 UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS  
RECOMBINANTES MIMÉTICOS DE ANTÍGENOS DO VÍRUS DA  
DENGUE POR “PHAGE DISPLAY”**

Aluna: Paula de Souza Santos

Orientador: Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

UBERLÂNDIA - MG  
2006

 UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS  
RECOMBINANTES MIMÉTICOS DE ANTÍGENOS DO VÍRUS DA  
DENGUE POR “PHAGE DISPLAY”**

Aluna: Paula de Souza Santos

Orientador: Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de Uberlândia como parte dos  
requisitos para obtenção do Título de  
Mestre em Genética e Bioquímica  
(Área Genética)

UBERLÂNDIA - MG  
2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS  
RECOMBINANTES MIMÉTICOS DE ANTÍGENOS DO VÍRUS DA  
DENGUE POR “PHAGE DISPLAY”**

Aluna: Paula de Souza Santos

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Dr. Luiz Ricardo Goulart (Orientador)

Examinadores:

Dra. Andréa Thompsom da Poian  
Dr. Guilherme Oliveira

Data da Defesa: 18 / 04 / 2006

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação foram contempladas

---

Dr. Luiz Ricardo Goulart

*“Pensar apenas ou desejar simplesmente, nunca levou ninguém a lugar nenhum. É necessário também ação. Não há mal que sempre dure, nem bem que nunca termine. Lamentar uma dor passada no presente é criar outro sofrimento novamente”*

*Antônio Carlos dos Santos*

*Dedico essa dissertação ao meu  
querido pai, Antônio Carlos, pelo  
amor e incentivo a mim sempre dados.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Antônio Carlos e Marlene, que iluminaram o caminho de minha vida, e pela sólida formação que me foi dada, proporcionando a continuidade nos estudos até a chegada a este mestrado.

À minha filha, Isabela, que traz tanta luz e gosto para minha vida, um amor especial. Você é a lição mais profunda que vivi de amor...

Ao meu companheiro, Christian, pelo carinho e amor dedicados em todos os momentos.

Às minhas irmãs, Carla e Roberta, pelo convívio afetivo.

Ao Luiz Ricardo, na qualidade de amigo e orientador, por sua disponibilidade, ensinamentos e apoio, bem como o imenso carinho nos momentos de dificuldade e de dor.

Aos amigos do grupo *Phage*, Ana Paula, Juliana, Andréa, Renata, Guilherme, Carlos, Rone e Fausto, que ajudaram com importantes trocas de informações, e também nos cuidados com os animais utilizados no estudo. Em especial, à Ana Paula, Juliana, pela amizade sempre presente.

Às amigas do laboratório, Paula e Karla, por estarem sempre ao meu lado em momentos de dificuldades.

À todos os colegas do laboratório, que tornaram o ambiente de trabalho mais agradável.

À professora Divina do Departamento de Virologia, pela ajuda na obtenção de amostras e também nas informações sobre o assunto.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa, CNPq, pelo apoio financeiro durante a realização deste trabalho.

E a todos que me incentivaram e, de alguma forma, contribuíram para realização deste trabalho.

## ÍNDICE

Lista de Abreviaturas.....	ix
Lista de Abreviaturas dos Aminoácidos.....	xii
Lista de Tabelas.....	xiii
Lista de Figuras.....	xiv
Resumo Geral.....	1
Introdução Geral.....	2
• Dengue.....	3
- Epidemiologia.....	3
- Aspecto clínico e diagnóstico da doença.....	6
- Controle do vetor.....	8
- Caracterização estrutural e molecular do vírus.....	9
- Caracterização antigênica do vírus.....	15
• “Phage Display” .....	18
Objetivos.....	23
Referências Bibliográficas.....	24
Capítulo Único.....	33
Resumo.....	34
Abstract.....	35
Introdução.....	36
Material e Métodos.....	38
• Antígenos.....	38
• Aves.....	38
• Imunização.....	38
• Purificação e concentração dos anticorpos.....	39
• Teste ELISA para confirmar a especificidade de IgY.....	40
• <i>Biopannig</i> – Seleção de peptídeos.....	40
• Amplificação de colônias de fagos em <i>Deepwell</i> .....	42
• ELISA Pré-Sequenciamento.....	42
• Extração de DNA.....	43
• Seqüenciamento de DNA.....	44

• Análise dos dados por bioinformática.....	44
• Teste ELISA dos clones contra soro humano específico.....	45
Resultados e Discussão.....	47
• Antígenos.....	47
• Aves.....	47
• Purificação e concentração dos anticorpos.....	47
• Teste ELISA para confirmar a especificidade de IgY.....	49
• <i>Biopannig</i> – Seleção de peptídeos.....	49
• ELISA Pré-Sequenciamento.....	51
• Seqüenciamento de DNA e Bioinformática.....	51
• Teste ELISA dos clones contra soro humano específico.....	65
Conclusões.....	67
Referências Bibliográficas.....	68
Anexo 1.....	75

## LISTA DE ABREVIATURAS

Å	Angstrom
°C	Graus Celsius
□	Número provável de clones independentes na biblioteca
µg	Microgramas
µL	Microlitros
aa	Aminoácido
AT	Amplitude taxonômica
BSA	Soroalbumina bovina
C	Proteína estrutural do capsídeo
cryoEM	Cryo-eletromicroscopia
DC	Dengue clássica
DENV	Vírus da dengue
DENV-1	Vírus da dengue tipo 1
DENV-2	Vírus da dengue tipo 2
DENV-3	Vírus da dengue tipo 3
DENV-4	Vírus da dengue tipo 4
DH	Dengue hemorrágica
DNA	Ácido Desoribonucleico
E	Proteína estrutural do envelope
EDTA	Etileno diamino tetra acetato
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ER2537	<i>E. coli</i> Cepa ER2537
FE	Probabilidade da Seqüência Randômica
FD	Febre da dengue
FHD	Febre hemorrágica da dengue
FO	Freqüência observada
g	Gramas
IE	Índice ELISA
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M

IgY	Imunoglobulina Y
IL	Interleucina
I(m)	Grau de informação
IPTG	Isopropil $\alpha$ -D-tiogalactosise
kDa	Quilodalton
L	Litro
M	Molar
M	Proteína estrutural de membrana
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
M13	Vetor de clonagem de bacteriófagos filamentosos
Ng	Nanogramas
nm	Nanômetro
NS1	Proteína não estrutural 1
NS2a	Proteína não estrutural 2 <sup>a</sup>
NS2b	Proteína não estrutural 2b
NS3	Proteína não estrutural 3
NS4a	Proteína não estrutural 4 <sup>a</sup>
NS4b	Proteína não estrutural 4b
NS5	Proteína não estrutural 5
OD	Densidade ótica
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPD	O- Phenylenediamine dihydrochloride
P	Probabilidade de ocorrência randômica
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS-T	Fosfato de sódio com tween 20 0.5%
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG	Poliétileno glycol
Pfu	Unidades formadoras de colônias
Ph	Potencial Hidrogeniônico
Ph.D	Bibliotecas de <i>Phage display</i> New England Biolabs
Ph.D- 7mer	Biblioteca contendo 7 peptídeos randômicos

PrM	proteína estrutural precursora de membrana
PIII	Proteína III capsídica de bacteriófagos filamentosos
PVIII	Proteína VIII capsídica de bacteriófagos filamentosos
RELIC	Contatos Ligantes de Receptores
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
SI	Sítio de identificação
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
sNS1	Forma secretada da proteína não estrutural 1
T CD4+	Linfócitos T CD4+
T CD8+	Linfócitos T CD8+
TNF	Fator necrosante de tumores
V	Volts
X-gal	5-Bromo-4-cloro-3indolil- $\alpha$ -D-galactosideo

## LISTA DE ABREVIATURA DE AMINOÁCIDOS

A	Alanina
C	Cisteína
D	Ácido aspártico
E	Ácido glutâmico
F	Fenilalanina
G	Glicina
H	Histidina
I	Isoleucina
K	Lisina
L	Leucina
M	Metionina
N	Asparagina
P	Prolina
Q	Glutamina
R	Arginina
S	Serina
T	Treonina
V	Valina
W	Triptofano
Y	Tirosina

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo Único

- Tabela 1:** Absorbância e quantificação dos anticorpos obtidos após a concentração e diálise.....Pág 48
- Tabela 2:** Títulos (em *pfu*: unidades formadoras de colônias) obtidos nos quatro ciclos de seleção. ....Pág 50
- Tabela 3:** ELISA para teste de imunorreatividade dos clones selecionados contra o anticorpo purificado obtido de galinhas imunizadas com proteína total do vírus da dengue tipo 3.....Pág 51
- Tabela 4:** Seqüências de aminoácidos, freqüências observada e esperada, e amplificação dos peptídeos.....Pág 53
- Tabela 5:** Freqüência de aminoácidos dos clones seqüenciados. Em vermelho estão os aminoácidos que apresentam maior freqüência.....Pág 54
- Tabela 6:** Alinhamento entre os peptídeos selecionados e proteínas de DENV.....Pág 58
- Tabela 7:** Provável sítio de alinhamento dos motivos VxRN e LRN (em destaque) na seqüência alvo do capsídeo dos tipos DENV-1, 2, 3 e 4.....Pág 63
- Tabela 8:** Peptídeos que apresentaram similaridades com proteínas de comunidades biológicas previamente conhecidas.....Pág 63

## LISTA DE FIGURAS

### Introdução Geral

- Figura 1:** Estágios de desenvolvimento do *Aedes aegypti*: (1) larva, (2) pupa, (3) indivíduo adulto [(1) <http://www.arbovirus.health.nsw.gov.au/areas/arbovirus/mosquit/photos>; (2) <http://fmel.ifas.ufl.edu/Key/aegyptipupa.htm>; (3) <http://www.angelfire.com/electronic/bodhidharma/death.html>]...... Pág 4
- Figura 2:** Sorotipos circulantes do vírus da dengue por Estado, Brasil, 2005 (Ministério da Saúde, 2005)..... Pág 5
- Figura 3:** Distribuição mundial da dengue no ano de 2005. Em amarelo, encontram-se áreas infestadas com *Aedes aegypti*; em vermelho, áreas com *Aedes aegypti* e atividade epidêmica da dengue (<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue/map-distribution-2005.htm>)..... Pág 6
- Figura 4:** Esquema das proteínas virais arranjadas na poliproteína codificada pela cadeia simples de RNA..... Pág 10
- Figura 5:** Representação de um corte central no vírus da dengue: 1- Proteína do envelope; 2- ectodomínios da proteína M e hastes da glicoproteína E; 3- bicamada lipídica; 4 e 5- Nucleocapsídeo ; 5- Ácido ribonucléico (RNA) (Kuhn *et al.* 2002).....Pág 11
- Figura 6:** Estrutura do vírus da dengue inteiro, mostrando cada monômero com os domínios I, II e III em vermelho, amarelo e azul, respectivamente. A fusão dos peptídeos é mostrada em verde (Kuhn *et al.* 2002)..... Pág 11
- Figura 7:** Diagrama do ectodomínio do vírus da dengue e proteínas do domínio transmembrana: ectodomínio de um monômero E, em rosa (domínio I), amarelo (domínio II) e lilás (domínio III); a alça e hélice de E e M estão em azul e laranja, respectivamente (Zhang *et al.*, 2003)..... Pág 13

**Figura 8:** Estrutura do fago M13 (<http://www.theses.ulaval.ca/2003/21058/ch01.html>)..... Pág 19

**Figura 9:** Ciclo do “Biopannig” em placa. Em cada ciclo, os fagos reativos com o alvo são selecionados por lavagens sucessivas, sendo os demais descartados. Os fagos remanescentes são então amplificados e seguem um novo ciclo para a maturação da afinidade de ligação ao alvo específico..... Pág 20

## Capítulo Único

**Figura 10:** Perfil eletroforético (SDS-PAGE 16%) de IgYs purificadas de soros de galinhas imunizadas com proteínas virais totais de dengue do tipo 3 (Canaleta 1 – soro total; 2-8 – soro purificado; M – marcador de peso molecular)..... Pág 48

**Figura 11** ELISA para teste de imunorreatividade do anticorpo purificado obtido de galinhas imunizadas com proteína total do vírus da dengue tipo 3 contra proteínas virais de dengue 1, 2 e 3..... Pág 49

**Figura 12:** Exemplo de placas resultantes da titulação. As colônias azuis representam a infecção de bactérias *E.coli* (ER2738) com fagos M13 carregando o gene *lacZ* da  $\beta$ -galactosidase.....Pág 50

**Figura 13:** Perfil eletroforético das amostras de DNA extraídas dos clones obtidos no processo de seleção. M - marcador de peso molecular.....Pág 52

**Figura 14:** Alinhamento dos 14 peptídeos selecionados pelo programa Clustal W 18.1.....Pág 55

**Figura 15:** Índices de antigenicidade preditas para os peptídeos selecionados gerados pelo programa Protean 4.0. Os números 1 a 7 representam a seqüência de aminoácidos dos peptídeos mencionados à esquerda. Em destaque, os peptídeos com domínios selecionados.....Pág 57

**Figura 16:** Identificação dos prováveis motivos VxRN e LRN na estrutura terciária da proteína do capsídeo de DENV-2, feito pelo programa Cn3D. Em amarelo, os domínios encontram-se expostos na estrutura conformacional.....Pág 62

**Figura 17:** Teste de imunorreatividade dos clones com soro de pacientes contaminados com DENV-1 e 3, e com proteínas totais de DENV-1, 2 e 3.....Pág 66

## RESUMO GERAL

### SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS RECOMBINANTES MIMÉTICOS DE ANTÍGENOS DO VÍRUS DA DENGUE POR “PHAGE DISPLAY”

A dengue é uma doença infecciosa febril aguda, transmitida de uma pessoa doente a uma pessoa sadia pela picada da fêmea contaminada de um mosquito *Aedes aegypti*. A doença é causada por um arbovírus, membro da família Flaviviridae e do gênero flavivirus. Existem quatro tipos de vírus da dengue: Dengue 1, Dengue 2, Dengue 3 e Dengue 4, e há um grande espectro de manifestações clínicas da doença, sendo as duas principais, a dengue clássica e a dengue hemorrágica. O diagnóstico geralmente é baseado em sintomas, e laboratorialmente é tardio, no entanto vários testes específicos para cada sorotipo.

A tecnologia do “Phage Display” (exposição de biomoléculas em fagos) tem sido amplamente utilizada no mapeamento de epítomos de diversos antígenos, constituintes de vários agentes causadores de doenças.

Com o objetivo de selecionar peptídeos recombinantes expressos no capsídeo de bacteriófagos produziu-se soro policlonal em galinhas previamente sensibilizadas com proteínas totais do vírus da dengue tipo 3. Após 4 ciclos de seleção de uma biblioteca de fagos com peptídeos recombinantes lineares de 7 resíduos contra a IgY policlonal, 14 fagos imunorreativos foram selecionados e suas seqüências de ácidos nucléicos foram posteriormente analisadas por bioinformática. Foi possível identificar domínios protéicos comuns entre os peptídeos, sendo que o principal domínio mapeado foi VLRN.

Testes subseqüentes se fazem necessários para a melhor caracterização destes peptídeos, incluindo possíveis aplicações diagnósticas e vacinais dos peptídeos selecionados.

PALAVRAS-CHAVE: Dengue, “Phage Display”, anticorpo monoclonal.

## ***INTRODUÇÃO GERAL***

# DENGUE

## Epidemiologia

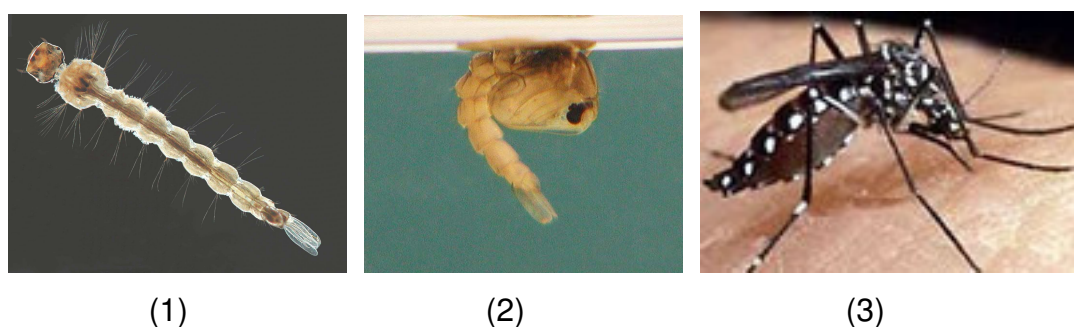
A dengue é uma doença febril aguda causada por um arbovírus, membro da família Flaviviridae e do gênero flavivirus. A doença apresenta evolução benigna, na forma clássica, e grave na forma hemorrágica. A dengue é hoje a mais importante arbovirose que afeta o homem e constitui um sério problema de saúde pública no mundo, especialmente nos países de clima tropical, onde as condições do meio ambiente favorecem o desenvolvimento e a proliferação do *Aedes aegypti*, principal transmissor da doença (Marques *et al.*, 2004).

Quatro sorotipos antigenicamente semelhantes designados dengue vírus tipo 1 (DENV-1), dengue vírus tipo 2 (DENV-2), dengue vírus tipo 3 (DENV-3) e dengue vírus tipo 4 (DENV-4), foram descritos (Ligon, 2004). Os quatro sorotipos do vírus do dengue têm antígenos muito similares, mas são suficientemente diferentes para provocar proteção parcial contra os outros após infecção por um deles. Após um período de incubação de 4-6 dias (mínimo de 3, máximo de 10), o vírus está presente no sangue dos pacientes durante a fase aguda da doença (WHO, 1997).

Os vetores são mosquitos do gênero *Aedes*, popularmente conhecido como pernilongo da dengue. *Ae. aegypti* é um dos mosquitos vetores mais eficientes para a transmissão de arboviroses porque é altamente antropológico e vive nas proximidades de humanos. A transmissão da dengue tem também outros vetores *Ae. Albopictus*, *Ae polynesiensis* e muitas espécies do complexo *Ae scutelleris*. Cada uma dessas espécies tem uma distribuição geográfica particular, no entanto, elas têm baixa eficiência epidêmica, quando comparada ao *Ae. aegypti* (WHO, 1997).

O ciclo ovo-ovo pode durar cerca de 10 dias. Quando a larva do mosquito nasce, ela passa por quatro estágios de crescimento, que podem durar oito dias no total. Depois ela se transforma em pupa, estágio que dura dois dias, aproximadamente. Depois de sair da pupa, o mosquito adulto já pode se reproduzir e botar ovos, quando o ciclo se reinicia (Figura 1).

A fêmea do mosquito, suscetível, infecta-se com o vírus da dengue quando se alimenta de um indivíduo infectante (no período de viremia). Após o período de incubação extrínseca, que vai desde a ingestão do sangue infectado até o momento em que é capaz de transmitir o vírus pela sua replicação nas glândulas salivares, o mosquito permanece infectante até a sua morte. Este período pode variar de 7 a 10 dias. Quando um mosquito infectante injeta o vírus da dengue no hospedeiro suscetível durante o repasto sanguíneo, após um período de incubação que varia, em média, de 4 a 6 dias (mínimo de 3 e máximo de 10 dias), a dengue pode evoluir para forma assintomática, forma clássica com febre, mialgias e artralgias, e para forma grave, conhecida como “dengue hemorrágica”, que cursa com distúrbios da coagulação e choque, podendo levar à morte. A duração dos sintomas varia usualmente de 3 a 7 dias e o período infeccioso (viremia) dura apenas alguns dias, variando também de 3 a 7 dias. Posteriormente, o indivíduo desenvolve imunidade específica de longa duração (Yang, 2003).

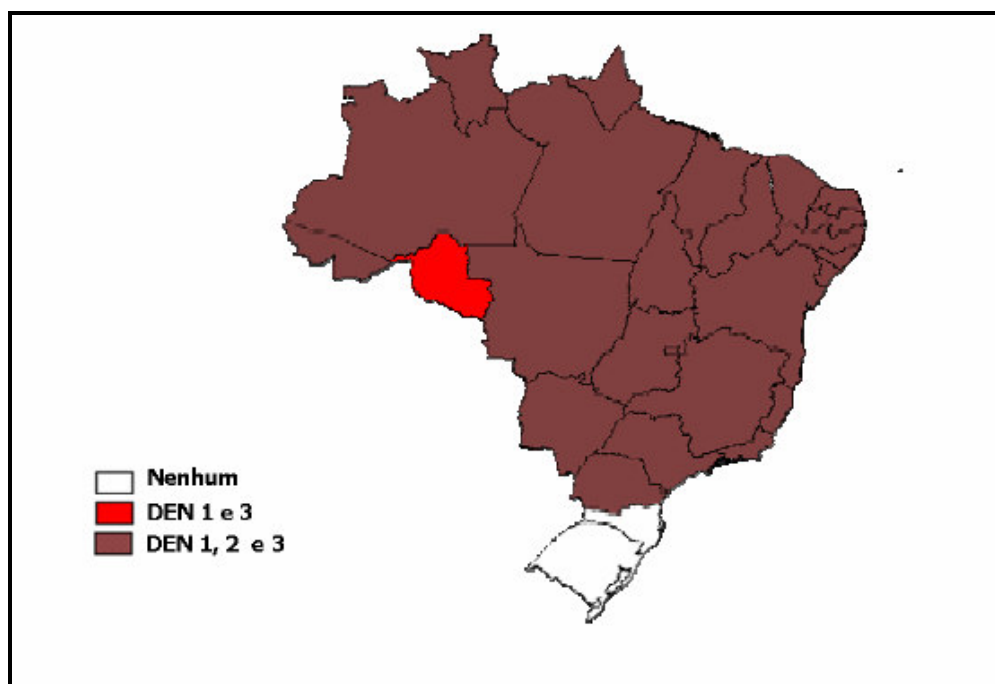


**Figura 1:** Estágios de desenvolvimento do *Aedes aegypti*: (1) larva, (2) pupa, (3) indivíduo adulto [(1) <http://www.arbovirus.health.nsw.gov.au/areas/arbovirus/mosquit/photos>; (2) <http://fmel.ifas.ufl.edu/Key/aegyptipupa.htm>; (3) <http://www.angelfire.com/electronic/bodhidharma/death.html>].

