UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
REGIONAL CATALÃO
UNIDADE ACADÊMICA ESPECIAL DE FÍSICA E QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

INVESTIGAÇÃO DE ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS DE APTÂMEROS LIGANTES À REGIÃO 5' NÃO TRADUZIDA NO GENOMA DO VÍRUS DA DENGUE BASEADA EM TÉCNICAS MOLECULARES

Rívia Aparecida Reinalda Arruda

Catalão - GO
2016

sistema de bibliotecas ufg

UFG

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

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

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

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Nome completo do autor: RÍVIA APARECIDA REINALDA ARRUDA

Título do trabalho: INVESTIGAÇÃO DE ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS DE APTÂMEROS LIGANTES À REGIÃO 5' NÃO TRADUZIDA NO GENOMA DO VÍRUS DA DENGUE BASEADA EM TÉCNICAS MOLECULARES

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento [x] SIM [ ] NÃO[1]

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

Rívia Aparecida Reinalda Arruda

Assinatura do (a) autor (a)

Data: 14 / 10 / 2016

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
REGIONAL CATALÃO
UNIDADE ACADÊMICA ESPECIAL DE FÍSICA E QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

INVESTIGAÇÃO DE ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS DE APTÂMEROS LIGANTES À REGIÃO 5' NÃO TRADUZIDA NO GENOMA DO VÍRUS DA DENGUE BASEADA EM TÉCNICAS MOLECULARES

Aluna: Rívia Aparecida Reinalda Arruda
Orientadora: Prof.ª Dra. Adriana Freitas Neves
Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Sérgio de Souza

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Goiás, Regional Catalão, como parte dos requisitos para obtenção do Título de MESTRE EM QUÍMICA.

Catalão - GO
2016

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

Arruda, Rívia Aparecida Reinalda
Investigação de Alterações Estruturais de Aptâmeros Ligantes à Região 5' Não Traduzida no Genoma do Vírus da Dengue Baseada em Técnicas Moleculares [manuscrito] / Rívia Aparecida Reinalda Arruda. - 2016.
xvii, 81 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Adriana Freitas Neves; co-orientador Dr. Eduardo Sérgio de Souza.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Unidade Acadêmica Especial de Física e Química, Catalão, Programa de Pós Graduação em Química, Catalão, 2016.
Bibliografia.
Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, gráfico, lista de figuras.

1. Aptâmeros. 2. DENV. 3. Dot blot. 4. PCR em Tempo Real. 5. FRET. I. Neves, Adriana Freitas, orient. II. Título.

CDU 54

UFG – CAC

química

Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química

UFG

Relatório de Defesa de Dissertação
Candidata: **Rívia Aparecida Reinalda Arruda**

Aos 02/09/2016 às 14 horas, realizou-se na Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão nas formas e termos do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Química a Defesa de Dissertação de Mestrado sob o título: **"Investigação de Alterações Estruturais de Aptameros Ligantes à Região 5' Não Traduzida do Genoma do Vírus da Dengue Baseada em Técnicas Moleculares"** apresentada pela candidata: **Rívia Aparecida Reinalda Arruda**. Ao final dos trabalhos a banca examinadora reuniu-se em sessão reservada para o julgamento tendo os membros chegado ao seguinte resultado:

Participantes da Banca:	**Função**	**Instituição**
Profa. Dra. Adriana Freitas Neves	Presidente	UFG – Catalão
Profa. Dra. Elisângela de Paula Silveira Lacerda	Titular	UFG – Goiânia
Profa. Dra. Maria Rita de Cássia Santos	Titular	UFG – Catalão

Resultado Final: APROVADA.

Parecer da Comissão Julgadora:

APROVADA MEDIANTE CORREÇÕES SOLICITADAS PELA BANCA.

Encerrada a sessão reservada, a presidente informou ao público presente o resultado. Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada e, para constar eu Milana Jacob da Silva, representante do Programa de Pós-graduação em Química lavrei o presente relatório que será assinado por mim e pelos membros da banca examinadora.

Profa. Dra. Adriana Freitas Neves

Profa. Dra. Elisângela P. S. Lacerda

Profa. Dra. Maria Rita de Cássia Santos

Representante do PPG Milana Jacob da Silva

(X) Não houve alteração no título. ( ) Houve. O novo título passa a ser:

Dedico esse trabalho ao meu amado esposo, **Tércio,** e aos meus amados pais, **Mary** e **Luiz,** que tanto apoiaram meu crescimento profissional e pessoal.

AGRADECIMENTOS

Ao bom Deus, ofereço minha mais sincera gratidão pelos dons da vida e capacidade de aprender, ferramentas fundamentais para esta conquista, e por ter me dado forças para sobrepujar todos os desafios.

Ao meu amado esposo, companheiro e amigo, Tércio, pela compreensão da minha luta, por me amar intensamente, me incentivar e ajudar nos momentos mais difíceis, sempre acreditando que tudo daria certo, apesar de todas as dificuldades.

Aos meus familiares e do meu esposo, pelo apoio e compreensão, em especial a minha mãe, Mary, por entender a minha ausência e pelo amor incondicional.

À minha orientadora, Prof.ª Dra. Adriana Freitas Neves, pelo estímulo, confiança, dedicação e esforços, proporcionados nas longas conversas e considerações sobre os melhores caminhos para a realização deste trabalho.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Eduardo Sérgio de Souza, por todo conhecimento transmitido, pela paciência e por estar sempre disposto a auxiliar na obtenção de resultados que estavam além dos meus esforços.

À Prof.ª Dra. Cássia Alessandra Marquezin, do Laboratório de Física de Materiais do Instituto de Física da UFG – Regional Goiânia, pelo auxílio nas medidas de FRET.

À Prof.ª Dra. Mariana P. de Campos Telles e sua aluna de doutorado Thaís Guimarães de Castro, do Laboratório de Genética e Biodiversidade da UFG – Regional Goiânia, pelo auxílio no sequenciamento e conhecimentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Jonny Yokosawa, do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM-UFU), pela contribuição ao ceder as amostras de células C6/36.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular, que transformaram momentos de tensão e apreensão em instantes de inestimável contentamento: ao Thyago, pela amizade e disposição em me auxiliar quando cheguei ao laboratório; à Írlei, pelas agradáveis conversas, que nos ajudavam a abstrair um pouco da correria diária; à minha companheira de bancada Amanda, pela amizade, auxílio em incontáveis experimentos, viagens a Goiânia para testes, que nos renderam muitas histórias divertidas, mesmo quando as coisas não davam certo, e pelos

momentos de descontração com gêneros musicais de gosto duvidoso; e à Evellyn, pelo companheirismo, auxílio em experimentos e compartilhamento de angústias e alegrias vividas no laboratório.

À técnica Vânia, pela disposição em ajudar sempre e pelo carinho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela bolsa concedida.

A todos os docentes e à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão, pela contribuição para minha formação.

A todos que direta e indiretamente colaboraram para essa conquista.

"Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes".

(Marthin Luther King)

RESUMO

O objetivo principal desse trabalho foi avaliar alterações conformacionais nos aptâmeros A03 e C10 previamente selecionados contra regiões não traduzidas presentes no genoma do vírus da dengue (DENV), por meio de testes de biologia e física molecular. Os aptâmeros são moléculas de ácidos nucleicos com potencial aplicação na teranóstica das mais diversas doenças. Nesse contexto, destaca-se a dengue, uma doença infecciosa viral com altos índices de morbi-mortalidade em um cenário mundial, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, onde são altas as incidências do mosquito vetor *Aedes aegypti.* Esses aptâmeros demonstraram, por meio de *dot blot* e de captura de ligantes por *beads* magnéticos com detecção por PCR em Tempo Real, afinidades e especificidades semelhantes de ligação à 5'UTR do DENV. Provavelmente, essas semelhanças se deram em função dos motivos e das estruturas secundárias análogas apresentadas por esses ligantes, obtidas por ensaios *in silico*. Os ensaios de Transferência Ressonante de Energia de Fluorescência (FRET) permitiram a confirmação dessa afinidade de ligação entre A03:DENV, devido às alterações estruturais ocorridas no aptâmero duplamente marcado em sua sequência (5'-FAM; 3'-TAMRA). As alterações conformacionais no aptâmero resultantes de sua interação com o alvo foram detectadas pelas mudanças nas intensidades de fluorescência do FAM e do TAMRA, decorrentes de alterações nas distâncias entre o doador e o aceitador que afetam a eficiência FRET e por conseguinte as intensidades de fluorescência destas moléculas. A força iônica do tampão utilizado nos ensaios apresentou importante influência na conformação do aptâmero, permitindo a detecção das interações entre A03 e o DENV. Os íons presentes na solução tampão afetaram a conformação estrutural do aptâmero e aumentaram sua estabilidade térmica, sendo que o íon Mg^{2+} levou a maiores alterações estruturais sobre o A03 comparado ao íon Na^{+}. Os dados aqui apresentados demostraram a importância dos estudos de afinidade e especificidade dos oligonucleotídeos ligantes ao vírus da dengue. É possível concluir que os aptâmeros A03 e C10 apresentam potencial de aplicação para fins diagnósticos e/ou terapêuticos, considerando o tampão diluente, uma vez que os diferentes sais presentes exercem influência sobre as estruturas conformacionais secundárias e terciárias dos aptâmeros, e em sua biodisponibilidade de interação com o alvo.

