCAGGATCTCTGGTCTCT
FIP	GCTGCGTTGTGTCTTGGGAGGTTTTCTGTACGCATGGGGTAGC
BIP	CCCAACACCAGGGGAAGCTGTTTTTTTGTGTTGTGCGGGGG
FLP	CTCCTCTAACCCTAGTC
BLP	GGTGGTAAGGACTAGAGG
<u>ZIKV</u>	
Iniciador	Sequência 5' → 3'
F3	CGGATGGGATAGGCTCAAAC
B3	ATGGACCTCCCGTCCTTG
FIP	CCTGAGGGCATGTGCAAACCTAGAATGGCAGTCAGTGGAGAT
BIP	ACCCTCAACTGGATGGGACAACTGGAGCTTGTTGAAGTGGTG
FLP	CATCAATTGGCTTCACAACGC
BLP	GGAAGAAGTTCCGTTTGTCTC

A mistura reacional utilizada para amplificação do DENV-1 e do ZIKV, via RT-LAMP, foi feita contendo 0,2 µM de cada iniciador externo (F3 e B3); 1,6 µM de cada iniciador interno (FIP e BIP); 0,8 µM de cada iniciador de *loop* (LF e LB); 1 µM betaína; 8 mM de MgSO₄; 0,2 mM de cada dNTP; 2 mM DTT; 1,6 U/µL

SuperScript™ III *Reverse Transcriptase*; 0,16 U/μL Rnase Out; 1 U/μL *Bst* 2.0 DNA polimerase; 0,64 U/μL *Bst* 3.0 DNA polimerase; 1X Tampão de amplificação isotérmica (20 mM Tris-HCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 0,1% Triton® X-100). Nas reações positivas adicionou-se RNA pré-purificado em concentrações variadas ou soro de pacientes infectados no volume de 1 μL. Nos controles negativos substituiu-se o RNA ou soro por água ultrapura. Em cada ensaio, 10 μL da mistura reacional foram adicionados ao disco papel, com 6 mm de diâmetro, e submetidos ao banho seco em um termobloco (Major Science, Saratoga, CA) a 65 °C durante 60 minutos.

3.5 Extração dos fragmentos de DNA do papel

Para a realização da extração dos fragmentos de DNA amplificados, o papel foi retirado do chip após o final da reação de RT-LAMP e inserido em um microtubo do tipo Eppendorf com capacidade para 0,2 mL. Posteriormente, ao tubo foi adicionado 15 μL de água ultrapura, efetuando-se a maceração do papel com a ponteira utilizada na adição da água, submetendo-o a 2 minutos de vórtex. Na sequência, perfurou-se o fundo do microtubo com uma agulha e o inseriu a um microtubo de maior capacidade para realização da centrifugação. A perfuração do microtubo juntamente com a centrifugação permitiu o deslocamento da solução em contato com o papel para o outro tubo contendo os fragmentos de DNA em solução, possibilitando a análise desta solução por eletroforese em gel de agarose.

3.6 Detecção dos fragmentos de DNA amplificados por RT-LAMP

3.6.1 Eletroforese em gel de agarose

A análise por eletroforese em gel de agarose foi realizada de acordo com o protocolo proposto por Lee e colaboradores 2012. Dessa forma, o gel foi preparado a

2 % (m/v) em Tris-EDTA-Borato (TEB) 0,5 %, e aquecido em micro-ondas em intervalos de 15 segundos para a completa dissolução da agarose. Posteriormente, adicionou-se GelRed -Biotium® a uma concentração de 65X.

Após a polimerização, o molde foi retirado e o gel foi adicionado a uma cuba eletroforética na presença do tampão TEB 0,5% em volume suficiente para cobrir o gel. Em seguida as amostras e o marcador de tamanhos de DNA foram adicionados aos respectivos poços e submetidos a aplicação de uma diferença de potencial de 100 volts durante aproximadamente 60 minutos para a separação dos diferentes tamanhos de fragmentos. Na sequência, o gel foi retirado da cuba eletroforética e submetido a um transiluminador UV (GE Healthcare lifesciences) para visualização dos fragmentos produzidos pela RT-LAMP.

3.6.2 Detecção visual *on-chip* com SYBR Green

A detecção visual dos fragmentos de DNA amplificados pela RT-LAMP foi realizada diretamente no papel pela adição de SYBR Green na diluição de 1:100 em água ou polietilenoglicol (PEG), adicionando 10 µL da solução ao disco de papel ao final das reações. Após ser submetido à radiação UV e emitir fluorescência, as imagens foram capturadas por meio de câmeras de smartphone ou pelo fotodocumentador (GE Healthcare lifesciences) e posteriormente foram analisadas a olho nu e/ou pelo software ImageJ.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo do tipo de papel utilizado como substrato para a reação de amplificação isotérmica de DNA

A primeira etapa deste trabalho consistiu na avaliação de diferentes tipos de papéis para o desenvolvimento da RT-LAMP. Foram testados desde papéis de filtro

comuns até papéis específicos para biologia molecular. Avaliou-se papéis de uso comum em laboratório, como os papéis-filtro quantitativo JP 40, 41 e 42, o papel cromatográfico 1Chr e avaliou-se também a utilização de um papel próprio para colheita, transporte, e isolamento de ácidos nucleicos, o papel FTA[®] (Figura 17). Todos os papéis foram cortados em forma de discos com 6 mm de diâmetro e sobre cada um foi adicionada a solução do intercalador SYBR Green na diluição de 1:40 em água.

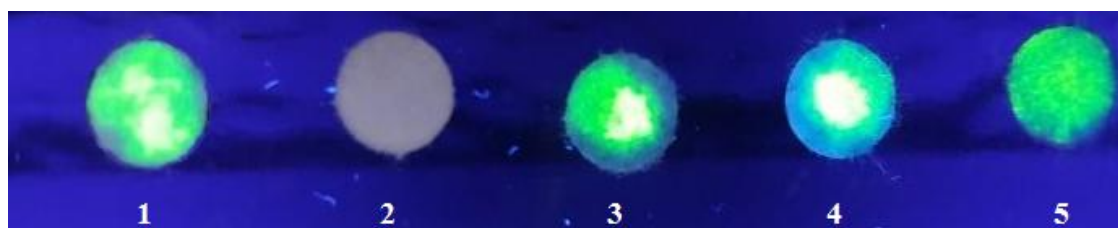


Figura 17 – Avaliação da interação do intercalador SYBR Green com diferentes tipos de papéis. (1) papel cromatográfico 1 Chr, (2) papel FTA e papéis filtro-quantitativo JP 40, 41 e 42, correspondendo à (3), (4 e (5).

Como pode ser observado na Figura 17, dentre os papéis avaliados apenas o papel FTA não apresentou fluorescência na presença apenas do intercalador. Dessa forma, para a realização das próximas etapas do estudo de desenvolvimento da RT-LAMP diretamente no substrato de papel, optou-se pela utilização do papel FTA.

4.2 Detecção dos produtos de RT-LAMP no papel FTA

A detecção visual a partir da fluorescência gerada pela adição do SYBR Green após o término da reação no ensaio positivo realizado no papel FTA, seria capaz de fornecer resultados referentes à interação intercalador-DNA, uma vez que neste papel foi constatado a ausência de interação do substrato com o intercalador SYBR Green. Dessa forma, foram realizadas reações positivas e negativas diretamente no papel FTA inicialmente inseridos dentro de um microtubo que foi fechado e levado a aquecimento em termobloco por 60 min. Após o final da reação, os discos de papel foram retirados do microtubo e adicionado a cada um 5 µL do

intercalador de DNA (na diluição de 1:40 em água) para realização da detecção visual.

Porém, observou-se que os ensaios positivos e negativos produziram fluorescência apenas tardiamente (10 minutos após adição do intercalador), apresentando ainda indistinção entre os ensaios, quando submetidos à radiação UV. Além disso, observou-se que o aquecimento do microtubo provocou a evaporação da solução que havia sido adicionada ao papel, concentrando-se na tampa do tubo. Com o intuito evitar a evaporação da solução presente no papel, utilizou-se um dispositivo multicamadas de poliéster-toner para acomodar o papel em seu interior, desenvolvido como descrito na Seção 3.3.1. Nesse primeiro protótipo o papel era inserido dentro do dispositivo antes da laminação.

Após o desenvolvimento deste primeiro protótipo do dispositivo, foram realizadas reações positivas e negativas no papel, adicionando 10 μ L da mistura reacional através do orifício de entrada de solução, que foi posteriormente vedado com fita adesiva, para evitar a evaporação da solução, e aquecido à 65 °C por 60 minutos. Ao término da reação o dispositivo foi aberto e 5 μ L do intercalador SYBR Green (diluição de 1:40 em água) foram adicionados ao disco de papel, que foi em seguida submetido à radiação UV, apresentado fluorescência tardia, observada somente 10 minutos após a adição do intercalador, e ainda indistinguível entre as reações positiva e negativa.

O volume do intercalador utilizado para realização da detecção visual não permitiu observar a fluorescência em todo disco de papel, restringindo-se apenas à região central onde o intercalador foi adicionado. Para que fossem possíveis o recobrimento e a visualização de fluorescência em toda a superfície do papel, optou-se pela utilização de um volume de 10 μ L da solução do intercalador, na diluição de 1:100, como proposto por Connelly e colaboradores (2015).

Após efetuar a alteração do volume da solução do intercalador observou-se a necessidade de um longo tempo de espera para a visualização de fluorescência. Para verificar exatamente o tempo necessário para a emissão da fluorescência nos discos de papel após a adição do SYBR Green, realizou-se novamente uma reação positiva, e após o término da reação foi adicionado ao papel os 10 μ L de SYBR Green. Mediante a utilização de um fotodocumentador, houve a possibilidade de aquisição da fluorescência emitida pelo disco de papel, expressa em escala de cinza. A

fluorescência foi observada durante 90 minutos, sendo registrada a cada 3 minutos, e posteriormente analisada pelo software ImageJ, para avaliação do comportamento da fluorescência em função do tempo após a adição do intercalador (Figura 18).

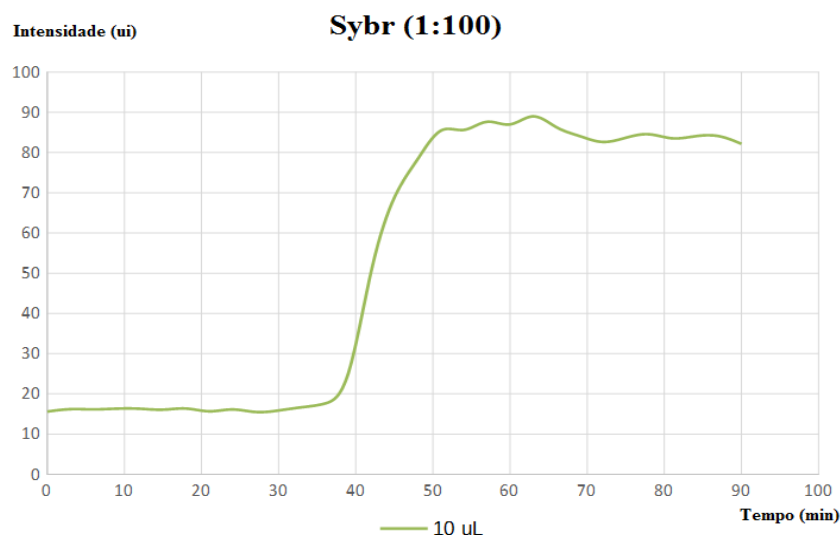


Figura 18 – Comportamento intensidade da fluorescência mediante adição do intercalador SYBR Green ao disco de papel contendo DNA amplificado.