Durante as duas últimas décadas, a incidência da infecção pela dengue tem crescido consideravelmente em áreas endêmicas, particularmente na região as Américas, onde o vírus da dengue tem mostrado uma característica de hiperendemicidade como resultado da circulação de múltiplos sorotipos em muitos países do continente (de Simone *et al.*, 2003).

Nas Américas, o vírus da dengue tem sido relatado há mais de 200 anos, e no Brasil, há referências de epidemias em 1916, em São Paulo, e em 1923, em

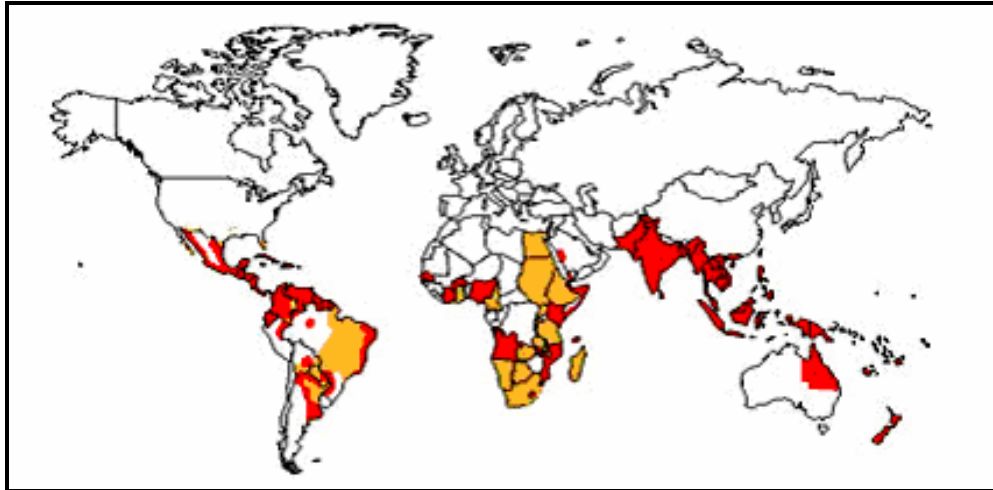
Niterói, sem diagnóstico laboratorial. A primeira epidemia documentada clínica e laboratorialmente ocorreu em 1981-1982, em Boa Vista – Roraima. A partir de 1986, foram registradas epidemias em diversos estados ([http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=22207](http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar_texto.cfm?idtxt=22207)). Atualmente, a circulação dos sorotipos 1, 2 e 3 do vírus foi identificada em 24 unidades federadas (Figura 2), com mais de 200.000 casos notificados em 2005 (Ministério da Saúde, 2005).



**Figura 2:** Sorotipos circulantes do vírus da dengue por Estado, Brasil, 2005 (Ministério da Saúde, 2005).

Em 2005, a dengue foi considerada a mais importante doença transmitida por mosquitos afetando humanos. Sua distribuição global é comparável à da malária, e é estimado que 2,5 bilhões de pessoas vivam em áreas de risco para a transmissão endêmica (Figura 3).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), dois quintos da população mundial corre o risco de ser infectada pela doença, e mais de cem países foram atingidos por epidemias de dengue ou dengue hemorrágica. A OMS estima que, anualmente, ocorrem mais de 50 milhões de casos de contágio de dengue e dengue hemorrágica, dos quais meio milhão de são hospitalizados, com cerca de 20 mil mortes (<http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/index.html>).



**Figura 3:** Distribuição mundial da dengue no ano de 2005. Em amarelo, encontram-se áreas infestadas com *Aedes aegypti*; em vermelho, áreas com *Aedes aegypti* e atividade epidêmica da dengue (<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue/map-distribution-2005.htm>).

### Aspecto clínico e diagnóstico da doença

O processo infeccioso desencadeado pelo vírus da dengue possui um amplo quadro clínico, podendo variar desde uma simples infecção inaparente (assintomática), até quadros mais graves, nos quais se verificam hemorragias, abrupto aumento da permeabilidade vascular e desenvolvimento de choque hipovolêmico. A doença se manifesta clinicamente sob duas formas: dengue clássica (DC), também descrita como febre da dengue (FD) e a dengue hemorrágica (DH) ou febre hemorrágica da dengue (FHD) (Morais, 1998). Segundo Simmons e colaboradores (2005), uma infecção primária com qualquer um dos quatro sorotipos do vírus da dengue, tipicamente, resulta em alguma doença assintomática ou então na febre do dengue. Estudos epidemiológicos sugerem que indivíduos que foram infectados uma segunda vez com um diferente sorotipo, o risco de desenvolver a febre da dengue hemorrágica é significativamente maior.

As características clínicas do dengue freqüentemente dependem da idade do paciente. Os lactentes e as crianças pequenas podem sofrer de febre não diferenciada com erupção maculopapular. As crianças maiores e os adultos têm uma síndrome de febre benigna ou a doença clássica incapacitante com início

abrupto e febre alta, cefaléia severa, dor retro-orbital, dores musculares e articulares. A taxa de mortalidade de casos é extremamente baixa (Guzmán e Kourí, 2002). Segundo os autores, muitas epidemias de dengue são acompanhadas por complicações que envolvem sangramento, tais como epistaxe, sangramento gengival, sangramento gastrointestinal, hematúria e hipermenorrea. Em alguns casos, um sangramento singularmente severo pode levar o paciente a óbito.

O tratamento para os sintomas da dengue clássica não é específico. A medicação é apenas sintomática, com analgésicos e antitérmicos (paracetamol e dipirona). Devem ser evitados os salicilatos (analgésicos a base de ácido acetil salicílico), já que seu uso pode favorecer o aparecimento de manifestações hemorrágicas e acidose (<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue/resources/DengueFactSheet.pdf>).

Os casos típicos de Dengue Hemorrágico são caracterizados por quatro manifestações clínicas principais: febre alta, fenômenos hemorrágicos, hepatomegalia e, freqüentemente, insuficiência circulatória (Guzmán e Kourí, 2002). As autópsias de casos de dengue hemorrágica, em ordem de freqüência, constata-se hemorragias na pele e nos tecidos subcutâneos, nas mucosas do trato gastrointestinal, e no coração e fígado. De maneira geral, é pouco freqüente a ocorrência de hemorragias subaracnoidais ou cerebrais. O volume hemorrágico, entretanto, não é excessivo. Efusão de soro com alto teor protéico (principalmente albumina) é comum nas cavidades pleural e abdominal (WHO, 1997).

A OMS definiu um critério de classificação das formas de Febre Hemorrágica do Dengue em 4 categorias, de acordo com o grau de gravidade (WHO, 1997).

Grau 1 - febre acompanhada de sintomas inespecíficos, em que a única manifestação hemorrágica é a prova do laço positiva.

Grau 2 - além das manifestações constantes do grau 1, somam-se hemorragias espontâneas leves (sangramento de pele, epistaxe, gengivorragia e outros).

Grau 3 - colapso circulatório com pulso fraco e rápido, estreitamento da pressão arterial ou hipotensão, pele pegajosa e fria e inquietação.

Grau 4 - choque profundo com ausência da pressão arterial e pressão de pulso imperceptível.

Na ocorrência de febre hemorrágica da dengue, os pacientes devem ser observados cuidadosamente para identificação dos primeiros sinais de choque. O período crítico será durante a transição da fase febril para a afebril, que geralmente ocorre após o terceiro dia da doença. Em casos menos graves, quando os vômitos ameaçarem causar desidratação ou acidose, ou não houver sinais de hemoconcentração, a reidratação do paciente pode ser feita em nível ambulatorial (WHO, 1997).

Os quatro vírus da dengue são capazes de produzir casos de FDH, sendo que DENV-2 e DENV-3 são mais freqüentemente associados à severa doença (Guzmán e Kourí, 2002).

Os métodos comumente usados para confirmar a infecção pela dengue, envolvem o isolamento do vírus, a detecção do antígeno ou RNA do vírus no plasma ou soro ou tecidos, e a presença de anticorpos vírus-específicos no soro e outros fluídos. Recentemente, várias técnicas têm sido desenvolvidas para um diagnóstico laboratorial rápido do vírus da dengue: a amplificação para um aumento na taxa de vírus isolado; o método de citometria de escoamento para uma rápida detecção de vírus; detecção de ácido nucléico viral por PCR-NESTED, RT-PCR, sequenciamento baseado na amplificação de ácido nucléico, e PCR em tempo real, detectando antígenos virais livres, imunoglobulina M (IgM) anti-vírus da dengue ou anticorpos IgG por ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay); diferenciação de uma infecção primária ou secundária pelo vírus (Kao *et al.*, 2005).

### **Controle do vetor**

A OMS considera o controle e a prevenção da dengue uma das suas prioridades. Atualmente, não existe uma vacina licenciada para o uso humano, apesar de intensa pesquisa nesse campo nos últimos 30 anos (Silveira, 2002). O controle dessa e de outras doenças causadas pelo *Aedes aegypti* baseia-se principalmente no controle do vetor (Severson *et al.*, 2004). Para isto, a participação da comunidade é extremamente importante na erradicação dos

locais com água que sirvam como criadouros do mosquito: pneus velhos, pratos ou vasos de plantas, garrafas, caixas d'água destampadas, e outros item que acumulem água (Ligon, 2004). O uso de malathion a ultra baixo volume é indicado para borrifação ambiental perifocal nos locais onde foram identificados casos de dengue e/ou o vetor. Porém o inseticida somente age nas formas aladas do mosquito e há relato de resistência nas Américas. Melhoria das condições higiênico-sanitárias das habitações, coleta apropriada do lixo e fornecimento de água encanada são medidas também importantes no controle do dengue. São, portanto, necessárias campanhas de esclarecimento dos vários segmentos da população, utilizando para isso os meios de comunicação existentes, coordenados pelas autoridades sanitárias da região (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>).

Torna-se relevante o incremento da investigação da epidemiologia do dengue e seus vetores por parte de grupos de pesquisa já constituídos, além do incentivo à pesquisa operacional para responder de forma ágil questões específicas dos programas de controle e avaliar o impacto dessas ações (Donalísio e Glasser, 2002).

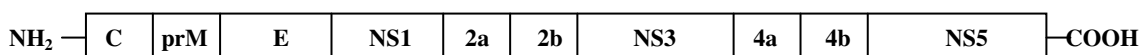
### **Caracterização estrutural e molecular do vírus**

A microscopia eletrônica tem sido usada para visualizar toda a estrutura de alguns flavivirus, até os vários estágios de seus ciclos de vida (Mukhopadhyay, 2005). A estrutura do vírus da dengue foi recentemente descrita pelo uso de cryo-eletromicroscopia (cryoEM), que permite a visualização de certos componentes da proteína viral (Kuhn *et al.* 2002).

O vírus da dengue é esférico com uma superfície relativamente lisa, exceto nas regiões em que as moléculas de glicoproteína se associam. Apresenta um diâmetro de aproximadamente 500 Å, e um capsídeo icosaédrico coberto por um envelope lipídico. O RNA é de cadeia simples, com aproximadamente 10.700 nucleotídeos. O genoma tem 11 Kb e codifica 3 proteínas estruturais [Capsídeo (C, 100 aminoácidos), Membrana (M, 75 aminoácidos) e Envelope (E, 495 aminoácidos)], sendo que as duas últimas estão na superfície do vírus. Além disso, codifica também 7 proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3,

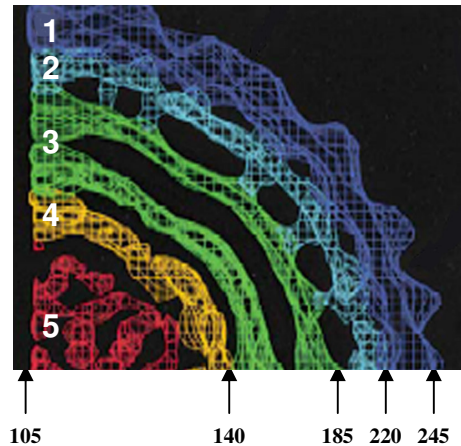
NS4a, NS4b, NS5) (Guzmán e Kouri, 2002; Kuhn *et al.* 2002). As regiões não codificantes 3' e 5' são importantes para a regulação da replicação viral. As principais propriedades biológicas do vírus relacionam-se à proteína E, do envelope: a ligação aos receptores, a aglutinação de eritrócitos, a indução de anticorpos neutralizantes e a resposta imune protetora estão, todas relacionadas à estrutura desta proteína (Guzmán e Kouri, 2002; Zhang *et al.*, 2004).

Durante a replicação do vírus, a cadeia senso positiva do RNA genômico viral é traduzida como uma poliproteína na ordem 5'-C-prM(M)-E-NS1-NS2a-NS2b-NS3-NS4a-NS4b-NS5-3', como mostra a Figura 4. A prM representa a proteína precursora de membrana (Wu *et al.*, 2003; Chua *et al.*, 2004).



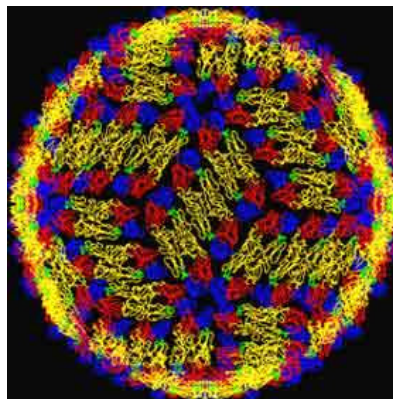
**Figura 4:** Esquema das proteínas virais arranjadas na poliproteína codificada pela cadeia simples de RNA.

Uma distribuição radial do vírus observada por crioeletromicroscopia, mostrou que a densidade deste pode ser dividida em uma série de camadas concêntricas, como apresentado na Figura 5. No envelope estão inseridas as proteínas de envelope (E) e a de membrana (M). A densidade mais alta ocorre no escudo exterior, entre os raios de 220 e 245 Å, e representa a glicoproteína E. O próximo escudo, entre os raios de 185 e 220 Å, representa os ectodomínios da proteína M (38 aminoácidos) e hastes da glicoproteína E (52 aminoácidos). Imediatamente abaixo, entre os raios de 140 e 185 Å, estão duas camadas concêntricas, as bicamadas lipídicas. Internamente, encontra-se o nucleocapsídeo, entre os raios de 105 e 135 Å. A densidade do escudo no nucleocapsídeo tem características globulares distintas representando as subunidades da proteína C. Entre 105 e 135 Å, corresponde a região do nucleocapsídeo, e dentro de um raio de 105 Å, a região do RNA do núcleo (Kuhn *et al.* 2002).



**Figura 5:** Representação de um corte central no vírus da dengue: 1- Proteína do envelope; 2- ectodomínios da proteína M e hastes da glicoproteína E; 3- bicamada lipídica; 4 e 5- Nucleocapsídeo ; 5- Ácido ribonucléico (RNA) (Kuhn *et al.* 2002).

A estrutura do vírus da dengue (Figura 6) possui jogos de três dímeros, quase paralelos, que dão forma a uma associação dominante, substituindo assim, as interações entre monômeros individuais na partícula icosaédrica montada (Kuhn *et al.* 2002).



**Figura 6:** Estrutura do vírus da dengue inteiro, mostrando cada monômero com os domínios I, II e III em vermelho, amarelo e azul, respectivamente. A fusão dos peptídeos é mostrada em verde (Kuhn *et al.* 2002).

A proteína E possui peso molecular de 53 kDa, e contém importantes determinantes antigênicos. Os anticorpos, principalmente os que se ligam a

epítomos da proteína E, promovem lise do envelope ou bloqueio de seus receptores, com conseqüente neutralização viral. A proteína E, localizada nas espículas do envelope dos vírus do dengue é fundamental para a ligação viral ao receptor de membrana e possui os mais importantes domínios antigênicos destes microorganismos. Os epítomos de E definem a produção de anticorpos específicos para o tipo viral e para o gênero dengue (Figueiredo, 1999). A estrutura da proteína E consiste de três domínios: domínio I (DI), o domínio N-terminal, e estruturalmente central; domínio II (DII), o domínio de fusão (ou dimerização) contendo o peptídeo hidrofóbico de fusão (Alisson *et al.*, 2001); e domínio III (DIII), o suposto domínio ligante ao receptor (Bhardwaj *et al.*, 2001).

O vírus da dengue entra na célula hospedeira quando a glicoproteína viral do envelope E liga ao receptor e responde com rearranjo conformacional à redução do pH. A mudança conformacional induz a fusão das membranas virais e da célula do hospedeiro (Modis *et al.*, 2004; Bressanelli *et al.*, 2004). A determinação da disposição de proteínas transmembrana mostra que o núcleo do nucleocapsídeo e as proteínas do envelope não têm uma interação direta no vírus maduro (Zhang *et al.*, 2003).

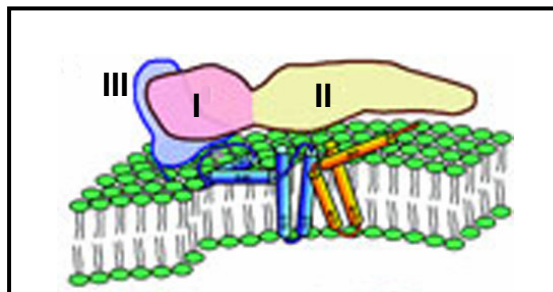
Videa e colaboradores (2005) misturaram os quatro polipetídeos recombinantes do vírus da dengue correspondendo a região N-terminal da proteína do envelope de todos os sorotipos, fizeram um teste ELISA, e encontraram 100% de concordância entre esses polipeptídeos, tornando-os reagentes úteis e acessíveis para o diagnóstico sorológico da dengue em países endêmicos.

As seqüências dos aminoácidos das proteínas E do DENV-2 e DENV-3 são 68% idênticas (Modis *et al.*, 2004).

As regiões  $\alpha$ -helicoidais da haste das moléculas de E, assim como a porção N-terminal das proteínas de M, são enterradas no folheto exterior da membrana viral. As regiões “âncora” das proteínas E e M, cada uma forma uma  $\alpha$ -hélice transmembrana antiparalela E-E e M-M, deixando a porção C-terminal no exterior da membrana viral (Figura 7) (Zhang *et al.*, 2003).

A proteína M é produzida pela clivagem da sua precursora, a glicoproteína pre-M, durante a fase final de maturação viral (Kuhn *et al.*, 2002 e Holbrook *et al.*, 2001). A proteína prM é clivada antes da liberação do vírus da célula, deixando a

pequena proteína estrutural M ancorada no envelope viral, e liberando o segmento “pr” no meio extra celular (Westaway, 1987)



**Figura 7:** Diagrama do ectodomínio do vírus da dengue e proteínas do domínio transmembrana: ectodomínio de um monômero E, em rosa (domínio I), amarelo (domínio II) e azul (domínio III); a alça e hélice de E e M estão em azul e laranja, respectivamente (Zhang *et al.*, 2003).

A proteína do capsídeo do vírus da dengue é essencial para a encapsidação específica do RNA genômico, mas há pouca informação sobre ela. O mecanismo de encapsidação não é compreendido, mas pode requerer a participação de proteínas virais não estruturais como também da proteína C (Ma *et al.*, 2004).

A descrição da estrutura da proteína C da dengue revela uma dobra alternada, e esta região sugere a interação com outros componentes virais na partícula do vírus. Além disso, o modelo comprova a associação da porção C-terminal da proteína do capsídeo com o RNA (Ma *et al.*, 2004).