Palavras-chave: Aptâmeros, DENV, *Dot blot*, PCR em Tempo Real, FRET.

ABSTRACT

The main purpose of this study was to assess conformational changes in preselected aptamers A03 and C10 against untranslated regions present in the genome of the dengue virus (DENV), by means of molecular biology and physics assays. Aptamers are nucleic acid molecules with potential theranostic applications. In this context, dengue was the target chosen for study because is an important infectious viral disease presenting high rates of morbidity and mortality in the worldwide, especially in tropical and subtropical areas, where there are high incidences of the mosquito vector *Aedes aegypti*. These aptamers showed, by dot-blot and magnetic beads ligand capture and subsequent qPCR detection, similar affinities and specificities to binding to the DENV 5'UTR. Probably, the analogy of the motifs and secondary structures presented in these ligands, identified by in silico studies, are responsible for these similarities. Data obtained by using Fluorescence Resonance Energy Transfer Assays (FRET) confirmed the affinity of A03 as DENV ligand by conformational changes in the double labeled aptamer (5'-FAM, 3'-TAMRA). Aptamer conformacional changes resulting from its interaction with the target were detected by the modifications in the fluorescence intensities between FAM and TAMRA fluorophores. These conformational changes results in donor-acceptor distance modification that has an effect on FRET efficiency and on fluorescence intensity of these molecules. The ionic strength of the buffer used in the trials had significant influence on the conformation of the aptamer, allowing the detection of interactions between A03 and DENV. The ions in the buffer lead an effect in the conformation of the aptamer, increasing its thermal stability, and the Mg^{2+} ion has led to major conformational changes on A03 compared to Na^{+} ion. The data presented herein demonstrated the importance of the studies of oligonucleotides binding affinity and specificity to Dengue virus. It can be concluded that the A03 and C10 aptamers have potential in application for diagnostic and/or therapeutic purposes, considering the diluent buffer, since different salts have influence on the secondary and tertiary conformational structures of aptamers, and on bioavailability of interaction with the target.

Keywords: Aptamer, DENV, Dot blot, Real-Time PCR, FRET.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1: Representação esquemática da partícula viral e do genoma do DENV..... 4

FIGURA 1.2: Representação esquemática da região 5'UTR do genoma do vírus da dengue..... 5

FIGURA 1.3: Representação esquemática da região 3'UTR do genoma do DENV..... 6

FIGURA 1.4: Representação esquemática do ciclo de replicação viral..... 7

FIGURA 1.5: Representação esquemática de estruturas secundárias comumente observadas em aptâmeros..... 14

FIGURA 1.6: Representação esquemática da formação do complexo aptâmero-alvo..... 15

FIGURA 1.7: Representação esquemática do processo geral de seleção de aptâmeros por SELEX. 18

FIGURA 1.8: Representação esquemática do funcionamento do teste de hibridização por *dot blot*..... 21

FIGURA 1.9: Curva de amplificação da PCR em Tempo Real..... 24

FIGURA 1.10: Representação de um espectro de absorção e emissão ideal de um par doador-aceitador para ensaios por FRET..... 26

FIGURA 1.11: Diagrama de Jablonski simplificado ilustrando o processo de FRET. 26

FIGURA 1.12: Esquema geral do funcionamento de um espectrofluorímetro utilizado na aquisição das medidas de FRET..... 28

FIGURA 5.1: Esquema geral da aplicação das amostras na membrana para os testes de afinidade com os aptâmeros A03 e C10..... 41

FIGURA 5.2: Representação das estruturas químicas dos fluoróforos FAM e TAMRA..... 45

FIGURA 6.1: Fotomicrografia do cultivo de células C6/36, em aumento de 400 x, com efeito citopático proveniente da inoculação do DENV..... 47

FIGURA 6.2: RT-PCR do RNA do vírus da dengue a partir de células C6/36 contaminadas e mantidas em meio de cultura L15..... 49

FIGURA 6.3: PCR assimétrica para obtenção de RNA *like*..... 50

FIGURA 6.4: Representação da predição da estrutura secundária dos aptâmeros A03 e C10 obtidas pelo *web server* NUPACK..... 50

FIGURA 6.5: Resultados dos testes *in silico* para a hibridização dos aptâmeros A03 e C10 com os quatro sorotipos do DENV (MFOLD)..... 51

FIGURA 6.6: Estabilidade da interação entre a sequência do aptâmero A03 e os demais aptâmeros avaliada por teste de interação bimolecular utilizando o *web server* MFOLD. 52

FIGURA 6.7: Ensaios de PCR e *dot blot* para obtenção dos aptâmeros ssDNA A03 e C10 biotinilados..... 53

FIGURA 6.8: *Dot blot* para análise da afinidade entre o DENV e os aptâmeros A03 e C10..... 54

FIGURA 6.9: Curvas de amplificação dos produtos obtidos nos ensaios de captura de DENV e aptâmeros (I), eletroforese em gel de agarose das amostras amplificadas (II) e curva de dissociação dos *primers* (*melting)* (III)..... 56

FIGURA 6.10: Representação esquemática do mecanismo de atuação do corante intercalante..... 57

FIGURA 6.11: Espectro de emissão fluorescente do fluoróforo FAM (excitado a 490 nm) ligado ao aptâmero A03 na extremidade 5', nas concentrações de 10, 50 e 100 nM, na presença de Tris e tampão salino (TS)..... 58

FIGURA 6.12: Espectro de emissão fluorescente das moléculas de A03 marcadas individualmente com FAM (F) na extremidade 5' (λ_{ex} – 490 nm), TAMRA (T) na extremidade 3' (λ_{ex} – 560 nm) e com marcação dupla FT (λ_{ex} – 490 nm)..... 59

FIGURA 6.13: Relação entre a distância dos fluoróforos fluoresceína (F) e *quencher* (Q); emissão e supressão de fluorescência..... 60

FIGURA 6.14: Espectros de emissão fluorescente demonstrando o efeito da adição de Mg^{2+} e Na^{+} e da temperatura na conformação estrutural do aptâmero A03..... 62

FIGURA 6.15: Espectros de emissão fluorescente das moléculas de A03, marcadas duplamente com FAM (F) na extremidade 5’ e TAMRA (T) na extremidade 3’, na presença de DENV (25, 50 e 100 nM)..... 64

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

°C	graus Celsius
3’CS	sequência conservada da 3’-UTR (*conserved sequence*)
5’CS	sequência conservada da 5’UTR (*conserved sequence*)
3’SL	*stem loop* da 3’-UTR
3’UAR	*upstream A*UG *Region* da 3’-UTR
5’UAR	*upstream A*UG *Region* da 5’-UTR
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP	fosfatase alcalina (*alkaline phosphatase*)
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
C	capsídeo
C6/36	linhagem de cultura de células de mosquito *Aedes albopictus*
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
$CaCl_2$	cloreto de cálcio
cHP	capsídeo *Hairpin*
CS	sequência conservada
CS1	sequência conservada 1 presente na 3’-UTR
CS2	sequência conservada 2 presente na 3’-UTR
DAI	dias após infecção
DB1	estrutura haltere 1 (*haltere structure*)
DB2	estrutura haltere 2
DC-SIGN	*dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3 grabbing non-integrin*
DENV	vírus da dengue
DEPC	dietilpirocarbonato
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	desoxirribonucleotídeos fosfatados (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
dsDNA	DNA de fita dupla
dUTP	desoxiuridina trifosfatada
E	envelope
ECP	efeito citopático
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético (*ethylenediamine tetraacetic acid*)
ELISA	*enzyme-linked immunosorbent assay*
F	FAM
FC	fração de complemento
FCS	espectroscopia de correlação de fluorescência (*fluorescence correlation spectroscopy*)
FD	febre de dengue
FHD	febre hemorrágica da dengue
FRET	transferência ressonante de energia de fluorescência (*fluorescence resonance energy transfer)*
FT	marcação com FAM e TAMRA
g	grama
HCl	ácido clorídrico
IgG	imunoglobulina G
IgM	imunoglobulina M

IH	inibição de hemaglutinação
IPTG	isopropil-β-D tiogalactopiranosídeo
kb	quilobases
KCl	cloreto de potássio
Kd	constante de dissociação
kDa	kilodalton
L 15	meio Leibovitzs 15
LaBioMol	Laboratório de Biologia Molecular
LB	Luria Bertani
M	molar
mg	miligrama
$MgCl_2$	cloreto de magnésio
mL	mililitro
mM	milimolar
M-MLV RT	*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*
MS	Ministério da Saúde
NaCl	cloreto de sódio
NBT	azul de nitrotetrazólio
NCBI	*National Center for Biotechnology Information*
ng	nanograma
NMR	ressonância magnética nuclear (*nuclear magnetic resonance)*
NIAID	*National Institute of Allergy and Infectious Diseases*
NIH	*National Institutes for Health*
nm	nanômetros
nM	nanomolar
nt	nucleotídeo
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPS	Organização PanAmericana de Saúde
ORF	sequência codificante (*open reading frame)*
PAHO	*Pan American Health Organization*
pb	pares de bases
PBS	tampão fosfato-salino
PCR	reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)
pH	potencial hidrogeniônico
pmoles	picomoles
qPCR	PCR quantitativa em tempo real
rcf	força centrífuga relativa
RCS2	repetição da sequência conservada 2
RNA	ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
RNAse	ribonuclease
rpm	rotações por minuto
RT	transcrição reversa (*reverse transcription*)
RT-PCR	transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase
s	segundos
SA-PMs	partículas paramagnéticas recobertas com estreptavidina
SAXS	dispersão de raios-X de baixo ângulo (*small-angle X-ray scattering)*
SCD	síndrome do choque por dengue
SE	semana epidemiológica