Pode-se observar que nos primeiros 30 minutos após a adição do intercalador o comportamento do papel permaneceu praticamente o mesmo, não sendo observada fluorescência nesse intervalo de tempo. A partir do minuto 36, é possível observar o acréscimo do valor de intensidade, alcançando o valor máximo aos 63 minutos. Dessa forma concluiu-se que a adição de 10 μ L do intercalador na diluição de 1:100 em água não permitiu a visualização imediata de fluorescência no disco de papel. Esse longo tempo de espera para o aparecimento da fluorescência no papel não é interessante para detecção visual, uma vez que o intuito deste tipo de detecção é justamente a economia de tempo necessário para obtenção do resultado final. O ideal é que a fluorescência seja visualizada imediatamente após a adição do intercalador, para que seja possível o desenvolvimento de uma metodologia rápida e sensível de detecção de patógenos, que é o objetivo deste trabalho.

4.2.1 Modificações na solução do intercalador

Com o intuito de observar a fluorescência imediatamente após a adição do intercalador foram realizados testes, baseado no trabalho de Dragan e colaboradores (2012) que descreveram o aumento da intensidade da fluorescência, em até 200 vezes quando solventes mais viscosos que a água são utilizados no preparo das soluções de SYBR Green. Os autores relatam que o aumento da fluorescência em solventes viscosos é conseguido devido à diminuição do número de colisões das moléculas, ocasionando a diminuição do efeito de supressão colisional e, consequentemente, aumentando a fluorescência.

Para verificar o efeito da viscosidade para obtenção de fluorescência, utilizou-se como solvente viscoso o Polietilenoglicol (PEG), que é 100 vezes mais viscoso que a água. Dessa forma, para variar a viscosidade das soluções do intercalador, foram preparadas soluções do intercalador (mantendo a diluição de 1:100) alterando a proporção PEG/água em 10/90, 30/70, 50/50, 70/30 e 100/0. Posteriormente, foram adicionados 10 µL das respectivas soluções do intercalador aos discos de papel que continham DNA proveniente da reação de amplificação e a fluorescência foi obtido pelo uso do fotodocumentador, como apresentado na Figura 19, imediatamente após a adição das soluções aos discos de papel.



Figura 19 – Avaliação do efeito do aumento da viscosidade da solução do intercalador SYBR Green na detecção visual, por meio da alteração na proporção PEG/água. Imagem obtida imediatamente após a adição do intercalador.

É possível observar que o aumento da viscosidade da solução do intercalador permitiu a obtenção de fluorescência mais intensa. As soluções do intercalador com razões 10/90 e 30/70 não permitiram a visualização imediata da fluorescência, a qual só foi observada nas soluções com razões 50/50, 70/30 e 100/0. A partir do sinal mais intenso obtido, mediante a utilização da solução do intercalador mais viscoso, efetuou-se uma reação de amplificação no papel e após o término da reação foi adicionado ao papel os 10 µL de SYBR Green em PEG (1:100). Mediante a utilização de um fotodocumentador, a fluorescência foi observada durante 90 minutos, sendo registrada a cada 3 minutos, e posteriormente analisada pelo software ImageJ, para avaliação do comportamento da fluorescência em função do tempo após a adição do intercalador (Figura 20).

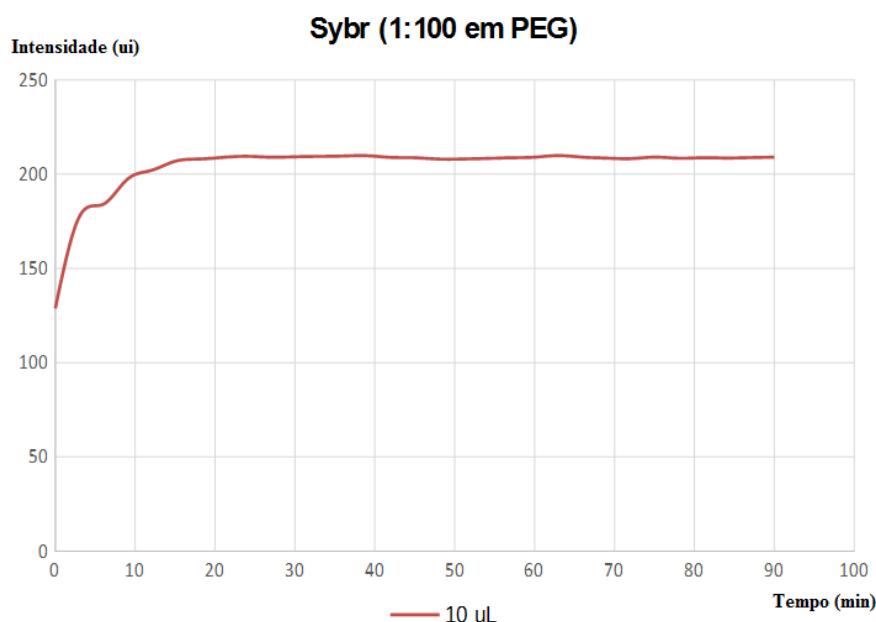


Figura 20 – Comportamento intensidade da fluorescência mediante adição do intercalador SYBR Green, diluído em PEG, ao disco de papel contendo DNA.

Nota-se que o a alteração da viscosidade do intercalador provocou tanto o aumento da intensidade da fluorescência quanto à diminuição do tempo necessário para visualização da fluorescência. A partir desses resultados verificou-se que a utilização de SYBR Green diluído em PEG proporcionou um aumento de intensidade após da adição do intercalador, de aproximadamente 2 vezes, relativamente à utilização da água como solvente. A utilização do PEG como solvente possibilitou a detecção imediata do DNA presente no disco de papel, contudo, as reações positivas

e negativas continuavam a apresentar resultados similares, os quais poderiam ser ocasionados pela presença de um resultado falso-positivo.

4.2.2 Verificação da ocorrência resultados falso-positivos

A obtenção de fluorescência nos ensaios positivos e negativos, excluída a interação entre o papel e o intercalador, poderia estar relacionada à presença de falso-positivos, como mencionado anteriormente. As principais causas apontadas para o problema dos falso-positivos, de acordo com Kil e colaboradores (2015), está relacionado à contaminação de reagentes, pipetas, superfícies no espaço de trabalho, ocasionados por aerossóis de fragmentos de DNA oriundos de reações de amplificação anteriores. (JOON, *et al.*, 2017; MA *et al.*, 2017 a). Dessa forma, realizou-se a troca de todas as alíquotas dos reagentes que estavam em uso por alíquotas novas, além de efetuar as reações positivas e negativas em ambientes diferentes, de modo a evitar a contaminação com produtos de amplificação dispersos no ar.

Apesar da mudança de todos os reagentes e cuidados na manipulação das soluções o problema do falso-positivo persistiu. Desta forma, buscou-se a otimização da composição química da mistura reacional para RT-LAMP em substrato de papel, de modo a melhorar a eficiência da reação e eliminar a ocorrência de falso-positivos.

Nesse sentido, otimizou-se a concentração de betaína e dNTP's, avaliou-se o uso de dois diferentes tipos de enzimas *Bst* DNA polimerase (2.0 e 3.0) e o tempo de reação.

4.2.3 Otimização da concentração de betaína

Connelly e colaboradores (2015) descreveram em seu trabalho a necessidade em efetuar a otimização da concentração da betaína, que é frequentemente utilizada como aditivo nas reações de amplificação isotérmicas (MA *et al.*, 2017 b), evitando a formação de produtos inespecíficos. Para determinar a concentração ideal de betaína, reações com 0,25 – 0,50 – 1,0 – 1,5 e 1,75 mol L⁻¹ foram estudadas, mantendo a

concentração dos demais reagentes inalteradas. As reações negativas e positivas foram realizadas em papel, e incubadas a 65 °C por 60 min. Após o término da reação, os dispositivos foram abertos, sendo adicionado 10 µL do intercalador SYBR Green (1:100 em PEG) e as imagens foram adquiridos através do fotodocumentador e, posteriormente, analisadas pelo software ImageJ. Os resultados são mostrados na Figura 21.

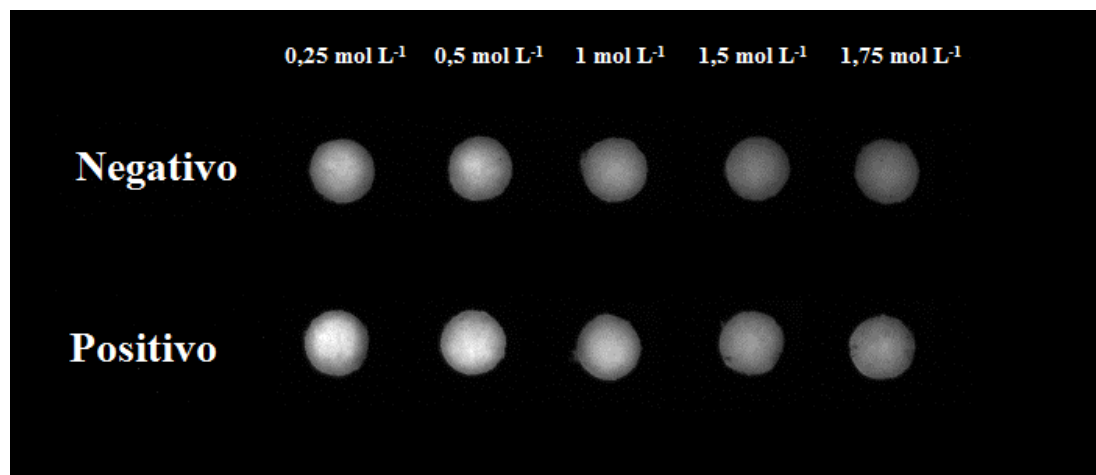


Figura 21 – Avaliação da influência da concentração de betaína na diminuição de falsos-positivos para o DENV-1.

A partir da análise dos resultados foi observado que o aumento da concentração de betaína acima de 1 mol L⁻¹ provocou à diminuição da intensidade de ambas as reações, negativas e positivas, aumentando a similaridade entre os ensaios. A utilização de concentrações de betaína inferiores a 1 mol L⁻¹ apresentou melhores resultados, pois obteve-se maiores diferenças entre as reações positivas e negativas, após análise pelo software, sendo determinada a utilização de betaína a 0,5 mol L⁻¹ como a concentração ideal na mistura reacional.