A proteína NS1 do vírus da dengue maduro contém 352 resíduos de aminoácidos, em um polipeptídeo 40 kDa. Contém também 12 resíduos de cisteína que são absolutamente conservados em todas as proteínas NS1 de flavivirus, indicando a sua importância à estrutura e função (Wallis *et al.*, 2004). A NS1 é expressa em células de mamíferos infectados sob três formas diferentes: intracelular, associada à membrana, essencial para a replicação viral; associada à superfície da célula, envolvida na transdução do sinal; sob uma forma secretada (sNS1), com propriedades biológicas ainda não elucidadas (Alcon-LePoder *et al.*, 2005). Os autores fizeram um estudo em camundongos adultos para determinar a distribuição da proteína *in vivo*, e esta foi predominantemente encontrada

associada ao fígado, sendo que os hepatócitos eram as principais células-alvo. Em humanos, NS1 foi eficientemente endocitada pelos hepatócitos *in vitro*. O estudo demonstra também que o acúmulo de sNS1 no último compartimento endossomal dos hepatócitos potencializa uma subsequente infecção pelo vírus *in vitro*, aumentando a possibilidade de que sNS1 possa contribuir para a propagação viral *in vivo*.

Relacionada com o processamento da proteína NS1, a proteína NS2a é a primeira de quatro pequenas proteínas hidrofóbicas. As proteínas NS2b, NS4a e NS4b são pequenas tal como a NS2a e são pouco conservadas entre flavivirus. Estas proteínas podem formar componentes de membrana nos complexos de replicação viral e podem estar envolvidas na localização de membranas das proteínas NS3 e NS5 via interação proteína-proteína (Chambers *et al.* 1990; Mackow *et al.*, 1987; Lindenbach e Rice, 1999).

A proteína NS3 é a segunda maior (68-70 kDa) e também a segunda mais altamente conservada proteína viral entre os flavivirus. Esta proteína não contém longos trechos de aminoácidos hidrofóbicos, mas tem associação com a membrana. (Chua *et al.*, 2004). A proteína NS3 tem um papel crítico na maturação e replicação da poliproteína, e sua ausência impede essas atividades (Katzenmeier, 2004). A proteína NS3 é composta de 618 aminoácidos, sendo que um terço da porção N-terminal (167 resíduos de aminoácidos) tem o domínio serina protease que requer NS2b - proteína ativadora - para catalizar o processamento das poliproteínas virais NS2a-NS2b, NS2b-NS3, NS3-NS4a e NS4b-NS5. O NS3 restante da proteína forma sítio de ligação a nucleotídeos trifosfatase (NTPase) e o sítio de ligação ao RNA. Previamente, um fragmento de 50 kDa truncado da região amino terminal de NS3 (designado NS3') com um potencial sítio de clivagem localizado no domínio helicase, foi encontrado em células de mamíferos infectados com flavivirus, mas não em células infectadas de mosquitos (Chao *et al.*, 2005).

NS5, a maior das dez proteínas e a mais altamente conservada, com 104 kDa (900 resíduos de aminoácidos), é uma proteína de multidomínios, com pelo menos dois domínios que contenham atividade enzimática que são cruciais para o ciclo replicativo do vírus. A região N-terminal está associada com a reação de encapsulação do RNA que coloca uma estrutura cap1 (7MeG5'-ppp5'-NMe) no

RNA de cadeia positiva do genoma. O sítio C-terminal contém oito motivos altamente conservados (I a VIII) que têm sido reconhecidos em muitas RNA polimerases RNA-dependentes e inclui o tripeptídeo “GDD” encontrado em todas as polimerases. Interessantemente, a atividade de encapsulação envolve três passos enzimáticos envolvendo a RNA trifosfatase 5'-terminal, a guanililtransferase, e a RNA metiltransferase (Baleotti *et al.*, 2003 e Chao *et al.*, 2005).

### **Caracterização antigênica do vírus**

Durante a infecção primária, o indivíduo desenvolve IgM após 5-6 dias e IgG após 7-10 dias. Durante a infecção secundária, altos níveis de IgG são detectáveis enquanto durar a fase aguda e aumentam consideravelmente até as próximas duas semanas. Os níveis de IgM diminuem, e em alguns casos, é indetectável durante a infecção secundária. Anticorpos IgM sugerem uma recente infecção, no entanto, eles permanecem por 2-3 meses. Altos títulos de IgG são características de infecção secundária (Guzmán e Kourí, 2002 e Chanama, 2004).

A glicoproteína E é um importante alvo de anticorpos contra DENV, e tem sido mostrado que anticorpos contra E inibem a ligação viral às células, e neutraliza a infectividade viral *in vitro* (Rothman, 2004). O domínio III da proteína E é particularmente importante para o desenvolvimento de vacinas para sorotipos específicos, pois a proteína possui múltiplas conformações que são sorotipo-dependentes (Jaiswal, 2004).

A proteína NS1 é também um importante alvo de anticorpos contra DENV. Anticorpos contra NS1 lisam células infectadas com o vírus *in vitro* e tem mostrado proteção contra o DENV em camundongos. Um anticorpo monoclonal direcionado contra a proteína prM também tem mostrado proteção contra o DENV em camundongos (Rothman, 2004).

A proteína NS3 parece ser particularmente imunogênica, com uma preponderância de epítomos de células T identificados. Essas células T reconhecem os diferentes sorotipos do DENV, dependendo do grau de homologia ao epítomo dado. No entanto, epítomos originários da proteína NS5, que é altamente conservada entre sorotipos, podem apresentar reatividade cruzada,

comportamento contrário da proteína NS3, que reconhece sorotipos específicos de DENV (Rothman, 2004). A proteína NS3 parece ser o principal alvo para células T CD4+ e CD8+, no entanto, alguns epítomos de células T têm sido reconhecidos em outras proteínas tais como envelope e capsídeo (Guzmán e Kourí, 2002).

Tem sido demonstrado que linfócitos T de memória respondem após a infecção primária, e há a possibilidade de que durante a infecção secundária, células T se tornem ativadas devido a interações com monócitos infectados. A rápida liberação de citocinas causada pela ativação de células T, e pela lise de monócitos infectados mediada por linfócitos citotóxicos pode resultar no extravasamento do plasma e hemorragia, como ocorre na FDH (WHO, 1997). Citocinas que induzem o extravasamento plasmático, tais como as interferon  $\gamma$ , interleucina (IL) 2 e fator necrosante de tumores (TNF)  $\alpha$  são aumentadas nos casos de FDH. Outras citocinas tais como IL-6, IL-8 e IL-10 também aumentam (Guzmán e Kourí, 2002).

Antígenos da dengue têm sido detectados em células de Kuffer, macrófagos alveolares, fagócitos mononucleares na pele e circulantes nos monócitos. O vírus tem sido isolado ou detectado em órgãos como os linfonóides, fígado, baço, rim e cérebro. Células imune efectoras, como monócitos e linfócitos T e células não-imune, como hepatócitos, células endoteliais e células do cérebro, têm sido noticiadas como potenciais hospedeiros (Guzmán e Kourí, 2002).

Uma infecção natural com o vírus da dengue induz uma imunidade protetora somente ao mesmo sorotipo (homóloga), e uma proteção por curto período de tempo (meses) contra um outro sorotipo (Rothman, 2004).

Uma vacina efetiva precisa proteger contra todos os quatro sorotipos da dengue, ou seja, ser tetravalente (Rothman, 2004). Além disso, precisa ser segura para uso humano, e ser economicamente viável (Halstead e Deen 2002). Para esse objetivo uma série de técnicas vem sendo estudadas, incluindo vacinas com vírus atenuados e vírus recombinantes, vacinas de subunidades recombinantes, e vacinas de DNA (OMS, 2005). As vacinas tetravalentes contendo vírus vivos atenuados parecem ser as mais adequadas para prevenir a doença, devido à possibilidade de proteção para todos os sorotipos e por longos períodos de tempo. As vacinas vivas têm a vantagem de estimular tanto a imunidade humoral (altos títulos de anticorpos neutralizantes), como a resposta celular (Bricks, 2004).

As proteínas NS1 e NS3 não estão associadas a partículas virais livres, e não parecem induzir a formação de anticorpos facilitadores da infecção. Por esses motivos são promissoras para o desenvolvimento de vacinas contra a dengue (Bricks, 2004).

Enquanto se aguarda a vacina, a melhor medida para controlar a doença é esclarecer a população sobre a forma de combate à proliferação dos mosquitos.

## PHAGE DISPLAY

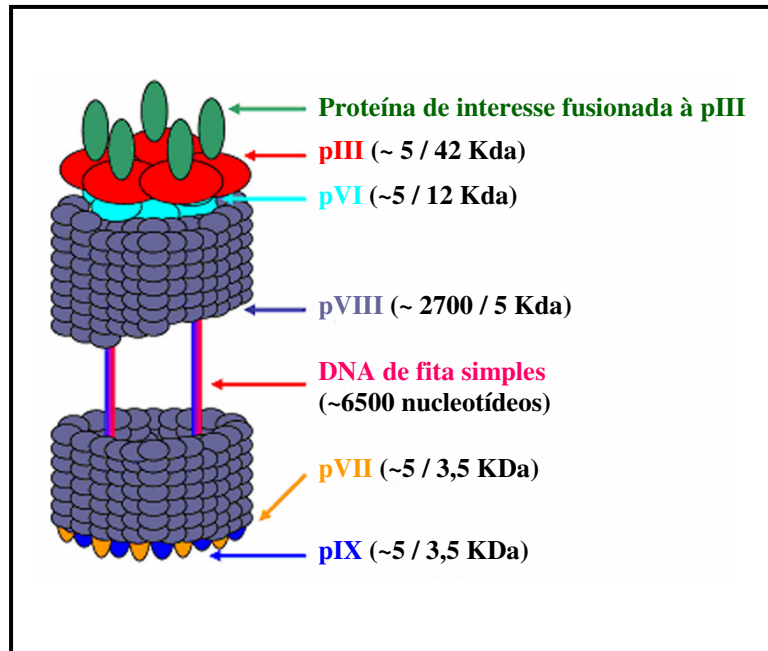
A metodologia do *Phage Display*, exposição de biomoléculas em fagos, foi desenvolvida por Smith (1985), ao conseguir a expressão da enzima de restrição EcoRI através da fusão com a proteína três (pIII) do capsídeo do fago.

*Phage display* permite a seleção de peptídeos e proteínas, incluindo anticorpos, com alta afinidade e especificidade para vários alvos. A vantagem crucial dessa tecnologia está na ligação direta que existe entre o fenótipo experimental e o genótipo encapsulado, mostrando a evolução dos ligantes selecionados até moléculas otimizadas (Azzazy e Highsmith, 2002).

Bacteriófagos, ou simplesmente fagos, são vírus que infectam uma variedade de bactérias Gram-negativas usando o *pilus* sexual como receptor. As partículas de fagos filamentosos (linhagens M13, f1 e fd) que infectam *E. coli* via *pilus F*, consiste em uma fita simples de DNA que é envolta em uma cápsula protéica. Um fago viável expressa aproximadamente 2.700 cópias da proteína gene 8 (g8 ou pVIII, uma proteína de 50 resíduos de aminoácidos) e 3 a 5 cópias do gene III (p3p ou pIII, proteína de 406 aminoácidos) (Russel, 1991).

A partícula viral esquematizada na Figura 8 é composta por cinco proteínas estruturais, presentes no capsídeo: pIII, pVI, pVIII, pVII e pIX. A pVIII forma o corpo cilíndrico do capsídeo. Nas extremidades desse capsídeo encontram-se de três a cinco cópias das demais proteínas estruturais. A extremidade distal contém as proteínas pVII e pIX, enquanto que a proximal é composta pelas proteínas codificadas pelo gene 3 (pIII) e pela própria pVI. A incorporação de proteínas exógenas na superfície dos fagos filamentosos faz-se fusionando esses peptídeos a proteínas estruturais das partículas virais. As duas principais proteínas utilizadas para esse fim são a proteína pVII e a pIII. A proteína 3, a maior das proteínas estruturais, com cerca de 42 KDa, também é responsável pela adesão da partícula viral ao *pilus* sexual (Brígido e Maranhão, 2002).

Foram identificados sítios potenciais para a inserção de peptídeos externos na proteína principal de revestimento (pVIII) do M13. Todos sítios de inserção, que foram usados com sucesso, ficam situados a 5 aminoácidos da porção N-terminal. Já os virions com inserções maiores do que aproximadamente 6 aminoácidos, não são incorporados ao mutante (Makowski, 1993).



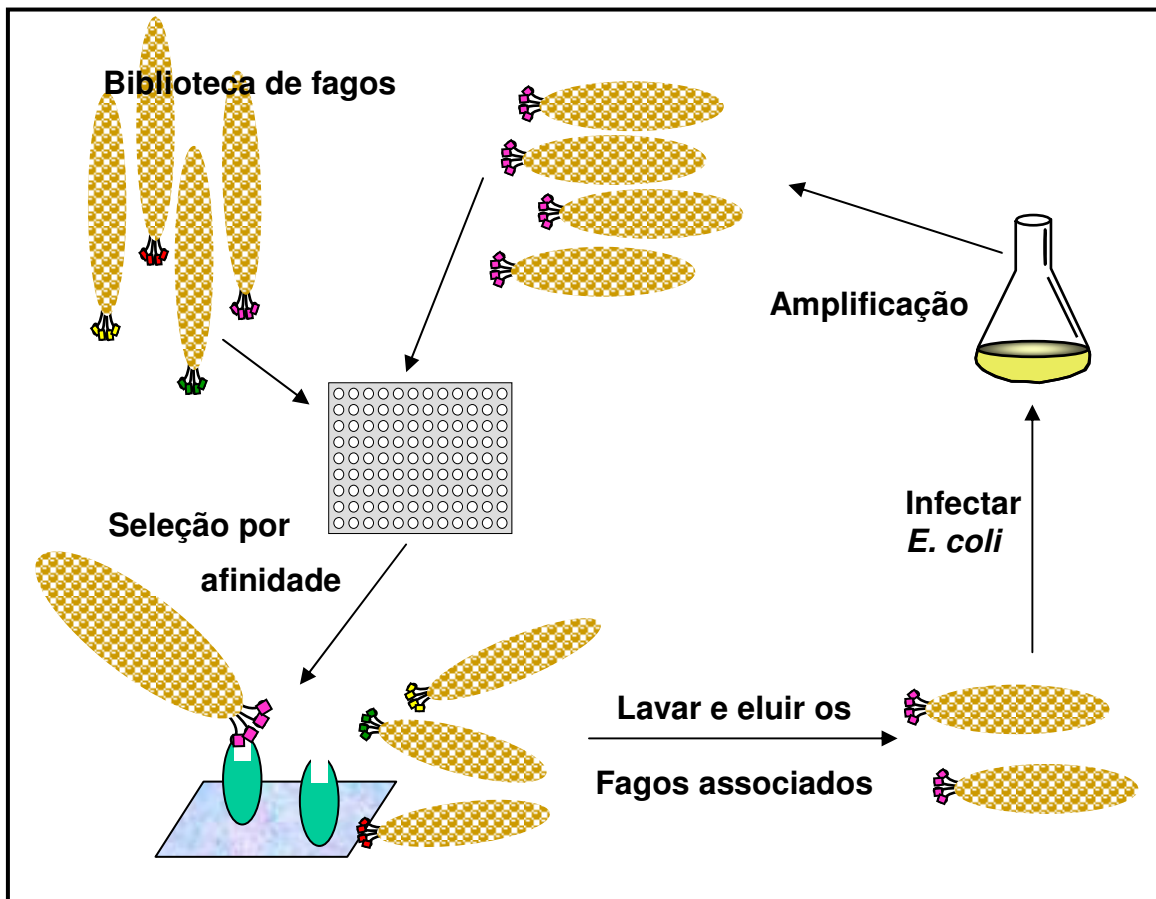
**Figura 8:** Estrutura do fago M13 (<http://www.theses.ulaval.ca/2003/21058/ch01.html>)

O sistema *phage display* foi criado para a exposição de bibliotecas de pequenos peptídeos (no máximo 30 aminoácidos). Isto porque o tamanho da proteína inserida no vetor deve ser limitado, pois grandes proteínas interferem nas funções das proteínas do capsídeo, tornando o fago pouco infectivo (Phizicky e Fields, 1995).

*Phage display* tem provado ser uma técnica muito poderosa na obtenção de bibliotecas contendo milhões ou até mesmo bilhões de diferentes peptídeos ou proteínas. A metodologia de bibliotecas mais amplamente utilizada é baseada no uso de fagos filamentosos (Smith 1985). As seqüências de DNA de interesse são inseridas em uma localização no genoma de bacteriófagos filamentosos, de modo que a proteína codificada é expressa na superfície do fago filamentososo como um produto de fusão a uma das proteínas da superfície do fago (Azzay e Highsmith, 2002)

O peptídeo ou proteína expresso na superfície do fago possibilita a seleção de seqüências baseada na afinidade de ligação para uma molécula alvo por um processo de seleção *in vitro* denominado *biopanning* (Parmley e Smith, 1988).

A seleção, ou *biopanning*, é realizada pela incubação da biblioteca de peptídeos expostos em fagos contra o alvo. O alvo é imobilizado em um suporte sólido tais como placas de ELISA, *beads*, resinas e membranas. Os fagos não ligantes ao alvo são eliminados por lavagens sucessivas, e os fagos específicos permanecem ligados para posterior eluição. O *pool* de fagos específicos é amplificado para os ciclos posteriores de seleção biológica (ciclos de ligação, eluição e amplificação) para o enriquecimento do conjunto de fagos com seqüências específicas contra o alvo. Após três ou quatro passagens, os clones individuais são caracterizados por seqüenciamento de DNA, *western blotting* ou ELISA (Smith 1985), conforme mostrado na Figura 9.



**Figura 9:** Ciclo do “Biopanning” em placa. Em cada ciclo, os fagos reativos com o alvo são selecionados por lavagens sucessivas, sendo os demais descartados. Os fagos remanescentes são então amplificados e seguem um novo ciclo para a maturação da afinidade de ligação ao alvo específico.

Peptídeos selecionados contra um alvo particular que tem seqüência similar têm um papel na identificação do motivo necessário para ligação (Stephen e Lane, 1992). Nos casos em que os peptídeos selecionados não se assemelham ao peptídeo ligante natural, foram denominados mimotopos (Geysen, *et al.*, 1986; Smith e Scott, 1993).

Peptídeos que neutralizam imunoglobulinas podem ser empregados como reagentes diagnósticos ou usados como agentes terapêuticos controlando doenças auto-imunes (Blank *et al.*, 1999). Bibliotecas de peptídeos randômicos podem ser usadas para mapear epítomos de anticorpos policlonais e monoclonais, identificando peptídeos ligantes, e desenvolvendo fagos que definem sítios para diferentes enzimas (Mattheus e Wells, 1993; Ohkubo *et al.*, 2001).

Apesar da técnica de *phage display* ter sido primeiramente introduzida há aproximadamente 15 anos, as aplicações e desenvolvimento desta tecnologia estão apenas começando a ser exploradas. Essa exploração da tecnologia de *phage display* irá levar à produção de uma enorme gama de ligantes, incluindo anticorpos recombinantes e peptídeos, com especificidades predefinidas. Além disso, tecnologias emergentes baseadas em *phage display* irão beneficiar diagnósticos através da produção de moléculas impossíveis de se obter por métodos tradicionais. Especificamente, anticorpos recombinantes contra antígenos tóxicos ou seqüências conservadas e carboidratos podem ser isolados (Soderlind *et al.*, 2000).

Os trabalhos com o uso da técnica *phage display* abrangem diversos estudos a respeito de enfermidades humanas como a tuberculose (Jeong *et al.*, 2006), diabetes (Baltrusch *et al.*, 2005), hepatite A (Kim *et al.*, 2004), hepatite B (Lu *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004) hepaptite C (Ferrieu-Weisbuch *et al.*, 2006), hepatite E (Gu *et al.*, 2004), hanseníase (Yang *et al.*, 2005), AIDS (Sticht *et al.*, 2005), mal de Parkinson (Gearhart *et al.*, 2002), câncer (Zhang *et al.*, 2005; Dantas-Barbosa *et al.*, 2005; Sharon *et al.*, 2005), Dengue (Wu *et al.*, 2001), dentre outros.

Uma das grandes vantagens apresentadas pela técnica de *Phage display* diz respeito a sua direta aplicação prática em teste de imunogenicidade. Fagos são comumente utilizados como partículas imunogênicas para a geração de anticorpos contra os peptídeos recombinantes expressos nas regiões N-terminais

de proteínas de superfícies e reagir cruzadamente com o alvo original, indicando que mimotopos expressos poderiam ser utilizados como candidatos a subunidades vacinais (Yang e Shiuan, 2003).

Durante os últimos 10 anos, exposição de anticorpos/antígenos em fagos (*phage display*) tem se transformado em uma técnica bem aceita e, num pequeno espaço de tempo tem gerado moléculas de altíssima qualidade. Anticorpos/antígenos derivados por *phage display* têm provado sua segurança e eficácia em testes clínicos. Processos de seleção adaptados à técnica, em combinação com anticorpos/antígenos de fácil montagem, abrem amplamente as portas para desenvolvimento sofisticado de anticorpos como medicamentos. Em adição, estes anticorpos/antígenos selecionados por *phage display* oferecem maiores vantagens em termos de velocidade e rendimento para pesquisa e identificação/validação de alvos. *Phage display* já é parte de uma moderna forma de descoberta de novas drogas (Kretzschmar e von Ruden, 2002).

