

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS
IMUNORREATIVOS A ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA
OS 4 SUBTIPOS DO VÍRUS DA DENGUE POR “PHAGE
DISPLAY”**

Tatiana Miranda Santos Anjo

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

UBERLÂNDIA - MG
Dezembro, 2007



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS
IMUNORREATIVOS A ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA
OS 4 SUBTIPOS DO VÍRUS DA DENGUE POR “PHAGE
DISPLAY”**

Tatiana Miranda Santos Anjo

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

UBERLÂNDIA - MG
Dezembro, 2007

 UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS
IMUNORREATIVOS A ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA
OS 4 SUBTIPOS DO VÍRUS DA DENGUE POR “PHAGE
DISPLAY”**

Tatiana Miranda Santos Anjo

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho
Unidade Acadêmica: Instituto de Genética e Bioquímica

Homologado pela coordenação do Curso
de Ciências Biológicas em 12/11/2007

Prof. Dra. Vera Lúcia de Campos Brites

UBERLÂNDIA – MG
Dezembro, 2007

 UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

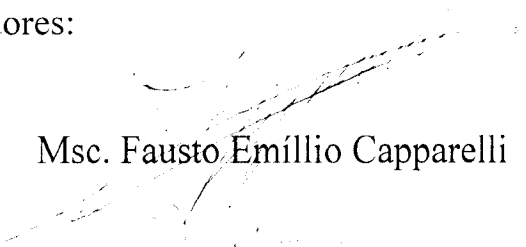
**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS
IMUNORREATIVOS A ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA
OS 4 SUBTIPOS DO VÍRUS DA DENGUE POR “PHAGE
DISPLAY”**

Tatiana Miranda Santos Anjo

Aprovado pela Banca Examinadora em: 13/12/2007 Nota: 10

Presidente: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart (Orientador)

Examinadores:


Msc. Fausto Emílio Capparelli

Msc. Juliana Franco Almeida

UBERLÂNDIA, 13 de Dezembro de 2007

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Luiz Antônio e Gislene, pelo amor, dedicação e incentivo durante toda minha vida, proporcionando-me a continuidade nos estudos até a conclusão do curso de Ciências Biológicas. Aos meus irmãos, Priscila e Vitor, e aos meus avós pela ternura e amizade. Ao meu namorado, Luiz Paulo, pelo apoio, companheirismo e carinho em todos os momentos.

Ao Dr. Luiz Ricardo, que além de ser o orientador deste trabalho foi um grande amigo, sempre disposto a ajudar e compartilhar suas idéias e conhecimentos. Agradeço pela oportunidade, apoio e confiança durante todo o trabalho.

À todos os colegas do laboratório que tornaram o ambiente de trabalho mais agradável, pelos ensinamentos e trocas de informações que contribuíram significativamente para minha formação. Agradeço em especial ao Fausto, que teve uma participação ativa no trabalho, sendo um importante co-orientador.

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

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização e elaboração deste trabalho. Muito obrigada!

RESUMO

Seleção e caracterização de peptídeos imunorreativos a anticorpos monoclonais contra os 4 subtipos do vírus da dengue por “Phage Display”

A dengue é uma doença febril aguda causada por um arbovírus do gênero *Flavivirus*, e é transmitida pelo vetor *Aedes aegypti*. Existem quatro sorotipos antígenicamente distintos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. A metodologia “Phage Display”, exposição de biomoléculas em fagos, tem sido amplamente utilizada no mapeamento de epítomos de proteínas antigênicas, constituintes de agentes causadores de doenças. Esse trabalho teve como objetivo isolar peptídeos imunorreativos, pela técnica “Phage Display”, contra mAbs dos 4 subtipos do vírus da dengue na tentativa de identificar e caracterizar prováveis epítomos funcionais das proteínas virais da dengue. Clones foram isolados de uma biblioteca randômica de peptídeos de 12 aminoácidos expostos em fagos por meio de três ciclos de seleção (*biopanning*), seqüenciados e analisados por meio de ferramentas de bioinformática. Em seguida, foram realizados testes ELISA a fim de verificar a especificidade destes aos mAbs, além de uma pré-validação frente ao soro positivo para DENV-3. A imunoreatividade de 20 peptídeos foram confirmadas por meio de testes imunoenzimáticos, onde 55% apresentaram reatividade significativa diante soro positivo, podendo apresentar possível utilidade em diagnósticos ou vacinas tetravalentes.

Palavras-chave: Dengue; *Phage Display*; peptídeos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>Dengue</i>	1
1.2. <i>Epidemiologia</i>	1
1.3. <i>Aspectos clínicos</i>	2
1.4. <i>Caracterização estrutural e antigênica do vírus</i>	4
1.5. <i>Controle e Prevenção</i>	8
1.6. <i>Diagnóstico e vacina</i>	9
1.7. <i>Phage Display</i>	11
2. MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1. <i>Biopanning – Seleção de peptídeos</i>	13
2.2. <i>Amplificação para extração de DNA</i>	16
2.3. <i>Extração de DNA</i>	17
2.4. <i>Sequenciamento de DNA</i>	17
2.5. <i>Análise dos dados por bioinformática</i>	18
2.6. <i>Amplificação para testes ELISA</i>	18
2.7. <i>Quantificação dos clones pelo espectrofotômetro</i>	19
2.8. <i>ELISA (“Enzimed Linked Immunosorbent Assay”) - Screening</i>	19
2.9. <i>ELISA (“Enzimed Linked Immunosorbent Assay”) - Pré-validação</i>	20
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	21
3.1. <i>Biopanning – Seleção de peptídeos</i>	21
3.2. <i>Amplificação para extração de DNA</i>	23
3.3. <i>Sequenciamento de DNA</i>	23
3.4. <i>ELISA (“Enzimed Linked Immunosorbent Assay”) - Screening</i>	25
3.5. <i>Análise dos dados de bioinformática</i>	25
3.6. <i>ELISA (“Enzimed Linked Immunosorbent Assay”) – Pré-validação</i>	35
4. CONCLUSÃO	36
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados das titulações de cada Biopanning para o anticorpo Dengue 1; pfu – unidades formadoras de colônias.....	22
Tabela 2. Resultados das titulações de cada Biopanning para o anticorpo Dengue 2; pfu – unidades formadoras de colônias.....	22
Tabela 3. Resultados das titulações de cada Biopanning para o anticorpo Dengue 3; pfu – unidades formadoras de colônias.....	22
Tabela 4. Resultados das titulações de cada Biopanning para o anticorpo Dengue 4; pfu – unidades formadoras de colônias.....	22
Tabela 5. Identificação de cada clone selecionado e suas respectivas frequências, no total de 97 peptídeos traduzidos.....	24
Tabela 6. Alinhamento dos peptídeos selecionados pelo programa ClustalW181.....	26
Tabela 7. Sequências de aminoácidos dos clones selecionados, frequência observada, frequência esperada, amplificação dos peptídeos e grau de informação.....	29
Tabela 8. Representação de diversos parâmetros para a indicação de prováveis alvos vacinais e diagnósticos, considerando os motivos protéicos, I.E., as taxas de hidrofobicidade, antigenicidade, exposição na superfície, e as proteínas alvos reconhecidas pelos peptídeos selecionados pelo ELISA.....	31

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Estágios de desenvolvimento do *Aedes aegypti*: larva, pupa e indivíduo adulto.
.....2
- Figura 2. Representação de um corte central no vírus da dengue: 1- Proteína do envelope; 2- ectodominios da proteína M e hastes da glicoproteína E; 3- bicamada lipídica; 4 e 5- Nucleocapsídeo ; 5- Ácido ribonucléico..... 5
- Figura 3. **a** - Os três domínios do envelope da dengue (E). Domínio I está representado em vermelho, domínio II em amarelo e domínio III em azul. O resíduo 53 liga o fragmento E estável à região C terminal da região transmembrana. **b** - Dímero E estável. Esta é a conformação do envelope (E) na partícula viral madura e em solução acima do pH de fusão **c** - Empacotamento do envelope (E) na superfície do vírus. Reconstruções por eletrocromicroscopia mostram que 90 dímeros do envelope (E) se empacotam em uma estrutura icosaédrica.....5
- Figura 4. **a**- E se liga a um receptor na superfície celular e o vírion é internalizadas para um endossomo. **b**- A redução do pH no endossomo causa uma mudança na conformação do domínio II formando uma dobradiça para fora da superfície do vírion, expondo os “loops de fusão” e, permitindo os monômeros do envelope (E) se rearranjarem lateralmente no plano da membrana viral. **c**- o “loop de fusão” se insere na camada de hidrocarbonetos da membrana celular do hospedeiro, promovendo a formação do trímero. **d** – As regiões de contato dos trímeros que são formadas, se espalham desde os “loops de fusão”, no topo, até a base do trímero. O domínio III troca de posição e gira para formar as regiões de contato dos trímeros, fazendo com que a porção C-terminal do envelope (E) se dobre de volta em direção ao “loop de fusão”. A energia liberada por esta reestruturação fazem com que membranas que estão opostas se curvem. **e** – A formação de um trímero de contato adicional entre a região de ancoragem e o domínio II leva inicialmente à uma hemifusão e, em seguida, **(f)** à formação de poros lipídicos de fusão.....6
- Figura 5. Estrutura de um bacteriófago M13. PIII, PVI, PVII, PVIII e PXIX representam as proteínas dos fagos. Peptídeos exógenos são expressos normalmente através da PIII ou PVIII.
.....12
- Figura 6. Representação do biopanning em placa. Em cada ciclo, os fagos reativos com o alvo são selecionados por lavagens sucessivas, sendo os demais descartados..... 16
- Figura 7. Exemplos de placas de titulações de ciclos de seleção dos eluatos (biopanning). As colônias azuis mostram bactérias *E.Coli* (ER2738) infectadas por fagos M13 carregando o gene *lacZ* da β -galactosidase..... 21

Figura 8. Perfil eletroforético das amostras de DNA extraídas dos clones obtidos no processo de seleção. C - marcador de peso molecular de 200ng de DNA controle com 7249 pb.
.....23

Figura 9. Teste ELISA apresentando a reatividade de todos os clones seqüenciados com os respectivos anticorpos..... 25

Figura 10. Teste ELISA preliminar mostrando a reatividade dos clones frente ao soro positivo para DENV-3.....35

LISTA DE ABREVIATURAS

Å	Angstrom
°C	Graus Celsius
µg	Microgramas
µL	Microlitros
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	Gramma
IE	Índice ELISA
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IgY	Imunoglobulina Y
IL	Interleucina
I(m)	Grau de informação
IPTG	Isopropil α -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 ^a
NS2b	Proteína não estrutural 2b
NS3	Proteína não estrutural 3
NS4a	Proteína não estrutural 4 ^a
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- 12mer	Biblioteca contendo 12 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
sNS1	Forma secretada da proteína não estrutural 1
T CD4+	Linfócitos T CD4+
T CD8+	Linfócitos T CD8+
V	Volts
X-gal	5-Bromo-4-cloro-3indolil- α -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

1. INTRODUÇÃO

1.1. Dengue

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).

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

O *A. aegypti*, possui hábitos doméstico e diurno, utilizando-se preferencialmente de depósitos de água limpa para deposição dos ovos, os quais têm uma alta capacidade de resistir à dessecação. O *A. aegypti* tem revelado grande capacidade de adaptação a diferentes situações ambientais desfavoráveis (TAUIL, 2002).

1.2. Epidemiologia

Foram descritos 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) (LIGON, 2004). Os quatro sorotipos do vírus da dengue têm antígenos muito similares, mas são suficientemente diferentes para provocar proteção parcial contra os outros após infecção por um deles (WHO, 1997).

O vírus da dengue é transmitido aos humanos através da picada da fêmea do mosquito *Aedes aegypti* infectado. 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. O 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) (YANG; SHIUAN, 2003).

O ciclo de vida do mosquito 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 duram 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) (FRANCIS; MEARA, 1985).

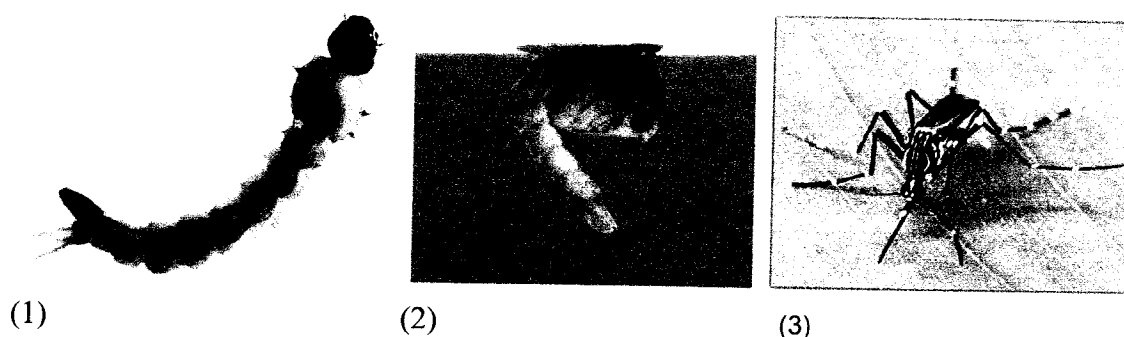


Figura 1. Estágios de desenvolvimento do *Aedes aegypti*: (1)-larva (RUSSELL,1996). (2)-pupa (FRANCIS; MEARA, 1985). (3) - Indivíduo adulto (ICPM, 2002).

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 (incluindo um bilhão de crianças) vivam em áreas de risco para a transmissão endêmica (CDC, 2005).