4.2.4 Otimização da concentração de dNTP's

Tendo-se determinada a concentração ideal de betaína, procedeu-se a otimização da concentração dos desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs). Para determinar a concentração ideal dos dNTP's no disco de papel, reações com 0,1 - 0,15 - 0,2 - 0,3 e 0,4 mmol L⁻¹ foram estudadas, mantendo-se constantes as concentrações dos demais reagentes. Após análise pelo ImageJ, observa-se na Figura

22 que nas concentrações de 0,1 e 0,15 m mol L⁻¹ de dNTP's as reações praticamente não emitiram fluorescência, indicando que as reações não tiveram êxito. Em contrapartida, nas concentrações de 0,3 e 0,4 mmol L⁻¹ pode-se observar o aumento da fluorescência no ensaio negativo, se aproximando a fluorescência do ensaio positivo e, conseqüentemente, comprometendo a diferenciação dos ensaios. Pode-se observar ainda que a utilização dos dNTP's à 0,2 mmol L⁻¹ apresentou maior distinção entre as reações negativa e positiva, possibilitando a diferenciação entre os ensaios.

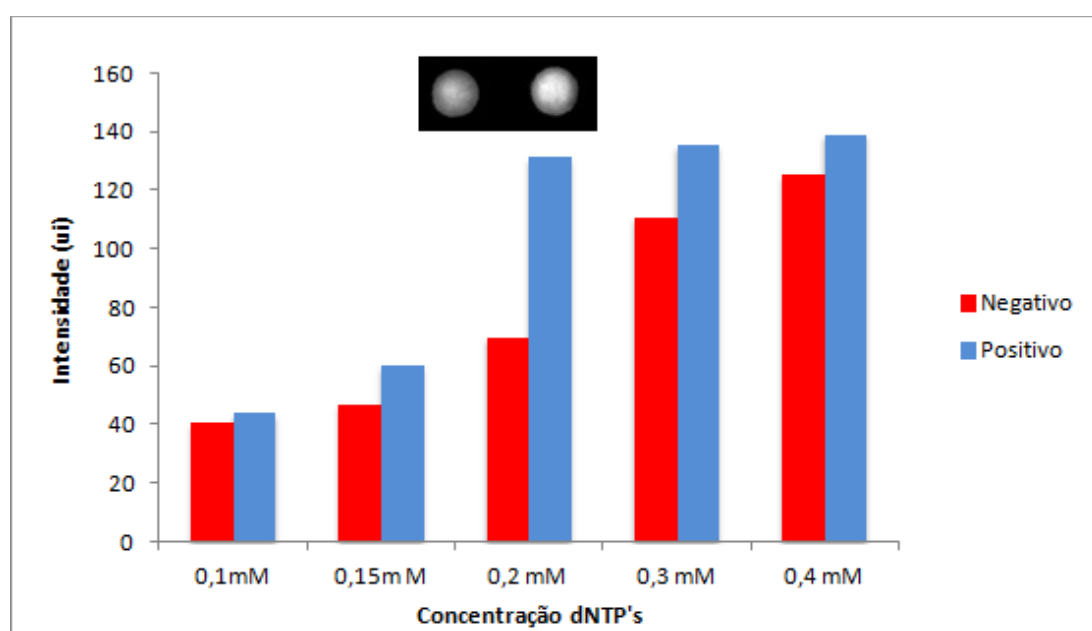


Figura 22 – Comportamento das reações negativas e positivas no papel, mediante a variação na concentração dos dNTP's, para o DENV-1.

4.2.5 Avaliação sobre o tipo de *Bst* DNA polimerase

Oliveira e colaboradores (2017) descreveram em seu trabalho a avaliação do uso de dois tipos de *Bst* DNA polimerase: a *Bst* e a *Bst* 2.0. A intenção era reduzir o tempo de reação pela utilização de uma enzima com maior potencial de deslocamento de cadeia e amplificação de DNA, o que foi conseguido pela utilização da *Bst* 2.0, reduzindo o tempo reacional de 120 para 60 minutos.

Recentemente, foi desenvolvida pela New England BioLabs uma nova enzima, resistente à ação de inibidores e com potencial de deslocamento de cadeia e amplificação de DNA superiores, possuindo atividade diretamente em amostras de DNA e RNA: a *Bst* 3.0 (NEB, 2018 a). O aumento da capacidade de amplificação também provoca uma diminuição no tempo necessário para obtenção de resultados em relação a *Bst* 2.0, requerendo de 30-60 minutos (TIAN et al., 2016; NEB, 2018 b). Pelo fato de agir diretamente em amostras contendo RNA, a utilização da *Bst* 3.0 para a realização da RT-LAMP proporciona o desenvolvimento de metodologias simples, utilizando uma única enzima, o que também diminui os custos com reagentes, por não requerer a utilização da enzima transcriptase reversa.

Dessa forma, procedeu-se à avaliação das enzimas *Bst* 2.0 e *Bst* 3.0 na realização da RT-LAMP. Na Tabela 2 encontram-se as condições experimentais empregadas a cada enzima, sendo utilizadas para a *Bst* 2.0 as condições experimentais descritas no item 3.4 e para a *Bst* 3.0, as condições propostas no protocolo da New England Biolabs e apresentada na Tabela 2.0.

Tabela 2- Condições experimentais para as enzimas *Bst* 2.0 e *Bst* 3.0 na mistura reacional

Reagentes	<i>Bst</i> 2.0	<i>Bst</i> 3.0
	Concentração da mistura reacional	
F3 e B3	0,2 µM	0,2 µM
FIP e BIP	1,6 µM	1.6 µM
LF e LB	0,8 µM	0,8 µM
Tampão	1X	1X
MgSO₄	8 mM	8 mM
dNTP	0,2 mM	1,4 mM
Betáína	0,5 M	-
Super Script	1,6 U/µL	-
RNase	0,16 U/µL	-
DTT	2 mM	-

<i>Bst</i>	1,0 U/ μ L	0,64 U/ μ L
RNA	1,0 ng/ μ L	1,0 ng/ μ L

Nesse estudo, foram avaliados tempos de reação de 30, 45 e 60 minutos para ambas as enzimas. As reações foram realizadas em papel, e incubadas a 65 °C. Após o término da reação, os dispositivos foram abertos, sendo-lhes adicionado 10 μ L do intercalador SYBR Green (1:100 em PEG) e as imagens foram adquiridas utilizando-se do fotodocumentador e, posteriormente, analisadas pelo software ImageJ. Os resultados são apresentados na Figura 23.

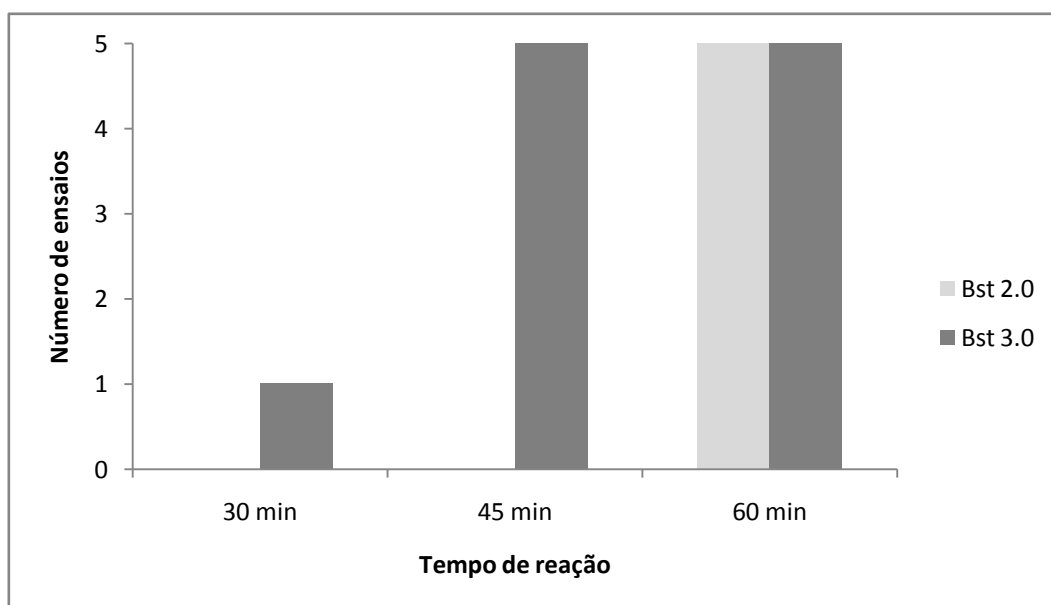


Figura 23 – Estudo da utilização das enzimas *Bst* 2.0 e *Bst* 3.0 em tempos de reação de 30, 45 e 60 minutos no substrato de papel.

Pela análise dos resultados, constatou-se o potencial de amplificação da enzima *Bst* 3.0 na redução do tempo necessário para obtenção dos produtos de amplificação, sendo possível o sucesso de 100% dos ensaios ($n=5$) com 45 minutos de reação. O comportamento da *Bst* 2.0 foi concordante com o trabalho de Oliveira e colaboradores (2017), possibilitando a detecção somente aos 60 minutos de reação. Observa-se ainda a necessidade de utilização de concentrações mais altas da *Bst* 2.0 ($1 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$) para a realização da RT-LAMP em papel, enquanto que a utilização da *Bst*

3.0 permite a utilização de concentrações mais baixas ($0,64 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$), diminuindo os custos com a reação.

4.3 Avaliação do dispositivo de Fita Deslizante para realização da RT-LAMP

Após a otimização dos parâmetros experimentais para a realização da RT-LAMP em substrato de papel, buscou-se melhorar o dispositivo, deixando-o de mais fácil operação, de modo a facilitar a adição dos reagentes e a detecção visual. Inicialmente, o dispositivo de PeT para acomodar o substrato de papel tinha seu reservatório vedado com fita adesiva para evitar evaporação da solução e ao final da reação a fita era retirada e o dispositivo aberto para retirada do papel e realização da detecção visual. Para facilitar a operação, desenvolveu-se o dispositivo de PeT de fita deslizante, onde o substrato de papel é fixado na extremidade da fita que desliza dentro da plataforma para duas regiões diferentes: a posição 1 na qual o papel é alinhado com o reservatório para adição dos reagentes, e a posição 2 que corresponde a região fechada do dispositivo para prevenir a evaporação da solução durante o aquecimento da reação, dispensando nesse caso o uso de fita adesiva para vedar o reservatório (Figura 24).

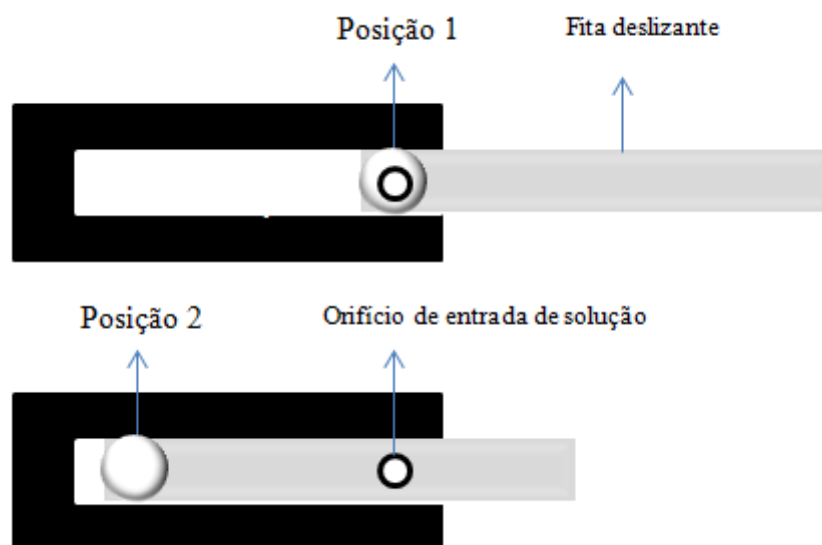


Figura 24 – Esquema das posições do dispositivo de fita deslizante. Posição 1 refere-se à região de adição dos reagentes e a posição 2 à região de prevenção da evaporação durante o aquecimento da reação.