## OBJETIVOS

Os objetivos principais do presente trabalho foram:

1. Isolar peptídeos reativos com o soro anti-dengue a partir de bibliotecas de peptídeos recombinantes (*phage display*).
2. Confirmar a imunorreatividade dos fagos recombinantes selecionados por métodos imunoenzimáticos e caracterizá-los por sequenciamento e bioinformática, determinando os prováveis epítomos funcionais das proteínas virais.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Alcon-LePoder S, Drouet MT, Roux P, Frenkiel MP, Arborio M, Durand-Schneider AM, Maurice M, Le Blanc I, Gruenberg J, Flamand M (2005) The secreted form of dengue virus nonstructural protein NS1 is endocytosed by hepatocytes and accumulates in late endosomes: implications for viral infectivity. *Journal of Virology* 79:11403-11411.

Alisson SL, Schalich J, Stiasny K, Mandl CW, Heinz FX (2001) Mutational evidence for an internal fusion peptide in flavivirus envelope protein E. *Journal of Virology* 75:4268–4275.

Azzazy HM, Highsmith WE Jr (2002) Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clinical biochemistry* 35:425-445.

Baleotti FG, Moreli ML , Figueiredo LTM (2003) Brazilian flavivirus phylogeny based on NS5. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98: 379-382.

Baltrusch S, Francini F, Lenzen S, Tiedge M (2005) Interaction of glucokinase with the liver regulatory protein is conferred by leucine-asparagine motifs of the enzyme. *Diabetes* 54:2829-2837.

Blank M, Shoenfeld Y, Cabilly S, Heldman, Y, Fridkin M, Katchalsi-Katzir E (1999) Prevention of experimental antiphospholipid syndrome and endothelial cell activation by syntetic peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:5164-5168.

Bhardwaj S, Holbrook M, Shope RE, Barrett ADT, Watowich SJ (2001). Biophysical characterization and vector-specific antagonist activity of domain III of the tick-borne flavivirus envelope protein. *Journal of Virology* 75:4002-4007.

Bressanelli S, Stiasny K, Allison SL, Stura EA, Duquerroy S, Lescar J, Heinz FX, Rey FA (2004) Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. *EMBO Journal* 23:728–738.

Bricks LF (2004) Vacinas para a dengue: perspectivas. *Pediatria (São Paulo)* 26:268-281.

Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM (1990) Flavivirus genome organization, expression and replication. *Annual review of microbiology* 44:649-688.

Chanama S, Anantapreecha S, A-nuegoonpipat A, Sa-gnasang A, Kurane I, Sawanpanyalert P (2004) Analysis of specific IgM responses in secondary dengue virus infections: levels and positive rates in comparison with primary infections. *Journal of Clinical Virology* 31: 185-189.

Chao DY, King CC, Wang WK, Chen WJ, Wu HL, Chang GJJ (2005) Strategically examining the full-genome of dengue virus type 3 in clinical isolates reveals its mutation spectra. *Virology Journal* 72.

Dantas-Barbosa C, Brigido MM, Maranhao AQ (2005) Construction of a human Fab phage display library from antibody repertoires of osteosarcoma patients. *Genetics and Molecular Research* 4:126-140.

de Simone TS, Nogueira RMR, Araújo, ESM, Guimarães FR, Santos FB, Schatzmayr HG, Souza RV, Teixeira Filho G. (2003) Dengue virussurveillance: the co-circulation of DENV-1, DENV-2 e DENV-3 in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 98:553-562.

Donalísio MR, Glasser CM (2002) Vigilância entomológica e controle de vetores do dengue. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 5:259-272.

Ferrieu-Weisbuch C, Bettsworth F, Becquart L, Paranhos-Baccala G, Michel S, Arnaud M, Jolivet-Reynaud C (2006) Usefulness of the phage display technology

for the identification of a hepatitis C virus NS4A epitope recognized early in the course of the disease. *Journal of Virological Methods* 131:175-83.

Figueiredo, LTM (1999) Vacinas contra o dengue. *Simpósio: Virologia Médica I* 32: 21-25.

Gearhart DA, Toole PF, Warren Beach J (2002) Identification of brain proteins that interact with 2-methylnorharman. An analog of the parkinsonian-inducing toxin, MPP+. *Neuroscience Research*. 44:255-65.

Geysen HM, Rodda SJ and Mason TJ (1986) A priori delineation of a peptide which mimics a discontinuous antigenic determinant. *Molecular Immunology* 23:709-715.

Gu Y, Zhang J, Wang YB, Li SW, Yang HJ, Luo WX, Xia NS (2004) Selection of a peptide mimic the neutralization epitope of hepatitis E virus with phage peptide display technology. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 19:680-705.

Guzmán MG, Kouri G (2002) Dengue: an update. *The Lancet Infectious Diseases* 2:33-42.

Halstead SB, Deen J (2002) The future of dengue vaccines. *The Lancet* 360:1243-1245.

Holbrook MR, Wang H, Barrett ADT (2001) Langkat virus M protein is structurally homologous to prM. *Journal of virology* 75:3999–4001.

Jaiswal S, Khanna N, Swaminathan S (2004) High-level expression and one-step purification of recombinant dengue virus type 2 envelope domain III protein in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 33:80–91.

Jeong EH, Son YM, Hah YS, Choi YJ, Lee KH, Song T, Kim DR (2006) RshA mimetic peptides inhibiting the transcription driven by a *Mycobacterium*

tuberculosis sigma factor SigH. Biochemical and Biophysical Research Communications 339:392-398.

Katzenmeier G (2004) Inhibition of the NS2B-NS3 protease – towards a causative therapy for dengue virus diseases. OMS - Dengue Bulletin 28:58-67.

Kao CL, King CC, Chao DY, Wu HL, Chang GJJ (2005) Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. Journal of Microbiology, Immunology and Infection 38:5-16.

Kim SJ, Jang MH, Stapleton JT, Yoon SO, Kim KS, Jeon ES, Hong HJ (2004). Neutralizing human monoclonal antibodies to hepatitis A virus recovered by *phage display*. Virology 318:598-607.

Kretzschmar T, von Ruden T, 2002. Antibody discovery: *phage display*. Current Opinion in Biotechnology 13:598-602.

Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, Jones CT, Mukhopadhyay S, Chipman PR, Strauss EG, Baker TS, Strauss JH (2002) Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. Cell 108: 717-725.

Ligon BL (2004) Dengue fever and dengue hemorrhagic fever: a review of the history, transmission, treatment and prevention. Seminars in Pediatric Infectious Diseases 15:60-65.

Lindenbach BD, Rice CM (1999) Genetic interaction of flavivirus nonstructural Proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. Journal of Virology 73:4611–4621.

Lu X, Weiss P, Block T (2004) A phage with high affinity for hepatitis B surface antigen for the detection of HBsAg. Journal of Virological Methods 119:51-4.

Ma L, Jones CT, Groesch TD, Kuhn RJ, Post CB (2004) Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:3414-3419.

Mackow E, Makino Y, Zhao BT, Zhang YM, Markoff L, Buckler-White A, Guiler M, Chanock R, Lai CJ (1987) The nucleotide sequence of dengue type 4 virus: analysis of genes coding for nonstructural proteins. *Virology* 159:217-28.

Makowski, L (1993) Structural constraints on the display of foreign peptides on filamentous bacteriophages 128:5-11.

Marques GRAM, Ribeiro AF, Voltolini JC, Condino MLF. (2004) Epidemiologia da dengue em São Sebastião, Litoral Norte, São Paulo, Brasil, 2001-2002. *Arquivos do Instituto Biológico* 71:462-465.

Mattheus DJ and Wells JÁ (1993) Substrate phage: selection of protease substrates by monovalente phage display. *Science* 260:1113-1117.

Ministério da Saúde (2005) Dengue – Boletim da Semana 52, 2005. 14 p.

Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC (2004) Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature* 427:313-319.

Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC (2005) Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein. *Journal of Virology* 79:1223–1231.

Morais JGM (1998) Considerações críticas sobre os modelos de intervenção sobre o *Aedes aegypti*: perspectivas do plano de erradicação em PE. Monografia (Programa de Residência em Medicina Preventiva e Social) – Universidade de Pernambuco, Recife.

Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG (2005) A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature Reviews Microbiology* 3:13-22.

Ohkubo S, Miyadera D, Sugimoto Y, Matsuo KI, Wierzba K, Yamada Y (2001) Substrate phage as a tool to identify novel séquence substrates porteases. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 4:573-583.

OMS (2005) Review on flavivirus vaccine development proceedings of a meeting jointly organized by the World Health Organizationm and the Tai Ministry od Publica Health, 26-27 April 2004, Bangkok, Thailand. *Vaccine* 23:2689-2695.

Parmley S, Smith G. Antibody-selectable filamentous fd phagevectors: affinity purification of target genes. *Gene* 73:305–318.

Phizicky EM, Fileds S (1995) Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiological Reviews* 59:94–123.

Rothman AL (2004) Dengue: defining protective versus pathologic immunity. *The Journal of Clinical Investigation* 113:946-951.

Russel M (1991) Filamentous phage assembly. *Molecular Microbiology* 5:1607-1613.

Severson DW, Knudson DL, Soares MB, Loftus BJ (2004) *Aedes aegypti* genomics. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34:715-721.

Silveira E (2002) Vacina pra dengue. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento* 25:4-7.

Simmons CP, Dong T, Chau NV, Dung NTP, Chau TNB, Thao LTT, Dung NT, Hien TT (2005) Early T-cell responses to dengue virus epitopes in vietnamese adults with secondary dengue virus infections. *Journal of Virology* 79:5665–5675.

Sharon J, Liebman MA, Williams BR (2005) Recombinant polyclonal antibodies for cancer therapy. *Journal of Cellular Biochemistry* 96:305-313.

Smith GP (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228:1315-1317.

Smith GP and Scott JK (1993) Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Methods in Enzymology* 217:228-257.

Soderlind E, Strandberg L, Jirholt P (2000). Recombining germline-derived CDR sequences for creating diverse single-framework antibody libraries. *Nature Biotechnology* 18:852–856.

Stephen CW, Lane DP (1992) Mutant conformation of p53. Precise epitope mapping using a filamentous phage epitope library. *Journal of Molecular Biology* 225:577-583.

Sticht J, Humbert M, Findlow S, Bodem J, Muller B, Dietrich U, Werner J, Krausslich HG (2005) A peptide inhibitor of HIV-1 assembly in vitro. *Nature Structural & Molecular Biology* 12:671-707.

Videa E, Coloma MJ, Dos Santos FB, Balmaseda A, Harris E (2005) Immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant polypeptides for diagnosis of dengue. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 12:882-884.

Yang HM (2003) Epidemiologia da transmissão da dengue. *TEMA Tendências em Matemática Aplicada e Computacional* 3:387-396.

Yang WJ, Shiuan D (2003) Plaque reduction test: an alternative method to assess specific antibody response to pIII-displayed peptide of filamentous phage M13. *Journal of Immunological Methods* 276:175–183.

Yang WJ, Lai JF, Peng KC, Chiang HJ, Weng CN, Shiuan D (2005) Epitope mapping of *Mycoplasma hyopneumoniae* using phage displayed peptide libraries and the immune responses of the selected phagotopes. *Journal of Immunological Methods* 304:15-29.

Wallis TP, Huang CY, Nimkar SB, Young PR, Gorman JJ (2004) Determination of the disulfide bond arrangement of dengue virus NS1 protein. *Journal of Biological Chemistry* 279:20729–20741.

WHO (1997) Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition. Geneva: <http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue/024-33.pdf>. World Health Organization.

Wu HC, Huang YL, Chao TT, Jan JT, Huang JL, Chiang HY, King CC, Shaio MF (2001) Identification of B-cell epitope of dengue virus type 1 and its application in diagnosis of patients. *Journal of Clinical Microbiology* 39:977–982.

Wu CF, Wang SH, Sun CM, Hu ST, Syu WJ (2003) Activation of dengue protease autocleavage at the NS2B-NS3 junction by recombinant NS3 and GST-NS2B fusion proteins. *Journal of Virological Methods* 114:45-54.

Westaway, EG (1987) Flavivirus replication strategy. *Advances in Virus Research* 33:45-90.

Zhang W, Chipman PR, Corver J, Johnson PR, Zhang Y, Mukhopadhyay S, Baker TS, Strauss JH, Rossmann MG, Kuhn RJ (2003) Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nature Structural Biology* 10:907-912.

Zhang Y, Zhang W, Ogata S, Clements D, Strauss JH, Baker TS, Kuhn RJ, Rossmann MG (2004) Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein. *Structure* 12:1607–1618.

Zhang ZC, Hu XJ, Yang Q (2004) Generation of high affinity human single-chain antibody against PreS1 of hepatitis B virus from immune phage-display antibody library. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases. Dis. Int.* 3:77-81.

Zhang KD, Guo XN, Yang L, Zhang DT, Bai FH, Jiang HP, Zhai HH, Nie YZ, Wu KC, Fan DM (2005) Screening and identification of phage-displayed polypeptides specifically binding to human gastric cancer with high metastatic potential to peritoneum. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 7:397-400.

***CAPÍTULO ÚNICO***

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS RECOMBINANTES  
MIMÉTICOS DE ANTÍGENOS DO VÍRUS DA DENGUE POR “PHAGE  
DISPLAY”**

## RESUMO

A dengue é causada por um arbovírus da família Flaviridae, transmitido de uma pessoa à outra através de um hospedeiro intermediário, o mosquito *Aedes aegypti*. É uma doença infecciosa tropical e subtropical caracterizada por febre e dor intensa nas articulações, além de sangramentos intensos quando na sua forma hemorrágica. Neste trabalho utilizou-se da tecnologia de exposição de peptídeos randômicos em fagos, *phage display*, no intuito de identificar peptídeos recombinantes com afinidade a anticorpos policlonais (IgY) gerados em galinhas imunizadas com proteínas totais do vírus da dengue tipo 3. As IgYs dos animais foram purificadas em coluna *HiTrap* e concentradas por diálise. As IgYs foram imunorreativas contra todas as culturas de DENV, mas não foram tipo específico. Os clones foram selecionados de uma biblioteca de fagos randômicos (PhD-7) por quatro ciclos de seleção contra as IgYs. Os fagos selecionados foram amplificados em placas *deepwell* e submetidos a testes ELISA. Clones imunorreativos contra IgY foram seqüenciados, traduzidos e analisados por bioinformática. Quatorze clones distintos foram selecionados e alinhados contra a seqüência de dados do proteoma viral e entre todos eles. Três seqüências consenso entre os clones foram detectadas: VLRN, APP e LPP. A procura por prováveis seqüências protéicas do vírus da dengue no BLAST mostrou similaridade a diversos sítios protéicos virais: poliproteína, envelope e as proteínas não-estruturais NS1, NS2a, NS3 e NS5. Todas elas se alinharam com as seqüências dos tipos DENV-1, -2, -3, e/ou -4, corroborando com a falta de especificidade das IgYs. Considerando o motivo VLRN, as análises dos índices de antigenicidade dos peptídeos similares demonstraram que estes índices são altamente influenciados pelos resíduos vizinhos. Análise 3-D da proteína do capsídeo viral do tipo DENV-2, com superposição do motivo VLRN, identificou duas seqüências alvos, NRVSTVQQQL e EIGRMLNILNRR, que estavam presentes na poliproteína dos quatro tipos virais, os quais podem conter dois prováveis domínios, VxRN e LRN, respectivamente. Domínios de fosforilação e glicosilação, encontrados em vírus eucarióticos, foram similares às seqüências presentes em cinco fagos recombinantes selecionados, o que não implica que estes motivos sejam fisiologicamente ativos no vírus da dengue. Finalmente, os peptídeos foram usados para detectar IgG e IgM humana. Testes ELISA foram realizados em dois pacientes com infecções isoladas de DENV-1 ou DENV-3. A reatividade dos 14 clones foi superior àquela observada para antígenos totais obtidos das culturas, embora não tenha sido específica.

## ABSTRACT

Dengue fever is caused by an arbovirus of the Flaviridae family, transmitted from person to another through an intermediate fly vector, *Aedes aegypti*. It is a tropical and subtropical infectious disease characterized by fever and strong pain in joints, which could also lead to bleeding in its hemorrhagic form. In this investigation, Phage Display technology was used to identify recombinant peptides with affinity to polyclonal antibodies (IgY) raised in immunized chickens with total proteins of the DENV-3 culture. Animal sera was purified in a *HiTrap* column and concentrated through dialysis. The IgY's were immunoreactive against DENV cultures, but were not type specific. Phage clones were selected from a random peptide library (PhD-7) in four cycles of biopanning against IgY. Selected phages were amplified in deepwell microtiter plates and submitted to ELISA tests. Immunoreactive clones against IgY were sequenced, translated and analysed through bioinformatics. Fourteen distinct clones were selected and aligned against viral proteome sequences and among themselves. Three consensus sequences among phage clones were detected: VLRN, APP and LPP. The peptide search in BLASTp showed similarity to the following viral proteins: polyprotein, envelop, and the nonstructural proteins NS1, NS2a, NS3 and NS5. All of them have matched with DENV-1, -2, -3, and/or -4 sequences, corroborating with the lack of type specificity of the raised IgY. Considering the VLRN motif, the analyses of antigenicity indexes of similar peptides demonstrated that its antigenicity is highly influenced by neighboring residues. Three-dimensional analysis of the DENV-2 capsid protein, with the alignment of the VLRN motif, have identified two target sequences, NRVSTVQQL and EIGRMLNILNRR, that are present in the polyprotein of all four viral types, which may contain the two possible domains VxRN and LRN, respectively. Six selected phages have presented known protein domains, and five of them presented specific phosphorylation and glycosylation sites, similar to known eukaryotic viruses; however, they may not be physiologically active sites in the dengue virus. Finally, the peptides were used to detect human IgG and IgM. ELISA tests were performed in two patients with isolated infections of DENV-1 or DENV-3. The reactivity of the 14 clones was superior to total antigens obtained from cultures, but they were not type specific.

## INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença febril aguda transmitida pelo *Aedes aegypti* e causada por um arbovírus, membro da família Flaviviridae e do gênero flavivirus (Marques, *et al.*, 2004). Quando um mosquito infectante injeta o vírus da dengue no hospedeiro suscetível durante o repasto sanguíneo, a dengue pode apresentar uma evolução benigna (forma clássica) ou grave (forma hemorrágica) (Yang, 2003).

O vírus da dengue é icosaédrico com um diâmetro de aproximadamente 500 Å, apresentando RNA de cadeia simples. O genoma codifica 3 proteínas estruturais (Capsídeo, Membrana e Envelope), além de 7 proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5) (Guzmán e Kouri, 2002; Kuhn *et al.* 2002).

A metodologia do *Phage Display*, desenvolvida por Smith (1985), tem sido amplamente usada desde sua descrição. É uma forma de seleção em que uma biblioteca de peptídeos ou proteínas com as seqüências randomizadas são expressas no exterior da partícula viral, enquanto o material genético encontra-se no genoma viral (Parmley e Smith, 1988). Bibliotecas de peptídeos fusionadas em fagos têm despertado o interesse como fonte de grande número de epítomos e têm sido vastamente utilizadas em estudo de interações de ligação entre antígeno-anticorpo (Cortese, 1995). *Phage Display* é uma metodologia eficaz para análise de epítomos lineares e conformacionais ou mimotopos, que geralmente são difíceis de ser caracterizados (Thullier *et al.*, 2001).

Na superfície viral foram expressos anticorpos (Barbas *et al.*, 1992; Rader *et al.*, 1997), peptídeos (Noren e Noren, 2001), enzimas (Soumillion *et al.*, 1994), receptores de superfície celular (Robertson, 1993), entre outras estruturas. Por um processo *in vitro* denominado *biopanning* (Parmley e Smith, 1988), o peptídeo ou proteína expresso na superfície do fago é selecionado através da afinidade de ligação com a molécula alvo.

Nosso grupo tem utilizado estas bibliotecas de fagos para a seleção de peptídeos na identificação de epítomos imunorreativos contra: imunoglobulinas Y anti-proteínas totais do vírus da Doença Infecciosa da Bursa de Fabrício (*IBDV*) (Capparelli, 2005), imunoglobulinas G provenientes de soros de pacientes com

leishmaniose visceral (Almeida, 2005), imunoglobulinas Y anti-proteínas totais de larvas de *Boophilus microplus* (Prudêncio *et al.*, 2003), soro policlonal anti-neuwiedase da peçonha bruta de *Bothrops neuwiedi pauloensis* em camundongos (Cardoso, 2004) e na construção de biblioteca combinatorial de anticorpos (Lino *et al.*, 2003).