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 são hospitalizados, com cerca de 20 mil mortes (WHO, 2005).

1.3. Aspectos clínicos

O processo infeccioso desencadeado pelo vírus da dengue possui um amplo quadro clínico, podendo variar desde uma simples infecção 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).

Uma infecção primária com qualquer um dos quatro sorotipos do vírus da dengue, tipicamente, resulta em alguma doença assintomática ou então na febre da dengue. Estudos epidemiológicos sugerem que em indivíduos que foram infectados uma segunda vez com um diferente sorotipo, o risco de desenvolver a febre da dengue hemorrágica é significativamente maior (SIMMONS *et al.*, 2005).

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 (CDC, 2005).

A febre da dengue é uma doença severa que afeta crianças, adolescentes e adultos, mas que raramente provoca a morte. Os aspectos clínicos da febre da dengue variam de acordo com a 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. (WHO, 1997).

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 (GUZMÁN; KOURÍ, 2002).

A dengue hemorrágica é uma complicação potencial que pode levar ao óbito, e é caracterizada por: febre elevada, fenômenos hemorrágicos, hepatomegalia, e em casos severos, insuficiência circulatória. A doença começa geralmente com uma ascensão repentina na temperatura acompanhada por hemorragias na pele e outros sintomas não específicos da dengue clássica. A febre geralmente continua por dois a sete dias e pode se elevar até 40-41°C, possivelmente com convulsões febris e fenômenos hemorrágicos. Em casos moderados de dengue hemorrágica, todos os sinais e sintomas diminuem depois que a febre diminui. Em casos severos, a condição do paciente pode de repente deteriorar-se após alguns dias de febre; a temperatura abaixa, seguidas por sinais de insuficiência circulatória, e o paciente pode evoluir rapidamente para um estado crítico de choque e morrer dentro de 12-24 horas, ou pode recuperar rapidamente através da reposição do volume de sangue por meio de terapias apropriadas. As autópsias de casos de dengue hemorrágica, em ordem de frequência, constata-se hemorragias na pele e nos tecidos subcutâneos, nas mucosas do trato gastrointestinal, e no coração e fígado. De maneira geral, é pouco frequente 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, 2002).

1.4. Caracterização estrutural e antigênica do vírus

A estrutura do vírus da dengue foi recentemente descrita pelo uso de crioeletromicroscopia (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 (GUZMÁN; KOURÍ, 2002).

O genoma tem 11 Kb e codifica 7 proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5) e também 3 proteínas estruturais: Capsídeo (C, 100 aminoácidos), Membrana (M, 75 aminoácidos) e Envelope (E, 595 aminoácidos), sendo que as duas últimas estão na superfície do vírus. As regiões não codificantes 3' e 5' são importantes para a regulação da replicação viral. Os domínios responsáveis pelas principais propriedades biológicas do vírus como a neutralização, aglutinação de eritrócitos, resposta imune protetora e as interações com receptores do vírus são associadas com proteínas do envelope (MAIRUHU *et al.*, 2004).

Uma distribuição radial do vírus observada por crioeletromicroscopia, mostrou que a densidade deste pode ser dividida em uma série de camadas concêntricas (Figura 2). 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 à região do nucleocapsídeo, e dentro de um raio de 105 Å, a região do RNA do núcleo (KUHN *et al.*, 2002).

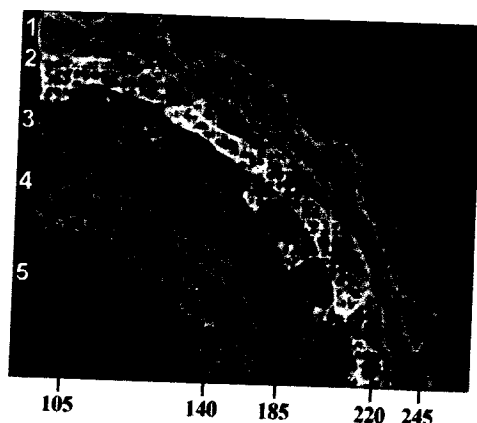


Figura 2. Representação de um corte central no vírus da dengue: 1- Proteína do envelope; 2- ectodomínios da proteína M e hastes da glicoproteína E; 3- bicamada lipídica; 4 e 5- Nucleocapsídeo ; 5- Ácido ribonucléico (RNA) (KUHN *et al.* 2002).

A 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.

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 (Figura 3) (BHARDWAJ *et al.*, 2001).

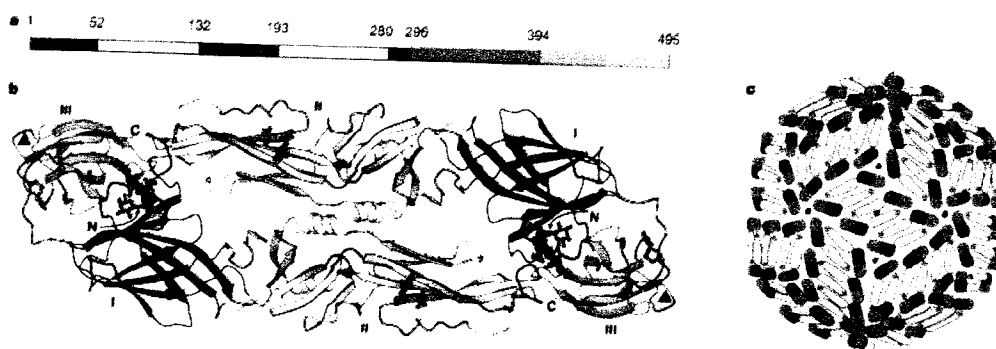


Figura 3. a- Os três domínios do envelope da dengue (E). Domínio I está representado em vermelho, domínio II em amarelo e domínio III em azul. O resíduo 53 liga o fragmento E estável à região C terminal da região transmembrana. **b-** Dímero E estável. Esta é a conformação do envelope (E) na partícula viral madura e em solução acima do pH de fusão **c-** Empacotamento do envelope (E) na superfície do vírus. Reconstruções por crioeletromicroscopia mostram que 90 dímeros do envelope (E) se empacotam em uma estrutura icosaédrica (MODIS *et al.*, 2004).

O vírus da dengue entra na célula hospedeira quando a glicoproteína viral do envelope E liga-se 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 (Figura 4) (MODIS *et al.*, 2004; BRESSANELLI *et al.*, 2004).

A estrutura tridimensional do ectodomínio solúvel E, em seu estado trimérico, pós-fusionado revela diferenças marcantes da forma dimérica pré-fusionada. O trímero alongado promove a formação de três "loops de fusão" nas extremidades, para fundir à membrana das células do hospedeiro. Esta estrutura permite – nos visualizar como esses “loop de fusão” interagem com a bicamada lipídica. Conhecendo estes mecanismos possibilita-se desenvolver estratégias que possam inibir a entrada do flavivírus na célula hospedeira (Figura 4) (MODIS *et al.*, 2004).

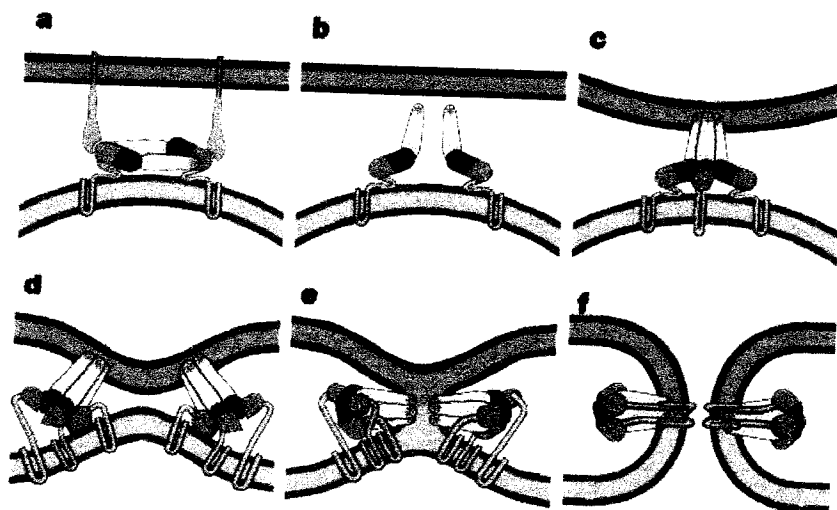


Figura 4. a- E se liga a um receptor na superfície celular e o vírion é internalizado para um endossomo. b- A redução do pH no endossomo causa uma mudança na conformação do domínio II formando uma dobradiça para fora da superfície do vírion, expondo os “loops de fusão” e, permitindo os monômeros do envelope (E) se rearranjarem lateralmente no plano da membrana viral. c- o “loop de fusão” se insere na camada de hidrocarbonetos da membrana celular do hospedeiro, promovendo a formação do trímero. d – As regiões de contato dos trimeros que são formadas se espalham desde os “loops de fusão”, no topo, até a base do trímero. O domínio III troca de posição e gira para formar as regiões de contato dos trimeros, fazendo com que a porção C-terminal do envelope (E) se dobre de volta em direção ao “loop de fusão”. A energia liberada por esta reestruturação faz com que membranas que estão opostas se curvem. e – A formação de um trímero de contato entre a região de ancoragem e o domínio II leva inicialmente a uma hemifusão e, em seguida, (f) à formação de poros lipídicos de fusão (MODIS *et al.*, 2004).

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 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).

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. A proteína NS3 tem um papel crítico na maturação e replicação da poliproteína, e sua ausência impede essas atividades (KATZENMEIER, 2004).

A 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. (BALEOTTI; MORELI; FIGUEIREDO, 2003 ; CHAO *et al.*, 2005).

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; KOURÍ, 2002 ; 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; KHANNA; SWAMINATHAN, 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 estrutural precursora de membrana (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 os 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; KOURÍ, 2002).

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).

1.5. Controle e Prevenção

A OMS considera o controle e a prevenção da dengue uma das suas prioridades. Os dados estatísticos de 2006, combinados aos atuais surtos já notificados e a presença do "El Niño", indicam que 2007 poderá ser um dos períodos mais difíceis e complexos para o controle da epidemia de dengue na América do Sul. De acordo com a Organização Pan-Americana da Saúde, nos últimos 25 anos houve alternância de surtos fortes e moderados na América do Sul. Esses surtos mais fortes se repetem entre três e cinco anos, e a tendência desses surtos cíclicos é de que se apresentem cada vez com mais intensidade (OPAS, 2007).

No Brasil, as condições sócio-ambientais favoráveis à expansão do *Aedes aegypti* possibilitaram a dispersão do vetor desde sua reintrodução em 1976 e o avanço da doença. Essa reintrodução não conseguiu ser controlada com os métodos tradicionalmente empregados no combate às doenças transmitidas por vetores. Programas com baixíssima ou mesmo nenhuma participação da comunidade, sem integração intersetorial e com pequena utilização do instrumental epidemiológico mostraram-se incapazes de conter um vetor com altíssima capacidade de adaptação ao novo ambiente criado pela urbanização acelerada e pelos novos hábitos (MISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

O controle baseia-se principalmente no controle do vetor (SEVERSON *et al.*, 2004). O método mais utilizado nos últimos vinte anos para o controle do *A. aegypti* é a aplicação de inseticidas a ultrabaixo volume (ULV). O pequeno impacto desse método na circulação viral tem levado a uma reavaliação das estratégias de controle (PAHO, 1994). Em alguns países, como Cuba e Cingapura, o cumprimento de leis para desestimular a manutenção de focos do

mosquito, com aplicação de multas, foi bem sucedido. O controle biológico do vetor, por meio do *Bacillus thuringiensis*, do *Bacillus sphaericus*, de peixes larvívoros e outros, adicionados aos depósitos domésticos de água, com a participação comunitária, também obteve sucesso em algumas situações, assim como o uso doméstico de larvicidas químicos (CLARO; TOMASSINI; ROSA, 2004).

Campanhas informativas, que utilizam redes de televisão, rádios, jornais, folhetos, cartazes, palestras comunitárias buscando a colaboração da população para a eliminação dos focos de mosquitos têm demonstrado eficiência limitada. As abordagens baseadas na participação comunitária e educação em saúde têm sido cada vez mais valorizadas, ao lado das ações ambientais e da vigilância epidemiológica, entomológica e viral (CLARO; TOMASSINI; ROSA, 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 (WHO, 2002).

1.6. Diagnóstico e vacina

Os métodos comumente usados para confirmar a infecção pela dengue, envolvem o isolamento do vírus, a detecção do antígeno, RNA do vírus no plasma, 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 e/ou RT-PCR; sequenciamento baseado na amplificação de ácido nucléico; PCR em tempo real detectando antígenos virais livres e identificação de imunoglobulina M (IgM) anti-vírus da dengue ou anticorpos IgG por ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (KAO *et al.*, 2005).

De acordo com GROEN *et al.* (2000), a maioria dos kits comerciais disponíveis para o diagnóstico da dengue está baseada no uso de antígenos virais totais, produzidos em culturas de células de cérebro de camundongos, para a detecção de anticorpos contra a dengue. O uso

desses tipos de diagnósticos são consequentemente associados a resultados falso-positivos devido à reações-cruzadas sorológicas e apresentam um potencial risco-biológico para a saúde pública por expor o vírus infeccioso à comunidade. Além disso, há um alto custo na produção desses antígenos virais.