Primeiramente buscou-se então avaliar a eficiência do dispositivo em evitar a evaporação da solução. Para isso, foram realizados testes adicionando-se 5, 10 e 15 μL de água ao disco de papel, sendo este submetido às condições de aquecimento da RT-LAMP. Observou-se ao final do experimento, que a utilização de um volume de 5 μL fez com que o papel secasse completamente, evidenciando a perda total da água por evaporação. Utilizando 15 μL , observou-se ao final do tempo de incubação o comprometimento da mobilidade da fita deslizante no interior do dispositivo, devido a aderência da fita deslizante às camadas internas do topo e da base. A utilização de 10 μL demonstrou ser o volume ideal, pois permitiu que o disco de papel continuasse úmido após o aquecimento, sem comprometer a mobilidade da fita deslizante.

Em seguida, procedeu-se à quantificação do volume de solução evaporada durante os 45 minutos de aquecimento, determinando-se a variação da massa de água adicionada ao disco de papel, antes e depois de ser submetido ao aquecimento (Figura 25). Para isso, inicialmente, determinou-se a massa do dispositivo de fita deslizante. Na sequência, 10 μL de água foram adicionados ao disco de papel e a fita deslizante foi empurrada para o interior do dispositivo (posição 2), sendo determinada a massa do dispositivo juntamente com a massa de água adicionada. Posteriormente, o dispositivo foi submetido ao aquecimento a 65 °C por 45 minutos e após esse processo determinou-se novamente a massa do dispositivo para verificar a quantidade de água perdida durante o aquecimento.

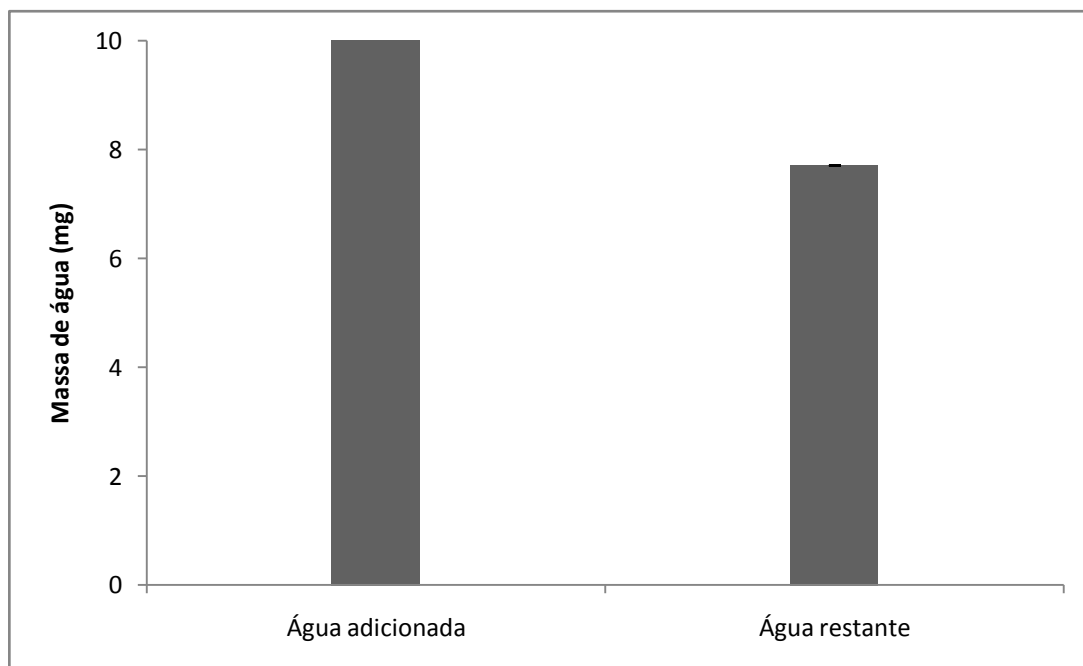


Figura 25 – Resistência à evaporação pelo dispositivo de fita deslizante ao ser submetido a 65°C por 45 minutos, permitindo a retenção de aproximadamente 75% da massa de água adicionada inicialmente ($n=5$).

Na figura acima pode-se observar a diferença da massa de água antes e após o aquecimento do dispositivo, sendo constatada a evaporação da solução, que ocorre devido o dispositivo não ser totalmente vedado do meio externo. Contudo, a configuração do dispositivo de fita deslizante demonstrou ser capaz de manter solução no disco de papel após o aquecimento, apresentando potencial para a realização da RT-LAMP. Observou-se que o dispositivo de fita deslizante ao ser aquecido, reteve em média 75% da massa de água adicionada, permitindo que o disco de papel continuasse úmido após o aquecimento.

4.3.1 Realização da RT-LAMP no dispositivo de fita deslizante

Após verificação dos fatores que poderiam comprometer a utilização do dispositivo de fita deslizante, precedeu-se à realização da RT-LAMP para detecção de DENV-1 e ZIKV diretamente nesse dispositivo. Foram realizadas reações positivas e negativas em triplicata. Para isso, foram empregadas as mesmas condições de reação expressas na Tabela 2 para a enzima *Bst* 3.0. Para detecção dos vírus DENV-1 e

ZIKV separadamente na plataforma, 10 µL da mistura reacional foram adicionados ao papel puxando a fita deslizante para a posição 1 (papel alinhado com o reservatório). Em seguida, a fita deslizante foi empurrada para a posição 2 (região fechada) para o aquecimento da reação. As reações foram incubadas a 65 °C por 45 minutos e após o tempo de incubação, a fita deslizante foi puxada para posição 1 para permitir a adição do intercalador ao disco de papel. Na sequência, os discos de papel foram submetidos à radiação UV, sendo a fluorescência capturados pela câmera de um smartphone. A Figura 26 mostra a detecção do DENV-1 e a Figura 27 mostra a detecção do ZIKV. As reações superiores são as reações negativas e as inferiores as reações positivas, para ambas as figuras.

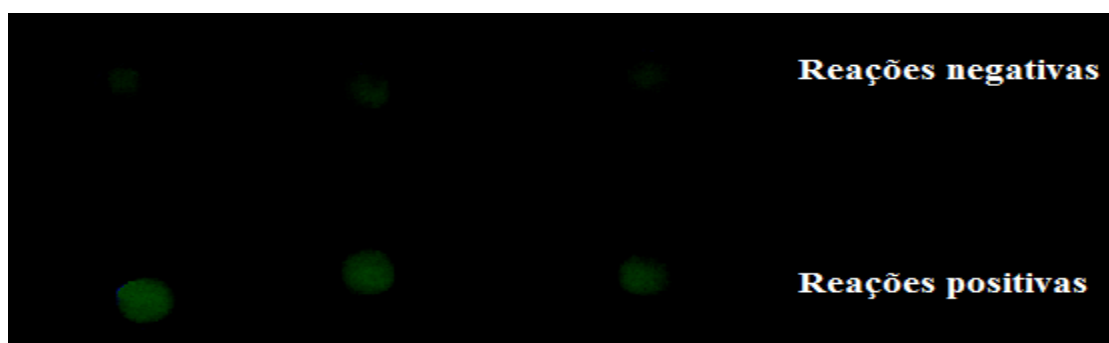


Figura 26 – Resultados da RT-LAMP no dispositivo de fita deslizante para detecção do DENV-1.

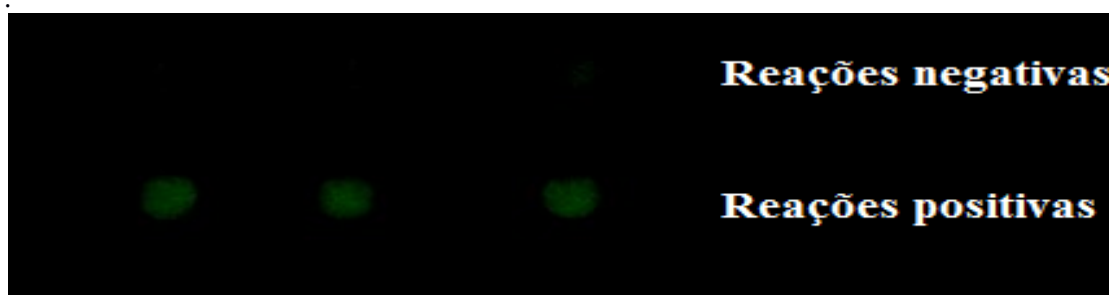


Figura 27 - Resultados da RT-LAMP no dispositivo de fita deslizante, para detecção do ZIKV.

A partir do sucesso da RT-LAMP diretamente no dispositivo de fita deslizante observou-se que mesmo com a ocorrência da evaporação de parte da solução foi possível a utilização deste dispositivo para detecção do DENV-1e do ZIKV. Ao fim da reação foi possível observar concordância entre os ensaios realizados em triplicata

e a diferenciação entre as reações positivas e negativas, verificadas visualmente pela adição do intercalador.

4.3.2 Detecção *off-chip* – Eletroforese em Gel

Nesse estudo os ensaios positivos foram realizados em triplicata no dispositivo de fita deslizante, nas mesmas condições descritas na Tabela 2 (para a *Bst* 3.0) e submetidos ao aquecimento a 65 °C por 45 minutos. Após o término da reação, efetuou-se a extração dos produtos dos discos de papel e as respectivas soluções foram analisadas por eletroforese em gel de agarose.

Na Figura 28 é possível observar no gel de agarose os fragmentos de DNA amplificados na RT-LAMP. Este experimento confirma que a fluorescência produzida na detecção visual *on-chip* é de fato proveniente da amplificação do DNA via RT-LAMP.

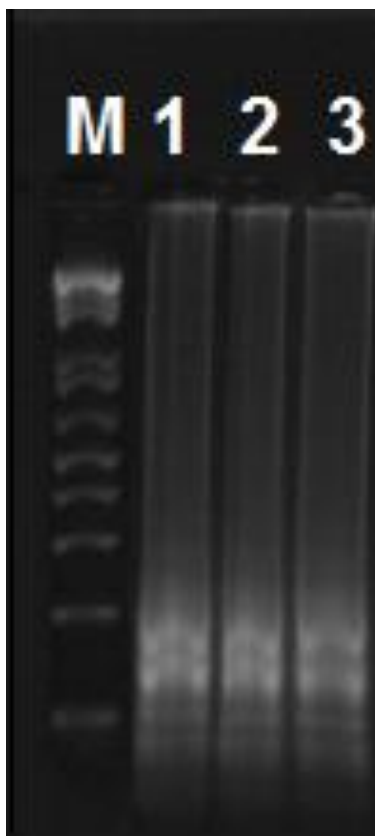


Figura 28- Análise da extração pós-amplificação por eletroforese em gel de agarose. M- marcador; 1-3 ensaios positivos.