SELEX	evolução sistemática de ligantes por enriquecimento exponencial (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*)
SERS	espectroscopia raman amplificada por superfície *(surface-enhanced raman spectroscopy)*
SFB	soro fetal bovino
SL	*stem loop*
SLA	*stem loop* A
SLB	*stem loop* B
SPR	*ressonância plasmônica de superfície (surface plasmon resonance)*
ssDNA	DNA de fita simples (*single strand* DNA)
SUS	Sistema Único de Saúde
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
T	TAMRA
Taq	*Thermus aquaticus*
TBE	tampão Tris/Borato/EDTA
TN	teste de neutralização
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
TS	tampão salino
U	unidade de enzima
UAR	*upstream A*UG *Region*
UTR	região não traduzida do RNA (*untranslated region*)
VEGF	*vascular endothelial growth factor*
WHO	*World Health Organization*
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosidase
µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micromolar

SUMÁRIO

1. **INTRODUÇÃO** 1
1.1 Aspectos Históricos e Epidemiológicos da Dengue 1
1.2 Aspectos Moleculares do Vírus da Dengue 3
1.2.1 Estrutura viral e genoma 3
1.2.2 Regiões não traduzidas 5' e 3'UTR 4
1.3 Replicação Viral 6
1.4 Diagnóstico Laboratorial de Infecção por DENV 8
1.4.1 Isolamento viral 9
1.4.2 Testes sorológicos 9
1.4.3 Testes moleculares 11
1.5 Vacinas contra Dengue 12
1.6 Aptâmeros 14
1.6.1 Aspectos gerais 14
1.6.2 SELEX 17
1.6.3 Caracterização da interação entre a molécula alvo e aptâmero 19
1.7 Técnica Colorimétrica: *Dot Blot* 20
1.8 Técnicas Baseadas em Fluorescência: PCR em Tempo Real e FRET 22
1.8.1 O fenômeno da fluorescência 22
1.8.2 PCR em tempo real 23
1.8.3 Transferência ressonante de energia de fluorescência (FRET) 25
1.8.3.1 Transferência de energia 25
...1.8.3.2 Instrumentação 28
2. JUSTIFICATIVA 30
3. OBJETIVOS 31
3.1 Objetivo Geral 31
3.2 Objetivos Específicos 31
4. MATERIAIS 32
5. METODOLOGIA 33
5.1 Obtenção do DENV 33
5.1.1 Cultivo de células: clone C6/36 – larva de Aedes Albobictus 33
5.1.2 Inoculação do DENV:sorotipos 1-4 em C6/36 33
5.1.3 Extração e transcrição reversa do RNA viral em DNA complementar (cDNA) 34
5.1.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR) 34

5.1.5 Purificação dos produtos da PCR 35

5.1.6 Clonagem do produto de PCR com vetor TOPO TA e transformação das bactérias TOP 10 35

5.1.7 Transformação das bactérias competentes e preparo de placas de cultivo dos transformantes 36

5.1.8 Extração de DNA plasmidial 36

5.1.9 Sequenciamento 37

5.1.10 Geração de RNA-like e marcação de moléculas alvo com biotina . 38

5.1.11 Teste de marcação com biotina 38

5.2 Obtenção dos Aptâmeros 39

5.2.1 Amplificação de aptâmeros dsDNA e ssDNA biotinilados 39

5.3 Testes *in silico*: Predição da Estrutura Secundária dos Aptâmeros, Interação entre os Aptâmeros A03 e C10 com DENV e Definição do Controle Negativo dos Testes de *Dot Blot* 40

5.4 Técnicas de Biologia Molecular 40

5.4.1 Hibridização por dot blot 40

5.4.1.1 Preparo da sonda e membrana, hibridização e detecção 41

5.4.2 Testes captura de ligantes e detecção por PCR em Tempo Real 42

5.4.2.1 Preparo das partículas magnéticas 42

5.4.2.2 Captura de DENV por aptâmeros 42

5.4.2.3 Ensaio reverso 43

5.4.2.4 PCR em Tempo Real 43

5.5 Ensaios por Biofísica Molecular – FRET 44

5.5.1 Instrumentação 44

5.5.2 Fluoróforos utilizados 44

5.5.3 Experimentos FRET 45

5.5.3.1 Avaliação do perfil de emissão dos fluoróforos FAM e TAMRA ligados ao aptâmero A03 45

5.5.3.2 Efeito da concentração dos íons Mg^{2+} e Na^{+} e temperatura na estrutura do aptâmero A03 46

5.5.3.3 Interação aptâmero A03 e DENV: influência da concentração de DENV, tempo de incubação e presença de íons 46

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO 47

6.1 Obtenção do DENV 47

6.1.1 Inoculação do Denv em células C6/36 47

6.1.2 Amplificação e Sequenciamento 49

6.2 Ensaios *in silico* 50

6.3 Hibridização por *Dot Blot*..... 53
6.4 Captura de Ligantes e Detecção por PCR em Tempo Real..... 54
6.5 Ensaios FRET..... 58
6.5.1 Interação aptâmero A03 e DENV: influência da concentração de DENV, tempo de incubação e presença de íons..... 63
7. CONCLUSÃO..... 67
8. PERSPECTIVAS FUTURAS..... 68
REFERÊNCIAS..... 69

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Históricos e Epidemiológicos da Dengue

A dengue, uma doença febril aguda transmitida por mosquitos hematófagos fêmeas do gênero *Aedes*, principalmente o *Aedes aegypti* (*A. aegypti*), é considerada a doença de transmissão vetorial com o maior crescimento no mundo. É uma importante arbovirose (doença transmitida por artrópodes) que afeta o homem e constitui-se em um sério problema de saúde pública mundial, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais urbanas, onde as condições ambientais favorecem o desenvolvimento e a proliferação do mosquito vetor (BRASIL, 2002). Estima-se que 3 bilhões de pessoas vivem em áreas onde há risco de contraírem dengue e que ocorrem cerca de 390 milhões de infecções/ano, em que 96 milhões destas são sintomáticas, e 20.000 mortes/ano (BHATT *et al*., 2013).

A infecção pode ser causada por um dos quatro sorotipos antigenicamente distintos do vírus da dengue (DENV-1, 2, 3 e 4), resultando em um amplo espectro clínicopatológico, variando desde um quadro assintomático até quadros sintomatológicos de Febre de Dengue (FD), quadros graves de Febre Hemorrágica de Dengue (FHD) e Síndrome do Choque de Dengue (SCD), que podem evoluir para óbito. Qualquer um dos quatro sorotipos podem causar todos os quadros clinipatológicos da dengue, no entanto, o sorotipo 2 tem sido associado com as formas mais graves (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009).

A suscetibilidade ao vírus da dengue é universal. A imunidade é permanente para um mesmo sorotipo (homóloga) e temporária para sorotipos distintos (heteróloga) (BRASIL, 2002). Observações epidemiológicas sugerem que, infecções sucessivas por diferentes sorotipos aumentam o risco de desenvolvimento da FHD (MACIEL *et al.*, 2008).

O vírus da dengue foi isolado pela primeira vez em 1943, a partir de amostras de sangue coletadas de soldados japoneses acometidos de doença febril, no Japão (KIMURA & HOTTA, 1944 apud AZEVEDO *et al*, 2011, p. 20) e de soldados americanos provenientes do Havaí. Ao identificar outro vírus em Nova Guiné, em 1944, observou-se que as cepas tinham características

antigênicas diferentes, sendo então, considerados sorotipos de um mesmo vírus (SABIN & SCHLESINGER, 1945 apud HENCHAL & PUTNAK, 1990, p. 377). O primeiro foi denominado sorotipo 1 (DENV-1) e o segundo sorotipo 2 (DENV-2). Os sorotipos DENV-3 e o DENV-4 foram isolados em 1956, em Manila, Filipinas, durante o curso da epidemia de FHD (HAMMON *et al*., 1960 apud HENCHAL & PUTNAK, 1990, p. 385).

Em decorrência das perturbações ambientais resultantes do desenvolvimento da economia e urbanização intensa e desordenada do sudeste da Ásia, a partir da Segunda Guerra Mundial, foi observado um aumento na incidência de doenças transmitidas por vetores artrópodes, o que favoreceu o início da pandemia global de dengue (GUBLER, 1997). O Sudeste Asiático representava a região do mundo mais atingida pela dengue, até a metade da década de 1990. Desde então, os países das Américas Central e do Sul começaram a se destacar nesse cenário e passaram a contribuir com mais da metade dos casos notificados dessa doença no mundo (BARRETO & TEIXEIRA, 2008).