Todas essas considerações são responsáveis por despertar o interesse de se desenvolver antígenos alternativos para substituir o uso de antígenos totais nos kits de diagnósticos. Uma forma de resolver esses problemas é substituir o antígeno viral total por antígenos recombinantes sintéticos, selecionando cuidadosamente os epítomos. Epítomos lineares, imunodominantes do vírus da dengue, são potencialmente adequados para a construção de proteínas com multiepítomos e têm sido extensivamente mapeados sobre as principais proteínas estruturais, a proteína do envelope (E) bem como proteínas não-estruturais (NS1). A maioria destes epítomos reconhecem especificamente anticorpos IgG (ANANDARAO *et al.*, 2006).

Recentemente, relatou-se uma nova abordagem sobre um multiepítomo onde *splicing* em conjunto acarretam em vários epítomos dengue-específicos os quais não promovem reações cruzadas com anticorpos de outros flavivírus que não o da dengue e que super-expressam seus produtos em *Escherichia coli*. Esta abordagem de multiepítomo, elimina a possibilidade de reação com o antígeno viral total (contribui para uma maior segurança), possibilita uma maior densidade/comprimento do epítomo (aumenta a sensibilidade), é baseada em uma minuciosa escolha dos epítomos específicos (especificidade) sendo super-expresso por *E. coli* (melhor custo-benefício na produção do antígeno) (ANANDARAO *et al.*, 2006).

Atualmente, não existe uma vacina licenciada para o uso humano, apesar da intensa pesquisa nesse campo nos últimos 30 anos (SILVEIRA, 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). O desenvolvimento de vacina para dengue é difícil porque os quatro diferentes tipos virais podem causar doença, e com isso, a proteção contra apenas um ou dois tipos virais da dengue pode, na realidade, incrementar o risco de formas mais graves (WHO, 2002).

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; DEEN, 2002).

Para esse objetivo, uma série de técnicas vêm sendo estudadas, incluindo vacinas com vírus atenuados e vírus recombinantes, vacinas de subunidades recombinantes, e vacinas de

DNA (WHO, 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).

Enquanto não há um avanço significativo na produção de vacinas efetivas contra o vírus da dengue, a melhor estratégia é conscientizar a população para um combate à proliferação dos mosquitos.

1.7. 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* 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).

Bacteriófagos, ou simplesmente fagos, são vírus que infectam uma variedade de bactérias Gram-negativas usando *pili* como receptores. Partículas de fagos filamentosos (Ff-cepas M13, f1 e fd) que infectam *E. coli* via F *pili*, consiste em uma fita simples de DNA que é envolvida em uma cápsula protéica (AZZAZY; HIGHSMITH, 2002).

A partícula viral do fago 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 pIII e pVI, sendo a primeira codificada pelo gene 3. 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 *pili* sexual (BRÍGIDO; MARANHÃO, 2002).

Um fago viável expressa 3 a 5 cópias do gene III (g-3) que codifica a proteína de adsorção pIII composta de 406 aminoácidos, a qual é uma das menores proteínas capsidiais de fago filamentoso, na sua ponta/extremidade (AZZAZY; HIGHSMITH, 2002).

Phage display é baseado em clonagem de fragmentos de DNA codificante de milhares de variantes de certos ligantes (ex: peptídeos, proteínas ou fragmentos destas) no interior do genoma de fagos, fusionado ao gene codificante de uma das proteínas do capsídeo deste fago (geralmente pIII, mas podendo ser pIV, pVI ou pVIII). A respeito de expressão, a fusão com a proteína do capsídeo é incorporada à novas partículas de fago que são montadas no espaço periplasmático da bactéria. Expressão do produto do gene fusionado e sua subsequente incorporação à proteína capsidial já madura resulta na exposição do ligante na superfície do fago, enquanto seu material genético reside no interior do mesmo (Figura 5) (BENHAR, 2001).

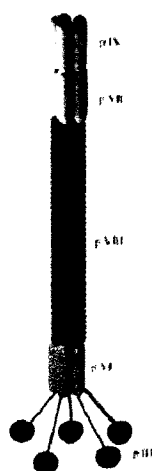


Figura 5. Estrutura de um bacteriófago M13. PIII, PVI, PVII, PVIII e PXIX representam as proteínas dos fagos. Peptídeos exógenos são expressos normalmente através da PIII ou PVIII (ARAP, 2005).

O peptídeo ou proteína expressa 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; 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).

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; SHIUAN, 2003).

Phage display já é parte de uma moderna forma de descoberta de novas drogas (KRETZSCHMAR; VON RUDEN, 2002).

Esse trabalho teve como objetivo isolar peptídeos imunorreativos de bibliotecas de peptídeos recombinantes por *Phage Display* contra anticorpos monoclonais dos tipos virais DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 para a identificação e caracterização de prováveis epítomos funcionais das proteínas virais que pudessem ser utilizados no desenvolvimento de novas vacinas ou testes diagnósticos para o controle da doença. Além disso, o trabalho visou 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.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. *Biopanning* – Seleção de peptídeos

Para o desenvolvimento deste estudo foram utilizados anticorpos monoclonais contra os subtipos virais *DENV- 1, - 2, - 3 e - 4*, obtidos através da *USBiological (USA)*, com o objetivo de isolar peptídeos miméticos de proteínas dos quatro subtipos virais da dengue.

Para a seleção dos peptídeos reativos com os anticorpos citados acima utilizou-se uma biblioteca comercial de 12 peptídeos randômicos fusionados na proteína pIII do fago M13, seguindo as instruções do fabricante (*Ph.D-12, Phage Display Peptide Library Kit – New England Biolabs*).

Para a realização da técnica, foi utilizada uma placa de microtitulação (*Maxisorp-NUNC*) com um total de 96 poços. Apenas quatro foram primariamente sensibilizados, cada um com seu respectivo anticorpo (*DENV-1, -2, -3, -4*), para uma concentração final de 100 µg/mL diluídos no tampão Bicarbonato (NaHCO₃ 0,1 M, pH 8,6). A placa permaneceu incubada, *overnight* a 4°C, em um recipiente umedecido sob agitação constante e suave.

O restante da solução não adsorvida na placa foi descartado batendo-a com a face da placa voltada para baixo em papel absorvente. Em seguida, a placa foi bloqueada com 250 μL de tampão de bloqueio (NaHCO_3 0.1 M pH 8,6; 5 mg/mL BSA; NaN_3 - 0,02%) por 1h sob agitação a 4°C. Logo após, a solução bloqueio foi descartada e a placa foi lavada seis vezes com 150 μL de TBST 0,1% (TBS - Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, água; 0,1% volume/volume de Tween 20).

Foram acrescentados a cada um dos quatro poços da placa anteriormente citados, 10 μL da biblioteca original de peptídeos (4×10^{10} partículas virais) diluídas em 100 μL de TBST 0,1% e, posteriormente, manteve-se a placa sob agitação por 1 h à temperatura ambiente. Os fagos não ligantes foram descartados através da lavagem da placa por dez vezes utilizando TBST 0,1%.

Os fagos ligantes foram eluídos por 10 min à temperatura ambiente com 100 μL do tampão de eluição (glicina-HCl 0,2 M, pH 2,2, contendo 1 mg/mL BSA) que por ter uma propriedade ácida provoca o desprendimento dos fagos reativos contra os anticorpos. A solução obtida teve seu pH ácido neutralizado com 15 μL do tampão Tris-HCl 1 M, pH 8,0. Aproximadamente 95 μL do eluato não-amplificado foi utilizado no processo de amplificação e o restante (~10 μL) foi usado na titulação. Todo esse procedimento é caracterizado como o primeiro ciclo de seleção.

O número de entrada e saída das partículas virais durante os ciclos do *biopanning* foi determinado pela titulação.

A solução de fagos a ser titulada foi submetida a diluições seriais de 10 vezes em meio LB. Para eluatos não amplificados foram utilizadas as diluições de 10^{-1} até 10^{-4} ; no caso de soluções com fagos amplificados a faixa de diluição utilizada foi de 10^{-8} a 10^{-11} . Cada diluição foi acrescida de 200 μL da cultura de *Escherichia coli* ER2738 na fase *mid-log* (OD_{600} ~0,5). Esta mistura foi agitada brevemente e incubada por 5 minutos a temperatura ambiente. As bactérias, agora infectadas, foram transferidas para tubos de cultura contendo 3mL de Agarose Top (0,06g LB; 0,003g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,021g Agarose) a 55°C e em seguida, espalhadas sobre uma placa de Petri contendo meio LB sólido, com IPTG 0,5mM e X-Gal 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e tetraciclina (20mg/ml em Álcool Etilico). Para cada diluição foi confeccionada uma placa.

Após incubação *overnight* em estufa à 37°C, foram visualizadas colônias de colorações azuis demonstrando que houve a quebra do substrato X-Gal pela expressão do gene da β -galactosidase dos fagos que infectaram as bactérias ER2738. Essas colônias 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).

A amplificação do eluato não-amplificado (~95 µL) foi realizada em 20 mL de meio de cultura líquido autoclavado com tetraciclina (20mg/ml em Álcool Etílico) para cada tipo viral (LB-10g de Bacto-Triptona, 5g de extrato de levedura, 5g de NaCl- 2,0g para 100mL de água MiliQ), juntamente com *E. coli* (ER2738) em fase inicial de crescimento ($OD_{600} \leq 0,3$). Cada cultura foi incubada por um período de 4-5 horas em agitador a 37°C.

Cada cultura foi transferida para um tubo Oakridge (Hitachi, 50 mL) e centrifugada (10 min, 10.000 rpm a 4°C). Os sobrenadantes contendo fagos foram transferidos para outros tubos limpos e re-centrifugados (10 min, 10.000 rpm a 4°C). Em seguida, foram pipetados 80% dos sobrenadantes para outros tubos esterilizados onde foram adicionados 1/6 do volume de PEG/NaCl (20% peso/volume de Polietileno glicol-800, NaCl 2,5M, água) e a solução permaneceu incubada overnight a 4°C para que houvesse a precipitação dos fagos.

No dia seguinte, os tubos foram centrifugados (15 minutos, 10000 rpm, 4°C), sendo o sobrenadante descartado e o tubo, novamente centrifugado, a fim de retirar qualquer impureza com o auxílio da pipeta.

Os precipitados foram ressuspensos em 1 mL de TBS e transferidos para microtubos (2ml) para que fossem centrifugados por mais cinco minutos (10.000 rpm à 4°C) com a finalidade de precipitar possíveis impurezas.

Os sobrenadantes foram novamente transferidos para microtubos limpos, para a adição de 1/6 do volume total de PEG-NaCl e incubados no gelo por 1 hora para, posteriormente, serem centrifugados (10 min, 14.000 rpm, 4°C). Os sobrenadantes foram descartados e depois houve uma breve recentrifugação para que os sobrenadantes residuais fossem removidos com a pipeta.

Os precipitados foram ressuspensos em 200 µL de TBS, e depois recentrifugados por um minuto, 14000 rpm, a 4°C e em seguida, transferidos para tubos novos e armazenados também a 4°C, obtendo-se, então, o eluato amplificado, que subseqüentemente foi titulado, assim como o eluato não-amplificado.

Esses eluatos amplificados foram utilizados no segundo ciclo de seleção, substituindo, dessa maneira, a biblioteca original de fagos de modo que a cada ciclo a especificidade dos fagos contra os anticorpos testados fosse aumentada. É importante destacar que houve um aumento da concentração de Tween (elevada estrigência), durante os processos de lavagem, de 0,1% para 0,5%, a partir do segundo ciclo do *biopanning*.

Foram realizados três ciclos de seleção, no qual o título de entrada para cada ciclo foi mantido constante com o número de partículas virais de 1×10^{11} ufc, variando-se o volume de acordo com a concentração do eluato amplificado do ciclo anterior, obtida nas titulações. Assim, ao final de cada ciclo, obteve-se eluatos não-amplificados e eluatos amplificados, sendo os últimos utilizados no ciclo de seleção subsequente (Figura 6).

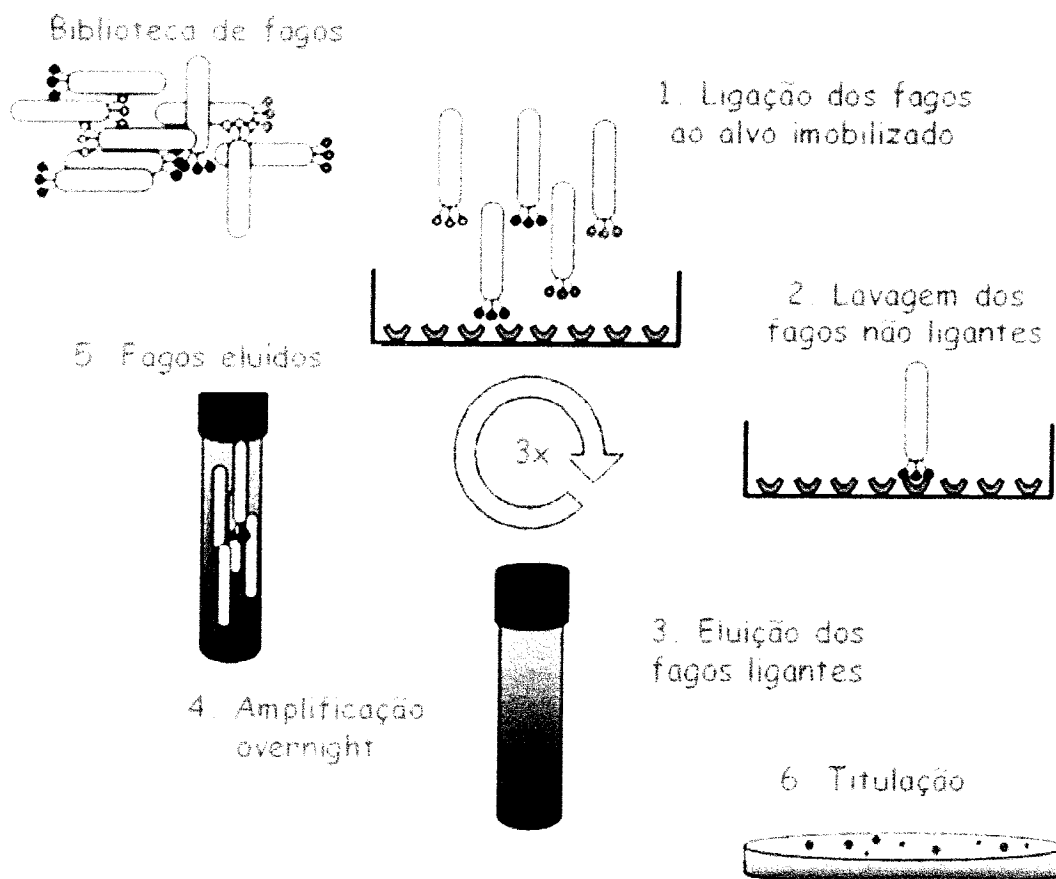


Figura 6. Representação do *biopanning* em placa. Em cada ciclo, os fagos reativos com o alvo são selecionados por lavagens sucessivas, sendo os demais descartados (IAT, 2005).