4.3.3 Sensibilidade da RT-LAMP em papel

Para avaliar o potencial da RT-LAMP em papel partindo de um RNA alvo, testes variando a quantidade de RNA por reação foram realizados. As reações foram realizadas a partir de concentrações iniciais de RNA que variaram de 10^{-6} – $1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$. Observa-se na Figura 29 que foi possível detectar a presença do ZIKV em baixas concentrações, como $10^{-6} \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, no entanto, com essa concentração os ensaios não foram reprodutíveis, amplificando apenas 1 das 4 reações realizadas. A concentração mínima do ZIKV que permitiu a detecção em todos os ensaios utilizando o dispositivo de fita deslizante foi de $10^{-4} \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ de RNA na mistura reacional, que corresponde a $0,1 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$.

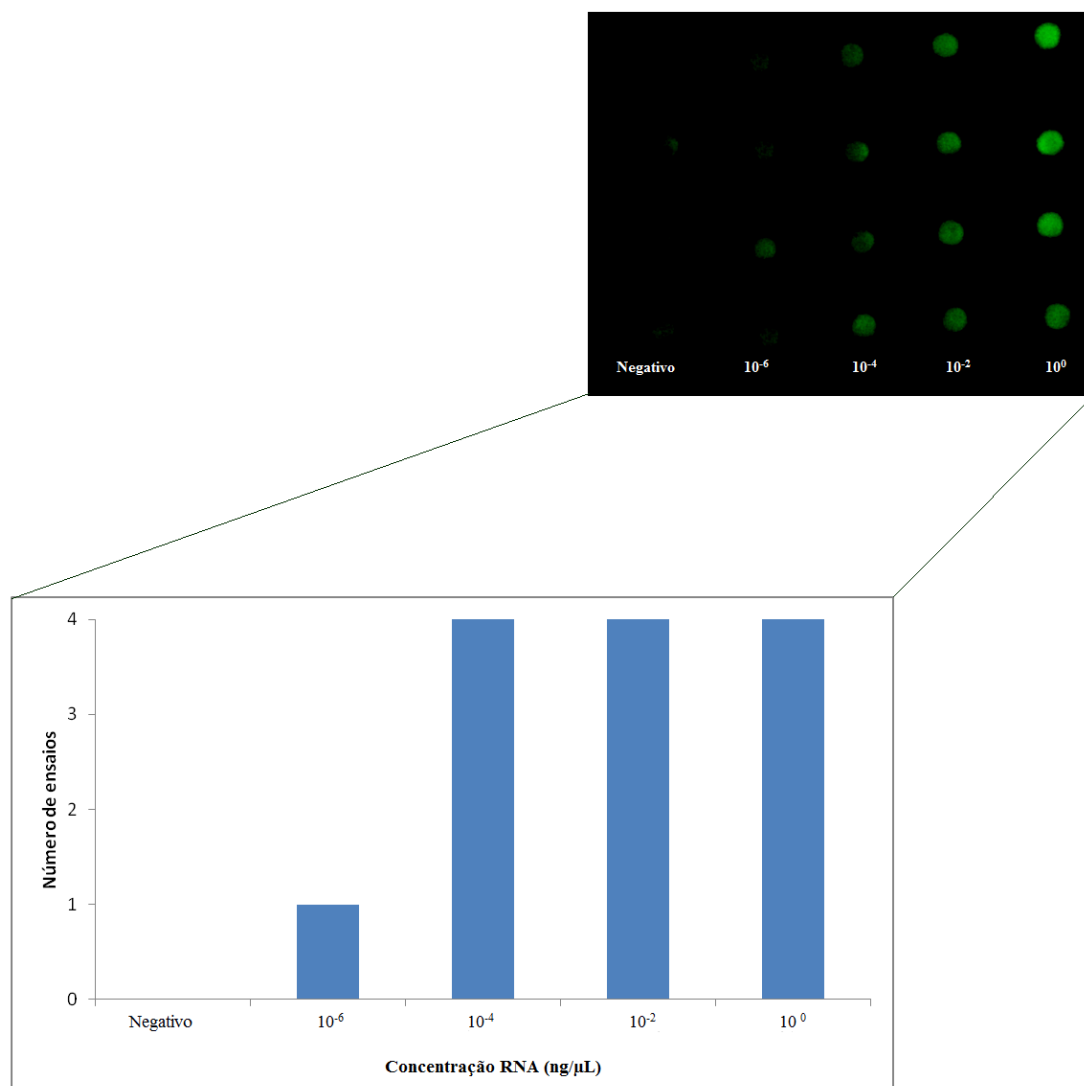


Figura 29- Limite de detecção do ZIKV por RT-LAMP nos dispositivos de fita deslizante.

A LAMP realizada em microdispositivo de PeT por Oliveira e colaboradores (20017) para detecção de *E.coli* apresentou um limite de detecção de $1 \text{ fg } \mu\text{L}^{-1}$. A RT-LAMP em papel apresentou um limite de detecção 100 vezes maior, porém devemos reforçar que a amplificação de DNA a partir de RNA alvo necessita da conversão do RNA a cDNA, através da reação de transcrição reversa. Essa deve ser a possível causa do aumento do limite de detecção neste trabalho, uma vez que não temos como quantificar a eficiência da reação de conversão do RNA. Além disso, amostras de RNA são muito mais sensíveis a degradação do que amostras de DNA. A instabilidade é devida, principalmente, à existência de enzimas ribonucleases (RNases), presentes no sangue, em tecidos, bactérias, na pele humana e em partículas

de poeira. As RNases são enzimas muito ativas, resistentes ao calor e de difícil inativação porque não precisam de cofatores para o desempenho de suas atividades.

Connelly e colaboradores (2015) também realizaram a LAMP em substrato de papel. Quando comparamos nossos resultados com os resultados obtidos por eles observamos novamente um aumento de 100 vezes no limite de detecção. Porém, como no caso anteriormente citado, eles realizaram a LAMP a partir de DNA de *E.coli* enquanto nós detectamos a presença de RNA viral através da RT-LAMP.

Os principais trabalhos, descritos na literatura, baseados na realização da RT-LAMP para detecção do ZIKV relatam a obtenção de limites de detecção entre 10^{-7} - 10^{-6} ng μL^{-1} (CALVERT *et al.*, 2017; YAREN *et al.*, 2017; SINGH *et al.*, 2018; SABALZA *et al.*, 2018). Nesses trabalhos a reação ocorreu diretamente em microtubos de polipropileno (do tipo Eppendorf) sendo a reação detectada por meio da utilização de corantes colorimétricos e por eletroforese em gel de agarose.

4.3.4 RT-LAMP com amostras complexas

Com o intuito de eliminar a necessidade de etapas prévias de extração do RNA viral e consequentemente obter redução do custo e do tempo total necessário para adquirir os resultados, efetuou-se um estudo visando à possibilidade de utilização direta do soro contendo o DENV ou ZIKV. Dessa forma, às reações positivas foram adicionadas alíquotas de 2 μL de soro para a realização direta da RT-LAMP, incubadas a 65 °C por 45 minutos. Após a submissão dos discos de papel à radiação UV, tendo-se previamente adicionada a solução do intercalador, foi possível observar a ocorrência de fluorescência nos ensaios positivos contendo soro de pacientes infectados pelo DENV-1 (Figura 30). Esse resultado confirma a possibilidade de redução do custo e do tempo para aquisição de resultados, uma vez que permite a eliminação das etapas de extração e purificação do RNA.



Figura 30 – Confirmação da possibilidade de utilização de amostras complexas, como o soro de pacientes infectados pelo DENV-1, para realização da RT-LAMP.

A possibilidade de utilização do dispositivo de fita deslizante diretamente em amostras complexas traz como benefícios não só a redução do tempo necessário para a realização do diagnóstico molecular, mas também abre uma gama de possibilidades para a utilização dessa metodologia de amplificação e detecção, como por exemplo, a sua aplicação no ponto de atendimento. A possibilidade de combinação da RT-LAMP com substratos simples e de baixo custo, como o papel, facilita sua utilização no ponto de atendimento, ou seja, a realização de diagnósticos de doenças infecciosas fora do ambiente laboratorial, possibilitando a detecção de casos precoces de doenças infecciosas e encaminhamento correto do paciente ao tratamento.

5. CONCLUSÕES

A realização da RT-LAMP no papel FTA demonstrou ser um método simples e de baixo custo, que permitiu o diagnóstico molecular rápido de doenças infecciosas como a dengue e zika. Devido à simplicidade operacional e por não necessitar de instrumentação sofisticada, a RT-LAMP realizada em papel pode ser uma ferramenta importante para o diagnóstico de doenças infecciosas no ponto de atendimento em locais de difícil acesso e com pouca infraestrutura.

A avaliação do uso de diferentes papéis para a realização e detecção da RT-LAMP demonstrou que nem todo tipo de papel pode ser utilizado para essa finalidade, pois alguns papéis apresentam fluorescência com adição do intercalador mesmo na ausência de DNA. Os tratamentos que dão origem ao papel FTA conseguem inibir a interação entre a celulose e o intercalador, e a fluorescência produzida são referentes à interação DNA-intercalador.

A utilização do PEG como solvente para a solução do intercalador permitiu a obtenção de fluorescência imediata e mais intensa quando comparada à utilização de água como solvente na diluição do SYBR Green. O aumento da viscosidade provocou o aumento da intensidade da fluorescência e a sua observação imediata, devido à diminuição do número de colisões das moléculas do intercalador, e consequente redução do efeito de supressão colisional, que reduz a fluorescência.

Através dos ensaios de otimização, foi possível a redução do tempo de reação de 60 para 45 minutos devido ao uso da enzima *Bst* 3.0 que possui maior atividade de deslocamento e síntese de fitas complementares e elimina a necessidade de utilização de outros reagentes como betaína, Supercrypt, RNase e DTT, diminuindo o custo reacional. Com a redução do tempo de reação, o tempo total para obtenção dos resultados, após a pipetagem, foi de 46 minutos (45 minutos de reação + 1 minuto para detecção visual).

O dispositivo de fita deslizante demonstrou ser uma plataforma capaz de integrar eficientemente as etapas de amplificação e detecção visual. Embora tenha sido observada a ocorrência de evaporação da solução no dispositivo, o mesmo ainda

reteve aproximadamente 75 % da solução adicionada, garantindo as condições necessárias à realização da RT-LAMP. A utilização do dispositivo de fita deslizante permitiu ainda um limite de detecção na ordem de $0,1 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$ de RNA na mistura reacional, que se situa próxima aos valores descritos na literatura para RT-LAMP. A possibilidade de utilização direta de amostras complexas, como o soro, para a realização da RT-LAMP permite a redução do tempo total para obtenção dos resultados, uma vez que as etapas prévias de extração e purificação de RNA não são necessárias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, F.; HASHSHAM, S. A. Miniaturized nucleic acid amplification systems for rapid and point-of-care diagnostics: A review. **Analytica Chimica Acta**, vol. 733, p. 1-15, 2012.