No Brasil, a primeira epidemia de dengue, com confirmação clínica e laboratorial, ocorreu em 1982 na cidade de Boa Vista, Roraima, onde foram identificados os sorotipos DENV-1 e DENV-4 (OSANAI *et al.*, 1983). Em 1986 ocorreu a reintrodução do DENV-1 no país, mais precisamente no Rio de Janeiro, resultando na disseminação pelo Brasil (SCHATZMAYR *et al.*, 1986). A introdução do DENV-2 se deu a partir do ano de 1990 (TEIXEIRA & BARRETO, 1999). O DENV-3 foi detectado no Brasil no final do ano 2000, sendo predominante na maioria dos estados brasileiros de 2002 a 2009 (NOGUEIRA *et al.*, 2001; LOPES *et al.*, 2014.).

De acordo com a Organização Pan-Americana da Saúde, em 2015 o Brasil contribuiu com 85% do número total de casos de dengue no continente americano. No período compreendido entre janeiro e julho de 2016, o país foi responsável por 67% dos casos confirmados em laboratório e notificados nas Américas, 13% dos casos graves e 47% dos óbitos por dengue. Nesse período, apesar de grande parte das amostras processadas para isolamento viral terem sido positivas para o DENV-1, constatou-se a circulação simultânea dos quatro sorotipos do DENV no país (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2015, 2016; BRASIL, 2016).

De acordo com dados do Ministério da Saúde, até a Semana Epidemiológica que ocorreu entre 03/01/2016 a 11/06/2016, já haviam sido registrados mais de 1,3 milhões de casos prováveis de dengue no Brasil, onde a análise da taxa de incidência demonstrou que as regiões Centro-Oeste e Sudeste apresentaram as maiores taxas, com 949,9 casos/100 mil habitantes e 940,6 casos/100 mil habitantes, respectivamente. O estado de Goiás, apesar de ter apresentado uma queda de 40,3% no número de casos, em relação ao mesmo período do ano de 2015, ainda contribui com 56,8% das notificações na região Centro-Oeste (BRASIL, 2016).

1.2 Aspectos Moleculares do Vírus da Dengue

1.2.1 Estrutura viral e genoma

O vírus da dengue pertence ao gênero *Flavivirus*, família Flaviridae (WESTAWAY, 1985). As partículas virais do DENV, assim como outros *Flavivirus*, são esféricas, com um diâmetro entre 50 e 55 nm, sendo revestidas por um capsídeo proteico (C) com simetria icosaédrica, envolvido por um envelope lipídico onde estão inseridas as proteínas de membrana (M) e espículas de natureza glicoproteica (E) (Figura 1.1a). A estrutura viral é composta de 6% de RNA, 67% de proteína, 9% de carboidratos e 18% de lipídios (RUSSEL *et al*., 1980).

As propriedades biológicas importantes do DENV, incluindo ligação a um receptor de membrana, hemaglutinação de células sanguíneas, indução de anticorpos neutralizantes e a resposta imune protetora, estão associados com a glicoproteína E (GUZMAN *et al*., 2010).

O RNA viral (Figura 1.1b) é senso positivo, contendo aproximadamente 11 Kilobases (Kb) de comprimento, com elementos sinalizadores importantes na regulação de processos fundamentais do ciclo de vida viral. Este genoma possui uma única sequência codificante (*open reading frame* – ORF) flanqueada por duas regiões não traduzidas denominadas 5´ e 3´ UTRs (*untranslated regions*), com aproximadamente 100 e 600 nucleotídeos, respectivamente. Essas regiões não codificadoras possuem sequências conservadas e estruturas secundárias de RNA que direcionam os processos de

amplificação genômica, tradução e empacotamento viral (CHAMBERS *et al*., 1990; ALVAREZ *et al*., 2005b).

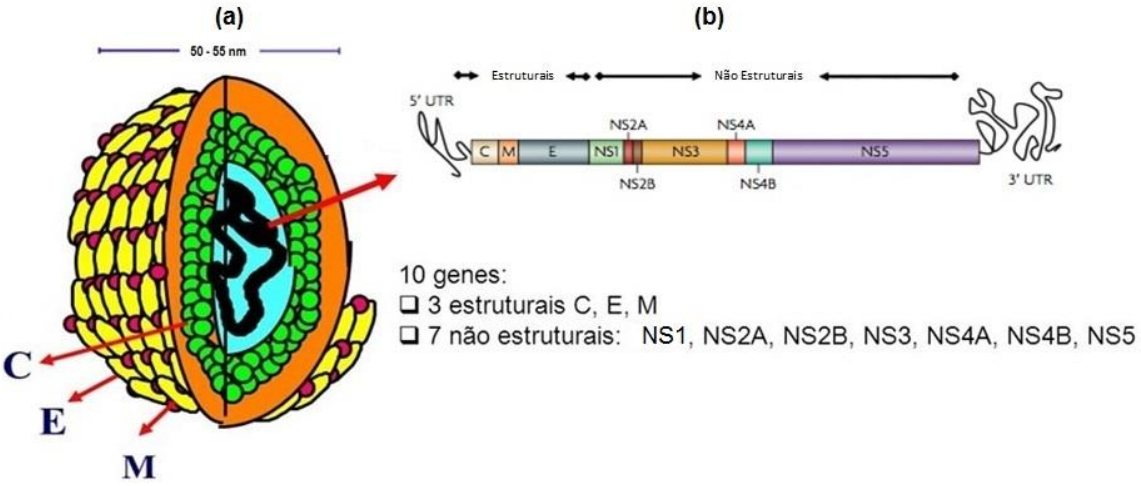

FIGURA 1.1: Representação esquemática da partícula viral e do genoma do DENV. (a) Organização estrutural da partícula do vírus; (b) Organização do genoma do DENV, com a representação das regiões 5' e 3'UTR, e a ORF que codifica três proteínas estruturais: capsídeo (C), membrana (M) e envelope de glicoproteínas (E), e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). Adaptado de Guzman *et al.*, 2010.

A região codificante é traduzida em uma poliproteína que é posteriormente clivada, por proteases celulares e serino proteases, em três proteínas estruturais (capsídeo, membrana e envelope) e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5), importantes para a replicação viral e processamento do polipeptídeo (CHAMBERS *et al.*, 1990; ALESHIN *et al*., 2007).

*1.2.2 Regiões não traduzidas 5' e 3'*UTR

A estrutura secundária da 5´UTR (Figura 1.2), possui uma estrutura "cap" tipo 1 (resíduo 7-metil-guanosina ligado a um trifosfato) seguida por uma sequência de nucleotídeos conservada 5'-AG-3' (ZHOU *et al.*, 2007). Em sua estrutura, apresenta hastes (*stem*) com uma pequena alça (*loop*) no topo, devido a complementariedade das sequências de nucleotídeos, onde ocorre o emparelhamento de pares de bases e um *loop* desemparelhado.

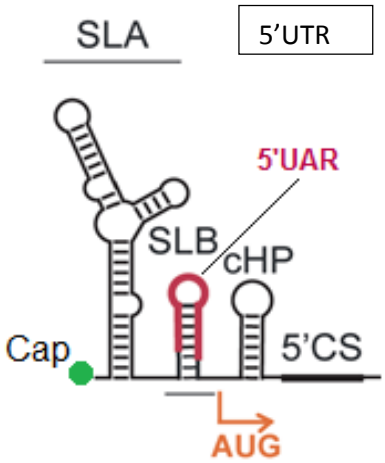

FIGURA 1.2: Representação esquemática da região 5'UTR do genoma do vírus da dengue. É constituída por estruturas conformacionais *steam loops* SLA, SLB (que termina no códon de iniciação AUG), região de codificação do capsídeo cHP e sequências conservadas 5'UAR e 5' CS. Adaptado de Iglesias & Gamarnik, 2011.

O *stem loop* A (SLA) é uma estrutura de haste longa, importante como elemento promotor reconhecido pela RdRp (*RNA-dependent RNA polymerase* NS5) para síntese de RNA (FILOMATORI *et al*., 2006). O segundo *stem loop* da região, o SLB, possui haste mais curta que termina no códon de iniciação da tradução AUG e contém uma sequência conhecida como 5'UAR, essencial para a interação RNA-RNA à longa distância e replicação do genoma, uma vez que é complementar a sequência 3'UAR localizada na outra extremidade do genoma (BRINTON & DISPOTO, 1988; ALVAREZ *et al.,* 2005b). O *hairpin* cHP (*capsid-coding region hairpin*) é a região de codificação do capsídeo, e 5'CS (*cyclization sequence*) apresenta uma região conservada que é complementar à CS1 localizada na 3'UTR. A conservação dessa estrutura demonstra a importância da 5´UTR na replicação do vírus (CAHOUR *et al*., 1995).

A região 3'UTR (terminal não poliadenilado) (Figura 1.3) pode ser dividida em 3 domínios. O domínio I é a região mais variável e está localizado logo após o codon de parada de tradução. O seu tamanho é muito variável entre os sorotipos, podendo apresentar aumento de 120 ou redução de 50 nucleotídeos (ALVAREZ *et al.,* 2005a).

O domínio II possui uma estrutura característica denominada haltere (DB), duplicada (DB1 e DB2). Os elementos de DB contêm sequências conservadas que são nomeadas CS2 (*complementary or cyclization sequences*)

e RCS2 (repetição de CS2) presentes nos flavivírus transmitidos por mosquitos (GEBHARD *et al*., 2011).