2.2. Amplificação para extração de DNA

As colônias que apresentaram coloração azul durante as titulações foram escolhidas ao acaso, procurando manter as de formatos homogêneos e bem isoladas. Essas colônias foram reamplificadas separadamente em uma placa *Deepwell* para um armazenamento dos clones selecionados e uma posterior extração de DNA dos mesmos.

Cada colônia azul obtida no 3º ciclo não-amplificado foi retirada e transferida para um *Deepwell* contendo 1 mL de meio de cultura com *E. coli* (ER2738) em fase de crescimento

inicial. A placa *Deepwell* foi vedada com um adesivo próprio e incubada por 5 horas no shaker a 37°C. Retirou-se 100µl de cada poço transferindo para uma placa de microtitulação *Corning Incorporated Costar*[®] 3591, como um *backup*, colocando-se 100 µl de glicerol (50%) estéril em cada poço. O *backup* foi armazenado numa temperatura de -20°C. A placa *Deepwell* permaneceu incubada sob agitação, overnight, nas mesmas condições anteriores.

2.3. Extração de DNA

No dia seguinte, a placa *Deepwell* foi centrifugada por 40 min a 3.700 rpm para a retirada do sobrenadante da cultura que, posteriormente, foi transferido para uma outra placa *Deepwell* estéril. Em seguida, foi adicionado 350 µL de PEG/NaCl (20% de polietileno glicol-8000, NaCl 2,5 M) a cada poço e incubou-se por 1 hora, a 4°C. Logo após, a placa foi centrifugada por 40 min a 3700 rpm a 4°C descartando-se o sobrenadante. Foi adicionado ao precipitado 100 µL de Tampão Iodeto (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 4 M) para cada poço. A placa ficou sob agitação no Vortex durante 5 minutos, e subsequente, foi acrescentado 250 µl / poço de etanol absoluto (100%), incubando a placa por 10-20 minutos à temperatura ambiente. A placa foi novamente centrifugada por 40 minutos a 3700 rpm a 4°C descartando o sobrenadante. Em seguida, lavou-se o precipitado com 500 µl de etanol 70%, centrifugando mais uma vez por 20 minutos a 3700 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspenso em 20 µl de água MiliQ.

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

2.4. Sequenciamento de DNA

O sequenciamento foi realizado utilizando o Kit *ET Dye Terminator* (*GE Healthcare*) 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'-HOCCCTCATAGTTAGCGTAACG-3' - *Amersham Biosciences*), que amplifica a região dos aminoácidos codificantes dos peptídeos randômicos fusionados nos fagos M13 recombinantes.

A reação de amplificação foi feita em termociclador (*Mastecycler*), e a precipitação do material amplificado realizou-se por meio do acréscimo de Acetato de Amônio (4M) e Etanol absoluto, seguido de centrifugação por 45 minutos a 14000 rpm em centrífuga refrigerada, lavagem com etanol 70% e centrifugação por 10 minutos nas mesmas condições anteriores. A diluição foi feita com tampão de corrida apropriado (“Loading buffer”).

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 36 resíduos perfeitos foram então traduzidas.

2.5. Análise dos dados por bioinformática

Foi utilizado o programa DNA2PRO para a tradução das seqüências de aminoácidos de insertos de bibliotecas tanto da *New England Biolabs (Ph.D.-12^{HM})* quanto de outras bibliotecas de interesse que contiverem as seqüências inicial e final do vetor. O programa automaticamente localiza a posição do inserto, traduz o mesmo e indica qualquer erro possível na seqüência do inserto (tais como códons inesperados ou erros na seqüência próxima) (<https://relic.bio.anl.gov/dna2pro.aspx>).

A análise de quais regiões do genoma do vírus da dengue nos quais os peptídeos encontrados se alinham e quais as porcentagens de homologia entre estas regiões foi realizada através do servidor Immuneepitope (http://tools.immuneepitope.org/tools/conservancy/iedb_input).

As propriedades bioquímicas dos peptídeos selecionados, tais como: Índice de Antigenicidade, Probabilidade de Exposição e Hidrofilicidade de cada peptídeo, foram obtidos pelo programa DNASTAR 4.0 – *Lasergene*, subprograma PROTEAN.

Foi feito um múltiplo alinhamento entre os peptídeos dos diferentes tipos virais, buscando prováveis motivos comuns entre os mesmos, pelo programa CLUSTAL W (18.1) (<http://services.bioasp.nl/blast/cgi-bin/clustal.cg>).

As seqüências dos genomas dos quatro subtipos virais, utilizados para os alinhamentos no servidor Immuneepitope, foram obtidas pelo servidor NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

2.6. Amplificação para testes ELISA

Uma colônia de *E. coli* (ER2738) foi inoculada em 20ml de meio de cultura LB e posteriormente incubada sob agitação a 37°C, overnight.

Em um meio LB de 100ml autoclavado e com tetraciclina (20mg/ml em Álcool Etilico) diluiu-se 1.000µl da cultura de *E. coli* acima citada. Em cada poço (um para cada clone) da *Deepwell* dispensou-se 1ml da cultura diluída. Os clones que obtiveram seqüências válidas depois de analisados e traduzidos foram reamplificados, adicionando-se 10 µl dos clones do seu respectivo *backup* à esta placa *Deepwell* que foi incubada por 24 horas sob agitação a 37°C.

Centrifugou-se a *Deepwell* por 40 minutos a 3700 rpm transferindo, logo após, seu conteúdo para uma outra *Deepwell* estéril. Adicionou-se então, 1/6 do volume em PEG/NaCl incubando-a por mais 12-16 horas a 4°C. Centrifugou-se por 40 min a 3700 rpm. Verteu-se a *Deepwell* dispensando todo sobrenadante secando sobre papel-toalha (trocado a todo o momento para evitar contaminação) e ressuspendeu-se o precipitado em 200µl de PBS 1X.

2.7. Quantificação dos clones pelo espectrofotômetro

Os clones amplificados e purificados foram quantificados através da leitura da densidade ótica (OD) por meio do Espectrofotômetro, analisando a absorbância à 269nm (identifica a cápsula do fago) e a 320 nm (identifica as impurezas da amostra). Essa leitura permitiu calcular qual a concentração de cada clone a ser utilizado no ELISA, desconsiderando as impurezas das amostras. Esse cálculo favorece uma homogeneidade das amostras, permitindo que os resultados do teste ELISA sejam mais confiáveis. Considerando que: (A1= valores da leitura 269nm) e (A2= valores da leitura 320nm), a quantificação foi calculada pela equação: $(A1-A2) \times 6.10^{16} / 7222$.

2.8. ELISA (“Enzimed Linked Immunosorbent Assay”) - Screening

Realizou-se um teste ELISA para determinar a reatividade dos peptídeos recombinantes (expressos nos fagos selecionados), contra os anticorpos monoclonais sintéticos contra DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4.

A placa de microtitulação *NUNC* foi sensibilizada com 1µg/poço dos anticorpos monoclonais diluídos em tampão Bicarbonato 0,06M pH 9,6 (1,0M NaHCO₃ e 1,0M Na₂CO₃ anidro), foi vedada com adesivo e incubada por 12-16 horas a 4°C.

A placa foi lavada três vezes com PBST 0,05%, e logo após adicionou-se 250µl de Solução de Bloqueio (PBST 0,1% -BSA 3%) incubando-a por 1 hora a temperatura ambiente. A placa foi novamente lavada três vezes com PBST 0,05%.

Adicionou-se então, 50 µL de solução contendo os fagos diluídos em Solução de Bloqueio, em uma concentração de $1,0 \times 10^{10}$, de acordo com os valores calculados pelas absorbâncias obtidos pela leitura no Espectrofotômetro. A placa foi incubada por 1 hora a 37°C.

Lavou-se a placa por cinco vezes com PBST 0,05%. Para a detecção da reatividade, utilizou-se em uma concentração de 1:10.000, o anticorpo conjugado anti-M13 marcado com peroxidase (*Monoclonal Antibody da Amersham Biosciences*) diluído em Solução de Bloqueio, sendo a placa incubada por 1 hora a 37°C.

A placa foi lavada por mais cinco vezes com PBST 0,05% e então a reação foi revelada com 100µL/poço de uma solução contendo OPD (O- Phenylenediamine dihydrochloride – *Sigma Chemical*). A reação foi interrompida pela adição de 10 µL de H₂SO₄ 4M. A leitura da absorbância foi feita em leitor Multiscan Plus versão 2.03, com filtro 492nm.

O *cut-off* foi calculado pela média do controle negativo (fago selvagem) mais 2 vezes o desvio padrão do controle negativo. O Índice ELISA (I.E.) foi calculado pela divisão da média das leituras das densidades óticas (DO) das duplicatas das amostras pelo valor do *cut-off* (fórmulas abaixo). Os clones selecionados foram aqueles que apresentaram I.E >1.

$$I.E. = \text{média D.O amostra} / \text{cut off}$$

$$\text{Cut-off} = \text{média das D.O dos fagos selvagens} + 2 \times \text{DESVPAD}$$

2.9. ELISA (“Enzimed Linked Immunosorbent Assay”) - Pré-validação

Os clones selecionados positivamente pelo ELISA anterior foram submetidos a um novo teste a título de pré-validar os mesmos diante do soro positivo para o subtipo DENV-3.

A sensibilização foi feita em uma placa de microtitulação *NUNC* com um volume final de 100µl/poço dos clones diluídos em tampão Carbonato/Bicarbonato 0,06M pH 9,6 (1,0M Na HCO₃ e 1,0M Na₂CO₃ anidro), em uma concentração final de 1,0 x 10¹⁰ fagos/poço, sendo a placa incubada por 2 horas a 37°C.

A placa foi lavada por duas vezes com PBST 0,1%, e adicionou-se 300µl de Solução de Bloqueio (PBST 0,1% - Molico 5%) incubando-a por 1 hora a 37°C.

A placa foi lavada seis vezes com PBST 0,1%, adicionando-se então anticorpos primários presentes nos soros de paciente infectado e não-infectado pelo vírus da dengue (DENV-3), em uma diluição de 1:1000 em Solução de Bloqueio (PBST 0,1% - Molico 5%), em um volume de 100µL/poço. A placa ficou incubada por 1 hora a 37°C.

Lavou-se a placa por três vezes com PBST 0,1%. Para a detecção da reatividade, utilizou-se em uma concentração de 1:5.000, o anticorpo conjugado anti-M13 marcado com peroxidase- *Monoclonal Antibody da Amersham Biosciences* diluído em Solução de Bloqueio, sendo incubada a placa por 1 hora a 37°C.

A placa foi lavada por mais cinco vezes com PBST 0,1% e então foi revelada com 100µL/poço de uma solução contendo OPD (O- Phenylenediamine dihydrochloride – *Sigma Chemical*). A reação foi interrompida pela adição de 10 µL de H₂SO₄ 4M. A leitura da absorbância foi feita em leitor Multiscan Plus versão 2.03, com filtro 492nm.

O *cut-off* foi calculado pela média do controle negativo (fago selvagem) mais 3 vezes o desvio padrão do controle negativo. O I.E. foi calculado pela divisão da média das leituras das densidades óticas (DO) das duplicatas das amostras pelo valor do *cut-off* (fórmulas abaixo). Os clones selecionados foram aqueles que apresentaram I.E >1.

$$\text{I.E.} = \text{média D.O amostra} / \text{cut off}$$

$$\text{Cut-off} = \text{média das D.O dos fagos selvagens} + 2 \times \text{desvpad}$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. *Biopanning* – Seleção de peptídeos

Os eluatos (não-amplificado e amplificado) obtidos a partir da seleção contra os mAbs (DENV-1, 2, 3 e 4) foram titulados durante os três ciclos. As colônias que apresentaram coloração azulada são consideradas positivas, demonstrando a quebra do substrato X-Gal, e a expressão do gene da β -galactosidase dos fagos pelas bactérias ER2738 (Figura 7) (Barbas, 2001).