AÑEZ, G.; HEISEY, D. A.; VOLKOVA, E.; RIOS, M. Complete Genome Sequences of Dengue Virus Type 1 to 4 Strains Used for the Development of CBER/FDA RNA Reference Reagents and WHO International Standard Candidates for Nucleic Acid Testing. **Genome Announcements**, vol. 4 (1), 2016.

ARMBRUST, D. A.; PRY, T. Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation. **Clin Biochem Rev**, vol. 29, S. 49-52, 2008.

ARROYO, M. I.; MORALES, G. P.; SOSA, P. A.; FONSECA, J. C.; MAESTRE, A. Amplificación isotérmica de ácidos nucleicos tipo LAMP para la detección de *Plasmodium*: nueva técnica diagnóstica. **Médica UIS**, vol. 21, p. 158-175, 2008.

BUSH, E. Advantages of Using FTA Cards in the Diagnostic Lab. **National Plant Diagnostic Network**, vol. 6 (3), p. 3-4, 2011.

CALVERT, A. E.; BIGGERSTAFF, B. J.; TANNER, N. A.; LAUTERBACH, M.; LANCIOTTI, R. S. Rapid colorimetric detection of Zika virus from serum and urine specimens by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). **Plos One**, vol. 12(9), 2017.

CAO, L.; CUI, X.; HU, J.; LI, Z.; CHOI, J. R.; YANG, Q.; LIN, M.; HUILI, Y.; XU, F. Advances in digital polymerase chain reaction (dPCR) and its emerging biomedical applications. **Biosensors and Bioelectronics**, vol. 90, p. 459-474, 2017.

CÁRDENAS, E. M.; MARCELLO, A. Switch-on the LAMP to spot Zika. **AnnTransl med**, vol. 5(24), 2017.

CHAMBERS, T. J.; HAHN, C. S.; GALLER, R.; RICE, C. M. Flavivirus Genome Organization, Expression, and Replication. **Annual Reviews Microbiology**, vol. 44, p. 649-688, 1990.

CHEN, X.; ZHANG, L.; CUI, D. Miniaturized Systems with Microchips for Four Isothermal Amplification Reactions. **8th International Conference on BioMedical Engineering and Informatics**, p. 407-411, 2015.

CHIARI, M.F.Nova Metodologia de diagnóstico para Ehrlichia Canis:PCRXLAMP. (Dissertação de mestrado em Biotecnologia). Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

CHOI, J. R.; TANG, R.; WANG, S.; ABAS, W. A. B. W.; MURPHY, B. P.; XU, F. Paper-based sample-to-answer molecular diagnostic platform for point-of-care diagnostics. **Biosensors and Bioelectronics**, vol. 74, p. 427-439, 2015.

CHOI, J. R.; HU, J.; GONG, Y.; FENG, S.; ABAS, W. A. B. W.; MURPHY, B. P.; XU, F. An integrated lateral flow assay for effective DNA amplification and detection at the point of care. **Analyst**, vol. 141, p. 2930-2939, 2016.

CHOTIWAN, N.; BREWSTER, C. D.; MAGALHAES, T.; LUCARELLI, J. W.; DUGGAL, N. K.; RUCKERT, C.; NGUYEN, C.; LUNA, S. M. G.; FAUVER, J. R.; ANDRE, B.; GRAY, M.; BLACK IV, W. C.; KADING, R. C.; EBEL, G. D.; KUANG, G.; BALMASEDA, A.; JAENISCH, T.; MARQUES, E. T. A.; BRAULT, A. C.; HARRIS, E.; FOY, B. D.; QUACKENBUSH, S. L.; PERERA, R.; ROVNAK, J. Rapid and specific detection of Asian- and African-lineage Zika viruses. **Sci Transl Med.**, vol. 9, 2017.

CONNELLY, J. T.; ROLLAND, J. P.; WHITESIDES, G. M. "Paper Machine" for Molecular Diagnostics. **Analytical Chemistry**, vol. 87, p. 7595-7601, 2015.

CULBERTSON, C. T.; MICKLEBURGH, T. G.; JAMES, S. A. S.; SELLENS, K. A.; PRESSNALL, M. Micro Total Analysis Systems: Fundamental Advances and Biological Applications. **Analytical Chemistry**, vol. 86, p. 95-118, 2014.

DAUNER, A. L.; MITRA, I.; JR, T. G.; SEALES, S.; PAL, S.; YANG, S. C.; GUEVARA, C.. CHEN, J. H.; LIU, Y. C.; KOCHER, T. J.; WU, S. J. L. Development of a pan-serotype reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of dengue virus. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, vol. 83, p. 30-36, 2015.

DICK, O. B.; MARTIN, J. L. S.; MONTROYA, R. H.; DEL DIEGO, J.; ZAMBRANO, B.; DAYAN, G. H. The history of dengue outbreaks in the Americas. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 87(4), p. 584-593, 2012.

DOBBS, L. J.; MADIGAN, M. N.; CARTER, A. B.; EARLS, L. Use of FTA Gene Guard Filter Paper for the Storage and Transportation of Tumor Cells for Molecular Testing. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, vol. 126, p. 56-63, 2002.

DOU, M.; DOMINGUEZ, D. C.; LI, X.; SANCHEZ, J.; SCOTT, G. A Versatile PDMS/Paper Hybrid Microfluidic Platform for Sensitive Infectious Disease Diagnosis. **Analytical Chemistry**, vol. 86, p. 7978-7986, 2014.

DRAGAN, A. I.; PAVLOVIC, R.; MCGIVNEY, J. B.; CASAS-FINET, J. R.; BISHOP, E. S.; STROUSE, R. J.; SCHENERMAN, M. A.; GEDDES, C. D. SYBR Green I: Fluorescence Properties and Interaction with DNA. **Journal of Fluorescence**, vol. 22, n 4, p. 1189-1199, 2012.

DUARTE, G.R.M.; PRICE, C. W.; AUGUSTINE, B.H.; CARRILHO, E.; LANDERS, J.P. Dynamic solid phase DNA extraction and PCR amplification in polyester-toner based microchip. **Analytical Chemistry**, vol. 34, p. 2169-2176, 2011.

EIKEN CHEMICAL, 2005. Disponível em <http://www.loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html>. Acessado em 25/10/2017.

FALGOUT, B.; MARKOFF, L. Evidence that Flavivirus NS1-NS2A Cleavage Is Mediated by a Membrane-Bound Host Protease in the Endoplasmic Reticulum. **Journal of Virology**, vol. 69, n. 11, p. 7232-7243, 1995.

FARES, R. C. G.; SOUZA, K. P. R.; AÑEZ, G.; RIOS, M. Epidemiological Scenario of Dengue in Brazil. **BioMed Research International**, 2015.

FIGUEIREDO, L. T. M. Dengue in Brazil: Past, Present and Future Perspective. **Dengue Bulletin**, vol. 27, p. 25-33, 2003.

FISCHBACH, J.; XANDER, N. C.; FRHOME, M.; GLÖKLER, J. F. Shining a light on LAMP assays— A comparison of LAMP visualization methods including the novel use of berberine. **BioTechniques**, vol. 58, n. 4, 2015.

FRIEDRICH, S. M.; ZEC, H. C; WANG, T. Analysis of single nucleic acid molecules in micro- and nano-fluidics. **Lab on a chip**, vol. 16, p. 790-811, 2016.

GANGULI, A.; ORNOB, A. YU, H.; DAMHORST, G. L.; CHEN, W.; SUN, F.; BHUIYA, A.; CUNNINGHAM, B. T.; BASHIR, R. Hands-free smartphone-based diagnostics for simultaneous detection of Zika, Chikungunya, and Dengue at point-of-care. **Biomed Microdevices**, vol. 19:73, 2017.

GILL, P.; GHAEMI, A. NUCLEIC ACID ISOTHERMAL AMPLIFICATION TECHNOLOGIES— A REVIEW. **Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acid**, vol. 27, p. 224-243, 2008.

GE Healthcare. **FTA™ Cards Collect, archive, transport, and purify nucleic acids all at room temperature**, 2010.

GE Healthcare. **Sample collection kits and cards, punching technologies, and rapid STR instrumentation**, 2015.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical microbiology reviews**, vol. 11 (3), p. 480-496, 1998.

GUBLER, D. J. The Economic Burden of Dengue. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 86, n. 5, p. 743-744, 2012.

GUO, Z.; YO, T.; HE, J.; LIU, F.; HAO, H.; ZHAO, Y.; WEN, J.; WANG, Q. An integrated microfluidic chip for the detection of bacteria e A proof of concept. **Molecular and Cellular Probes**, vol. 29, p. 223-227, 2015.

GURUGAMA, P.; GARG, P.; PERERA, J.; WIJEWICKRAMA, A.; SENEVIRATNE, S. Dengue Viral Infections. **Indian Journal of Dermatology**, vol. 55 (1), p. 68-78, 2010.

GUSTAVSSON, I.; LINDELL, M.; WILANDER, E.; STRAND, A.; GYLLENSTEN, U. Use of FTA card for dry collection, transportation and storage of cervical cell specimen to detect high-risk HPV. **Journal of Clinical Virology**, vol. 46, p. 112-116, 2009.

GUZMÁN, M. G.; KOURÍ, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. **International Journal of infectious Diseases**, vol. 8, p. 69-80, 2004.

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 Review**, S7-S16, 2010.

HATAOKA, Y.; ZHANG, L.; MORI, Y.; TOMITA, N.; NOTOMI, T.; BABA, Y. Analysis of Specific Gene by Integration of Isothermal Amplification and Electrophoresis on Poly(methyl methacrylate) Microchips. **Analytical Chemistry**, vol.76, p. 3689-3693, 2004.

HENCHAL, E. A.; PUTNAK, J., R. The Dengue Viruses. **Clinical Microbiology Reviews**, vol. 3, n. 4, p. 376-396, 1990.

HU, J.; WANG, S.; WANG, L.; LI, F.; MURPHY, B. P.; LU, T. J.; XU, F. Advances in paper-based point-of-care diagnostics. **Biosensors and Bioelectronics**, vol. 54, p. 585-597, 2014.

HU, S.; LI, M.; ZHONG, L.; LU, S.; LIU, Z.; PU, J.; WEN, J.; HUANG, X. Development of reverse-transcription loopmediated isothermal amplification assay for rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes 1–4. **BMC Microbiology**, 15:265, 2015.

HUANG, W.; ZHANG, H.; XU, J.; WANG, S.; KONG, X.; DING, W.; XU, J.; FENG, J. Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for the Rapid Detection of *Ralstonia solanacearum* Phylotype I Mulberry Strains in China. **Frontiers in Plant Science**, vol. 10 (76), 2017.

IWAMOTO, T.; SONOBE, T.; HAYASHI, K. Loop-Mediated Isothermal Amplification for Direct Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex, M. avium, and M. intracellulare in Sputum Samples. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 41, n. 6, p. 2616-2622, 2003.

JOON, D.; NIMESH, M.; BASIL, M. V.; SALUJA, D. Evaluation of improved IS6110 LAMP assay for diagnosis of pulmonary and extra pulmonary tuberculosis. **Journal of Microbiological Methods**, vol.139, p. 87-91, 2017.