O presente trabalho consiste na aplicação da técnica de *phage display* para a identificação e seleção de peptídeos específicos com o vírus da dengue, determinando os prováveis epítomos funcionais das proteínas virais.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Antígenos

Antígenos inativados do sorotipo DENV-3, produzidos em cérebros de camundongos e extraídos pelo método sucrose–acetona foram cedidos pelo Setor de Arboviroses do Instituto Evandro Chagas (Laboratório de Referência para Dengue).

A dosagem de proteínas das amostras foi realizada pelo método descrito por Bradford (1976). A partir daí foi feita uma curva de calibração da massa molecular em relação à leitura espectrofotométrica, e determinou-se a quantidade de antígeno a ser usada nas imunizações.

### Aves

Utilizou-se de 4 galinhas da raça *White Leghorn* de três semanas de idade, cedidas pela Granja Rezende de Uberlândia-MG.

### Imunização

Antes do início da imunização, coletou-se o sangue dos animais para que funcionasse como controle pré-imune.

O esquema de imunização foi o descrito por Barbas *et al.* (2001), com algumas modificações. Seis aplicações intramusculares de proteínas virais totais emulsionadas em adjuvante foram realizadas, sendo que na primeira imunização a quantidade de proteína era de aproximadamente 200 µg, e as demais de 100 µg, com intervalos de 15 dias entre cada uma das imunizações. Na primeira dose foi usado um adjuvante completo de Freund (Sigma Chemical Co, USA) e nas doses subseqüentes o adjuvante incompleto de Freund (Sigma), sendo que em ambas correspondiam a 50% do volume total da solução. Além do adjuvante, também foi acrescido PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM, pH 7.4) para tamponar a solução. Foram imunizadas duas galinhas e outras duas mantidas como controle (imunizadas somente com adjuvante e PBS).

Após 3 meses coletou-se o sangue, e o título de anticorpos específicos foi monitorado por testes ELISA. O *cut-off* foi calculado pela soma das médias dos animais controles mais 2 vezes o desvio padrão, e o índice ELISA pelo valor obtido em cada diluição dividido pelo *cut-off*. Após a constatação do título apropriado, os animais foram sacrificados por punção cardíaca.

Armazenou-se o sangue coletado em estufa à 37°C por 1 hora e, logo após, em câmara fria à 4°C overnight, para obtenção do soro a ser purificado.

### **Purificação e concentração dos anticorpos**

A purificação de IgY foi realizada com o uso da coluna *HiTrap IgY Purification HP, 5 mL (Amersham Biosciences)*. A bomba peristáltica foi preenchida com tampão de eluição ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  20 mM, pH 7.5), e então conectada à coluna. A coluna foi lavada com 5 volumes (25 mL) de cada tampão: ligação ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  20 mM,  $\text{K}_2\text{SO}_4$  0,5 M, pH 7.5), eluição e limpeza ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  20 mM, 30% volume/volume de isopropanol, pH 7,5). Em seguida a coluna foi equilibrada com 5 volumes de tampão de ligação, e foi aplicada amostra (6 mL de soro). A coluna foi lavada com 10 volumes da mesma (50 mL) de tampão de ligação. As IgY foram então eluídas com 10 volumes da coluna de tampão de eluição, sendo coletadas amostras de 1 mL que foram quantificadas no espectrofotômetro (280 nm). A coluna foi regenerada com 8 volumes (40 mL) de tampão de limpeza, e reequilibrada com 5 volumes de tampão de ligação. À medida que as amostras eram filtradas na coluna de purificação, as leituras ópticas das alíquotas ( $\text{OD}_{280\text{nm}}$ ) eram obtidas.

Para diálise das amostras obtidas foi utilizada uma membrana de celulose *Fisherbrand® (regenerated cellulose-DYALYSIS tubing)*. As amostras do soro purificado foram colocadas em tubos de diálise (tubos 1 a 8), concentradas em sacarose por 1 hora a 4°C e em seguida dialisadas em PBS por 12 horas a 4°C. As amostras foram quantificadas no espectrofotômetro à 280nm.

A visualização das amostras foi realizada por SDS PAGE 16% (Anexo 1), como descrito por Laemmli (1970). Para coloração do gel foi necessária uma solução de *Coomassie-blue R-250* como corante de proteínas, e solução descorante logo após.

## Teste ELISA para confirmar a especificidade de IgY

Após a obtenção do anticorpo purificado, foi necessário confirmar a especificidade das IgY em relação aos demais tipos virais.

Foi sensibilizada uma placa de alta afinidade (NUNC) com 20 µg/mL de proteínas totais de cada tipo viral, diluídos em 100 µL/poço de tampão carbonato (NaHCO<sub>3</sub> 60 mM, pH 9,6) e incubada por 12 horas, sob agitação, à 4°C.

Após 3 lavagens com PBS-T 0,05% (PBS + 0,05% volume/volume de Tween 20), foram adicionados 250 µL de tampão de bloqueio (PBS-T 0,05% - BSA 3%), sendo a placa incubada por 1 hora à temperatura ambiente. A placa foi então lavada por mais 3 vezes e adicionados 100 µL de solução contendo soro das galinhas imunizadas na concentração de 1:600, mais 50 µL de bloqueio (um clone em cada poço). Após a incubação por 1 hora à 37°C, realizou-se mais 6 lavagens. Foi adicionado o anticorpo *Anti-IgY* conjugado marcado com peroxidase (*Amersham Biosciences*, 1:5000) diluído em solução de bloqueio, com incubação por 1 hora à 37°C. Em seguida, a placa foi lavada por mais 6 vezes, e então revelada com 100 µL/poço de uma solução contendo OPD (O-Phenylenediamine dihydrochloride – *Sigma Chemical*), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e tampão citrato (0,1 M). A reação foi interrompida pela adição de 10 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 M. A leitura da absorbância foi feita em leitor Multiscan Plus versão 2.03, com filtro 492nm.

## ***Biopanning*** – Seleção de peptídeos

Para a seleção dos peptídeos (expressos na proteína III do capsídeo de fagos filamentosos), reativos com os anticorpos acima descritos, utilizou-se uma biblioteca randômica de peptídeos de 7 aminoácidos (“Ph.D -7 mer - *New England Biolabs*”).

Foi adsorvido no poço de uma placa de microtitulação de 96 poços (Maxisorp - NUNC) 150 µL de IgY purificada em coluna específica para IgY (100 µg/mL em NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M, pH 8,6) e incubada overnight a 4°C em um recipiente contendo papel toalha umidificado. A placa foi bloqueada com 150 µL de um tampão de bloqueio (NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M, pH 8,6, 5 mg/mL BSA) por 1h sob agitação a 4°C, e lavada seis vezes com TBST (TBS (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM,

água, 0,1% volume/volume de Tween 20). Foram acrescentados na placa 10 µL da biblioteca de peptídeos diluída em 100 µL de TBST, e a placa foi mantida sob agitação por 1 h a temperatura ambiente. Fagos não ligantes foram removidos pela lavagem da placa por dez vezes com TBST. Os fagos ligantes foram eluídos com 100 µL do tampão de eluição (glicina-HCl 0,2 M, pH 2,2, contendo 1 mg/mL BSA) por 10 min à temperatura ambiente e imediatamente neutralizados com 15 µL do tampão de neutralização (Tris-HCl 1 M, pH 8,0). Alíquotas dos fagos eluídos foram utilizadas para a determinação do título.

Uma pequena amostra deste eluato (10 µL) foi titulada e o tratante foi utilizado para reamplificação, realizada em 20 mL de cultura de *E. coli* (ER2537) em fase inicial de crescimento ( $OD_{600} \leq 0,3$ ), contendo tetraciclina, incubando-se a cultura por 4-5 horas em agitador com temperatura a 37°C, antes do procedimento de precipitação dos fagos e posterior titulação.

A cultura foi transferida para um tubo Oakridge (Hitachi, 50 mL) e centrifugada (10 min, 10.000 rpm). As células residuais foram descartadas e o sobrenadante transferido para um tubo limpo e re-centrifugado. Foi pipetado 80% do sobrenadante para um tubo esterilizado onde foi adicionado 20% do volume de PEG/NaCl (20% peso/volume de Polietileno glicol-8000, NaCl 2,5M, água), e a mistura permaneceu em repouso por 12 horas a 4°C.

No dia seguinte, a precipitação foi centrifugada 15 minutos a 10.000 rpm à 4°C. O sobrenadante foi descartado e o tubo foi centrifugado brevemente, para que o sobrenadante residual pudesse ser removido. O precipitado foi ressuspensionado em 1 mL de TBS, transferido para um microtubo e centrifugado por 5 minutos, 10.000 rpm à 4°C para precipitar os resíduos celulares. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo para a adição de PEG/NaCl (1/6 do volume). A mistura foi incubada em gelo por 1 hora e então centrifugada (10 min, 14.000 rpm, 4°C). O sobrenadante foi descartado, e a centrifugação foi repetida para remoção de sobrenadante residual. O precipitado foi ressuspensionado em 200 µL de TBS, obtendo-se então o eluato amplificado, pronto para a titulação.

Os fagos reamplificados a partir do primeiro ciclo de seleção foram utilizados em um segundo ciclo e assim subseqüentemente, por um total de quatro ciclos, sendo que a partir do segundo ciclo a estringência do tampão de

lavagem foi aumentada de 0,1% para 0,5% de Tween-20 em todas as lavagens.

Para todas as titulações foram utilizados 10 µL dos fagos, diluídos em 90 µL de meio de cultura LB. As diluições ( $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ , para eluato não amplificado e de  $10^{-8}$  a  $10^{-11}$ , para fagos amplificados) foram incubadas com 200 µL de *E. coli* (ER2738) em fase de crescimento inicial por 5 minutos e plaqueadas em meio LB contendo IPTG (0,5 mM) e X-gal (40 µg/mL), juntamente com 3 mL de Agarose Top (10 g de Bacto-Triptona, 5g de extrato de levedura, 5g de NaCl, 1 g de  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  / litro).

Após a incubação em estufa por toda a noite à 37°C, as colônias azuis foram contadas para a obtenção dos títulos de entrada e saída para todos os ciclos de seleção (número de colônias azuis x fator de diluição).

### **Amplificação de colônias de fagos em *Deepwell***

As colônias que apresentaram coloração azul, demonstrando a quebra do substrato X-Gal e a expressão do gene da β-galactosidase dos fagos pelas bactérias ER2738, foram reamplificadas separadamente em placas *Deepwell* para o armazenamento dos clones selecionados. Para isso, cada colônia isolada obtida do 4º ciclo não amplificado foi dispensada em um poço da *Deepwell* contendo 1 mL de meio de cultura com *E. coli* em fase de crescimento inicial. A placa foi incubada por 12 horas à 37°C, sob agitação. A placa *Deepwell* foi centrifugada por 60 minutos a 3.700 rpm, para a retirada do sobrenadante da cultura. Seu conteúdo foi transferido para uma outra placa *Deepwell* e então foi adicionado 1/6 do volume de PEG/NaCl (20% de polietileno glicol-8000, NaCl 2,5 M) incubando-a por 12 horas à 4°C. A placa foi centrifugada por 1 hora a 3.700 rpm, o sobrenadante descartado, e o precipitado suspenso em 200 µL de PBS.

### **ELISA Pré-Sequenciamento**

Testes de ELISA foram realizados para determinar a reatividade dos peptídeos recombinantes (expressos nos fagos selecionados), contra os anticorpos presentes no soro das galinhas imunizadas com proteínas virais totais da dengue do tipo 3.

O procedimento seguiu, em linhas gerais, os mesmos parâmetros mencionados para o ensaio anterior, com algumas modificações. A sensibilização da placa foi feita com 1 µg/poço do anticorpo policlonal purificado IgY anti-dengue diluído em bicarbonato de sódio. Após o bloqueio foram adicionados 100 µL de solução contendo 50 µL do fago mais 50 µL de bloqueio (um fago em cada poço). Para a detecção, utilizou-se o anticorpo conjugado anti-M13 marcado com peroxidase (1:500).

O *cut-off* foi calculado pela soma das médias do controle negativo (fago selvagem) mais 2 vezes o desvio padrão, e o índice ELISA pelo valor obtido em cada diluição dividido pelo *cut-off*. Os clones selecionados foram aqueles que apresentaram índice ELISA maior que 1.

### **Extração de DNA**

Para a obtenção de DNA dos fagos, 10 µL dos fagos purificados em placa *Deepwell* foram adicionados a 1 mL de cultura de ER2738 em fase de crescimento inicial em tubos FALCON de 15 mL, onde permaneceram sob agitação vigorosa por 6 horas à 37°C. Após o crescimento, as culturas foram transferidas para microtubos para a sedimentação das bactérias que foram centrifugadas por 10 minutos a 4.000 rpm. 500 µL do sobrenadante foram transferidos para outro tubo, e acrescidos a este, 200 µL de PEG-NaCl, incubando o tubo em seguida à temperatura ambiente por 10 minutos. Após centrifugar por 10 minutos a 14.000 rpm, foi descartado o sobrenadante, e o precipitado foi ressuspensão com em 100 µL de Tampão Iodeto (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, NaI 4 M), e então foi adicionados 250 µL de etanol absoluto, incubando o tubo por 10-20 minutos à temperatura ambiente. O tubo foi centrifugado por 10 minutos a 14.000 rpm, descartando o sobrenadante, e em seguida, foi lavado o precipitado com 500 µl de etanol 70%, centrifugando mais uma vez por 10 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado suspenso em 20 µl de água ultra pura estéril.

A qualidade do DNA presente nas amostras foi verificada pela corrida eletroforética em gel de agarose 0,8%.

## Sequenciamento de DNA

O seqüenciamento foi realizado utilizando o Kit *Big Dye Terminator* (Amersham Biosciences) e um seqüenciador automático *MegaBace 1000* (Amersham Biosciences) do Laboratório de Genética Molecular (UFU). Para a reação do seqüenciamento, foi utilizado o *primer* – 96 M13 – (5'-<sub>H</sub>OCCCTCATAGTTAGCGTAACG –3'- Amersham Biosciences), que amplifica a região dos aminoácidos codificantes dos peptídeos randômicos fusionados nos fagos M13 recombinantes.

A análise das seqüências de DNA provenientes do seqüenciador automático foram processadas em software do próprio equipamento (Sequence Analyser, BASE CALLER, Cimarron 3.12, Phred 15). Logo após esta pré-análise, as seqüências dos vetores foram retiradas e somente aqueles insertos com 14 resíduos perfeitos foram então traduzidas.

## Análise dos dados por bioinformática

As seqüências de DNA geradas pelo seqüenciamento foram analisadas utilizando-se programas de bioinformática disponíveis on-line.

A tradução das seqüências de aminoácidos obtidas no seqüenciamento se deu pelo programa DNA2PRO7. Este programa é designado para tradução de seqüências de insertos tanto de bibliotecas da *New England Biolabs* (*Ph.D.-7<sup>TM</sup>* or *Ph.D.-C7C<sup>TM</sup>*) quanto de outras bibliotecas de interesse que contiverem as seqüências inicial e final do vetor (<http://relic.bio.anl.gov/dna2pro7.aspx>).

O cálculo da freqüência e da medida de informação de cada um dos peptídeos dentro da biblioteca original de fagos foi feito pelo programa INFO (<https://relic.bio.anl.gov/info.aspx>).

Realizou-se o cálculo da freqüência de aminoácidos dentro da população de peptídeos pelo programa AAFREQ (<http://relic.bio.anl.gov/v/aafreqs.aspx>).

Para análise do pareamento entre os peptídeos recombinantes selecionados, foi utilizado o programa ClustalW versão 18.1 ([www.ebi.ac.uk/clustalw/](http://www.ebi.ac.uk/clustalw/)).

Os motivos protéicos gerados foram analisados quanto às homologias com proteínas de dengue depositadas no “GENBANK” pelo programa BLAST – Basic Local Alignment Search Tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Para análise do índice de antigenicidade de cada peptídeo, fez-se uso do programa DNASTAR 4.0 – *Lasergene*, subprograma PROTEAN.

A identificação motivos na estrutura terciária da proteína foi feito pelo programa Cn3D versão 4.1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/CN3D/cn3d.shtml>).

Para encontrar os padrões protéicos e a linhagem taxonômica referindo-se às famílias de proteínas e domínios comuns em espécies, gêneros ou táxons a qual os peptídeos pertencem, foi utilizado o programa PROSCAN (PROSITE SCAN). Este programa examina os peptídeos contra o PROSITE, um banco de dados de famílias de proteínas e domínios que consiste de locais biologicamente significantes, padrões e perfis que ajudam a identificar confiantemente a família conhecida da proteína, caso exista uma ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_prosite.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_prosite.html)).

### **Teste ELISA dos clones contra soro humano específico**

Para confirmar a especificidade dos clones obtidos, realizou-se o teste ELISA com soro de 2 pacientes contaminados individualmente com DENV-1 e DENV-3. Esses soros foram previamente tipados por PCR e gentilmente cedidos pelo Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias, USP, São Paulo-SP. Como controle negativo foi utilizado um poço sem fago e sem soro, e os controle positivos foram os antígenos totais das culturas específicas para os tipos DENV-1, -2, e -3.

Foram feitos 4 testes ELISA, sendo que em 2 foram utilizados soros humanos com DENV-1, e nos outros 2, soros humanos com DENV-3. Em ambos tipos virais, foi aplicado anticorpo anti-IgG em uma das placas, conjugado com peroxidase e na outra, anticorpo anti- IgM, também conjugado com peroxidase. No controle negativo utilizado, não foram colocados os fagos e o soro testado.

A sensibilização das placas foi feita com fagos, na concentração de  $5 \times 10^9$ , e também com proteínas totais de DENV-1 e DENV-3, na concentração de 20

µg/mL, ambos diluídos em bicarbonato de sódio. Esta foi incubada por 12 horas, sob agitação, à 4°C.

Após 3 lavagens com PBS-T 0,05% (PBS + 0,05% volume/volume de Tween 20), foram adicionados 250 µL de tampão de bloqueio (PBS-T 0,05% - BSA 3%), sendo a placa incubada por 1 hora à temperatura ambiente. As placas foram então lavadas por mais 3 vezes e foram adicionados soros de pacientes infectados com DENV-1 e DENV-3. Nas placas em que seriam aplicados anti-IgG, conjugado com peroxidase, a concentração do soro foi de 1:500, e nas placas em que seriam aplicados anti-IgM, conjugado com peroxidase, a concentração do soro foi de 1:50. Após a incubação por 1 hora à 37°C, realizou-se mais 6 lavagens. Foram adicionados os anticorpos *Anti-IgG* e *Anti-IgM* conjugados, marcados com peroxidase (*Amersham Biosciences*, 1:5000) diluídos em solução de bloqueio, com incubação por 1 hora à 37°C. Em seguida, a placa foi lavada por mais 6 vezes, e então revelada com 100µL/poço de uma solução contendo OPD (O-Phenylenediamine dihydrochloride – *Sigma Chemical*), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e tampão citrato (0,1M). A reação foi interrompida pela adição de 10 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 M. A leitura da absorbância foi feita em leitor Multiscan Plus versão 2.03, com filtro 492nm.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Antígenos

A leitura no espectrofotômetro do antígeno foi de 0,255 numa diluição de 2% (2 µl de antígeno : 98 µl de água). A concentração obtida do antígeno foi estimada em 5,115 µg/ml, obtida através da equação  $y = 0,0286x - 0,0376$  (onde “y” representa a concentração protéica final estimada, e “x” representa a leitura espectrofotométrica em densidade ótica à 595 nm), com qui-quadrado de 0,9774.

### Aves

Ainda é pequeno o conhecimento da resposta humoral em galinhas para antígenos da dengue. Segundo Lemamy e colaboradores (1999), aves têm capacidade de produzirem anticorpos com alto título e grande persistência da resposta imune para proteínas de bactérias e mamíferos. Além disso, os anticorpos produzidos em galinhas possuem vantagens bioquímicas como resistência a pH extremo (Lee *et al.*,2002), resistência à temperatura elevada (Jensenius *et al.*,1988), grande afinidade (Ikemori *et al.*,1993) e avidéz (Stuart *et al.*,1988), motivo pela qual, têm sido usadas eficientemente em análises imunológicas (Schade *et al.*,1996). Estas foram características essenciais para a escolha de galinhas no desenvolvimento da resposta imune contra o vírus da dengue.

### Purificação e concentração dos anticorpos

Após a sexta imunização, o título encontrado foi de 1:1800, valor considerado satisfatório para obtenção de anticorpos.