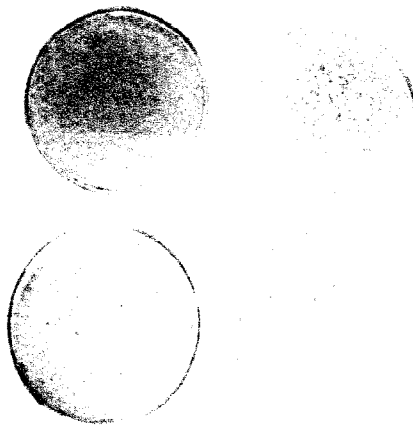


Figura 7. Exemplos de placas de titulações de ciclos de seleção dos eluatos (*biopanning*). As colônias azuis mostram bactérias *E.Coli* (ER2738) infectadas por fagos M13 carregando o gene *lacZ* da β -galactosidase

O rendimento das placas foi determinado pela contagem daquelas que apresentavam aproximadamente 100 colônias. Com isso, foi calculada a quantidade de eluato a ser utilizado nas etapas subsequentes de seleção. Os valores apresentados em cada titulação demonstram o enriquecimento de fagos específicos que ficaram retidos nas placas, durante os processos de seleção (Tabelas 1, 2, 3 e 4).

Neste experimento, observando os valores obtidos nos ciclos não-amplificados, pôde-se perceber o enriquecimento de clones a favor do alvo durante os três ciclos de seleção. O enriquecimento já esperado se deve ao fato de que, a cada ciclo, clones cada vez mais específicos foram sendo retidos para subsequente eluição e amplificados para o ciclo seguinte.

Tabela 1. Resultados das titulações de cada *Biopanning* para o anticorpo Dengue 1; pfu – unidades formadoras de colônias

	ETAPAS	RESULTADO
1° Ciclo	Eluato não-amplificado	$1,4 \times 10^4$ pfu
	Eluato amplificado	$1,7 \times 10^{10}$ pfu
2° Ciclo	Eluato não-amplificado	$2,0 \times 10^4$ pfu
	Eluato amplificado	$7,0 \times 10^{10}$ pfu
3° Ciclo	Eluato não-amplificado	$1,4 \times 10^8$ pfu

Tabela 2. Resultados das titulações de cada *Biopanning* para o anticorpo Dengue 2; pfu – unidades formadoras de colônias

	ETAPAS	RESULTADO
1° Ciclo	Eluato não-amplificado	$3,1 \times 10^3$ pfu
	Eluato amplificado	$2,5 \times 10^{11}$ pfu
2° Ciclo	Eluato não-amplificado	$6,3 \times 10^5$ pfu
	Eluato amplificado	$3,2 \times 10^{10}$ pfu
3° Ciclo	Eluato não-amplificado	$3,3 \times 10^8$ pfu

Tabela 3. Resultados das titulações de cada *Biopanning* para o anticorpo Dengue 3; pfu – unidades formadoras de colônias

	ETAPAS	RESULTADO
1° Ciclo	Eluato não-amplificado	$2,2 \times 10^4$ pfu
	Eluato amplificado	$1,5 \times 10^{11}$ pfu
2° Ciclo	Eluato não-amplificado	$1,5 \times 10^4$ pfu
	Eluato amplificado	$1,1 \times 10^{11}$ pfu
3° Ciclo	Eluato não-amplificado	$2,3 \times 10^7$ pfu

Tabela 4. Resultados das titulações de cada *Biopanning* para o anticorpo Dengue 4; pfu – unidades formadoras de colônias .

	ETAPAS	RESULTADO
1° Ciclo	Eluato não-amplificado	$4,3 \times 10^3$ pfu
	Eluato amplificado	$1,8 \times 10^{10}$ pfu
2° Ciclo	Eluato não-amplificado	$4,7 \times 10^3$ pfu
	Eluato amplificado	$5,9 \times 10^{11}$ pfu
3° Ciclo	Eluato não-amplificado	$2,3 \times 10^5$ pfu

3.2. Amplificação para extração de DNA

O crescimento de clones em placas *Deepwell* revelou-se eficiente na obtenção de quantidades suficientes de fagos a serem utilizados tanto para a realização dos testes ELISA quanto para purificação dos mesmos para obtenção de material genético suficiente e de qualidade para o sequenciamento.

A qualidade do DNA foi observada por meio da análise eletroforética (Figura 8). Nota-se que o processo de extração foi eficiente, pois verificou-se bandas no gel com peso molecular característico da molécula de DNA além de não demonstrar nenhum tipo de degradação ou contaminantes, tais como RNA bacteriano. A quantidade de DNA obtida foi estimada por meio da comparação com o DNA padrão fornecido pelo kit de sequenciamento *DYEnamic™ ET Dye terminator kit* (MegaBACE™) (200ng/μL).

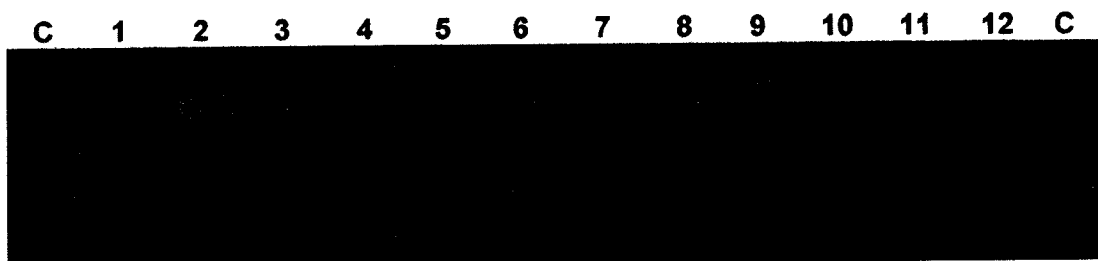


Figura 8. Perfil eletroforético das amostras de DNA extraídas dos clones obtidos no processo de seleção. C - marcador de peso molecular de 200ng de DNA controle com 7249 pb.

3.3. Sequenciamento de DNA

As seqüências de DNA geradas foram visualizadas pelo programa *Sequence Analyser* (*MegaBace, Amersham Biosciences*), para análise de sua qualidade.

A tradução foi feita pelo programa DNA2PRO (RELIC Softwares) que gerou 68 seqüências íntegras, sendo 32 distintas entre si (Tabela 5).

Dentre as 32 seqüências distintas, onze correspondem à clones selecionados contra DENV-1, dois contra DENV-2, doze contra DENV-3 e sete contra DENV-4. As seqüências foram representadas pelo número de identificação de cada clone seqüenciado.

Tabela 5. Identificação de cada clone selecionado e suas respectivas frequências, no total de 97 peptídeos traduzidos.

Tipo Viral	Seq ID	Peptídeos	Frequência	Porcentagem
DENV-1	1	NAHSNHVFSWKR	1/12	8.3%
	2	YDPKFHHYTWKS	2/12	16.6%
	3	MQGPRHNYTWKT	1/12	8.3%
	4	QHSYTWKALPTT	1/12	8.3%
	5	SPHSNPNLWKL	1/12	8.3%
	6	LTHSRLHTYTWK	1/12	8.3%
	7	LPSLHTSRLLSL	1/12	8.3%
	8	SSLHAYTWKHTF	1/12	8.3%
	9	TMNMPAKIFAAM	1/12	8.3%
	10	THVYSWKTPTNL	1/12	8.3%
	11	EHLKHTYTWRSS	1/12	8.3%
DENV-2	12	HFHYPKKAGLPP	1/20	5.0%
	13	KQPLFASELSLW	19/20	95.0%
DENV-3	14	ERAVPIPIETRR	1/25	4.0%
	15	SKPSSLYALHAR	1/25	4.0%
	16	WHRTTWLYGQPT	1/25	4.0%
	17	ANTSSLWPLQMR	6/25	24.0%
	18	VYAHYTPQKRGP	8/25	32.0%
	19	SPLRPPHILSLV	2/25	8.0%
	20	LQSSNRYLDSLL	1/25	4.0%
	21	SPLKPPHLSSQV	1/25	4.0%
	22	YSNSELVARIKH	1/25	4.0%
	23	TAGQALHFPLHE	1/25	4.0%
	24	AQESSLYTLQAR	1/25	4.0%
25	ANTSSVWPLQMR	1/25	4.0%	
DENV-4	26	SQSCQSCYFGPV	1/11	9.0%
	27	FHWWPYVSGPPT	2/11	18.1%
	28	DIPSIASRLPPK	2/11	18.1%
	29	WEILPWTKYNNP	3/11	27.2%
	30	VSFKPMALDFKF	1/11	9.0%
	31	SPSCQSCYFGPV	1/11	9.0%
	32	WHWRDVWSAPP	1/11	9.0%

Como pode ser observado pela Tabela 5, foi obtida uma grande variedade de peptídeos distintos, selecionados a partir dos anticorpos monoclonais contra os subtipos virais da dengue.

Os peptídeos reativos à DENV-1 apresentaram uma grande diversidade e baixa repetibilidade entre os mesmos. Já em relação aos peptídeos selecionados contra DENV-2, o peptídeo 13 (KQPLFASELSLW) apresentou uma frequência de 95% em relação ao total de 20 peptídeos obtidos. Os clones com maior frequência em relação ao DENV-3 foram os peptídeos 17 (ANTSSLWPLQMR) e 18 (VYAHYTPQKRGP), apresentando uma frequência de 24% e 32%, respectivamente mediante o total de 25 clones obtidos. Já o clone que

apresentou maior frequência para os peptídeos selecionados pelo DENV-4 foi o peptídeo 27, com uma frequência equivalente a 27,2% em um total de 11 clones.

3.4. ELISA (“Enzimed Linked Immunosorbent Assay”) -Screening

O teste imunoenzimático (ELISA) realizado a fim de confirmar a reatividade dos clones seqüenciados com os respectivos anticorpos teve como controle negativo fagos selvagens, estabelecendo um cut-off referente à 0,149 e I.E >1.

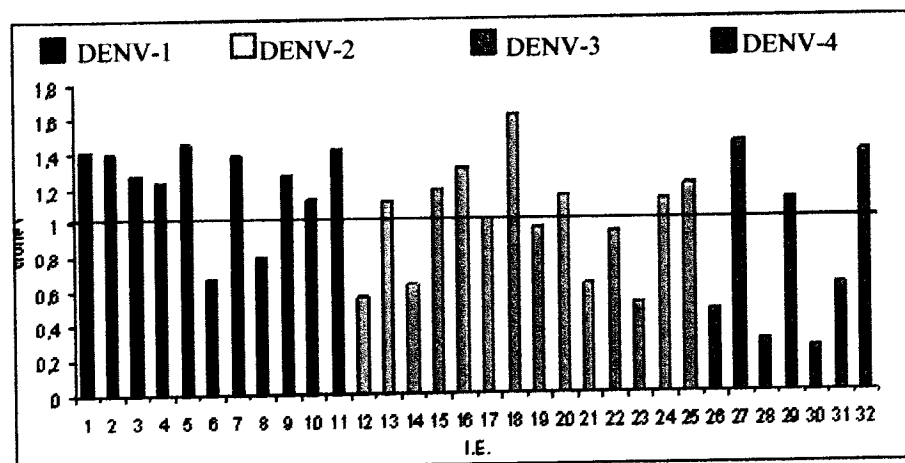


Figura 9: Teste ELISA apresentando a reatividade de todos os clones seqüenciados com os respectivos anticorpos

Os resultados de ELISA foram bastante satisfatórios no que diz respeito ao processo de seleção de fagos reativos aos anticorpos monoclonais dos subtipos virais da dengue (Figura 9), na medida em que quase a totalidade dos fagos selecionados (I.E >1), apresentaram seqüências que se relacionavam com proteínas dos seus respectivos subtipos virais, sendo 81,8% para clones contra DENV-1, 50% contra DENV-2, 58,3% contra DENV-3 e 42,8% contra DENV-4.

3.5. Análise dos dados de bioinformática

A Tabela 6, gerada pelo programa ClustalW 18.1, mostra o alinhamento dos clones selecionados para cada subtipo viral, permitindo notar a presença de seqüências de aminoácidos comuns (seqüências consenso).

Tabela 6. Alinhamento dos peptídeos selecionados pelo programa ClustalW 18.1.

Anticorpos	Alinhamento	I.E	
Dengue 1	seq6	LTHSRLH TYTWK	0,67
	seq11	EHLK HTY TWRSS	1,42
	seq2	YDPK FHY TWKS	1,39
	seq8	SSLHAY TKHTF	0,8
	seq4	QH SYTWK ALPTT	1,23
	seq3	MQGPRH NYTWKT	1,27
	seq10	TH Y SWKTPNTL	1,14
	seq7	LPSL HTS RLLSP	1,38
	seq1	NAHSN HV SWKR	1,41
	seq5	SHSN P NSWKL	1,45
seq9	TMNMPAKIFAAM	1,27	
Dengue 2	seq12	HFHY PK AGLPP	0,56
	seq13	KQPLFA SE LSLW	1,12
Dengue 3	seq17	ANTSS LW PLOMR	1,01
	seq25	ANTSS VW PLOMR	1,21
	seq15	SK ESS LYALHAR	1,19
	seq24	A Q ESSLYTLQAR	1,13
	seq20	L Q SSNRYLDSLL	1,15
	seq16	WHRTTWLY Q PT	1,31
	seq18 (inv)	PGRK Q PTYHAYV	1,62
Dengue 4	seq29 (inv)	PNNYK W ELIEW	1,13
	seq27	BH W W F YV S CP P T	1,45
	seq32	WHWRD V W S A P P	1,39

Nota-se a presença dos motivos protéicos **HxYTWK** e **HSNxxxSWKx** entre os clones selecionados para DENV-1, mostrado em vermelho, com identidade total ou parcial.