KALVATCHEV, Z.; TSEKOV, I.; KALVATCHEV, N. LOOP-MEDIATED AMPLIFICATION FOR SENSITIVE AND SPECIFIC DETECTION OF VIRUSES. **Biotechnol. & Biotechnol.**, vol. 24 (1), p. 1559-1561, 2010.

KIL, E-J.; KIM, S.; LEE, Y-J.; KANG, E-H.; LEE, M.; CHO, S-H.; KIM, M-K.; LEE, N-Y.; HEO, N-Y.; CHOI, H-S.; KWON, S-T. Advanced loop-mediated isothermal amplification method for sensitive and specific detection of Tomato chlorosis virus using auracil DNA glycosylase to control carry-over contamination. **Journal of Virological Methods**, vol. 2013, p. 68-74, 2015.

KUBOKI, N.; INOUE, N.; SAKURAI, T.; DI CELLO, F.; GRAB, D. J.; SUZUKI, H.; SUGIMOTO, C.; IGARASHI, I. Loop-mediated isothermal amplification for detection of African trypanosomes. **Journal of clinical microbiology**, vol. 41 (12), p. 5517-5524, 2003.

LAU, Y. L.; LAI, M. Y.; TEOH, B. T.; JAMIL, J. A.; JOHARI, J.; SAM, S. S.; TAN, K. K.; ABUBAKAR, S. Colorimetric Detection of Dengue by Single Tube Reverse-Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification. **PLOS ONE**, vol.10 (9), 2015.

LEE, M. S.; SHIH, H. C.; LU, J. J.; SU, M. C.; DENG, M. C.; WU, C. C.; LIN, F. Y.; LIN, K. H.; CHEN, P. Y.; HSU, W. L. M-specific reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for detection of pandemic (H1N1) 2009 virus. **European Journal of Clinical Investigation**, vol. 41, p. 434-441, 2011.

LEE, P. Y.; COSTUMBRADO, J.; HSU, C. Y.; KIM, Y. H. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. **Journal of visualized experiments**, vol. 62, e3923, 2012.

LEE, S. Y.; LEE, C. N.; MARK, H.; MELDRUM, D. R.; LIN, C. W. Efficient, specific, compact hepatitis B diagnostic device: Optical detection of the hepatitis B virus by isothermal amplification. **Sensors and Actuators B**, vol. 127, p. 598-605, 2007.

LI, J. J.; XIONG, C.; LIU, Y.; LIANG, J. S.; ZHOU, X. W. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): Emergence As an Alternative Technology for Herbal Medicine Identification. **Frontiers in Plant Science**, vol. 7:1956, 2016.

LIANA, D. D.; RAGUSE, B.; GOODING, J. J.; CHOW, E. Recent Advances in Paper-Based Sensors. **Sensors**, vol. 12, p. 11505-11526, 2012.

LINDENBACH, B.; THIEL, H.; RICE, C. M. Flaviviridae: The Viruses and Theirs Replication. In: KNIPE, D. M. and HOWLEY, P. M. **FIELDS VIROLOGY**. 5 ed. Washington: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, vol. 2, p. 250-255, 2007.

LINDSTRON, S.; SVAHN, A. H.; Miniaturization of biological assays -- overview on microwell devices for single-cell analyses. **Biochimica et biophysica acta**, vol. 1810(3), p. 308-316, 2011.

LINNES, J. C.; RODRIGUEZ, N. M.; LIU, L.; KLAPPERICH, C. M. Polyethersulfone improves isothermal nucleic acid amplification compared to current paper-based diagnostics. **Biomed Microdevices**, vol. 18:30, 2016.

LIU, J.; XU, L.; GUO, J.; CHEN, R.; GRISHAM, M. P.; QUE, Y. Development of Loop-Mediated Isothermal Amplification for Detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in Sugarcane. **BioMed Research International**, vol. 2013, 2013.

LO, S. J.; YANG, S. C.; YAO, D. J.; CHEN, J. H.; TU, W. C.; CHENG, C. M. Molecular-level dengue fever diagnostic devices made out of paper. **Lab on a Chip**, vol. 13, p. 2686-2692, 2013.

LU, X.; LI, X.; MO, Z.; JIM, F.; WANG, B.; ZHAO, H.; SHAN, X.; SHI, L. Rapid Identification of Chikungunya and Dengue Virus by a Real-Time Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification Method. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 85, n. 5, p. 947-953, 2012.

LU, Y.; MA, X.; WANG, J.; SHENG, N.; DONG, T.; SONG, Q.; RUI, J.; ZOU, B.; ZHOU, G. Visualized detection of single-base difference in multiplexed loop-mediated isothermal amplification amplicons by invasive reaction coupled with oligonucleotide probe-modified gold nanoparticles. **Biosensors and Bioelectronics**, vol. 90, p. 388-393, 2017.

LU, Y.; YAO, B.; WANG, G.; HONG, N. The detection of ACLSV and ASPV in pear plants by RT-LAMP assays. **Journal of Virological Methods**, vol. 252, p. 80-85, 2018.

MA, C.; WANG, F.; WANG, X.; HAN, L.; JING, H.; ZHANG, H.; SHI, C. A novel method to control carryover contamination in isothermal nucleic acid amplification. **Chemical Communications**, vol. 53, p. 10696-10699, 2017 a.

MA, C.; WANG, Y.; ZHANG, P.; SHI, C. Accelerated isothermal nucleic acid amplification in betaine-free reaction. **Analytical Biochemistry**, vol. 530, p. 1-4, 2017 b.

MACIEL, I. J.; JÚNIOR, J. B. S.; MARTELLI, C. M. T. EPIDEMIOLOGIA E DESAFIOS NO CONTROLE DO DENGUE. **Revista de patologia Tropical**, vol. 37, n. 2, p. 111-130, 2008.

MAGNUSDOTTIR, S.; AAKERMAN, B.; JONSSON, M. DNA Electrophoresis in Agarose Gels: Three Regimes of DNA Migration Identified and Characterized by the Electrophoretic Orientational Behavior of DNA. **The Journal of Physical Chemistry**, vol. 98 (10), p. 2624-2633, 1994.

MARK, D.; HAEBERLE, S.; ROTH, G.; VON STETTEN.; ZENGERLE, R. Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications. **Chemical Society Reviews**, vol. 39, p. 1153-1182, 2010.

MEREDITH, N. A.; QUINN, C.; CATE, D. M.; REILLY III, T. H.; VOLCKENS, J.; HENRY, C. S. Paper-based analytical devices for environmental analysis. **Analyst**, vol. 141, p. 1874-1887, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Dengue: Aspectos Edidemiológicos, Diagnóstico e Tratamento**, 2002.

MONAZAH, A.; ZEINODDINI, M.; SAEEDINIA, A. R. Evaluation of a rapid detection for *Coxsackievirus B3* using one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). **Journal of Virological Methods**, vol. 246, p. 27-33, 2017.

MORI, Y.; NAGAMINE, K.; TOMITA, N.; NOTOMI, T. Detection of Loop-Mediated Isothermal Amplification Reaction by Turbidity Derived from Magnesium Pyrophosphate Formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 289, p. 150-154, 2001.

MORI, Y.; NOTOMI, T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. **Japanese Society of Chemotherapy and The Japanese Association for Infectious Diseases**, vol. 15, p. 62-69, 2009.

MURRAY, N. E. A.; QUAN, M. B.; SMITH, A. W. Epidemiology of dengue, past, present and future prospects. **Clinical Epidemiology**, vol. 5, p. 299-309, 2013.

NAHAR, S.; AHMED, M. U.; SAFAVIEH, M.; ROCHETTE, A.; TORO, C.; ZOUROB, M. A flexible and low-cost polypropylene pouch for naked-eye detection of herpes simplex viruses. **Analyst**, vol. 140, p. 931-937, 2015.

NAGAMINE, K.; HASE.; NOTOMI, T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. **Molecular and Cellular Probes**, vol. 16, p. 223-229, 2002.

NDUNGURU, J.; TAYLOR, N. J.; YADAV, J.; ALY, H.; LEGG, J. P.; AVELING, T.; THOMPSON, G.; FAUQUET, C. M. Application of FTA technology for sampling, recovery and molecular characterization of viral pathogens and virus-derived transgenes from plant tissues. **Virology Journal**, vol. 2:45, 2005.

NEB, 2018 a. Disponível em <https://www.neb.com/products/m0374-Bst-3-0-dna-polymerase#Product%20Information>. Acessado dia 12/01/2018.

NEB, 2018 b. Disponível em <https://www.neb.com/protocols/2015/08/04/typical-lamp-protocol-m0374>. Acessado em 12/01/2018.

NEERAJA, M.; LAKSHMI, V.; LAVANYA, V.; PRIYANKA, E. N.; PARIDA, M. M.; DASH, P. K.; SHARMA, S.; RAO, P. V. L.; RADDY, G. Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by NS1 specific reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay in patients presenting to a tertiary care hospital in Hyderabad, India. **Journal of Virological Methods**, vol. 211, p. 22-31, 2015.

NOTOMI, T.; OKAYAMA, H.; MUSUBUCHI, H.; YONEKAWA, T.; WATANABE, K.; AMINO, N.; HASE, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Research**, vol. 28, n. 12, 2000.

NOTOMI, T.; MORI, Y.; TOMITA, N.; KANDA, H. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. **Journal of Microbiology**, vol. 53, n. 1, p. 1-5, 2015.

OCWIEJA, K. E.; MIX, S. S.; LIU, C.; SONG, J.; BAU, H.; BUSHMAN, F. D. A Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay Optimized to Detect Multiple HIV Subtypes. **Plos One**, vol. 10 (2), 2015.

OLIVEIRA, K. G.; BORBA, J. C.; BAILÃO, A. M.; SOARES, C. M. A.; CARRILHO, E.; DUARTE, G. R. M. Loop-mediated isothermal amplification in disposable polyester-toner microdevices. **Analytical Biochemistry**, vol. 534, p. 70-77, 2017.

OSCORBIN, I. P.; BELOUSOVA, E. A.; ZAKABUNIN, A. I.; BOYARSKIKH, U. A.; FILIPENKO, M. L. Comparison of fluorescent intercalating dyes for quantitative loop-mediated isothermal amplification (qLAMP). **BioTechniques**, vol. 61, n. 1, p. 20-25, 2016.

PAL, S.; DAUNER, A. L.; MITRA, I.; FORSHEY, B. M.; GARCIA, P.; MORRISON, A. C.; HALSEY, E. S.; KOCHER, T. J.; WU, S. J. L. Evaluation of Dengue NS1 antigen Rapid Tests and ELISA Kits Using Clinical Samples. **PLOS ONE**, vol. 9 (11), 2014.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). **dengue guidelines for patient care in the region of the americas**, Second Edition, 2017.

PARIDA, M.; HORIOKE, K.; ISHIDA, H.; DASH, P. K.; SAXENA, P.; JANA, A. M.; ISLAM, M. A.; INOUE, S.; HOSAKA, N.; MORITA, K. Rapid Detection and Differentiation of Dengue Virus Serotypes by a Real-Time Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 46, n. 6, p. 2895-1903, 2005.