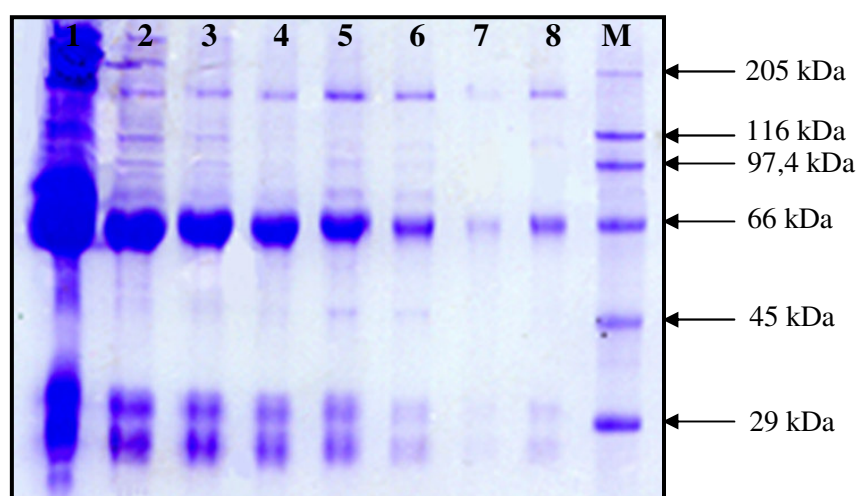
A purificação dos anticorpos foi considerada eficiente, pois houve uma limpeza das amostras na coluna de purificação após a incubação do soro, mostrado pelo decréscimo da densidade ótica (OD) nas frações coletadas. As amostras que apresentaram OD semelhantes foram reunidas em um único tubo,

obtendo um total de 7 amostras. Os rendimentos protéicos das frações após a concentração e diálise podem ser observados na Tabela 1.

**Tabela 1:** Absorbância e quantificação dos anticorpos obtidos após a concentração e diálise.

Amostra	Absorbância (280 nm)	Quantificação (mg/mL)
1	0,420	3
2	0,366	2,6
3	0,445	3,18
4	1,290	9,2
5	1,000	7,14
6	0,220	1,57
7	0,186	1,33

As frações coletadas foram analisadas quanto ao perfil eletroforético (SDS-PAGE 16%) demonstrando estar parcialmente livre de impurezas que pudessem prejudicar o procedimento de seleção de peptídeos recombinantes, como mostra a Figura 10. As bandas de IgY obtidas contém as seguintes massas moleculares: ~ 180 kDa (IgY inteira); ~ 66kDa (cadeia pesada) e ~ 25 kDa (cadeia leve). A fração usada no biopanning é a da canaleta 4.

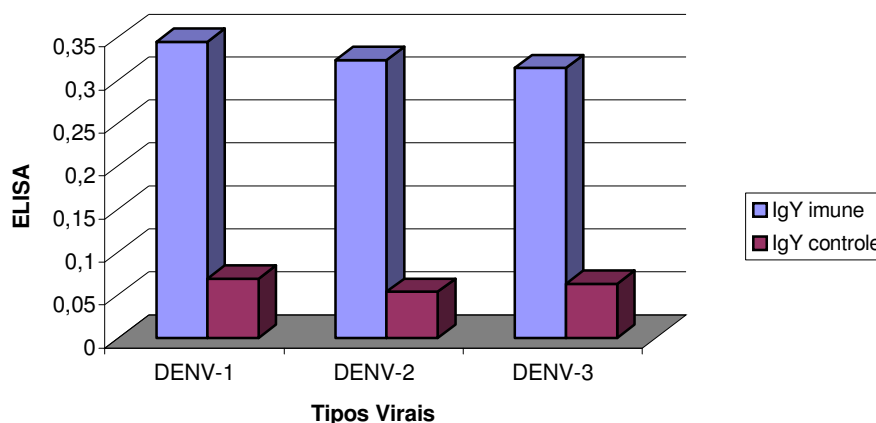


**Figura 10:** Perfil eletroforético (SDS-PAGE 16%) de IgYs purificadas de soros de galinhas imunizadas com proteínas virais totais de dengue do tipo 3 (Canaleta 1 – soro total; 2-8 – soro purificado; M – marcador de peso molecular)

## Teste ELISA para confirmar a especificidade de IgY

Foram testados soros de galinhas anteriormente imunizadas com proteínas totais do vírus da dengue tipo 3, além de galinhas mantidas como controle, imunizadas somente com adjuvante. Estes soros foram confrontados com proteínas totais do vírus da dengue tipos 1, 2 e 3.

Como pode ser observado na Figura 11, não houve diferença significativa entre os índices ELISA encontrados para os diferentes tipos virais, demonstrando que o IgY obtido não foi específico para o dengue tipo 3.

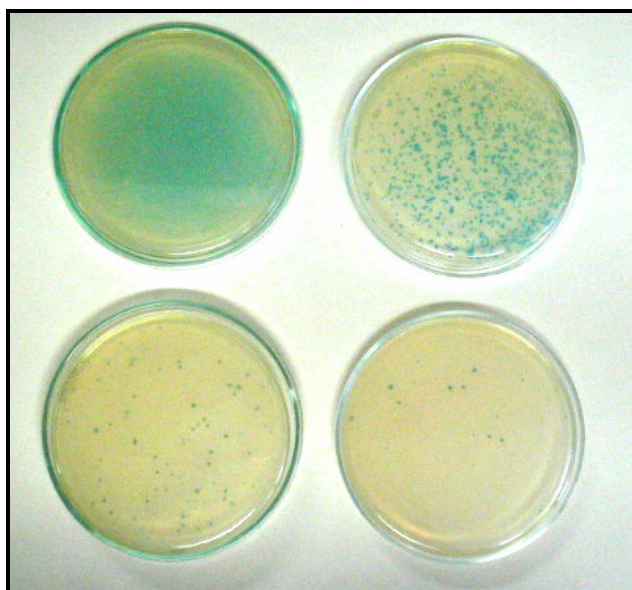


**Figura 11** ELISA para teste de imunorreatividade do anticorpo purificado obtido de galinhas imunizadas com proteína total do vírus da dengue tipo 3 contra proteínas virais de dengue 1, 2 e 3.

## **Biopanning – Seleção de peptídeos**

As titulações realizadas foram eficientes em todos os ciclos de seleção de peptídeos. As colônias apresentaram coloração azulada, demonstrando a quebra do substrato X-Gal, e a expressão do gene da  $\beta$ -galactosidase dos fagos pelas bactérias ER27308 (Barbas, 2001), como mostrado na Figura 12. Colônias brancas não eram esperadas neste processo, pois somente as azuis sobrevivem ao antibiótico. A presença de colônias brancas indicaria a contaminação do experimento com fagos de origem selvagem.

Contava-se o rendimento das placas que apresentavam aproximadamente 100 colônias, para calcular a quantidade de eluato a utilizar nas etapas subseqüentes. Os valores das titulações mostraram enriquecimento dos fagos específicos, que ficavam retidos na placa, durante os processos de seleção (Tabela 2).



**Figura 12:** Exemplo de placas resultantes da titulação. As colônias azuis representam a infecção de bactérias *E.coli* (ER2738) com fagos M13 carregando o gene *lacZ* da  $\beta$ -galactosidase.

**Tabela 2:** Títulos (em *pfu*: unidades formadoras de colônias) obtidos nos quatro ciclos de seleção.

Ciclo	Número de partículas de fagos	
	Eluato não amplificado	Eluato amplificado
Primeiro	$1,3 \times 10^3$	$4,2 \times 10^7$
Segundo	$4,9 \times 10^3$	$9,9 \times 10^9$
Terceiro	$1,6 \times 10^4$	$5,0 \times 10^{10}$
Quarto	$1,3 \times 10^5$	$5,4 \times 10^{10}$

## ELISA Pré-Sequenciamento

Com a realização do teste de ELISA, foi possível observar que 51,61% dos clones apresentaram reatividade acima do Índice ELISA (IE) calculado (Tabela 3). A Tabela mostra em vermelho os clones positivos (IE  $\geq$  1), que foram utilizados no sequenciamento, e em azul os controles negativos (fagos selvagem), que não foram seqüenciados. Os clones marcados em preto também não foram seqüenciados, por terem apresentado baixa reatividade.

**Tabela 3:** ELISA para teste de imunorreatividade\* dos clones selecionados contra o anticorpo purificado obtido de galinhas imunizadas com proteína total do vírus da dengue tipo 3.

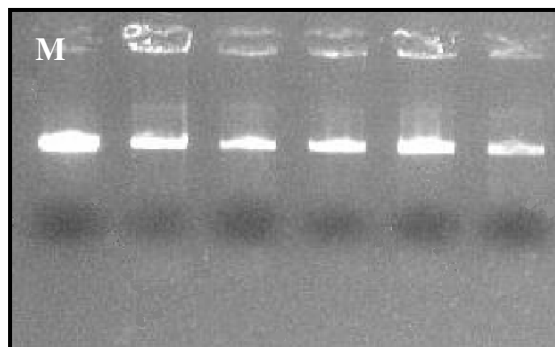
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,064	0,064	0,208	0,131	0,065	0,112	0,060	0,06	0,071	0,066	0,063	0,062
B	0,080	0,131	0,084	0,166	0,180	0,072	0,076	0,078	0,173	0,071	0,079	0,076
C	0,112	0,210	0,108	0,169	0,108	0,099	0,129	0,098	0,077	0,081	0,181	0,100
D	0,072	0,072	0,069	0,070	0,063	0,067	0,066	0,130	0,069	0,065	0,072	0,090
E	0,099	0,075	0,072	0,152	0,071	0,068	0,071	0,065	0,132	0,071	0,070	0,072
F	0,079	0,122	0,073	0,077	0,071	0,069	0,070	0,064	0,066	0,113	0,072	0,071
G	0,150	0,071	0,136	0,071	0,079	0,070	0,148	0,104	0,111	0,055	0,062	0,070
H	0,056	0,054	0,102	0,054	0,099	0,093	0,060	0,069	0,076	0,080	0,084	0,072

\*Números em vermelho significam índice ELISA significantes. Os números em azul são os controles negativos (fago selvagem).

## Sequenciamento de DNA e Bioinformática

A análise eletroforética do DNA obtido mostrou a ausência de degradação ou de contaminantes, tais como RNA bacteriano (Figura 13).

As seqüências de DNA geradas foram visualizadas pelo programa Sequence Analyser (MegaBace, Amersham Biosciences), para análise de sua qualidade. A tradução destas seqüências de DNA em aminoácidos foi feita pelo programa DNA2PRO7 (RELIC Softwares), específico para bibliotecas de 7 peptídeos da “New England Biolabs”. Este software gerou 25 seqüências de aminoácidos, sendo 14 distintas entre si. A seqüência YQDSAKT repetiu-se por 12 vezes.



**Figura 13:** Perfil eletroforético das amostras de DNA extraídas dos clones obtidos no processo de seleção. M - marcador de peso molecular

A Tabela 4 apresenta diversos parâmetros para a indicação do sucesso de seleção de cada peptídeo, conforme Rodi *et al.* (2002). Os seguintes parâmetros são mostrados: seqüências de aminoácidos obtidas, juntamente com a freqüência dos peptídeos expressos nos fagos selecionados a partir do quarto ciclo de seleção. Além disso, a Tabela também mostra a amplificação dos peptídeos decorrentes do processo de seleção em relação à freqüência esperada (FE) dos peptídeos na biblioteca original. Na mesma Tabela, o grau de informação de cada peptídeo foi calculado utilizando o log neperiano da probabilidade de ocorrência ao acaso do fago na biblioteca, sendo que quanto maior o grau de informação, melhor o peptídeo, ou seja, a seleção foi mais efetiva e, mais raro ele é na biblioteca. Outro dado apresentado, foi o número provável de clones independentes dentro da biblioteca ( $\lambda$ ).

O peptídeo YQDSAKT foi o mais freqüente na seleção e o quarto com o maior índice de informação, tornando-se um dos principais mimotopos selecionados, especialmente quando se considera o número de clones independentes previstos na biblioteca com esta mesma seqüência, ou seja, neste caso espera-se somente um único clone. Contudo, o peptídeo com o maior índice de informação foi o VLRNVHN, o qual apresenta o principal motivo protéico VLRN. Peptídeos que exibem alto grau de informação são menos prováveis de ocorrer ao acaso do que aqueles que possuem baixo nível de informação (Rodi *et al.*, 2002).

Os aminoácidos arginina e cisteína nas seqüências de peptídeos randômicos atuam na secreção de Proteína III e podem interferir na infectividade

dos fagos. Conseqüentemente, clones com peptídeos contendo estes aminoácidos podem ser menos freqüentes durante a seleção (Noren e Noren, 2001). De acordo com os resultados obtidos, nenhum peptídeo apresenta cisteína (C), enquanto que 10 possuem arginina (R), demonstrando não só sua importância nos motivos protéicos, quanto a sua baixa interferência na freqüência de peptídeos com este aminoácido. Observou-se, ainda, que houve um grande enriquecimento de todos os peptídeos selecionados em relação às suas freqüências esperadas na biblioteca de fagos, sugerindo que os fagos são específicos para dengue.

**Tabela 4:** Seqüências de aminoácidos, freqüências observada e esperada, e amplificação dos peptídeos e grau de informação.

Peptídeos	Freqüência Observada (FO)	Probabilidade da Seqüência Randômica (FE)*	Amplificação (FO/FE)	I(m)**	$\lambda$ ***
YQDSAKT	12/25 (48%)	$5,72 \times 10^{-10}$	$8,39 \times 10^9$	21,282	1
ALYPARI	1/25 (4%)	$2,13 \times 10^{-9}$	$1,87 \times 10^8$	19,966	4
TYKLPPP	1/25 (4%)	$4,03 \times 10^{-9}$	$9,92 \times 10^7$	19,329	8
LLRNAST	1/25 (4%)	$2,24 \times 10^{-8}$	$1,78 \times 10^7$	17,611	44
VLRNAPP	1/25 (4%)	$7,12 \times 10^{-9}$	$5,61 \times 10^7$	18,759	14
VLRNSPT	1/25 (4%)	$5,61 \times 10^{-9}$	$7,13 \times 10^7$	18,998	11
VLRNVHN	1/25 (4%)	$2,62 \times 10^{-11}$	$1,54 \times 10^{10}$	24,366	0,05
KLWNISS	1/25 (4%)	$2,88 \times 10^{-9}$	$1,39 \times 10^8$	19,665	5
ALRNLGP	1/25 (4%)	$5,30 \times 10^{-10}$	$7,55 \times 10^8$	21,358	1
VLRNMNP	1/25 (4%)	$1,06 \times 10^{-9}$	$3,77 \times 10^8$	20,665	2
MLRNLPP	1/25 (4%)	$4,86 \times 10^{-9}$	$8,23 \times 10^9$	19,142	9
ALRNYTS	1/25 (4%)	$4,80 \times 10^{-10}$	$8,33 \times 10^8$	21,457	0,9
QLRNAPP	1/25 (4%)	$7,12 \times 10^{-9}$	$5,62 \times 10^7$	18,759	14
KLFNANP	1/25 (4%)	$1,06 \times 10^{-7}$	$3,77 \times 10^6$	16,051	212

\*Probabilidade de seqüência randômica = freqüência esperada na biblioteca (FE)

\*\*I(m) = grau de informação =  $-\ln$  (probabilidade de seqüência randômica)

\*\*\* $\lambda$  = número provável de clones independentes na biblioteca = complexidade x FE, onde: complexidade da biblioteca =  $\sim 2 \times 10^9$ .

A freqüência de cada aminoácido dos clones seqüenciados foi apresentada pelo programa AAFREQ. Os aminoácidos mais freqüentes foram L (16), N (14) e P (14), como mostra a Tabela 5. O fato das bibliotecas serem de peptídeos randômicos permite que vários clones possam compartilhar os mesmos motivos, mas com resíduos em posições diferentes do peptídeo, fazendo com que certos

aminoácidos sejam mais freqüentes após a seleção e sequenciamento. Assim, aqueles presentes resíduos mais freqüentes nas sete posições esperadas da biblioteca, são alinhados e anotados como prováveis motivos. Logo, a alta freqüência desses aminoácidos, nas referidas posições do peptídeo recombinante, pode indicar um provável motivo não apresentado nos clones selecionados, mas descoberto pela combinação de várias seqüências.

Nesta mesma tabela foi possível identificar o peptídeo consenso (VLRNAPP) através dos aminoácidos que apresentaram maior freqüência. Pode-se notar que o peptídeo consenso foi um dos peptídeos selecionados, no entanto não se trata de um peptídeo com alto grau de informação, tornando-se mais comum a sua ocorrência ao acaso.

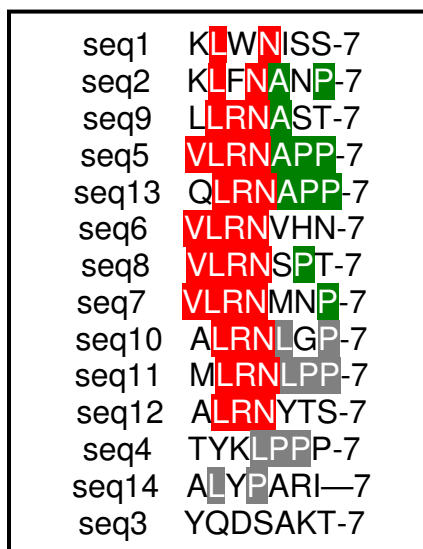
**Tabela 5:** Freqüência de aminoácidos dos clones seqüenciados. Em vermelho estão os aminoácidos que apresentam maior freqüência.

AA	1	2	3	4	5	6	7	Total	Freqüência
A	3	0	0	0	6	0	0	9	0,0918
C	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0000
D	0	0	1	0	0	0	0	1	0,0102
E	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0000
F	0	0	1	0	0	0	0	1	0,0102
G	0	0	0	0	0	1	0	1	0,0102
H	0	0	0	0	0	1	0	1	0,0102
I	0	0	0	0	1	0	1	2	0,0204
K	2	0	1	0	0	1	0	4	0,0408
L	1	12	0	1	2	0	0	16	0,1633
M	1	0	0	0	1	0	0	2	0,0204
N	0	0	0	11	0	2	1	14	0,1429
P	0	0	0	1	1	5	7	14	0,1429
Q	1	1	0	0	0	0	0	2	0,0204
R	0	0	9	0	0	1	0	10	0,1020
S	0	0	0	1	1	2	2	6	0,0612
T	1	0	0	0	0	1	3	5	0,0510
V	4	0	0	0	1	0	0	5	0,0510
W	0	0	1	0	0	0	0	1	0,0102
X	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0000
Y	1	1	1	0	1	0	0	4	0,0408
								98	
<b>Consenso</b>	V	L	R	N	A	P	P		

A Figura 14, gerada pelo programa ClustalW 18.1, mostra o alinhamento dos 14 clones selecionados, permitindo notar a presença de seqüências de aminoácidos comuns. Nota-se a presença do motivo protéico VLRN repetido entre

os clones selecionados, mostrado em vermelho, sendo 4 clones com homologia total, e 7 clones com homologia parcial. Os motivos APP e LPP, mostrados em verde e cinza, respectivamente, compartilham os resíduos PP e apresentam 2 clones cada com homologia total, contudo o APP possui 4 clones parciais, enquanto que o LPP possui 2 clones com homologia parcial.

O peptídeo consenso, obtido pela frequência do aminoácido que mais ocorreu, foi alinhado pelo programa Blast com as seqüências completas das proteínas específicas para Dengue, depositadas em banco de dados (GeneBank), com o objetivo de obter seqüências comuns entre ambos. O resultado deste alinhamento demonstrou que este peptídeo apresenta similaridades com o precursor de poliproteína de DENV-4 ([gi|11096033|gb|AAG30148.1](http://gi|11096033|gb|AAG30148.1)), pelo motivo VLRN. Pode-se concluir, portanto, que o motivo consenso não é específico para DENV-3.