Comparando os múltiplos alinhamentos dos peptídeos selecionados pelo DENV-1 (Tabela 6) com a reatividade dos respectivos clones pela análise do I.E. (Figura 9), é possível perceber que os clones que apresentaram o $I.E. > 1$, compartilham motivos em comum.

A maioria dos peptídeos reativos à DENV-1 compartilham o mesmo motivo **HxYTWK**, porém, há uma diferença de reatividade entre eles. Ao analisarmos a seqüência 8, percebemos que o I.E. foi menor que 1, apesar de compartilhar o mesmo motivo **HxYTWK** com os peptídeos 2, 3 e 4, os quais possuem $I.E. > 1$. Essa diferença pode ser explicada pela presença do aminoácido apolar A (Alanina) presente no motivo da seqüência 8, que o difere dos peptídeos 2,3,4 que possuem aminoácidos polares nos motivos tais como H (Histidina), N (Asparagina), e S (Serina), respectivamente.

Apesar de compartilhar motivo comum com peptídeos de alta reatividade, o clone 6 apresentou $I.E. < 1$. Isso pode estar relacionado com aminoácidos próximos ao motivo em comum com outros clones, os quais podem estar interferindo na apresentação ou conformação deste motivo ao anticorpo.

Os peptídeos 1 e 5 possuem uma alta reatividade, apresentando um I.E. equivalente a 1,41 e 1,45, respectivamente. Ambos não compartilham uma seqüência consenso com os outros peptídeos, porém, possuem o motivo **HSNxxxSWKx** em comum, como pode ser observado na Tabela 6. É interessante notar que apesar desses dois peptídeos compartilharem o motivo comum SWK com o peptídeo 10, este apresentou um I.E. menor quando comparado com os outros citados acima, o que pode reforçar uma possível importância da presença do motivo HSN na seqüência dos peptídeos.

O peptídeo 9, apesar de apresentar uma reatividade muito alta (I.E. = 1,27), não possui uma seqüência consenso com os outros peptídeos, sendo então, um possível mimotopo, considerando que não possui homologias e nem motivos comuns.

Em relação aos dois peptídeos seqüenciados da DENV-2, não foi encontrado motivos comuns entre eles, e apenas o peptídeo 13 apresentou um I. E. >1 mostrando que ele pode conter uma seqüência relevante o que é ressaltado por sua alta freqüência na seleção para DENV-2.

Através da análise dos peptídeos reativos à DENV-3, foi possível verificar a presença de seqüências consenso entre eles.

Os peptídeos 17 e 25 compartilham o motivo **ANTSSxWPLQMR**, ambos com uma reatividade positiva, quando observado o teste ELISA.

As seqüências 15 e 24 também compartilham uma seqüência consenso, **SSLYxxxAR**, e a reatividade desses peptídeos é muito semelhante, visto que o I.E. dos mesmos são 1,19 e 1,13, respectivamente.

Um fato a se destacar é que os clones que apresentaram maior reatividade no DENV-3 foram as seqüências 16 e 18, e foi observado um motivo comum entre eles, **QPT**, motivo este, totalmente distinto dos outros peptídeos. O motivo só foi possível ser notado através da inversão da seqüência 18, como pode ser analisado na Tabela 6.

Entre os peptídeos selecionados pela DENV-4, apenas as seqüências 27, 29 e 32 apresentaram uma reatividade positiva. Os picos de reatividade foram nos clones 27 e 32, e ambos possuem um motivo comum, **xHWxxxxSxPPx**. Já o peptídeo 29, apresentou uma reatividade menor, quando comparada com os dois outros, porém apresentou um motivo comum com o peptídeo 27, através de sua inversão, obtendo o motivo **WP**. Com isso, sabe-se que a seqüência consenso que prevalece na reatividade desses clones é o **xHWxxxxSxPPx**.

Na Tabela 7 são apontados diversos parâmetros apresentados pelo fabricante para cada tipo de biblioteca de fagos que indicam o sucesso de seleção de cada peptídeo. São apresentados os seguintes parâmetros: seqüências de aminoácidos obtidas, freqüência dos

peptídeos selecionados (FO), frequência esperada desses peptídeos na biblioteca original (FE), amplificação dos peptídeos decorrentes do processo de seleção em relação à frequência esperada dos peptídeos da biblioteca original (FO/FE), grau de informação de cada peptídeo ($I(m)$) e número provável de clones independentes dentro da biblioteca (λ). Estes parâmetros são obtidos mediante cálculos a partir das frequências dos aminoácidos para cada posição no clone, a frequência esperada é calculada pela multiplicação das frequências de todos os aminoácidos observados. Todos os outros parâmetros são fórmulas que se originam desta FE, conforme apresentadas por RODI; SOARES; MAKOWSKI, 2002. Ao analisar a tabela, deve-se relacionar todos os dados de cada peptídeo selecionado, assim um peptídeo que apresenta um baixo valor de FE e λ , e alto valor para $I(m)$ e FO/FE possui uma baixa probabilidade de ser selecionado, a menos que a seleção seja de fato específica. Por isso, observando, por exemplo, os clones 2 e 7 do DENV-1, foi visto que eles possuem os maiores valores para $I(m)$ e FO/FE, e os menores para FE e λ e, mesmo assim foram selecionados durante o *biopanning*, apresentando ainda uma alta reatividade ao mAb DENV-1 durante o teste ELISA, o que comprova mais uma vez a eficiência da seleção.

Já o clone 13, selecionado pelo DENV-2, evidenciou uma seleção efetiva com baixos valores para FE e λ . Apesar de não ser o clone que mais se destacou nesses requisitos, apresentou a maior frequência observada (95%) assim como um I.E. >1.

Analisando-se os clones selecionados para DENV-3, o peptídeo 18 foi o que apresentou uma seleção mais eficaz baseado nos parâmetros da Tabela 7, o que é reforçado pela sua alta reatividade observada no teste ELISA contra seu respectivo Mab. É interessante notar que este clone compartilha o motivo **QPT** com o clone 16 que teve a segunda melhor seleção quando comparando com os outros peptídeos de DENV-3. Por isso, o motivo **QPT** pode estar relacionado com a especificidade da seleção desses clones.

Em relação ao DENV-4, o clone 29 foi o que mais se destacou em relação à eficiência de sua seleção, o que justifica sua maior frequência observada em relação aos outros clones.

Tabela 7. Sequências de aminoácidos dos clones selecionados, frequência observada, frequência esperada, amplificação dos peptídeos e grau de informação.

Subtipo Viral	Clone	Peptídeo	Frequência Observada (FO)	Frequência Randômica * (FE)	Amplificação ** (FO/FE)	I(m)***	λ ****	
DENV-1	1	NAHSNHVFSWKR	1/12	$4,01 \times 10^{-15}$	$4,8 \times 10^{12}$	33,2	$8,0 \times 10^{-6}$	
	2	YDPKFHHYTWKS	2/12	$6,51 \times 10^{-17}$	$3,0 \times 10^{14}$	37,3	$1,3 \times 10^{-7}$	
	3	MQGPRHNYTWKT	1/12	$1,13 \times 10^{-13}$	$1,7 \times 10^{11}$	29,8	$2,2 \times 10^{-4}$	
	4	QHSYTWKALPTT	1/12	$1,13 \times 10^{-11}$	$1,7 \times 10^9$	25,2	$2,2 \times 10^{-2}$	
	5	SPHSNPNLWSWKL	1/12	$2,74 \times 10^{-15}$	$7,1 \times 10^{13}$	33,5	$5,4 \times 10^{-6}$	
	7	LPSLHTRSRLSP	1/12	$7,14 \times 10^{-18}$	$2,7 \times 10^{15}$	39,5	$1,4 \times 10^{-8}$	
	9	TMNMPAKIFAAM	1/12	$3,78 \times 10^{-12}$	$5,1 \times 10^9$	26,3	$7,5 \times 10^{-3}$	
	10	THVYSWKTPTNL	1/12	$2,35 \times 10^{-14}$	$8,3 \times 10^{11}$	31,4	$4,7 \times 10^{-5}$	
	11	EHLKHTYTWRSS	1/12	$3,86 \times 10^{-12}$	$5,0 \times 10^9$	26,3	$7,7 \times 10^{-3}$	
	DENV-2	13	KQPLFASELSLW	19/20	$1,55 \times 10^{-15}$	$1,2 \times 10^{13}$	34,1	$3,1 \times 10^{-6}$
	DENV-3	15	SKPSSLYALHAR	1/25	$2,25 \times 10^{-16}$	$8,7 \times 10^{13}$	36,0	$4,5 \times 10^{-7}$
16		WHRTTWLYGQPT	1/25	$1,97 \times 10^{-16}$	$9,9 \times 10^{13}$	36,2	$3,9 \times 10^{-7}$	
17		ANTSSLWPLQMR	6/25	$5,99 \times 10^{-16}$	$3,2 \times 10^{13}$	35,1	$1,1 \times 10^{-6}$	
18		VYAHYTPQKRGP	8/25	$1,46 \times 10^{-16}$	$1,3 \times 10^{14}$	36,5	$2,9 \times 10^{-7}$	
20		LQSSNRYLDSLL	1/25	$3,43 \times 10^{-13}$	$5,7 \times 10^{10}$	28,7	$6,8 \times 10^{-4}$	
24		AQESSLYTLQAR	1/25	$1,0 \times 10^{-16}$	$1,9 \times 10^{10}$	27,6	$2,0 \times 10^{-3}$	
25		ANTSSVWPLQMR	1/25	$7,25 \times 10^{-16}$	$2,7 \times 10^{13}$	34,9	$1,4 \times 10^{-6}$	
DENV-4	27	FHWWPYVSGPPT	2/11	$3,1 \times 10^{-13}$	$6,3 \times 10^{10}$	28,8	$6,2 \times 10^{-4}$	
	29	WHWRDVWSAPP	3/11	$1,82 \times 10^{-16}$	$1,0 \times 10^{14}$	36,2	$3,6 \times 10^{-7}$	
	32	WEILPWTKYNNP	1/11	$5,80 \times 10^{-15}$	$3,3 \times 10^{12}$	32,8	$1,1 \times 10^{-5}$	

*Probabilidade de seqüência randômica = frequência esperada na biblioteca (FE) **Amplificação = frequência observada/frequência esperada ***I(m) = grau de informação = $-\ln$ (probabilidade de seqüência randômica) **** λ = número provável de clones independentes na biblioteca = complexidade x FE, onde complexidade da biblioteca ($2,7 \times 10^9$ - Ph.D.-12).

A Tabela 8 apresenta diversos parâmetros na indicação de prováveis alvos genômicos para a fabricação de vacinas e uso em diagnóstico, considerando apenas os peptídeos selecionados pelo teste de ELISA. Os parâmetros analisados foram: os principais motivos protéicos reconhecidas pelos peptídeos (Imunepitope e ClustalW 18.1), I.E., proteínas alvos do genoma de cada subtipo viral (BLAST e Imunepitope) e as regiões que compreendem as taxas hidrofiliçidade, antigenicidade e exposição em superfície (Protean-DNAStar) acima de 1.

Na Tabela 8, os aminoácidos representados em azul correspondem à homologias das proteínas do vírus da dengue com os peptídeos selecionados pelo teste ELISA.

As marcações identificadas com (-) abaixo de cada aminoácido representa aqueles que são comuns a todos os subtipos virais, enquanto que os aminoácidos identificados com (.) não são homólogos, mas apresentam propriedades bioquímicas semelhantes aos outros subtipos virais da dengue. Já os aminoácidos com nenhuma marcação, representam os aminoácidos com homologia somente a um subtipo viral. Estas marcações estão relacionadas ao múltiplo alinhamento dos genomas dos quatro subtipos do vírus da dengue, com a finalidade de localizar peptídeos com homologias específicas a um único subtipo (provável uso em vacinas) ou comuns aos quatro subtipos (provável uso em diagnóstico).

A Tabela 8 indica também quais entre os 12 aminoácidos apresentam taxas significativas de hidrofobicidade variando de 4,5 à -4,5, antigenicidade variando de 1,7 à -1,7 e probabilidade de exposição em superfície variando de 1 à 6 . Cada número, de 1 a 12, representa um aminoácido dos peptídeos

Os números compreendidos com (-), mostram uma seqüência contínua de aminoácidos, enquanto os números caracterizados por (/), indica intervalos na seqüência de aminoácidos.

Tabela 8. Representação de diversos parâmetros para a indicação de prováveis alvos vacinais e diagnósticos, considerando os motivos protéicos, I.E., as taxas de hidrofobicidade, antigenicidade, exposição na superfície, e as proteínas alvos reconhecidas pelos peptídeos selecionados pelo ELISA.