PARIDA, M.; SANNARANGAIAH, S.; DASH, P. K.; RAO, P. V. L.; MORITA, K. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. **Reviews in Medical Virology**, 18, p. 407-421, 2008.

PEELING, R. W.; ARTSOB, H.; PELEGRINO, J. L.; BUCHY, P.; CARDOSA, M. J.; DEVI, S.; ENRIA, D. A.; FARRAR, J.; GUBLER, D. J.; GUZMAN, M. G.; HALSTEAD, S. B.; HUNSPERGER, E.; KLIKS, S.; MARGOLIS, H. S.; NATHANSON, C. M.; NGUYEN, V. C.; RIZZO, N.; VÁZQUEZ, S.; YOKSAN, S. Evaluation of diagnostic tests: dengue. **Nature**, S10-S38, 2010.

RAHIKAINEN, A. L.; PALO, J. U.; LEEUW, W.; BUDOWLE, B. SAJANTILA, A. DNA quality and quantity from up to 16 years old post-mortem blood stored on FTA cards. **Forensic Science International**, vol. 261, p. 148-153, 2016.

RODRIGUEZ, N. M.; LINNES, J. C.; FAN, A.; ELLENSON, C. K.; POLLOCK, N. R.; KLAPPERICH, C. M. Paper-Based RNA Extraction, *in Situ* Isothermal Amplification, and Lateral Flow Detection for Low-Cost, Rapid Diagnosis of Influenza A (H1N1) from Clinical Specimens. **Analytical Chemistry**, vol. 87, p. 7872-7879, 2015.

ROZAND, C. Paper-based analytical devices for point-of-care infectious disease testing. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, vol. 33, p. 147-156, 2014.

SABALZA, M.; YASMIN, R.; BARBER, C. A.; CASTRO, T.; MALAMUD, D.; KIM, B. J.; ZHU, H.; MONTAGNA, R. A.; ABRAMS, W. R. Detection of Zika virus using reverse transcription LAMP coupled with reverse dot blot analysis in saliva. **Plos One**, vol. 5, 2018.

SAFAVIEH, M.; KANAKASABAPATHY, M. K.; TARLAN, F.; AHMED, M. U.; ZOUROB, M.; ASGHAR, W.; SHAFIEE, H. Emerging Loop-Mediated Isothermal Amplification-Based Microchip and Microdevice Technologies for Nucleic Acid Detection. **Biomaterials Science & Engineering**, vol. 2, p. 278-294, 2016.

SAHNI, A. K.; GROVER, N.; SHARMA, A.; KHAN, I. D.; KISHORE, J. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for diagnosis of dengue. **Med J Armed Forces India**, vol. 69, p. 246-253, 2013.

SALANT, H.; ABBASI, I.; HAMBURGER, J. The Development of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Method (LAMP) for *Echinococcus granulosus* Coprodetction. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 87(5), p. 883-887, 2012.

SAMEENOI, Y.; PANYMEESAMER, P.; SUPALAKORN, N.; KOEHLER, K.; CHAILAPAKUL, O.; HENRY, C. S.; VOLCKENS, J. A Microfluidic Paper-Based Analytical Device (μ PAD) for Aerosol Oxidative Activity. **National Institutes of Health**, vol. 47(2), p. 932-940, 2013.

SÁNCHEZ, E.; NINA, M.; AGUIRRE, P.; ARCE, M.; TORO, N.; VILELA, R. Amplificación isotérmica mediada por LOOP (LAMP) de ácidos nucleicos em el diagnostico clínico. **Con-ciencia**, vol. 2, p. 125-138, 2014.

SERUFO, J. C.; NOBRE, V.; RAYES, A.; MARCIAL, T. M.; LAMBERTUCCI, J. R. Dengue: uma nova abordagem. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol. 33(5), p. 465-476,

SHAW, K. J.; VASILIADOU, R.; PARTON, J.; PAMME, N.; HASWELL, S. J. INTEGRATED DNA PURIFICATION AND AMPLIFICATION USING FTA[®] PAPER AND PCR REAGENT ENCAPSULATION. **16th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences**, 2012.

SHEPARD, D. S.; UNDURRAGA, E. A.; HALASA, Y. A.; STANAWAY, J. D. The global economic burden of dengue: a systematic analysis. **Lancet Infect Dis**, vol. 16(8), p. 935-941, 2016.

SHU, P. Y.; HUANG, J. H. Current Advances in Dengue Diagnosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, vol.11, n. 4, p. 641-650, 2004.

SILVA, N. S.; UNDURRAGA, E. A.; FERREIRA, E. R. S.; ESTOFOLETE, C. F.; NOGUEIRA, M. L. Clinical, laboratory, and demographic determinants of hospitalization due to dengue in 7613 patients: A retrospective study based on hierarchical models. **Acta Tropica**, vol. 177, p. 25-31, 2018.

SINGH, R. K.; DHAMA, K.; KARTHIK, K.; TIWARI, R.; KHANDIA, R.; MUNJAL, A.; IQBAL, H. M. N.; MALIK, Y. S.; MARI, R. B. Advances in Diagnosis, Surveillance, and Monitoring of Zika Virus: An Update. **Front Microbiol**, vol. 8, 2018.

SMITH, L. M.; BURGOYNE, L. A. Collecting, archiving and processing DNA from wildlife samples using FTA[®] databasing paper. **BMC Ecology**, vol. 4, 2004.

SMIT, J. M.; MOESKER, B.; ZYBERT, I. R.; WILSCHUT, J. Flavivirus Cell Entry and Membrane Fusion. **Viruses**, vol. 3, p. 160-171, 2011.

STATISTA, 2016. Disponível em <https://www.statista.com/chart/4322/the-spread-of-the-zika-virus/>. Acessado dia 29/03/2018.

STELLWAGEN, N. C. Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution. **Electrophoresis**, vol. 30, p. 188-195, 2009.

TAN, T. T. M.; TAN, Z. Y.; TAN, W. L.; LEE, P. F. P. Gel electrophoresis. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, vol. 35 (5), 2007.

TEGEGNE, B.; GETIE, S.; LEMMA, W.; MOHON, A. N.; PILLAI, D. R. Performance of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the diagnosis of malaria among malaria suspected pregnant women in Northwest Ethiopia. **Malaria Journal**, vol. 16:34, 2017.

TEOH, B. T.; SAM, S. S.; TAN, K. K.; JOHARI, J.; DANLAMI, M. B.; HOOI, P. S.; ESA R. M.; ABUBAKAR, S. Detection of dengue viruses using reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. **BMC Infectious Diseases**, vol. 13:387, 2013.

TEOH, B. T.; SAM, S. S.; TAN, K. K.; DANLAMI, M. B.; SHU, M. H.; JOHARI, J.; HOOI, P. S.; BROOKS, D.; PIEPENBURG, O.; NENTWHICH, O.; SMITH, A. W.; FRANCO, L.; TENORIO, A.; ABUBAKAR, S. Early Detection of Dengue Virus by Use of Reverse Transcription-Recombinase Polymerase Amplification. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 53, n. 3, p. 830-837, 2015.

THERMOFISHER, 2018. Disponível em <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/rt-education/reverse-transcription-applications.html>. Acessado em 08/01/2018.

TIAN, B.; QIU, Z.; MA, J.; TORRE, T. Z. G.; JOHANSSON, C.; SVEDLINDH, P.; STRÖMBERG, M. Attomolar Zika virus ooligonucleotide detection based on loop-mediated isothermal amplification and AC susceptometry. **Biosensors and Bioelectronics**, vol. 86, p. 420-425, 2016.

TOMITA, N.; MORI, Y.; KANDA, H.; NOTOMI, T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. **NATURE PROTOCOLS**, vol. 3, n. 5, p. 877-882, 2008.

Virus Pathogen Database and Analysis Resource (ViPR): 2017 Release. Disponível em https://www.viprbrc.org/brc/home.spg?decorator=flavi_dengue. Acessado dia 21/11/2016.

WANG, F.; JIANG, L.; GE, B. Loop-Mediated Isothermal Amplification Assays for Detecting Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Ground Beef and Human Stools. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 50, p. 91-97, 2012.

WANG, X.; FU, Z.; CHEN, X.; PENG, C.; XU, X.; WEI, W.; LI, F.; XU, J. Use of a novel metal indicator to judge loop-mediated isothermal amplification for detecting the 35S promoter. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, vol. 409, p. 881-889, 2017.

WEI, K.; LI Y. Global evolutionary history and spatiotemporal dynamics of dengue virus type 2. *Scientific Reports*, vol. 7, 2017.

WHITESIDES, G.M. The origins and the future of microfluidics. **Nature**, vol. 442, p. 368-373, 2006.

WINKLER, C. W.; PETERSON, K. E. Using immunocompromised mice to identify mechanisms of Zika virus transmission and pathogenesis. **Immunology**, vol. 153, p. 443-454, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**. 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global strategy for dengue prevention and control**. 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Dengue vaccine: WHO position paper. **Weekly epidemiological record**, vol. 91, n. 30, p. 349-364, 2016.

WU, Q.; JIN, W.; ZHOU, C.; HAN, S.; YANH, W.; ZHU, Q.; JIN, Q.; MU, Y. Integrated Glass Microdevice for Nucleic Acid Purification, Loop-Mediated Isothermal Amplification, and Online Detection. **Analytical Chemistry**, vol. 83, p. 3336-3342, 2011.

XIA, Y.; SI, J.; LI, Z. Fabrication techniques for microfluidic paper-based analytical devices and their applications for biological testing: A review. **Biosensors and Bioelectronics**, vol. 77, p. 774-789, 2016.

YAGER, P.; EDWARDS, T.; FU, E.; HELTON, K.; NELSON, K.; TAM, M. R.; WEIGL, B. H. Microfluidic diagnostic technologies for global public health. **Nature**, vol. 442, p. 412-418, 2006.

YAREN, O.; ALTO, B. W.; GANGODKAR, P. V.; RANADE, S. R.; PATIL, K. N.; BRADLEY, K. M.; YANG, Z.; PHADKE, N.; BENNER, S. A. Point of sampling detection of Zika virus within a multiplexed kit capable of detecting dengue and chikungunya. **BMC Infectious Diseases**, vol. 17:293, 2017.

ZANOLI, L. M.; SPOTO, G. Isothermal Amplification Methods for the Detection of Nucleic Acids in Microfluidic Devices. **Biosensors**, vol. 3, p. 18-43, 2013.

ZHANG, C.; XING, D. Miniaturized PCR chips for nucleic acid amplification and analysis: latest advances and future trends. **Nucleic Acids Research**, vol. 35, p. 4223-4237, 2007.

ZHANG, Y.; ZHANG, L.; SUN, J.; LIU, Y.; MA, X.; CUI, S.; MA, L.; XI, J. J.; JIANG, X. Point-of-Care Multiplexed Assays of Nucleic Acids Using Microcapillary-based Loop-Mediated Isothermal Amplification. **Analytical Chemistry**, vol. 86, p. 7057-7062, 2014.

ZIPPER, H.; BRUNNER, H.; BERHANGEN, J.; VITZTHUM, F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. **Nucleic Acids Research**, vol. 32, n. 12, 2004.