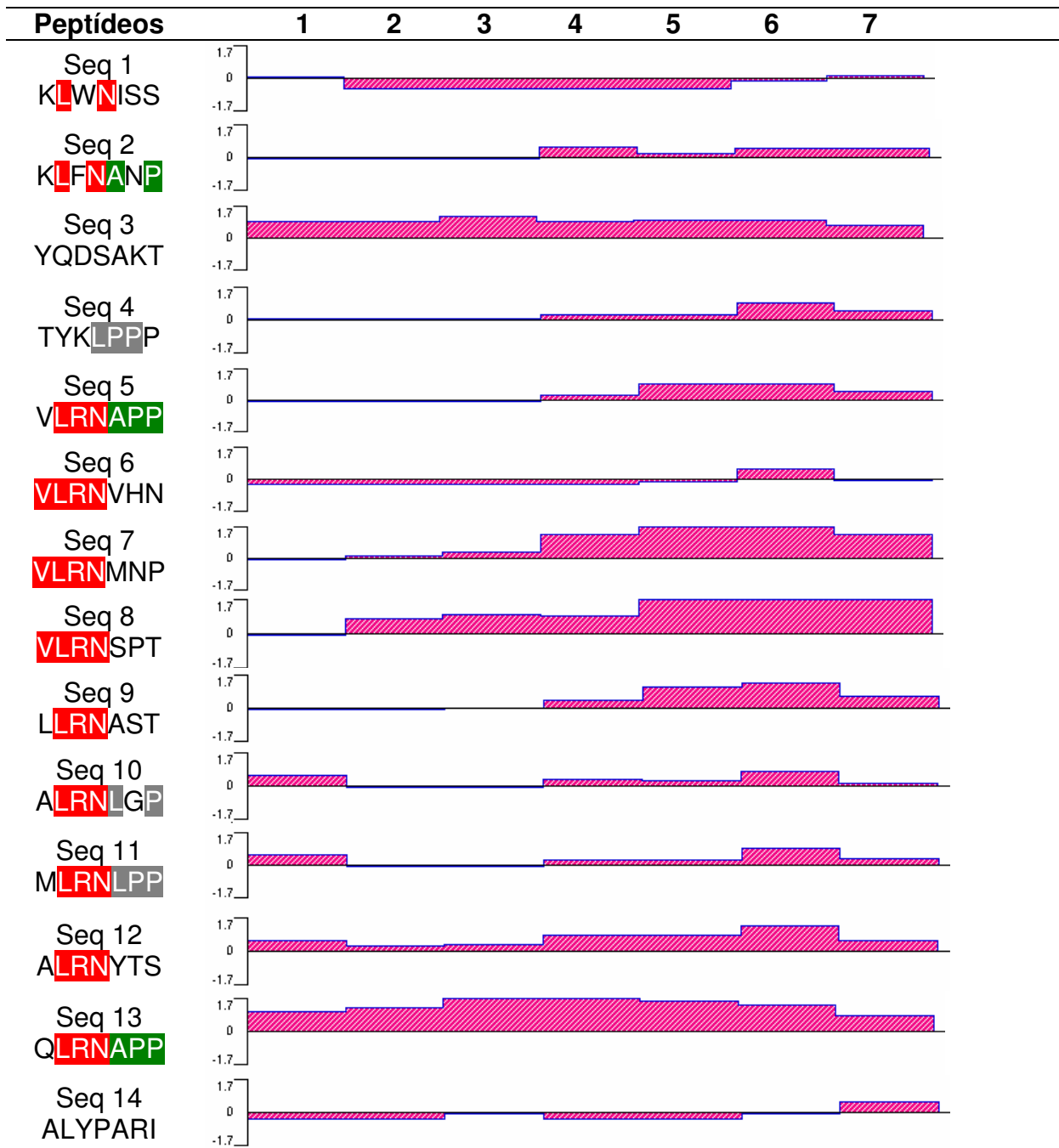
**Figura 14:** Alinhamento dos 14 peptídeos selecionados pelo programa ClustalW 18.1.

O índice de antigenicidade foi calculado para cada um dos peptídeos pelo programa Protean 4.0, gerando a Figura 15, onde se podem observar índices que variam de 1,7 à -1,7, para os maiores e menores índices de antigenicidade, respectivamente. Os números de 1 a 7 representam a seqüência de aminoácidos dos peptídeos mencionados à esquerda. A antigenicidade dos peptídeos foi

predita para verificação da ocorrência de reconhecimento pelas imunoglobulinas. Ainda, epítomos ausentes de homologias, assim como epítomos conformacionais, poderiam ser relacionados como um provável alvo em função da observação dos valores antigênicos.

O índice de antigenicidade de Jameson-Wolf (Jameson e Wolf, 1988) prediz determinantes antigênicos potenciais combinando métodos de predição estrutural de proteínas. Os resultados são mostrados com picos – determinantes antigênicos potenciais. O algoritmo pode ser usado para prever as características topológicas da proteína, diretamente a partir da seqüência primária dos aminoácidos. O programa gera valores para parâmetros de acessibilidade, combina os valores obtidos para regiões flexíveis e prediz a estrutura secundária, criando um perfil linear do contorno da proteína. A maioria dos picos antigênicos das proteínas está localizada nas suas regiões expostas, sendo que o programa oferece meios de prever determinantes antigênicos potenciais.

Nota-se que a presença do motivo principal VLRN nos peptídeos, destacada em vermelho, não determina o índice de antigenicidade, exceto para os clones 8 e 13, que apresentaram valores positivos apenas para o motivo parcial LRN. Estes índices positivos são altamente influenciados por alguns resíduos vizinhos, pois peptídeos semelhantes como as seqüências dos clones 5 e 13, mudam em apenas um único resíduo (V x Q) determinando um comportamento totalmente diferente quanto ao índice de antigenicidade. Os peptídeos contendo o motivo LPP, destacado em cinza, apresentam índices de antigenicidade razoavelmente altos na região correspondente à estes aminoácidos, assim como aqueles que contêm o motivo APP, destacado em verde. Clones individuais, que não apresentam homologia com outros fagos, também apresentaram altos índices, como o de seqüência 3, e devem ser investigados quanto a sua especificidade e localização protéica.



**Figura 15:** Índices de antigenicidade preditas para os peptídeos selecionados gerados pelo programa Protean 4.0. Os números 1 a 7 representam a seqüência de aminoácidos dos peptídeos mencionados à esquerda. Em destaque, os peptídeos com domínios selecionados.

Os peptídeos obtidos no processo de seleção foram alinhados pelo programa Blast com as seqüências completas das proteínas específicas para

Dengue, depositadas em banco de dados (GeneBank), com o propósito de avaliar o grau de similaridade entre as seqüências (Tabela 6).

**Tabela 6:** Alinhamento entre os peptídeos selecionados e proteínas de DENV.

Peptídeo	IE	Proteínas	Motivo
KLWNIS	1,78	<a href="#">gi 26245725 gb AAN77510.1</a> NS5 [DENV-2]	WxxSS
KLFNANP	1,09	<a href="#">gi 33914246 gb AAL99210.1</a> Proteína do envelope [DENV-3]	LFxANP
YQDSAKT	1,08	<a href="#">gi 37545165 gb AAM51546.1</a> Poliproteína [DENV-3]	DSAK
TYKLPPP	1,67	<a href="#">gi 22384959 gb AAM96029.1</a> Poliproteína [DENV-2]	YKxPP
VLRNAPP	2,27	<a href="#">gi 11096033 gb AAG30148.1</a> Precursor de poliproteína [DENV-4]	VLRN
VLRNVHN	2,47	<a href="#">gi 11096033 gb AAG30148.1</a> Precursor de poliproteína [DENV-4]	VLRN
VLRNMNP	2,37	<a href="#">gi 11096033 gb AAG30148.1</a> Precursor de poliproteína [DENV-4]	VLRN
		<a href="#">gi 75706485 gb ABA25791.1</a> Proteína do envelope [DENV-3]	LRxM
		<a href="#">gi 31376239 gb AAN73071.1</a> Poliproteína [DENV-3]	LRxM
VLRNSPT	2,08	<a href="#">gi 81301435 gb ABB70563.1</a> Poliproteína [DENV-1]	VLxxMN
		<a href="#">gi 11096033 gb AAG30148.1</a> Precursor de poliproteína [DENV-4]	VLRN
		<a href="#">gi 18378364 gb AAL68559.1</a> Proteína do envelope [DENV-2]	RNxPT
		<a href="#">gi 40643331 emb CAD31751.1</a> Poliproteína [DENV-2]	LRxxPT
		<a href="#">gi 38327270 gb AAR17682.1</a> NS1 [DENV-2]	LRxxPT
LLRNAST	2,85	<a href="#">gi 37543958 gb AAM51538.1</a> Poliproteína [DENV-3]	LLRN LRxAS
		<a href="#">gi 25992096 gb AAN77049.1</a> NS2b [DENV-3]	LLRN
		<a href="#">gi 30523272 gb AAP31664.1</a> Anticorpo anti-DENV	NLPP
MLRNLPP	1,55	<a href="#">gi 40643331 emb CAD31751.1</a> Poliproteína [DENV-2]	LRxLP
		<a href="#">gi 14269098 gb AAK58017.1</a> Precursor de poliproteína [DENV-4]	LRxLP
		<a href="#">gi 254054 gb AAB22972.1</a> NS3 [DENV-1]	LRxLP
		<a href="#">gi 1407811 gb AAB03620.1</a> NS3 [DENV-2]	LRxLP
ALRNLGP	1,42	<a href="#">gi 58044290 gb AAW64434.1</a> Poliproteína [DENV-1]	ALRxxxxxNL ALxNL
		<a href="#">gi 4337013 gb AAD18036.1</a> Poliproteína [DENV-2]	LRxLG ALxNL
		<a href="#">gi 54401699 gb AAV34603.1</a> Poliproteína [DENV-3]	ALxNL
		<a href="#">gi 57544910 gb AAW51420.1</a> Poliproteína [DENV-4]	LRxLG
		<a href="#">gi 14269098 gb AAK58017.1</a> Precursor de poliproteína [DENV-4]	LRxLG
		<a href="#">gi 38327274 gb AAR17684.1</a> NS1 [DENV-4]	LRxLG
ALRNYTS	1,09	<a href="#">gi 27368030 gb AAN03445.3</a> Glicoproteína do envelope [DENV-1]	ALxNL
		<a href="#">gi 40643331 emb CAD31751.1</a> Poliproteína [DENV-2]	LRxxTS
		<a href="#">gi 37543958 gb AAM51538.1</a> Poliproteína [DENV-3]	LRxxTS
		<a href="#">gi 28171513 gb AAN38633.1</a> NS2a [DENV-4]	LRxxTS
		<a href="#">gi 14269098 gb AAK58017.1</a> Precursor de poliproteína [DENV-4]	LRxxTS
QLRNAPP	2,48	<a href="#">gi 37545165 gb AAM51546.1</a> Poliproteína [DENV-3]	QLxNA

Assim como ocorreu com o peptídeo consenso, o resultado destes alinhamentos demonstrou que estes peptídeos apresentam similaridades com proteínas relacionadas à dengue previamente depositadas em banco de dados, no entanto, não é específica para DENV-3, sendo encontrados também em proteínas dos demais tipos virais. O peptídeo ALYPARI não obteve nenhuma semelhança significativa com DENV, embora possua o motivo LxP, homólogo parcial ao LPP.

As seqüências obtidas alinharam com algumas proteínas do DENV. Em virtude da representação conservada em determinadas regiões ao longo dos peptídeos, os motivos poderiam representar importantes epítomos contínuos ou descontínuos dos antígenos (Cortese *et al.*, 1995; Yang e Shiuan, 2003).

Observando os resultados obtidos, nota-se a similaridade de alguns clones com poliproteínas de DENV: VLRNMNP (DENV-1), TYKLPPP, MLRNLPP, ALRNYTS (DENV-2), YQDSAKT, VLRNMNP, LLRNAST, ALRNLGP, ALRNYTS, QLRNAPP (DENV-3) e ALRNLGP (DENV-4), pelas seqüências VLxxMN, YKxPP, LRxLP, LRxxTS, DSAK, LRxM, LLRN (seqüência do peptídeo LLRNAST), LRxAS (seqüência do peptídeo LLRNAST), ALxNL, LRxxTS e QLxNA, respectivamente. Essas poliproteínas são codificadas pelo genoma do vírus e são processadas em 10 polipeptídeos, sendo 3 estruturais e 7 não estruturais.

Os peptídeos, com seus respectivos motivos, VLRNAPP (VLRN), VLRNVHN (VLRN), VLRNMNP (VLRN), VLRNSPT (VLRN e VLxxxPT), MLRNLPP (LRxLP), ALRNLGP (LRxLG) e ALRNYTS (LRxxTS) apresentam similaridades com o precursor de poliproteína para DENV-4. Todas as proteínas do vírus derivam de uma poliproteína precursora de grande tamanho, por processamento proteolítico co-traducional e pós-traducional (Tibaire Montes, 2001), daí a importância dos peptídeos serem similares a esta poliproteína.

Os clones que apresentam similaridade com proteínas do envelope (E) de diferentes tipos virais são: ALRNLGP (AlxNL), para glicoproteína do envelope do DENV-1; VLRNSPT (RNxPT), para proteína do envelope do DENV-2; e KLFNANP (LFxANP) e VLRNMNP (LRxM), para proteína do envelope do DENV-3. A proteína E possui 53 kDa, e contém importantes determinantes antigênicos (Alisson *et al.*, 2001). Provavelmente os peptídeos estão compartilhando similaridades antigênicas, entre os motivos e talvez entre as proteínas. Thullier e colaboradores (2001), usando um anticorpo monoclonal que neutraliza todos os sorotipos do

dengue, ligante à glicoproteína do envelope, identificaram o clone WSLFLNHAE similar à seqüência da proteína. Segundo os autores, este é um segmento crítico para a infectividade de todos os quatro sorotipos. Interessante observar que essa seqüência crítica possui algumas similaridades em relação aos peptídeos selecionados que se alinham com a proteína do envelope, especificamente considerando os motivos LN ou LF.

A proteína NS1 tem identidade com os peptídeos VLRNSPT (DENV-2) e ALRNLGP (DENV-4), que têm motivos LRxxPT e LRxLG, respectivamente. A NS1, com 40 KDa, possui atividade na maturação viral e é encontrada na superfície, ligada à membrana da célula infectada, podendo também ser secretada. Essa proteína tem capacidade imunizante, sendo que os anticorpos atuam como mediadores de fenômenos de citotoxicidade por linfócitos, através de seus receptores para a porção Fc de imunoglobulinas (Figueiredo, 1999). Wu *et al.* (2001), usando um anticorpo monoclonal sorotipo-específico de DENV-1, identificaram um epítipo (célula B) de peptídeo randômico expresso em fago, com motivo consenso HxYxW, que mimetiza a seqüência HKYSWK da proteína NS1 do mesmo tipo viral. Em outro trabalho, os mesmos autores (2003), usando a mesma metodologia com enfoque em DENV-2, confirmaram que o motivo HRL foi crucial para a ligação peptídeo-anticorpo. Interessantemente, este motivo apresenta identidade parcial às seqüências lineares LR observadas nos diversos clones selecionados por nosso grupo.

O peptídeo ALRNYTS apresenta similaridade com a proteína NS2a de DENV-4 apresentando o motivo LRxxTS. Já o clone LLRNAS, com o provável motivo LLRN, apresenta similaridade com a proteína NS2b de DENV-3. Ambas são proteínas pouco conhecidas no ponto de vista imunológico em DENV, sugerindo mais estudos com estas proteínas.

O peptídeo MLRNLPP apresenta similaridade com proteína NS3 de DENV-1 e DENV-2 através do motivo LRxLP. Esta proteína, com 69 kDa, é uma enzima bifuncional, nucleotídeo, trifosfatase/helicase viral. A NS3 que se apresenta em contato com a superfície celular ou é secretada, possui capacidade imunizante. A presença de NS3 estimula a destruição das células infectadas por linfócitos T citotóxicos (Figueiredo, 1999).

O peptídeo KLWNISS apresentou similaridade com a proteína NS5 de DENV-2 pelo motivo WxxSS. Essa proteína é a maior das dez proteínas e a mais altamente conservada, com 104 kDa. É uma proteína que possui domínios que contêm atividade enzimática que são cruciais para o ciclo replicativo do vírus (Chao *et al.*, 2005). A similaridade deste peptídeo à proteína NS5 pode justificar a ocorrência de reatividade cruzada dos demais peptídeos aos múltiplos sorotipos virais (Rothman, 2004).

Os peptídeos VLRNSPT e ALRNLGP, similares a NS1; e MLRNLPP, similar a NS3, podem se tornar importantes alvos vacinais, por serem altamente imunogênicas e importantes alvos de anticorpos contra a dengue.

Epítopos podem ser classificados como conformacionais (seqüências descontínuas) ou não conformacionais (seqüências lineares). Epítopos lineares são curtos estiramentos da estrutura da proteína primária, composta de resíduos contínuos de aminoácidos da seqüência primária. Epítopos conformacionais consistem em muitos resíduos de aminoácidos, discretos na seqüência primária, que montam determinantes antigênicos na forma da estrutura terciária das proteínas (Barlow *et al.*, 1986). Seqüências consenso podem não mostrar nenhuma similaridade com a seqüência do antígeno natural (Felici *et al.*, 1993). Nesse caso, epítopos podem mimetizar epítopos naturais (mimotopos) ou epítopos conformacionais. Essa pode ser a justificativa para que os prováveis motivos não tenham sido encontrados na seqüência linear da proteína do capsídeo.

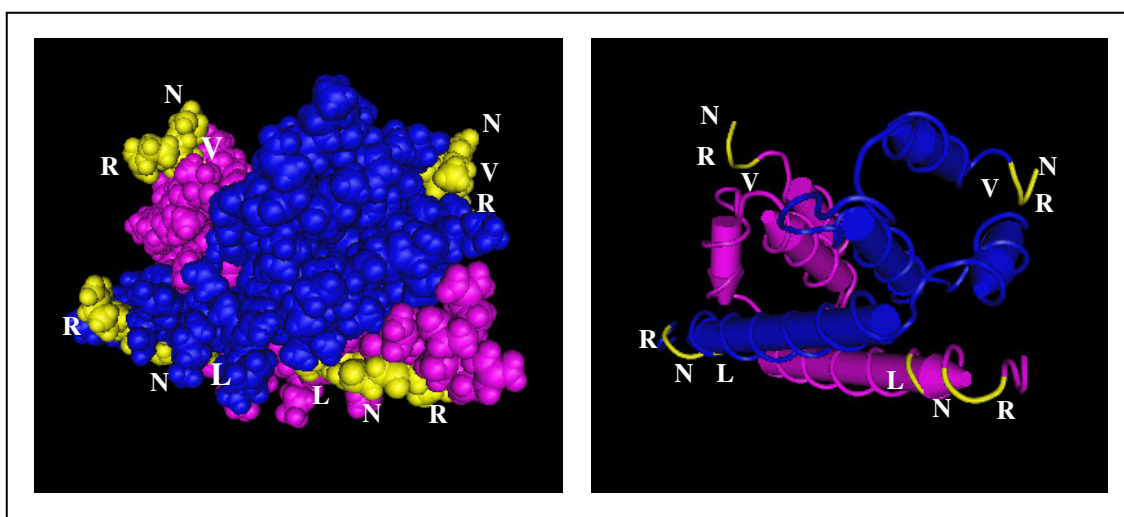
Como os motivos VxRN e LRN não se alinham na estrutura linear da proteína do capsídeo, a busca motivos foi feita diretamente na estrutura terciária da proteína, por superposição, pelo programa Cn3D (Figura 16).

Ma e colaboradores (2004) apresentaram a estrutura 3D da proteína do capsídeo, de DENV-2 e encontraram uma dobra alternativa na proteína e esta região sugere a interação com outros componentes virais na partícula do vírus. Segundo eles, proteínas C de outros flavivirus podem ter uma dobra similar, devido à sua seqüência ser conservada.

A proteína C apresenta duas seqüências alvo prováveis, **NRVSTVQQQL** (porção N-terminal em contato com a membrana viral) e **EIGRMLNILNRR** (porção C-terminal em contato com o RNA viral), que possuem respectivamente os motivos

VxRN e LRN, ambos conformacionais e não lineares no fago. Todos os sorotipos do vírus da dengue possuem as seqüências conservadas nas regiões alvo, como mostra a Tabela 7.

A proteína C de DENV-2 é um dímero simétrico com quatro hélices (dois pares antiparalelos) (Jones, 2003). Cada dímero possui uma das seqüências alvo analisadas. Pode-se observar que ambos os motivos estão localizados na porção mais externa da molécula, propiciando um maior contato de superfície, portanto tornando-se uma região candidata para a localização de epítopos.



**Figura 16:** Identificação dos prováveis motivos VxRN e LRN na estrutura terciária da proteína do capsídeo de DENV-2, feito pelo programa Cn3D. Em amarelo, os domínios encontram-se expostos na estrutura conformacional.

**Tabela 7:** Provável sítio de alinhamento dos motivos VxRN e LRN (em destaque) na seqüência alvo do capsídeo dos tipos DENV-1, 2, 3 e 4.

Seqüência Alvo	Proteína	Similaridade
EIGRMLNILNRR	<a href="#">gi 53680707 gb AAU89544.1</a> Poliproteína [DENV-1]	ElxxMLNI+NRR
	<a href="#">gi 2909793 gb AAC40836.1</a> Poliproteína [DENV-2]	EIGRMLNILNRR
	<a href="#">gi 51850387 dbj BAD42421.1</a> Poliproteína [DENV-3]	ElxxML+I+NRR
	<a href="#">gi 53653753 gb AAU89380.1</a> Poliproteína [DENV-4]	EIGRMLNILNRR
	<a href="#">gi 28171515 gb AAN38635.1</a> Precursor de poliproteína [DENV-4]	EIGRMLNILNxR
NRVSTVQQL	<a href="#">gi 37963458 gb AAR05860.1</a> Poliproteína [DENV-1]	NRVSTVxQL
	<a href="#">gi 21070437 gb AAM34299.1</a> Poliproteína [DENV-2]	NRVSTVQQL
	<a href="#">gi 37545169 gb AAM51547.1</a> Poliproteína [DENV-3]	NRVSTxxQL
	<a href="#">gi 61652905 gb AAx48017.1</a> Poliproteína [DENV-4]	NRVSTxQxL
	<a href="#">gi 28171470 gb AAN38615.1</a> Precursor de poliproteína [DENV-4]	NRVSTxQL

Dos 14 peptídeos selecionados, 6 apresentaram similaridades com proteínas de comunidades biológicas previamente conhecidas e com probabilidades de ocorrência ao acaso muito baixa (Tabela 8), sugerindo que os fagos foram selecionados especificamente para os sítios alvos.