O domínio III é a região mais conservada da 3'-UTR. Apresenta uma sequência de 25 nucleotídeos denominada CS1, a qual é bem conservada entre os quatro sorotipos virais e é complementar à 5'CS (KOFLER *et al*., 2006). A estrutura conhecida como 3'SL (*stem loop*) é bem conservada entre todos os membros da família *Flaviviridae* e crítica para os mecanismos de replicação viral, a qual contém a sequência 3'UAR que é complementar à 5'UAR (BRINTON *et al*., 1986; YU & MARKOFF, 2005).

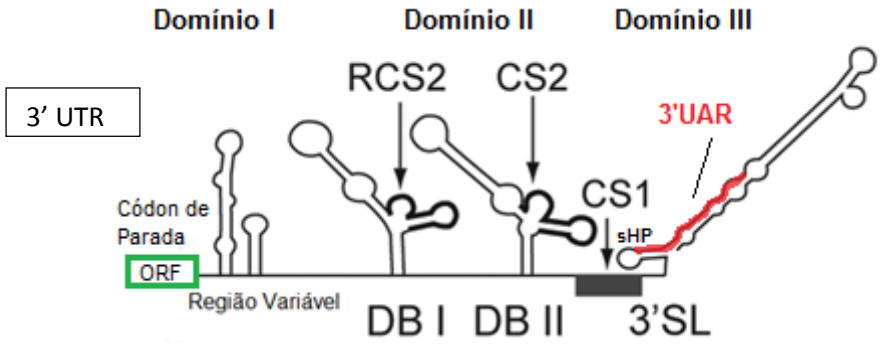

FIGURA 1.3: Representação esquemática da região 3'UTR do genoma do DENV. É dividida em três domínios, sendo: domínio I (região variável), domínio II (estruturas com halteres, DBI e DBII e sequências conservadas RCS2 e CS2), domínio III (regiões conservadas CS1, 3'SL e 3'UAR). Adaptado de Iglesias & Gamarnik, 2011.

Estudos sugerem que a 3'UTR forma estruturas secundárias conservadas que interagem com fatores nucleicos ou proteínas virais e/ou do hospedeiro formando um complexo envolvido na regulação da transcrição e replicação do RNA, podendo intensificar a eficiência da tradução (ZHOU *et al*., 2006).

1.3 Replicação Viral

Após a introdução do DENV no hospedeiro, inicia-se o ciclo de replicação viral, que consiste no desencadeamento de uma série de eventos na célula hospedeira: adsorção da partícula viral, entrada no citoplasma e liberação do genoma, tradução, replicação, montagem, e liberação das novas partículas virais (Figura 1.4) (CLYDE *et al*., 2006).

O início da replicação se dá com a ligação do receptor na superfície celular, onde podem ser infectados muitos tipos de células, incluindo tecidos muscular, do sistema vascular e hematológico (SENEVIRATNE *et al.,* 2006). As interações da proteína E, e a molécula de adesão intercelular específica de células dendríticas (DC-SIGN) são essenciais para infecção dessas células e para internalização eficiente da partícula viral (WU *et al*., 2000).

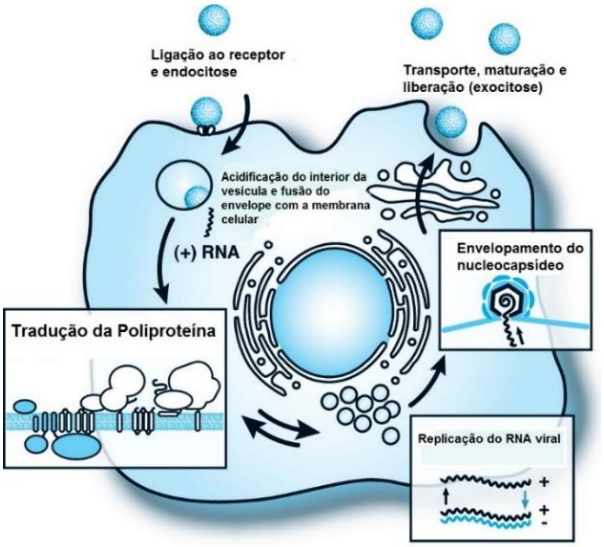

FIGURA 1.4: Representação esquemática do ciclo de replicação viral. A partícula viral é endocitada depois de se ligar a receptores celulares. Após a liberação do genoma viral no citoplasma, iniciam-se os processos de replicação, montagem, maturação e liberação da nova partícula viral formada. Adaptado de Lindenbach *et al*., 2007.

Os vírus são endocitados por clatrinas e transportados em vesículas endossomais. À medida que a vesícula vai sendo transportada, o seu interior é gradualmente acidificado. O baixo pH do endossoma induz a fusão do envelope do vírus com membranas celulares, provocando mudanças conformacionais na proteína E, ocorrendo a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma. Nesse ambiente, o genoma viral é traduzido como um RNAm da célula numa atividade polirribossomal, inicialmente livre no citoplasma, dando início à tradução da poliproteína viral (LINDENBACH *et al*., 2007).

Após a infecção, o genoma de entrada serve como RNAm para tradução, molde para a síntese de RNA e substrato para a encapsidação. Deve haver regulação para que haja utilização eficiente do genoma durante esses processos e garantir a propagação viral. Esta regulação se dá por elementos de RNA presentes nas regiões codificantes e não codificantes do genoma, na

qualidade de promotores, intensificadores e repressores, dos processos virais (IGLESIAS & GAMARNIK, 2011). Além disso, durante a infecção, o RNA atua em mecanismos para evitar a resposta antiviral do hospedeiro, como a camuflagem de sua identidade por meio de mutações em seu conteúdo de ácidos nucleicos.

A capacidade mutagênica viral limita a ação do sistema imune, uma vez que diversos mecanismos de controle de infecção viral, como o reconhecimento pelos receptores do tipo Toll (TLR: *toll-like receptors*) para produção de anticorpos ou mesmo a resposta imune mediada por apresentação de antígenos, dependem do reconhecimento dos padrões proteicos presentes nos vírus pelo sistema imunológico (LORENZI & CASTELO, 2011).

Depois de produzir as proteínas virais, são formados os complexos de replicação do RNA genômico e as fitas de RNA intermediárias de polaridade negativa, que servem de molde para a produção de novas fitas de RNA positivas (CLYDE *et al*., 2006). As cópias de RNA viral podem ser detectadas a partir de 3 horas após a infecção (LINDENBACH *et al*., 2007).

O ciclo de replicação é finalizado com a montagem de novas partículas virais, próximo ao retículo endoplasmático, onde o nucleocapsídeo é envelopado. A progênie viral é transportada pelo sistema de Golgi, em vesículas, até a membrana plasmática e as partículas virais são liberadas para o meio extracelular pelo mecanismo de exocitose, após a maturação (LOPES *et al*., 2014).

1.4 Diagnóstico Laboratorial de Infecção por DENV

A infecção pelo vírus da dengue possui um amplo espectro de apresentações clínicas, variando desde a doença febril leve a várias síndromes graves. Os principais sintomas podem incluir febre, dor retro-orbital, mialgia, dor de cabeça intensa, artralgia e manifestações hemorrágicas como sangramento nasal e gengival e pequenas manchas vermelhas na pele (LOPES *et al*., 2014). Dessa forma, a observação clínica, bem como dados epidemiológicos, são importantes para o diagnóstico, mas, por não oferecerem precisão são necessários testes laboratoriais para que a infecção possa ser confirmada (GUZMAN *et al*., 2010), viabilizando os cuidados adequados para cada caso,

bem como o suporte à vigilância (alertas de epidemias), estudos de patogênese e pesquisas de vacinas (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 2016).

O estabelecimento de um diagnóstico sistemático e específico de dengue no laboratório pode ser feito por técnicas de isolamento viral, métodos sorológicos, e/ou métodos moleculares (GUBLER, 1998).

1.4.1 Isolamento viral

Essa técnica é feita a partir da inoculação de sangue do paciente, até cinco dias após o início da febre (viremia), em linhagens celulares de mosquitos. As células clone C6/36 de *Aedes albopictus* são as mais utilizadas por serem mais econômicas e também por possuírem uma boa sensibilidade, embora células de outros mosquitos (tais como *Aedes pseudoscutellaris* AP-61) (KUNO *et al*., 1981; KUNO, 1983) e de mamíferos (Vero, LLC-MK2 e células BHK21) também possam ser utilizadas (PHANTHANAWIBOON *et al*., 2014). Após um período de incubação que permita a replicação do vírus, os mesmos são isolados, identificados e sorotipados, geralmente por imunofluorescência, utilizando anticorpos monoclonais sorotipos-específicos (GUZMAN *et al*., 2010).

Geralmente, o isolamento do vírus é feito a partir do soro, mas o plasma, os leucócitos, sangue completo ou tecidos provenientes de autópsia, também podem ser utilizados (GUZMAN *et al*., 1999; ROSEN *et al*., 1999). Apesar desse método apresentar alta sensibilidade, os resultados demoram vários dias para serem obtidos, o que representa uma grande desvantagem dessa técnica.