Seq. ID	Peptídeos	Motivos	I.E.	Hidrofobicidade	Antigenicidade	Superfície	Proteína Alvo	
Dengue 1								
1	NAHSNHVFSWKR	XAXSXXVXXWXX -----	1,41	1-2 / 7 / 11-12	1-6 / 12	1 / 11	Precursor e poliproteína DV1	
2	YDPKEHHYTWKS	XXPXXHXKXXWKS -	1,39	1-12	1-12	1-12	Poliproteína DV1	
3	MQGPRHNYTWKT	X,XXXHXKXXWXX -	1,27	1-12	1-12	1-12	Poliproteína DV1	
4	QHSYTWKALPTT	XHXKXXKXXXXXX -	1,23	1-12	1-6 / 8-10	1-6 / 8-9	Poliproteína DV1	
		QHXXXXXXXXXXXX -----		1-12	1-8	1-7 / 10 / 12	Poliproteína DV1	
		QXXXIXXAXXXX -----		1-12	1-12	1-12	Poliproteína DV1	
		XXSXIXXKXXXT -	0	1-2 / 9 / 11-12	0	Poliproteína DV1		
		XXXXIXKAXXXX -----		1-12	1-12	1-12	Poliproteína DV1	
5	SPHSNPNLSWKL	XXXSXXNXXWKL -----	1,45	1-12	2-11	3-10	Poliproteína DV1	
7	LPSLHTSRLLSP	XXXXTXRLLSP (1=2=3) -----	1,38	4	11	0	Poliproteína DV1	
9	TMNMPAKIFAAM	TXXXAKXFXXX -----	1,27	4-12	5-12	5-6 / 8-10 / 12	Precursor e poliproteína DV1	
		XXXXAKIXXAX -		1-5	2-5 / 7-10 / 12	2-4	Precursor e poliproteína DV1	
		XXMXXXXXXXXAM -		1-4	1-4	0	Precursor e poliproteína DV1	
		XXXXPAXIXAXX -----		1-4 / 7-8	1-7 / 10-12	2	Precursor e poliproteína DV1	
		(1=2=3)						
		XMXXXAXIFXXX -----	0	1-4	1	Precursor e poliproteína DV1		
		(1=3)						
		XXMFXKXIXXAX -----	1-4 / 7	2-7	2-3	Precursor e poliproteína DV1		
		(1=3)						
		XXXXXXKXFAAX -	4-9 / 11	2 / 4-9	5-6	Precursor e poliproteína DV1		
TXXXAKXXXXAX -----	1-12	1-12	1-10 / 12	Precursor e poliproteína DV1				
XXNMXXXXXXXXXX -----	1-12	1 / 4-11	5-7	Precursor e poliproteína DV1				
XXXXAKIXXXM -----	1-8	1-10	1-7	Precursor e poliproteína DV1				
XXXXPAXXXXXM -	1-11	1-10	1-7	Precursor e poliproteína DV1				
XXNMXXXXXXXXXX -----	1-4 / 6-9 / 11	7-8 / 12	4 / 12	Precursor e poliproteína DV1				
(1=2=3)								
v								
10	THVYSWKTPTNL	THVXSWXXXXXL -----	1,14	1-11	4-11	8	Poliproteína DV1	
11	EHLKHTYWRSS	XXXXTXTWXSS (1=2) -----	1,42	1-12	1-10	2-8	Precursor e poliproteína DV1	

Seq. ID	Peptídeos	Motivos	I.E.	Hidrofilicidade	Antigenicidade	Superfície	Proteína Alvo
Dengue 2							
13	KQPLFASELQW	XQXIXASEXXXX	1,12	4-6	5-11	6	Proteína hipotética DV2
Dengue 3							
15	SKPSSLYALHAR	XXPSXXXXXXXXR	1,19	1-6/ 8-12	1-7/ 9-12	1/ 10-12	Proteína hipotética DV3
		SXXSXLXXXXR		1-12	1-12	1-2/ 6-7/9-12	Proteína hipotética DV3
		XXXSXXXXXHX		1-6	1-5	1-3	Proteína hipotética DV3
		(1=3)					
		SXXXXXXAXHX		1/12	1-4/ 11-12	0	Proteína hipotética DV3
		XXXXXXXXAXAR		1-6/8-12	2-12	7/9-11	Proteína hipotética DV3
		(1=3)					
		SXXXXXXAXHX		1-12	1-11	1/ 8	Proteína hipotética DV3
16	WHRTTWLYGQPT	XXXXXXXXXXPT	1,31	6-12	6-12	6-12	Proteína hipotética DV3
		XXRPTXXXGXXX		1-2/ 4-7	1-3/ 6-10	1-3/ 5	Proteína hipotética DV3
		XXXXXXXXLXXXPT		1-5	1-5/12	1-4	Proteína hipotética DV3
		XXXXXXXXGXX		6-12	7-12	0	Proteína hipotética DV3
		XXRPTXXXGPT		1-12	2/ 5-12	4-12	Proteína hipotética DV3
		XXXXXXXXXX		1-12	1-12	1-12	Proteína hipotética DV3
		XXRPTWXXXXXXXX		1-12	1-5	1-4	Proteína hipotética DV3
		(1=3=4)					
17	ANTSSLWPLQMR	XXTXSXXFXQXX	1,01	1-12	1-12	3-7/10-12	Proteína hipotética DV3
		AXXXLXXLXXR		8-12	8-12	8-12	Proteína hipotética DV3
		AXXXSXXFXQXX		1-12	3-12	3-5/ 8-12	Proteína hipotética DV3
		ANXXLXXXXR		1/5-12	1-2/ 5-6/ 8-12	8-12	Proteína hipotética DV3
		AXTXXXXXXQXX		1-12	1-12	3-12	Proteína hipotética DV3

Seq-ID	Peptídeos	Motivos	I.E.	Hidrofilicidade	Antigenicidade	Superfície	Proteína Alvo	
20	LQSSNRYLDSLL	VXXXXXXXXRGP	1,15	6-12	3-12	10-12	Proteína hipotética DV3	
		XXXXXXXXXXPF		4-12	1-2 / 6-12	6-12	Proteína hipotética DV3	
		VXXXXXXXXXXPX		6-12	6-12	6-12	Proteína hipotética DV3	
		XXAHTXXRXX		1-8	1/4 / 6 / 9 / 10	1/3-4 / 6-7	Proteína hipotética DV3	
		XXXXXXXX.KPXX		1-12	1-12	1-12	Proteína hipotética DV3	
		(1=3=4)						
		VXXXXXXXXXXGP		1-12	2-12	4-11	Proteína hipotética DV3	
		VXXXXXXXXXX		6-12	7-12	7-12	Proteína hipotética DV3	
		XXXXXXXXXXLX		1-12	1-12	1-9	Proteína hipotética DV3	
		XXXXXXXXXXL		7	5-6 / 8 / 11-12	5-6	Proteína hipotética DV3	
24	AQESSLYTLQAR	XXXXXXXXLXXP	1,13	8-12	8-12	8-12	Proteína hipotética DV3	
		XXXXXXXXLXXP		7-12	7-12	7-12	Proteína hipotética DV3	
		XXXXXXXXLXXX		1-7	1-7	1-6	Proteína hipotética DV3	
		AXXXXXXXXXXX		2-12	1-12	4-12	Proteína hipotética DV3	
		AXXXXXXXXXP		1/5-12	1-2 / 5-6 / 8-12	8-12	Proteína hipotética DV3	
		A.XXXLXXXXR		1/7-12	11-12	9-12	Proteína hipotética DV3	
25	ANTSSVWPLQMR	XXXXXXXXXX	1,21	1-12	1-12	3-7 / 10-12	Proteína hipotética DV3	
		XXXXXXXXXX		1-12	3-12	3-5/8-12	Proteína hipotética DV3	
		AXXXXXXXXX.XP		1-12	1-12	3-12	Proteína hipotética DV3	

Dengue 4

27	FHWWPYVSGPPT	XXXXXXXXSXPP	1,45	0	11-12	12	Precursor poliproteína DV4
		XXXXXXXXXXPF		12	1-10	1-10/12	Precursor poliproteína DV4
		XXXXXXXXXXPX (3=1=4)		1-10	1-11	4/6	Precursor poliproteína DV4
		XXXXXXXXXXPY		6-8/10-12	3-5/ 11-12	10-12	Precursor poliproteína DV4
		XXXXXXXXVSGXXX		1-6/12	1/ 9-12	1-3	Precursor poliproteína DV4
29	WEILPWTKYNNP	XXX.PWTXXXX	1,13	3/7-12	1-2/8-12	12	Precursor poliproteína DV4
		WEXXPXXXXXX		1-12	1-9	1-4/9/11-12	Precursor poliproteína DV4
		XXXXXXXXXXNP		4/ 6-12	3-12	6-12	Precursor poliproteína DV4
32	WHWRDVWSAAPP	XXXXXXXXXX	1,39	1-8	1-8	1-5	Precursor poliproteína DV4
		XXXXXXXXXXP		1-12	1-2/ 7-12	2 / 9-12	Precursor poliproteína DV4

O resultado apresentado na tabela, mostrando os motivos e as proteínas alvos, demonstrou que estes peptídeos apresentam similaridades com proteínas relacionadas à dengue, previamente depositadas em banco de dados.

A maioria dos peptídeos se alinhou na poliproteína e seu precursor; isto é de suma importância visto que, de acordo com MONTES (2001), todo o repertório protéico dos subtipos virais da dengue se origina da poliproteína, por processamento proteolítico co-traducional e pós-traducional, incluindo: Protein C (Core protein / Capsid protein); prM; Peptide pr; Small envelope protein M (Matrix protein); Envelope protein E; Non-structural protein 1 (NS1); Non-structural protein 2A (NS2A); Non-structural protein 2A-alpha (NS2A-alpha); Serine protease subunit NS2B (Non-structural protein 2B); Serine protease subunit NS3 (Non-structural protein 3); Non-structural protein 4A (NS4A); Peptide 2k; Non-structural protein 4B (NS4B); RNA-directed RNA polymerase NS5 (Non-structural protein 5).

É importante destacar que o peptídeo 13, do DENV-2, além de ser o mais freqüente durante a seleção para o *mAb* DENV-2, pode ser considerado um potencial alvo no desenvolvimento de uma vacina, pelo fato de que analisando a clusterização dos 4 genomas dos subtipos virais da dengue, ele apresentou homologia em uma região específica do subtipo viral 2. Outra consideração importante, é que as taxas de antigenicidade foram significativas, em uma região que compreende o motivo **ASE** deste peptídeo. Para este tipo de consideração este peptídeo deverá ser testado em relação a sua antigenicidade, juntamente com outros peptídeos que possam em conjunto promover uma resposta tetravalente para a proteção efetiva contra todos os subtipos do vírus da dengue.

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. Esta proteína é importante pois 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). Assim como no trabalho citado acima, os peptídeos 2, 3, e 4 da DENV-1 apresentaram o motivo **HxYxW**, mimetizando a mesma região da proteína NS1. Outro fato muito interessante é que toda a região que compreende o motivo apresenta altos índices de hidrofobicidade, antigenicidade e probabilidade de exposição em superfície.

3.6. ELISA (“Enzimed Linked Immunosorbent Assay”) – Pré-validação

O teste ELISA preliminar com soro de pacientes infectados mostrou resultados satisfatórios, visto as altas estringências dos reagentes (Tween 20, Leite Molico) utilizados e reduzidas concentrações de anticorpo conjugado. Estas medidas foram tomadas a fim de minimizar possíveis resíduos na reação, ou seja, acarretar numa maior confiabilidade dos resultados. Além das medidas citadas acima, para o I.E., o cut – off foi calculado utilizando-se de 3 vezes o desvio padrão do controle negativo (selvagem)

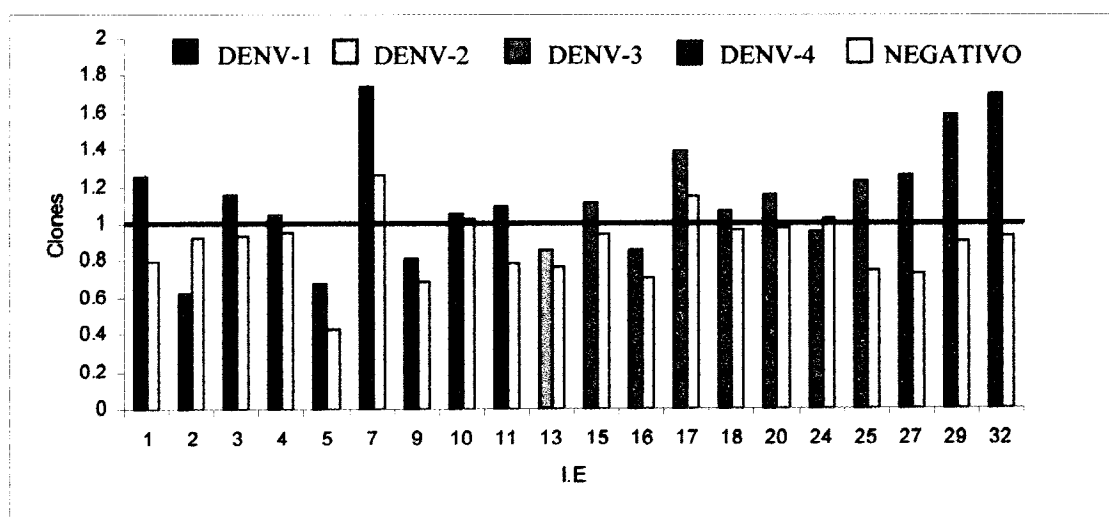


Figura 10. Teste ELISA preliminar mostrando a reatividade dos clones frente ao soro positivo para DENV-3.

Dentre os 20 clones utilizados, 55% apresentaram reatividade frente ao soro positivo para DENV-3 (cut-off ≥ 1), enquanto os clones expostos à soros negativos não apresentaram uma reatividade significativa.

Analisando a reatividade dos clones testados individualmente para cada subtipo viral, observou-se que 44,44% dos clones DENV-1, 57,14% dos clones DENV-3 e 100% dos clones DENV-4 apresentaram reatividade positiva contra o soro contaminado com DENV-3.