**Tabela 8:** Peptídeos que apresentaram similaridades com proteínas de comunidades biológicas previamente conhecidas.

Peptídeo	SI*	Função	Padrão	AT**	P***	Acesso
YQDSAKT	SAK	Sítio de fosforilação da proteína Kinase C	[ST]-x-[RK]	Vírus eucarióticos	$1,423 \times 10^{-2}$	<a href="#">PS00005</a>
TYKLPPP	TYK					
ALRNYTS	NYTS	Sítio de N-glicosilação	N-{P}-[ST]-{P}.	Vírus eucarióticos	$5,138 \times 10^{-3}$	<a href="#">PS00001</a>
LLRNAST	NAST					
KLWNISS	NISS					
ALYPARI	ARI	Alvo sinal C-terminal de microcorpos	[STAGCN]-[RKH]-[LIVMAFY]	Eucariotos	$1,733 \times 10^{-2}$	<a href="#">PS00342</a>

\*SI: Sítio de identificação

\*\*AT: Amplitude taxonômica

\*\*\*P: Probabilidade de ocorrência randômica

Os peptídeos YQDSAKT e TYKLPPP apresentam similaridades com o sítio de fosforilação da proteína kinase C de vírus eucarióticos, através dos sítios de identificação SAK e TYK, respectivamente, sendo S ou T o sítio de fosforilação. A proteína kinase C, está envolvida em processos celulares incluindo secreção,

exocitose, expressão gênica, modulação da condução iônica, proliferação celular e *down-regulation* de receptores extracelulares (Kapczinski *et al.*, 2004). *In vivo*, a proteína Kinase C exibe uma preferência pela fosforilação de resíduos de serina ou de treonina, encontrados próximos a um resíduo básico C-terminal (Kishimoto *et al.*, 1985). A presença de resíduos básicos adicionais ao N ou C-terminal do aminoácido alvo, aumenta a velocidade da reação de fosforilação.

Os peptídeos ALRNYTS, LLRNASL e KLWNISS apresentam similaridades com o sítio de N-glicosilação dos vírus eucarióticos, através dos sítios de identificação NYTS, NASL e NISS, respectivamente, sendo N o sítio de glicosilação. A N-glicosilação é uma das principais modificações pós-traducionais, sendo responsável por alterações na conformação, estabilidade e conseqüentemente, na funcionalidade de proteínas em eucariotos (Maia e Leite, 2001). A seqüência de N-glicosilação foi determinada como sendo NxS/T (Asp-x-Ser/Tre), onde x pode ser qualquer aminoácido, exceto prolina. Esse tripeptídeo, em geral, faz parte de uma estrutura de folha pregueada (Miletti, 1997).

O peptídeo ALYPARI apresenta similaridade com o alvo sinal C-terminal de microcorpos de eucariotos, através do sítio de identificação ARI. Microcorpos são uma classe de organelas citoplasmáticas, a qual pertencem os peroxissomos e glioxissomos. Proteínas de microcorpos são sintetizadas em polissomos livres e importadas até as organelas (de Hoop e Ab, 1992). Tem sido experimentalmente mostrado que, em algumas proteínas peroxissomais, o alvo sinal reside nos últimos três aminoácidos do sítio C-terminal (Gould *et al.*, 1988; Gould *et al.*, 1989; Gould *et al.*, 1990). Esta seqüência consenso é conhecida como SKL (Ser-Lis-Leu), no entanto, algumas variações são possíveis em todas as três posições.

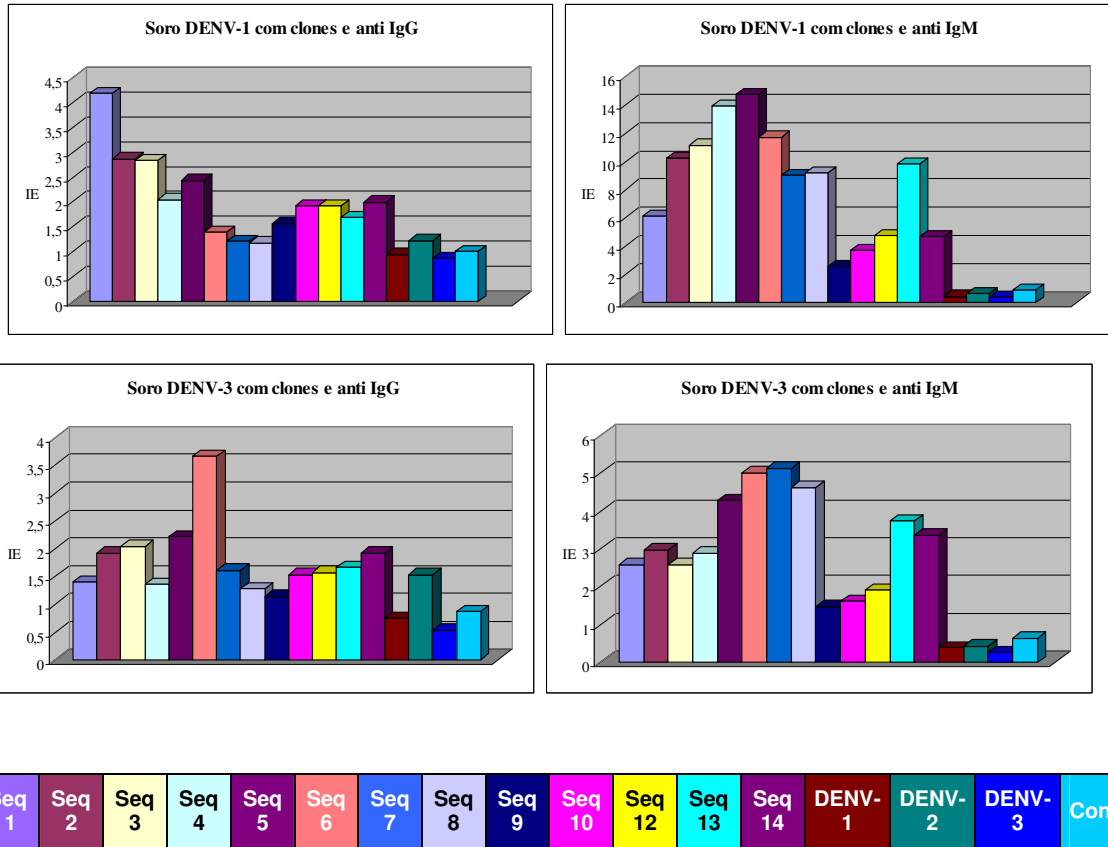
A presença de domínios conhecidos de vírus eucarióticos/eucariotos sugere que os peptídeos selecionados possuem similaridade com o vírus da dengue e podem estar associados ao processo de modulação do vírus no hospedeiro. Aqueles peptídeos que não apresentaram semelhança com nenhuma comunidade biológica previamente descrita podem estar associados a novos sítios biológicos e que devem ser investigados posteriormente.

## **Testes ELISA para os clones contra soro humano específico**

O teste ELISA (Figura 17) comprovou que os peptídeos não foram específicos para DENV-3, uma vez que os clones deveriam reagir apenas com o soro dos pacientes contaminados com esse tipo viral, bem como com a cultura específica. Reatividade inesperada também foi observada com os antígenos específicos para DENV-1, -2, e -3, com positividade significativa apenas para IgG de DENV-2, embora os soros dos pacientes haviam sido identificados previamente como IgM positivos, específicos para os tipos 1 e 3, conforme tipagem realizada por RT-PCR. Portanto, a única explicação plausível para este resultado é que ocorreu soroconversão dos pacientes de IgM para IgG e que provavelmente houve erro na tipagem das amostras.

Com relação aos peptídeos selecionados, o ensaio demonstrou que os clones também apresentaram reação cruzada com soro de pacientes contaminados com DENV-1. Os peptídeos recombinantes foram superiores em imunorreatividade em relação aos IE obtidos das proteínas totais da dengue.

Soros de pacientes com DENV-2 e DENV-4 e cultura do tipo 4 não foram analisados nesse estudo. O fago de seqüência MLRNLPP (Seq 11) também não foi analisado, por não ter sido previamente amplificado. Estes resultados corroboram os testes ELISA prévios com IgY e culturas, bem como com os resultados de bioinformática.



**Figura 17:** Teste de imunorreatividade dos clones com soro de pacientes contaminados com DENV-1 e 3, e com proteínas totais de DENV-1, 2 e 3.

## CONCLUSÕES

- Embora as galinhas da raça *White Leghorn* tenham sido imunizadas com antígenos totais do vírus da dengue tipo 3, a resposta imunológica foi inespecífica para tipo viral, mas com alta sensibilidade ao vírus da dengue, devendo ser testada contra os outros *Flavivirus* para determinar sua especificidade.
- Dentre os 14 fagos recombinantes selecionados em 4 ciclos de seleção por “Phage Display”, o motivo comum mais freqüente foi o VLRN, apresentando alto índice de imunorreatividade, com reação cruzada entre os tipos virais 1 e 3, conforme sorologia específica de indivíduos infectados com DENV-1 e DENV-3
- Domínios de fosforilação e glicosilação, encontrados em vírus eucarióticos, foram similares às seqüências presentes em cinco fagos recombinantes selecionados, resultado este que suporta os outros achados por sorologia e bioinformática, demonstrando que a seleção de peptídeos reativos contra anticorpos anti-dengue foi relativamente eficaz, o que não implica que estes motivos sejam fisiologicamente ativos no vírus da dengue

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Alisson SL, Schlich J, Stiasny K, Mandl CW, Heinz FX (2001) Mutational Evidence for an Internal Fusion Peptide in Flavivirus Envelope Protein E. *Journal of Virology* 75:4268–4275.

Almeida JF (2005) Identificação de peptídeos recombinantes ligantes a anticorpos policlonais provenientes de pacientes com leishmaniose visceral via “phage display”. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

Barbas CF, Bain JD, Hoekstra DM, Lerner RA (1992) Semisynthetic combinatorial antibody libraries: a chemical solution to the diversity problem. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 89:4457.

Barbas CF, Burton DR, Scott JK, Silverman GJ (2001) *Phage Display. A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p.8.4-8.7.

Barlow DJ, Edwards MS, Thornton JM (1986). Continuous and discontinuous protein antigenic determinants. *Nature* 322:747–748.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.

Capparelli FE (2005) Caracterização de motivos protéicos imunogênicos contra a doença infecciosa da bursa em aves por Phage Display. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

Cardoso R (2004) Isolamento e caracterização de peptídeos sintéticos em phage display pela interação com anticorpos policlonais anti-neuwiedase da peçonha

bruta de *Bothrops neuwiedi pauloensis*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

Chao DY, King CC, Wang WK, Chen WJ, Wu HL, Chang GJJ (2005) Strategically examining the full-genome of dengue virus type 3 in clinical isolates reveals its mutation spectra. *Virology Journal* 72:1-10

Cortese R, Monaci P, Nicosia A, Luzzago A, Felici F, Calfre G, Pessi A, Tramontano A, Sollazzo M (1995) Identification of biologically active peptides using random libraries displayed on phage. *Current Opinion in Biotechnology* 6:73-80.

Chow VT, Seah CL, Chan YC (1993) Use of NS3 consensus primers for the polymerase chain reaction amplification and sequencing of dengue viruses and other flaviviruses. *Archives of Virology*. 133:157-170.

de Hoop MJ, Ab G (1992) Import of proteins into peroxisomes and other microbodies. *Biochemical Journal* 286:657-69.

Felici F, Luzzago A, Folgori A, Cortese R (1993) Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides. II. Selection of clones recognized by a protective monoclonal antibody against the *Bordetella pertussis* toxin from phage peptide libraries. *Gene* 128:21–27.

Figueiredo, LTM (1999) Vacinas contra o dengue. Simpósio: *Virologia Médica I* 32: 21-25.

Gould SJ, Keller GA, Subramani S (1988) Identification of peroxisomal targeting signals located at the carboxy terminus of four peroxisomal proteins. *Journal of Cell Biology* 107:897-905.

Gould SJ, Keller GA, Hosken N, Wilkinson J, Subramani S (1989) A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *Journal of Cell Biology* 108:1657-1664.

Gould SJ, Keller GA, Schneider M, Howell SH, Garrard LJ, Goodman JM, Distel B, Tabak H, Subramani S (1990) Peroxisomal protein import is conserved between yeast, plants, insects and mammals. *EMBO J* 9:85-90.

Guzmán MG, Kouri G (2002) Dengue: an update. *The Lancet Infectious Diseases* 2:33-42.

Ikemori Y (1993) Research note: avidity of chicken yolk antibodies to enterotoxigenic *Escherichia coli* fimbriae. *Poultry Science* 72:2361-2365.

Jameson BA, Wolf H (1988) The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. *Computer Applications in the Biosciences*. 4:181-186.

Jensenius JC *et al.* (1981) Eggs: conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG. *Journal of Immunological Methods* 46:63–68.

Jones CT, Ma L, Burgner JW, Groesch TD, Post CB, Kuhn RJ (2003) Flavivirus capsid is a dimeric alpha-helical protein. *Journal of Virology* 7:7143-7149.

Kapczinski F, Frey BN, Zannatto V (2004) Fisiopatologia do transtorno afetivo bipolar o que mudou nos últimos 10 anos? *Revista Brasileira de Psiquiatria* 26:17-21.

Kishimoto A, Nishiyama K, Nakanishi H, Uratsuji Y, Nomura H, Takeyama Y, Nishizuka Y (1985) Studies on the phosphorylation of myelin basic protein kinase Cadenosina 3':5'- monophosphate-dependente protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* 260:12492-12499.

Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, Jones CT, Mukhopadhyay S, Chipman PR, Strauss EG, Baker TS, Strauss JH (2002) Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* 108: 717-725.

Laemmli, UK (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lee KA *et al.* (2002) Acid stability of anti-*Helicobacter pylori* IgY in aqueous polyol solution. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 35:488–493.

Lemamy GJ (1999) High-affinity antibodies from hen's-egg yolks against human mannose-6-phosphate/insulin-like growth-factor-II receptor (M6P/IGFII-R): characterization and potential use in clinical cancer studies. *International Journal of Cancer* 80:896-902.

Lino GR, Prudêncio CR, Cardoso R, Maranhão AQ, Brígido MM, Goulart LR (2003) Geração de uma biblioteca combinatorial de sscFv a partir do repertório de galinha imunizada com proteínas totais de carrapato bovino *Boophilus microplus*. 16<sup>a</sup> Reunião Anual do Instituto Biológico, São Paulo, Brasil.

Ma L, Jones CT, Groesch TD, Kuhn RJ, Post CB (2004) Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:3414-3419.

Maia IG, Leite A (2001) N-glycosylation in sugarcane. *Genetics and molecular biology* 24: 231-234.

Marques GRAM, Ribeiro AF, Voltolini JC, Condino MLF. (2004) Epidemiologia da dengue em São Sebastião, Litoral Norte, São Paulo, Brasil, 2001-2002. *Arquivos do Instituto Biológico* 71:462-465.

McBride WJH, Vasudevan SG (1995) Relationship of a dengue 2 isolate from Townsville, 1993, to international isolates. *Commun Dis Intell* 19:522-523.

Miagostovich, M (1999) Características dos vírus dengue e de suas replicações. *Simpósio sobre dengue -Informes em Saúde Pública*, 2:3-8.

Miletti LC (1997) Detecção de  $\alpha$ -L-flucosidase em *Trypanosoma cruzi*. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo. São Paulo.

Noren KA, Noren CJ (2001) Construction of high-complexity combinatorial phage display peptide libraries. *Methods* 23:169–178.

Parmley, S, Smith, G (1988) Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* 73:305–318.

Prudêncio CR, Cardoso R, Lino GR, Goulart LR (2003) Produção de soros policlonais em galinhas para a detecção de antígenos do carrapato bovino (*Boophilus microplus*). 16<sup>a</sup> Reunião Anual do Instituto Biológico, São Paulo, Brasil.

Rader C, Barbas CF (1997) Phage display of combinatorial antibody libraries. *Current Opinion in Biotechnology* 8:503-508.

Robertson MW (1993) Phage and *Escherichia coli* expression of the human high affinity immunoglobulin E receptor alfa-subunit ectodomain. *Journal of Biological Chemistry* 268:12736-12743.

Rodi DJ, Soares AS, Makowski L (2002) Quantitative assessment of peptide sequence diversity in m13 combinatorial peptide phage display libraries. *Journal of Molecular Biology* 322: 1039-1052.

Schade R, Hlinak A (1996) Egg yolk antibodies, state of the art and future prospects. *ALTEX* 13:5-9.

Smith GP (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228:1315-1317.

Soumillion P, Jespers L, Bouchet M, Marchand-Brynaert J, Winter G, Fastrez J (1994) Selection of  $\beta$ -lactamase on filamentous bacteriophage by catalytic activity. *Journal of Molecular Biology*. 237:415-422.

Stuart CA (1988) High-affinity antibody from hens' eggs directed against the human insulin receptor and the human IGF1 receptor. *Analytical Biochemistry* 173:142-150.

Tibaïre Montes, M (2001). Actualización en dengue: Parte 1. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 21:39-45.

Thullier P, Demangel C, Bedouelle H, Mégret F, Jouan A, Deubel V, Mazié JC, Lafaye P (2001) Mapping of a dengue virus neutralizing epitope critical for the infectivity of all serotypes: insight into the neutralization mechanism. *Journal of General Virology* 82:1885–1892.

Yang HM (2003) Epidemiología da transmissão da dengue. *TEMA Tendências em Matemática Aplicada e Computacional*. 3:387-396.

Uzcátegui NY, Camacho D, Comach G, Cuello de Uzcátegui R, Holmes EC, Gould EA (2001) Molecular epidemiology of dengue type 2 virus in Venezuela: evidence for in situ virus evolution and recombination. *Journal of General Virology* 82:2945-2953.

Uzcátegui NY, Comach G, Camacho D, Salcedo M, de Quintana MC, Jiménez M, Sierra G, de Uzcátegui RC, James WS, Turner S, Holmes EC, Gould EA (2003) Molecular epidemiology of dengue virus type 3 in Venezuela. *Journal of General Virology* 84:1569-1575.

Yang WJ, Shiuan D (2003) Plaque reduction test: an alternative method to assess specific antibody response to pIII-displayed peptide of filamentous phage M13. *Journal of Immunological Methods* 276:175-183..

Wang WK, Sung TL, Lee CN, LinTY, King CC (2002) Sequence diversity of the capsid gene and the nonstructural gene NS2B of dengue-3 virus in vivo. *Virology* 303:181-191.

Wang P, Qin E, Yu M, Geng L, Zhao W, Hu Z, Yuan Z, Yang P (2001) Determination and analysis of the complete genomic sequence of the dengue type 4 virus B5 strain isolated in China. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 17:148-154.

Wenbin C, Xinyong Q, Maguire T (1991) Nucleotide sequence of the non-structural gene NS3 from Dengue-2 virus, strain Tonga 1974. Submitted MRC Virus Research Unit.

Wu HC, Jung MY, Chiu CY, Chao TT, Lai SC, Jan JT, Shai MF (2003) Identification of a dengue virus type 2 (DEN-2) serotype-specific B-cell epitope and detection of DEN-2-immunized animal serum samples using an epitope-based peptide antigen. *Journal of General Virology* 84:2771–2779.

Wu HC, Huang YL, Chao TT, Jan JT, Huang JL, Chiang HY, King CC, Shaio MF (2001) Identification of B-cell epitope of dengue virus type 1 and its application in diagnosis of patients. *Journal of Clinical Microbiology* 39:977–982.

Zhang C, Mammen MP Jr, Chinnawirotpisan P, Klungthong C, Rodpradit P, Monkongdee P, Nimmannitya S, Kalayanarooj S, Holmes EC (2005) Clade replacements in dengue virus serotypes 1 and 3 are associated with changing serotype prevalence. *Journal of Virology* 79:15123-15130.

## Anexo 1:

### Reagentes para realização de gel SDS-PAGE (16%)

<b>Soluções</b>	<b>Reagentes</b>
Gel de separação:	Tris-HCl 0,375 M pH 8,8 SDS 0,1% EDTA 2 mM Acrilamida/bis (29/1%) TEMED 0,125% Persulfato de Amônio 0,125%
Gel de empilhamento:	Tris-HCl 0,125 M pH 6,8 SDS 0,1% EDTA 2mM Acrilamida/bis (29/1%) TEMED 0,125% Persulfato de Amônio 0,125% H <sub>2</sub> O
Tampão Catodo:	Tris 0,1 M Glicina 0,1 M SDS 0,1% H <sub>2</sub> O
Tampão Anodo (pH 8,9):	Tris-HCl 0,2 M
Tampão da amostra:	Tris-HCl 0,1 M pH 6,8 SDS 4% Glicerol 20% Azul de bromofenol 0,2% H <sub>2</sub> O
Solução de Coomassie-blue 0,1% (coloração do gel)	
Solução descorante	Álcool Etilico 30% Acido Acético 10% H <sub>2</sub> O 60%