1.4.2 Testes sorológicos

Os ensaios sorológicos são amplamente utilizados para diagnóstico de infecção por DENV, uma vez que são métodos relativamente mais baratos e de mais fácil execução, quando comparados às culturas celulares e técnicas baseadas em ácidos nucleicos (GUZMAN *et al*., 2010).

Existem várias técnicas sorológicas utilizadas para diagnóstico da dengue, como os métodos de inibição de hemaglutinação (IH), fixação do

complemento (FC), teste de neutralização (TN), e ensaio imunoenzimático para captura de anticorpos IgM (imunoglobulina M) MAC ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), IgG (imunoglobulina G) ELISA. Entretanto, as três primeiras técnicas exigem coletas de amostras pareadas (aguda e convalescente) e exibem alta reatividade cruzada, o que inviabiliza a especificidade da detecção. Desse modo, os testes imunoenzimáticos de captura de IgM ou IgG são os mais utilizados (GUBLER, 1998).

Os anticorpos da classe IgM podem ser capturados na fase aguda, a partir do quinto dia do início dos sintomas, atingindo níveis máximos em sete a oito dias, começando a diminuir depois de um a dois meses. Já os anticorpos da classe IgG, são detectados em concentrações muito baixas a partir do quinto dia, e atingem títulos máximos em duas semanas, persistindo por dois a três anos após a infecção (GUBLER,1998; SHU *et al*., 2003).

Quando os indivíduos são infectados por dengue pela segunda vez, uma resposta imune secundária ocorre, gerando níveis elevados de IgG através da estimulação de células B de memória a partir da infecção anterior, bem como uma resposta de IgM para a infecção atual. Visto que, níveis elevados de IgG e IgM podem gerar competição na ligação com o antígeno, pode ser feito um ensaio de captura de IgM (GUZMAN *et al*., 2010).

Apesar do diagnóstico por MAC ELISA apresentar especificidade e seletividade acima de 90% em amostras recolhidas após cinco dias de sintomas, a partir da análise do soro (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 1994) e de sangue total em papel de filtro (VAZQUEZ *et al*., 1998; HERRERA *et al*., 2006), esse ensaio pode apresentar falso positivo devido à IgG específico de dengue e reações cruzadas com outros flavivírus, principalmente em regiões onde existe a circulação de vários flavivírus (GUZMAN *et al*., 2010).

Outra forma de diagnóstico sorológico para a dengue é a detecção de antígeno NS1, uma glicoproteína não estrutural produzida por flavivírus, a qual é expressa na superfície das células infectadas e secretada na circulação sanguínea, podendo ser detectada (GUBLER, 1998). Estes testes não diferenciam os sorotipos e incluem antígeno-ELISA de captura, detecção de antígeno por fluxo lateral e medição de respostas IgM e IgG específicos de NS1. Apesar de já existirem diversos kits disponíveis comercialmente, ainda são

necessários estudos adicionais para obtenção de métodos diagnósticos mais rápidos, sensíveis e específicos (XU *et al*., 2006).

1.4.3 Testes moleculares

Para diagnóstico rápido de infecções por DENV, têm sido utilizadas técnicas baseadas na detecção do RNA viral em soro de paciente no período virêmico. Entre os métodos mais utilizados, inclui-se a transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) convencional. A reação envolve a transcrição reversa seguida de amplificação, utilizando iniciadores (*primers*) que tem como alvo uma região específica e conservada do genoma do vírus. Os produtos obtidos nessa reação podem ser analisados por eletroforese em gel de agarose, poliacrilamida ou sistemas fluorescentes. Essa técnica permite a diferenciação dos sorotipos do vírus, pela utilização de *primers* específicos (KAO *et al*., 2001).

Esse método oferece alta sensibilidade e especificidade para o resultado, porém necessita de várias etapas em sua execução, o que o torna laborioso e passível de contaminação com o próprio produto de amplificação. De acordo com Raengsakulrach e cols. (2002), a sensibilidade dos ensaios de RT-PCR, em comparação com o isolamento do vírus em cultura de células de mosquito varia entre 25% e 79%.

A aplicação de técnicas de fluorescência à RT-PCR juntamente com uma plataforma de instrumentação adequada, capaz de combinar amplificação, detecção e quantificação, permitiu o desenvolvimento de uma variação desse método, denominado RT-PCR em Tempo Real ou RT-qPCR.

A RT-PCR em Tempo Real tem sido largamente utilizada para o diagnóstico de dengue (CHIEN *et al*., 2006; DOS SANTOS *et al*., 2008; ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 2016).

Najioullah e cols. (2014) avaliaram quatro kits comerciais de RT-PCR em Tempo Real para detecção de DENV em amostras clínicas, e apenas um dos kits apresentou resultado em concordância com o ensaio padrão-ouro hemi-nested de Lanciotti, demonstrando 90% de eficácia. Desse modo, embora já tenha sido comprovado que a técnica RT-qPCR possibilita rapidez e

sensibilidade para o diagnóstico de dengue, são necessários estudos clínicos mais rigorosos antes da liberação desses kits para comercialização.

1.5 Vacinas Contra Dengue

O desenvolvimento da vacina contra dengue enfrenta grandes desafios devido a existência de quatro sorotipos patogênicos que competem e interagem no nível imunológico e a falta de um modelo animal para dengue.

Em dezembro de 2015, a vacina Dengvaxia® (CYD-TDV), produzida pela empresa francesa Sanofi Pasteur, teve seu registro aprovado no Brasil pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A vacina, que é indicada para pessoas entre 9 e 45 anos e protege contra os quatro sorotipos do DENV, é a primeira a ser licenciada no Brasil e está disponível apenas na rede particular de laboratórios. A Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS vai avaliar o custo, efetividade e impactos epidemiológico e orçamentário da incorporação da vacina ao sistema público de imunizações (PORTAL BRASIL, 2016).

A CYD-TDV foi avaliada em dois ensaios clínicos de Fase III (CYD14 em cinco países da Ásia e CYD15 em cinco países da América Latina), resultando na inclusão de mais de 35.000 participantes com idade entre 2 e 16 anos. Nos ensaios, os participantes foram distribuídos aleatoriamente para vacina e placebo numa proporção de 2:1. O estudo incluiu uma fase ativa de acompanhamento por um ano após a última dose da vacina na série e um período de acompanhamento de base hospitalar de quatro anos adicionais, o que está em curso. A eficácia dessa vacina apresentou variação por sorotipo, sendo maior para os sorotipos 3 e 4, consistindo em 71,6% e 76,9% respectivamente. Para os sorotipos 1 e 2 a eficácia apresentada foi de 54,7% e 43,0%. A eficiência da vacinação também variou por faixa etária e ocorrência de exposição prévia à dengue antes da vacinação (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

Em fevereiro de 2016, uma outra vacina (TV003) entrou em teste no Brasil, após ter atingido proteção eficaz em 21 voluntários de um ensaio clínico realizado nos Estados Unidos (KIRKPATRICK *et al.*, 2016). A TV003 foi produzida por cientistas do laboratório de Stephen Whitehead, do Instituto

Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas (NIAID) dos Estados Unidos. O Instituto Butantan licenciou a tecnologia da vacina e deu início aos testes clínicos no Brasil, que se encontram no momento na última fase (III), para determinar se a vacina candidata oferece proteção contra os quatro sorotipos virais e obter informações sobre sua segurança. A previsão de duração desses testes é de cinco anos e, só a partir de então, se aprovada, é que a vacina poderá ser liberada para imunização em massa (NIH, 2016).

Em um cenário de preocupação mundial, onde a propagação de dengue é contínua e crescente, o fracasso no controle do mosquito vetor, a inexistência de drogas eficazes para o tratamento de infecções por DENV, a pequena quantidade de vacinas existentes e ainda em fase de testes e a possibilidade de aumento da eficácia e sensibilidade dos métodos de diagnóstico, são fatores importantes que indicam os grandes desafios persistentes no estudo da dengue. Assim, se torna extremamente necessário o aprimoramento e desenvolvimento de técnicas mais sensíveis e específicas para aplicação em diagnóstico e tratamento da doença.

A Química Combinatória (QC) é atualmente uma das mais promissoras ferramentas biotecnológicas para a descoberta e o desenvolvimento de novas moléculas com potencialidades terapêuticas (AMARAL *et al*., 2003). É caracterizada pela síntese e pesquisa simultânea de grandes bibliotecas, para identificação de compostos e isolamento de moléculas funcionais. Os ácidos nucleicos são macromoléculas atrativas para esse fim, uma vez que são capazes de se conformar em estruturas tridimensionais bem definidas e podem ser amplificados por síntese enzimática (SUNDARAM *et al*., 2013).

A seleção de uma classe de ácidos nucleicos funcionais, denominados aptâmeros, a partir de uma biblioteca combinatória tem sido feita, provando ser uma ferramenta versátil em pesquisa biomédica e constituindo um campo vasto e importante da biotecnologia atualmente (RADOM *et al*., 2013).