A baixa reatividade do clone 13, selecionado a partir do DENV-2, já era esperada, visto que os soros disponíveis para realização do teste ELISA eram do subtipo DENV-3. Isto pode ser comprovado pela análise da bioinformática na Tabela 8, onde verificou-se que a região de homologia deste clone ocorre em uma região exclusiva do genoma do vírus da DENV-2 (possível uso vacinal).

Baseado no que foi descrito acima, pode-se observar que clones selecionados para subtipos virais DENV-1 e DENV-4, apresentaram reação positiva frente ao soro de paciente contaminado com DENV-3. Esta reatividade cruzada se deve ao fato de que os clones

apresentaram homologia em regiões comuns aos genomas de todos 4 subtipos virais (Tabela 8), podendo apresentar possível utilidade em diagnósticos.

Este ELISA teve como finalidade uma pré-validação dos clones selecionados sendo necessários testes com maior número de pacientes tipados quanto ao subtipo do vírus da dengue, que confirmem a validação e a confiabilidade destes clones no uso para diagnóstico e/ou vacina.

4. CONCLUSÃO

- A metodologia “Phage Display” foi eficiente, permitindo a seleção de 32 peptídeos distintos e imunorreativos contra anticorpos monoclonais para os quatro subtipos virais da dengue.
- Os resultados dos ensaios imunoenzimáticos, ELISA, realizados com os clones selecionados mostraram-se promissores, visto que 55% dos clones apresentaram reatividade frente ao soro positivo para DENV-3, podendo ser utilizados como possíveis alvos genômicos para o desenvolvimento de diagnósticos. Por ser uma pré-validação, testes com uma maior quantidade de soros de pacientes positivos para o vírus da dengue serão necessários pra comprovar a utilidade destes clones tanto para diagnósticos quanto para possível vacina.
- O uso das ferramentas de bioinformática foi essencial tanto na obtenção das seqüências dos clones quanto na validação dos resultados obtidos nos testes imunoenzimáticos. Através das análises de caracterização realizada para cada clone foi possível destacar alguns peptídeos, como por exemplo, o peptídeo 13 que apresentou homologia em uma região exclusiva do genoma do vírus da DENV-2, e alguns peptídeos selecionados contra DENV-1, DENV-3 e DENV-4 que apresentaram homologias em regiões comuns aos 4 subtipos do vírus da dengue, com altas taxas de hidrofiliidade e antigenicidade.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCON-LEPODER, S.; DROUET, M.T.; ROUX, P.; FRENKIEL, M.P.; ARBORIO, M.; DURAND-SCHNEIDER, A.M.; MAURICE, M.; LE BLANC, I.; GRUENBERG, J.; FLAMAND, M. 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**, v. 79, p. 11403-11411, 2005.

ALISSON, S.L.; SCHALICH, J.; STIASNY, K.; MANDL, C.W.; HEINZ, F.X. Mutational Evidence for an Internal Fusion Peptide in Flavivirus Envelope Protein E. **Journal of Virology**, v. 75, p. 4268-4275, 2001.

ANANDARAO, R.; SWAMINATHAN, S.; FERNANDO, S.; JANA, A.M.; KHANNA, N. Recombinant Multiepitope Protein for Early Detection of Dengue Infections. **American Society for Microbiology**, v. 13, p. 59-67, 2006.

ARAP, M.P. Phage display technology - Applications and innovations. **Genetics and Molecular Biology**, v.28, n^o.1, 2005.

BALEOTTI, F.G.; MORELI, M.L.; FIGUEIREDO, L.T.M. Brazilian flavivirus phylogeny based on NS5. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 379-382, 2003.

BARBAS, C.F.; BURTON, D.R.; SCOTT, J.K.; SILVERMAN, G.J. Phage Display. A laboratory manual. **New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press**, p.8.4-8.7, 2001.

BENHAR, I. Biotechnological applications of phage and cell display. **Biotechnol Adv.**, v.19, p.1-33, 2001.

BHARDWAJ, S.; HOLBROOK, M.; SHOPE, R.E.; BARRETT, A.D.T.; WATOWICH, S.J. Biophysical characterization and vector-specific antagonist activity of domain III of the tick-borne flavivirus envelope protein. **Journal of Virology**, v. 75, p. 4002-4007, 2001.

BRICKS, L.F. Vacinas para a dengue: perspectivas. **Pediatrics (São Paulo)**, v. 26, p.268-281, 2004.

BRÍGIDO, M.M.; MARANHÃO, A.Q. Bibliotecas Apresentadas em Fagos. **Tecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 26, p. 44-51, 2002.

BRESSANELLI, S.; STIASNY, K.; ALLISON, S.L; STURA, E.A.; DUQUERROY, S.; LESCAR, J.; HEINZ, F.X.; REY, F.A. Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. **EMBO Journal** , v. 23, p. 728–738, 2004.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Division of Vector Borne Infectious Diseases**, 2005. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue/map-distribution-2005.htm>>. Acesso em: 03 ago. 2007.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Dengue Fact Sheet**, 2005. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue/resources/DengueFactSheet.pdf>>. Acesso em: 28 set. 2007.

CHANAMA, S.; ANANTAPREECHA, S.; A-NUEGOONPIPAT, A.; SA-GNASANG, A.; KURANE, I.; SAWANPANYALERT, P. Analysis of specific IgM responses in secondary dengue virus infections: levels and positive rates in comparison with primary infections. **Journal of Clinical Virology** v. 31, p. 185-189, 2004.

CHAO, D.Y.; KING, C.C.; WANG, W.K., CHEN, W.J.; WU, H.L.; CHANG, G.J.J. Strategically examining the full-genome of dengue virus type 3 in clinical isolates reveals its mutation spectra. **Virology Journal** v. 72, 2005.

CLARO, L. B. L.; TOMASSINI, H. C. B.; ROSA, M. L. G. **Prevenção e controle do dengue**: uma revisão de estudos sobre conhecimentos, crenças e práticas da população. Rio de Janeiro: Cad. Saúde Pública, 2004. vol. 20, nº.6 . Instituto de Saúde da Comunidade, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Brasil.

FIGUEIREDO, L. T. M. **Vacinas contra o dengue**. Simpósio: Virologia Médica I. v. 32, p. 21-25, 1999.

FRANCIS, M.M.C; MEARA, G.F.O. **Photografics Guide to Common mosquitoes of Florida**. University of Florida – Florida Medical Entomology Laboratory. Pag. 15, 1985. Disponível em: <<http://fmel.ifas.ufl.edu/Key/atlas.pdf>> Acesso em: 28 set. 2007.

GROEN, J.; KORAKA, P.; VELZING, J.; COPRA, C.; and A. D. M. E. Osterhaus. Evaluation of six immunoassays for detection of dengue virus-specific immunoglobulin M and G antibodies. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 7, p. 867–871, 2000.

GUZMÁN, M.G.; KOURI, G. Dengue: an update. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, p. 33-42, 2002.

HALSTEAD, S.B.; DEEN, J. The future of dengue vaccines. **The Lancet**, v. 360, p. 1243-1245, 2002.

IAT - INSTITUTE OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY. Suranaree University of Technology, 2005. **Phage Display Technology**. Disponível em: <<http://www.sut.ac.th/iat/biotech/MYLabweb/research.htm>> Acesso em: 01 out. 2007.

ICPM - **Institute of Clinical Pathology and Medical Research**. NSW Arbovirus Surveillance & Vector Monitoring Program, 2002. Disponível em: <<http://www.arbovirus.health.nsw.gov.au/areas/arbovirus/mosquit/photos>> Acesso em: 28 set. 2007.

JAISWAL, S.; KHANNA, N.; SWAMINATHAN, S. High-level expression and one-step purification of recombinant dengue virus type 2 envelope domain III protein in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 33, p. 80–91, 2004.

KAO, C. L.; KING, C. C.; CHAO, D. Y.; WU, H. L.; CHANG, G. J. J. Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 38, p. 5-16, 2005.

KATZENMEIER, G. Inhibition of the NS2B-NS3 protease – towards a causative therapy for dengue virus diseases. OMS - **Dengue Bulletin** v. 28, p. 58-67, 2004.

KRETZSCHMAR, T.; VON RUDEM, T. Antibody discovery: *phage display*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 598-602, 2002.

KUHN, R.J.; ZHANG, W.; ROSSMANN, M.G.; PLETNEV, S.V.; CORVER, J.; LENCHES, E.; JONES, C.T.; MUKHOPADHYAY, S.; CHIPMAN, P.R.; STRAUSS, E.G.; BAKER, T.S.; STRAUSS, J.H. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. **Cell**, v.108, p. 717-725, 2002.

LIGON, B. L. Dengue fever and dengue hemorrhagic fever: a review of the history, transmission, treatment and prevention. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v. 15, p. 60-65, 2004.

MA, L.; JONES, C.T.; GROESCH, T.D.; KUHN, R.J.; POST, C.B. Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.101, p. 3414-3419, 2004.

MAIRUHU, A.T.A.; WAGENAAR, J.; BRANDJES, D.P.M.; VAN GORP, E.C.M. Dengue: an arthropod-borne disease of global importance. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases** , v. 23, p. 425-433, 2004.

MARQUES, G. R. A. M.; RIBEIRO, A. F.; VOLTOLINI, J. C.; CONTINO, M. L. F. Epidemiologia da dengue em São Sebastião, Litoral Norte, São Paulo, Brasil, 2001-2002. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 71, p. 462-465, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, **Programa Nacional de Controle da Dengue - PNCD**, 2005. Disponível em:<<http://dtr2001.saude.gov.br/dengue/>> . Acesso em: 30 set. 2007.

MODIS, Y.; OGATA, S.; CLEMENTS, D.; HARRISON, S.C. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature**, v. 427, p. 313-319, 2004.

MONTES, T.M. Actualización en dengue: Parte 1. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**, v. 21, p. 39-45, 2001.

MORAIS, J.G.M. **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, PE, 1998.

OPAS - ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **OPAS prevê ano difícil para o controle do Dengue.** 2007. Disponível em: <<http://www.opas.org.br/mostrant.cfm?codigodest=331>> Acesso em: 05 jun 2007.

PARMLEY, S. F., SMITH, G. P. Antibody-selectable filamentous phage vectors: affinity purification of target genes. **Gene**, v. 73, p. 305–318, 1988.

PAHO- PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, Pan American Sanitary Bureau, Regional Office of the World Health Organization. **Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: guidelines for prevention and control.** Washington DC: Scientific Publication 1994, n° 548, p. 98. ISBN 9275115486

RODI, D.J.; SOARES, A.S.; MAKOWSKI, L. Quantitative assessment of peptide sequence diversity in m13 combinatorial peptide phage display libraries. **Journal of Molecular Biology**, v. 322, p. 1039-1052, 2002.

ROTHMAN, A.L. Dengue: defining protective versus pathologic immunity. **The Journal of Clinical Investigation** v. 113, p. 946-951, 2004.

RUSSELL, R.C. **A colour photo atlas of mosquitoes of Southeastern Australia.** Medical Entomology, Westmead Hospital, Department of Medical Entomology, 1996. Disponível em: <http://medent.usyd.edu.au/photos/larvae_photographs.htm> Acesso em: 25 nov. 2007.

SEVERSON, D. W.; KNUDSON, D. L.; SOARES, M. B.; LOFTUS, B. J. *Aedes aegypti* genomics. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, p. 715-721, 2004.

SILVEIRA, E. Vacina pra dengue. **Biotecnologia, ciência e desenvolvimento**, v. 25, p. 4-7, 2002.

SIMMONS, C. P.; DONG, T.; CHAU, N.V.; DUNG, N. T. P.; CHAU, T. N. B.; THAO, L. T. T.; DUNG, N. T.; HIEN, T. T. Early T-cell responses to dengue virus epitopes in vietnamese adults with secondary dengue virus infections. **Journal of Virology**, v. 79, p. 5665–5675, 2005.

SMITH, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, v. 228, p. 1315-1317, 1985.

TAUIL, P.L. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, p. 867-71, 2002.

THULLIER, P.; DEMANGEL, C.; BEDOUELLE, H.; MÉGRET, F.; JOUAN, A.; DEUBEL, V.; MAZIÉ, J.C.; LAFAYE, P. Mapping of a dengue virus neutralizing epitope critical for the infectivity of all serotypes: insight into the neutralization mechanism. **Journal of General Virology**, v.82, p.1885–1892, 2001.

YANG, W. J.; SHIUAN, D. Plaque reduction test: an alternative method to assess specific antibody response to pIII-displayed peptide of filamentous phage M13. **Journal of Immunological Methods**, v. 276, p. 175–183, 2003.

WALLIS, T.P.; HUANG, C.Y.; NIMKAR, S.B.; YOUNG, P.R.; GORMAN, J.J. Determination of the disulfide bond arrangement of dengue virus NS1 protein. **Journal of Biological Chemistry** v. 279, p. 20729–20741, 2004.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control**, 1997. Disponível em: <<http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue>>. Acesso em: 01 ago. 2006.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue and dengue haemorrhagic fever: Prevention and Control**, 2002. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en>>. Acesso em: 01 out. 2007.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Epidemic and Pandemic Alert and Response (EPR)**, 2005. Disponível em: <<http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en>>. Acesso em: 07 set. 2006.

WU, H.C.; HUANG, Y.L.; CHAO, T.T.; JAN, J.T.; HUANG, J.L.; CHIANG, H.Y.; KING, C.C.; SHAIQ, M.F. Identification of B-cell epitope of dengue virus type 1 and its application in diagnosis of patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p.977–982, 2001.