1.6 Aptâmeros

1.6.1 Aspectos gerais

O termo aptâmero é derivado da palavra latina "*aptus*" que significa encaixe e da palavra grega "*meros*" - partes. Os aptâmeros são peptídeos ou oligonucleotídeos provenientes de RNA ou DNA (ssDNA – *single strand* DNA), de cadeia simples e curta (oligonucleotídeos), selecionados, *in vitro,* para se ligarem a alvos específicos com elevada afinidade e seletividade, já que conseguem se dobrar em estruturas secundárias e terciárias bem definidas (MENCIN *et al*., 2014). Podem apresentar estruturas tridimensionais específicas e complexas (Figura 1.5), caracterizadas por hastes, *loops*, protuberâncias, *hairpins*, pseudo-nós e quadruplex (STOLTENBURG *et al*., 2007).

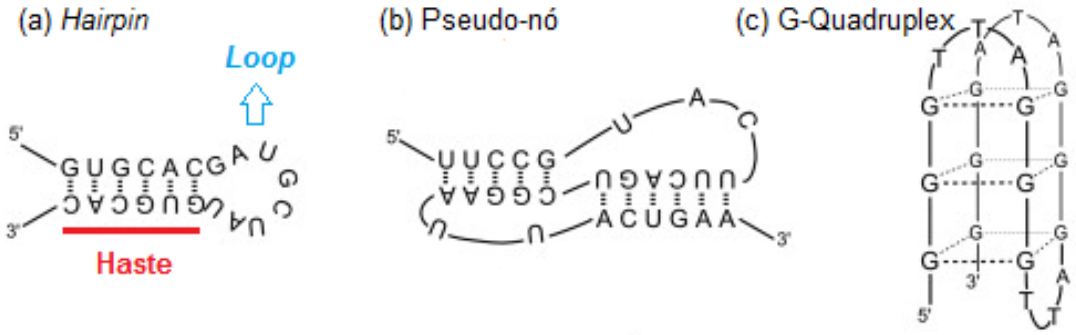

FIGURA 1.5: Representação esquemática de estruturas secundárias comumente observadas em aptâmeros: *Hairpin* (a), pseudo-nó (b), G-quadruplex (c). Adaptado de Radom *et al*., 2013.

Esses oligonucleotídeos apresentam variação em tamanho de 20 a 80 bases (8 a 25 kDa) (LEVY-NISSENBAUM *et al*., 2008) e podem ser selecionados para uma grande variedade de alvos pré-definidos, incluindo íons, pequenas moléculas orgânicas, peptídeos e proteínas, células ou uma infinidade de microrganismos inteiros (ŠMUC *et al*., 2013).

A interação entre os aptâmeros e seus alvos (Figura 1.6) se dá por complementaridade de bases e ligações de hidrogênio, interações de emparelhamento entre compostos aromáticos das bases dos aptâmeros, interações eletrostáticas entre grupos carregados, interações de *Van der Waals*, ou de uma combinação desses efeitos. As mudanças conformacionais

adaptativas podem ocorrer na presença do alvo e na formação do complexo de ligação, onde os sítios de ligação são específicos na estrutura tridimensional (HERMANN & PATEL, 2000).

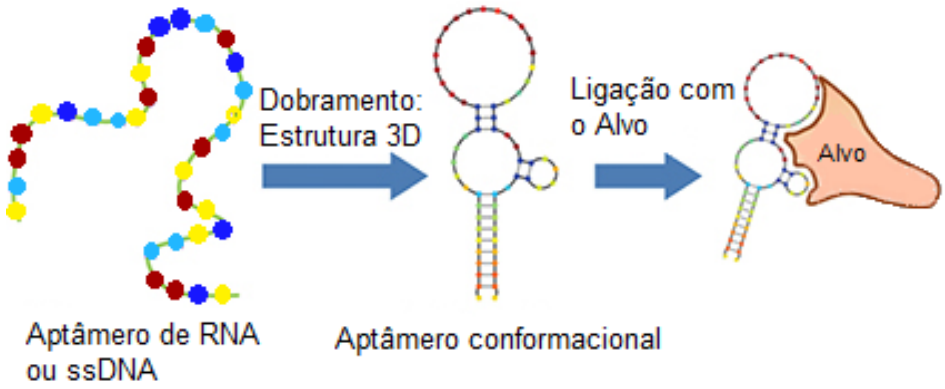

FIGURA 1.6: Representação esquemática da formação do complexo aptâmero-alvo. Após dobramento, o aptâmero forma uma estrutura tridimensional de interação com o alvo. Adaptado de Sun *et al*., 2014.

A tecnologia de seleção dos aptâmeros vem chamando atenção da comunidade cientifica, devido à aplicabilidade no diagnóstico e tratamento de doenças de preocupação mundial, tais como o câncer (HERR *et al.*, 2006; MARANGONI *et al*., 2015; WU *et al*., 2015) e infecções virais por HIV (ZHOU & ROSSI, 2011; DUCLAIR, 2015), dengue (FLETCHER *et al*., 2010; BRUNO *et al*., 2012; CNOSSEN, 2014; SILVA, 2015; CHEN *et al*., 2015), dentre outras.

Essas moléculas, além de apresentarem as vantagens dos anticorpos, ainda possuem aplicabilidade exclusivas, como:

- Alta seletividade e alta habilidade em se ligar e reconhecer alvos específicos (constante de afinidade - K_d na faixa nanomolar) se comparados a anticorpos (K_d na faixa de mili/micromolar).
- Penetram nos tecidos de maneira mais rápida e mais eficiente, devido ao seu peso molecular significativamente mais baixo (Aptâmeros: 8-25 kDa, Anticorpos: ~150 kDa).
- São biocompatíveis e praticamente não imunogênicos, *in vivo*, não sendo reconhecidos pelo sistema imunológico como agentes externos, em comparação com anticorpos, que são altamente imunogênicos, principalmente após injeções repetidas. Estudos clínicos desenvolvidos pelo grupo de estudos Eyetech demonstraram que um aptâmero específico da proteína de sinalização Fator de

Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) apresentou pouca imunogenicidade quando administrado em macacos, em doses 1.000 vezes mais elevadas (EYETECH STUDY GROUP, 2002, 2003).

- Os aptâmeros são mais estáveis termicamente, como pó ou solução, e conseguem manter sua estrutura ao longo de ciclos repetidos de desnaturação e renaturação. Como base na propriedade intrínseca dos oligonucleotídeos, após serem submetidos à desnaturação à 95 °C, conseguem retornar à sua estrutura nativa após arrefecimento.
- Existem protocolos de síntese química e tecnologia de modificação de ligação bem estabelecidos, podendo aumentar a eficiência de ligação ao alvo e reduzir suas taxas de degradação no interior da célula.
- A síntese de aptâmero em grande escala é rápida e as modificações podem ser feitas facilmente e de maneira controlada, como, por exemplo, inclusão de porções sinalizadoras por fluoróforos e *quenchers* (silenciadores), que facilitam grandemente a produção de biossensores.
- Há uma baixa variação estrutural durante a síntese química de aptâmeros, pois uma vez selecionados, podem ser sintetizados em grande quantidade com precisão e reprodutibilidade por meio de reações químicas.
- Possuem menores custos de produção a uma variedade de alvos (SONG *et al*., 2012; SUN *et al*., 2014).

Essas propriedades biológicas, físicas e químicas fazem dos aptâmeros ferramentas eficazes para diagnóstico e terapia, e para elucidação dos mecanismos de doenças (SONG *et al*., 2012).

Dentre os métodos moleculares com potencial aplicação para a seleção em larga escala de ligantes específicos a uma molécula alvo, destaca-se o SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment:* Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial). Essa técnica representa uma ferramenta útil na identificação de aptâmeros, podendo gerar alvos com potencial diagnóstico e também terapêutico para o tratamento de doenças que acometem a saúde humana, como a dengue (STOLTENBURG *et al*., 2007).

1.6.2 SELEX

Desde sua primeira descrição em 1990 (ELLINGTON & SZOSTAK, 1990; TUERK & GOLD, 1990), o método SELEX é amplamente aplicado para a seleção, *in vitro*, de aptâmeros, com elevada afinidade para um determinado alvo, a partir de uma biblioteca combinatória de ácidos nucleicos.

Em geral, o processo SELEX consiste em etapas que são repetidas a fim de selecionar sequências com maior afinidade de ligação com o alvo (Figura 1.7), sendo que cada ciclo completo é denominado *round* (SYED & PERVAIZ, 2010).

No primeiro passo, uma biblioteca randômica de oligonucleotídeos (RNA ou ssDNA) é sintetizada quimicamente para conter entre 10^{12}-10^{15} sequências que consistem em regiões de sequências aleatórias, que podem ter sua complexidade aumentada com a inserção de grupos funcionais de interesse, flanqueadas por locais conservados de ligação de iniciadores (SONG *et al*., 2012; SUN *et al*., 2014). Este passo utiliza o seguinte esquema: oligonucleotídeo com a 5'-sequência conhecida (iniciador), seguida de uma sequência aleatória (Ns), terminando com uma sequência-3’ também conhecida. A sequência conhecida varia de 18 a 22 bases e a aleatória possui entre 20-40 nucleotídeos. O iniciador 5'-senso pode ser rotulado com um fluorocromo para monitoramento do aptâmero e o iniciador 3'-anti-senso marcado com uma molécula de afinidade, como a biotina, que é utilizada para separar os oligonucleotídeos de cadeia simples gerados em cada *round* de amplificação (SUN *et al*., 2014).

Utilizando uma biblioteca de ssDNA, a mesma pode ser aplicada diretamente na seleção de aptâmeros de DNA. Por outro lado, a geração de aptâmeros de RNA requer dois passos adicionais, onde um conjunto de oligonucleotídeos aleatórios de ssDNA é gerado, e posteriormente é adicionada uma sequência promotora de transcrição, comumente a T7 para a RNA polimerase, utilizando o iniciador 5'-senso e o DNA é então utilizado como molde para a transcrição, *in vitro* (SUN *et al*., 2014).

O segundo passo do SELEX consiste na etapa de ligação, onde a biblioteca de oligonucleotídeos é aquecida e arrefecida rapidamente para promover a formação de estruturas 3D e incubada com o alvo de interesse para o enriquecimento de ligação específica.

A separação entre os componentes da biblioteca ligados ao alvo e os componentes não ligados, é feita no terceiro passo. As sequências não ligadas são eliminadas por meio de membranas, colunas, esferas magnéticas, e eletroforese capilar (MALLIKARATCHY *et al*., 2006; PAREKH *et al*., 2010; MARTIN *et al*., 2013).

No quarto passo, os componentes da biblioteca que se ligaram ao alvo são eluídos do seu sítio de ligação (separados do alvo) e replicados, *in vitro,* por PCR (aptâmeros de DNA) ou RT-PCR (aptâmeros de RNA) para criar uma nova biblioteca para ser utilizada no próximo *round* do SELEX. O número de *rounds* necessários depende das características do alvo, concentração da biblioteca, condições de seleção e eficiência do método de separação (SONG *et al.*, 2012; SUN *et al.*, 2014).

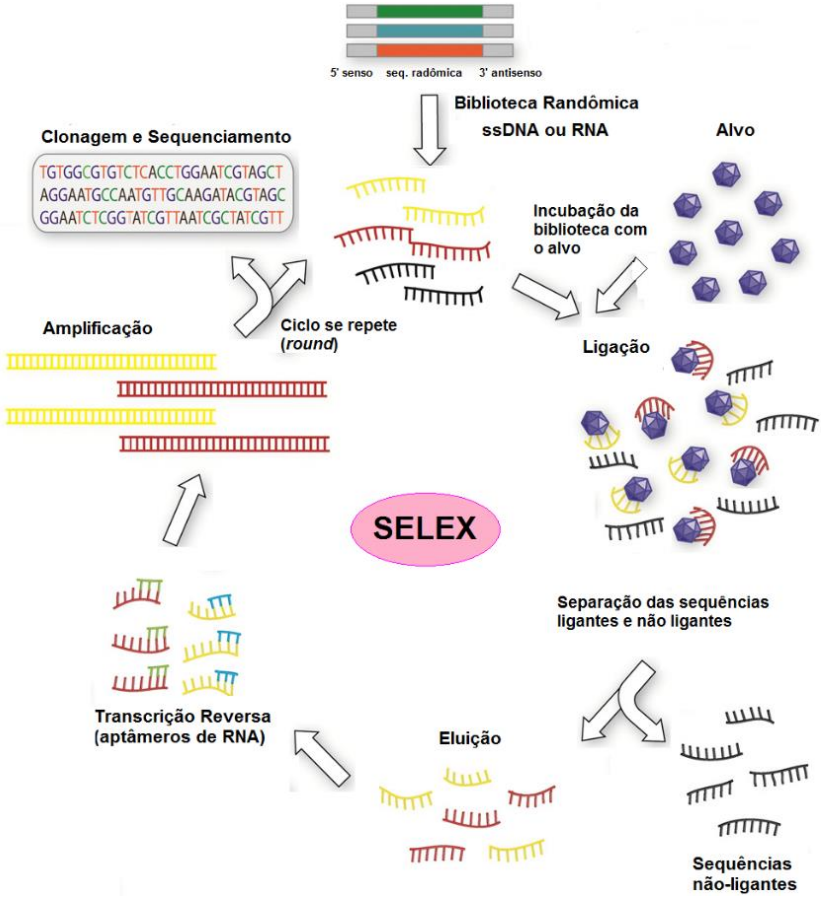

FIGURA 1.7: Representação esquemática do processo geral de seleção de aptâmeros por SELEX. Adaptado de Darmostuk *et al*., 2015.

Após o último *round*, as moléculas selecionadas são clonadas e sequenciadas de forma aleatória. A análise comparativa das sequências permite

a identificação de clones que são enriquecidos ou de locais de consenso que estão envolvidos no reconhecimento do alvo. As sequências mais promissoras são sintetizadas e estudadas.

Na maioria dos casos, os aptâmeros com constantes de dissociação na ordem de nanomolar podem ser isolados (STOLTENBURG *et al*., 2007). As sequências que se ligam aos seus alvos na ordem de picomolar também podem ser selecionadas (MOSING *et al*., 2005).

Os aptâmeros são continuamente desenvolvidos por este processo, e as suas características são identificadas utilizando vários ensaios físicos, químicos e biológicos, (SONG *et al*., 2012). Os parâmetros de seleção podem ser facilmente manipulados para obtenção de aptâmeros mais eficientes para uma ampla gama de condições (pH, temperatura ou a composição do tampão) (RADOM *et al.*, 2013).

Algumas modificações têm sido incluídas no método SELEX tradicional, como, por exemplo, a eletroforese capilar (CE), para maximizar a afinidade e especificidade, e melhorar a velocidade de seleção e taxa de sucesso aos aptâmeros selecionados (MOSING *et al.*, 2005).

1.6.3 Caracterização da interação entre a molécula alvo e aptâmero

A elevada flexibilidade da estrutura do aptâmero permite a interação do mesmo com os sítios de ligação do alvo, os quais não estão disponíveis para anticorpos. Além disso, as estruturas tridimensionais formadas proporcionam o fornecimento de encaixes para o alvo, resultando em uma elevada afinidade de ligação e especificidade. A investigação dessas estruturas conformacionais permite a compreensão da interação molecular do complexo aptâmero-alvo, dos mecanismos de afinidade de ligação e fornece parâmetros termodinâmicos e cinéticos de associação e dissociação (ŠMUC *et al*., 2013).

Após passarem pelo processo de seleção, as sequências dos aptâmeros consideradas promissoras são escolhidas para investigação mais aprofundada. A avaliação das interações entre os aptâmeros selecionados e alvo são primordiais na caracterização das regiões de ligação e proposições de especificidade do ligante. Essas interações dependem da natureza do alvo com base na sua sequência de nucleotídeos e da estrutura 3D do aptâmero e alvo,

uma vez que podem ocorrer numa ampla variedade de formas estruturais (STOLTENBURG *et al*., 2007).

Várias técnicas têm sido demonstradas na literatura para avaliação da especificidade e sensibilidade da interação entre essas moléculas, consistindo em análises físico-químicas, biológicas, colorimétricas, dentre outras. Os aptâmeros podem, por exemplo, ser transfectados para células a fim de avaliar a interação aptâmero-alvo, *in vivo*, bem como avaliar a citoxicidade do mesmo (GUO *et al*., 2014).

Além da transfecção, a afinidade de ligação das sequências selecionadas contra alvos específicos é comumente avaliada utilizando técnicas como a Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR) (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ *et al*., 2012; SHIRATORI *et al*., 2014), Espectroscopia RAMAN Amplificada por Superfície (SERS) (PAGBA *et al*., 2010; OCHSENKÜHN & CAMPBELL, 2010) e Ressonância Magnética Nuclear (NMR) (MAO *et al*., 2004; NEVES *et al*., 2010).

Os métodos colorimétricos podem ser empregados utilizando corantes orgânicos (STOJANOVIC & LANDRY, 2002), tais como em ensaios por *Dot Blot* (ZHU *et al*., 2010; WANG; YE *et al*., 2013; WANG; ZHAO *et al*., 2013) e por nanopartículas de ouro (HUANG *et al*., 2005; ZHANG *et al*., 2008).

Diversas técnicas baseadas em fluorescência também são amplamente utilizadas para esse fim, podendo ser destacadas a Espectroscopia de Correlação de Fluorescência (FCS) e Dispersão de Raios-X de Baixo Ângulo (SAXS) (WERNER *et al*., 2009), Transferência Ressonante de Energia de Fluorescência (FRET) (NAGATOISHI *et al*., 2006; LI *et al*., 2008; MAIRAL *et al*., 2014), PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR) (MARANGONI *et al*., 2015, MARTON *et al*., 2016) e Citometria de Fluxo (HERR *et al*., 2006).

1.7 Técnica Colorimétrica: *Dot Blot*

A hibridização por *dot blo*t é uma técnica utilizada para a avaliação rápida da afinidade de interação entre ácidos nucleicos. O DNA, que possui cargas negativas em sua superfície, é imobilizado por meio de interação eletrostática em uma membrana carregada positivamente e detectado pela

hibridização com uma sonda (sequência específica) marcada com um fluoróforo ou enzima (LARA, 2002).

Existem uma grande variedade de enzimas cuja atividade pode ser detectada através de mudanças visuais decorrentes da reação por elas catalisadas a partir de substratos naturais ou artificiais. As fosfatases (extraídas de intestino bovino) e as peroxidades (extraídas de raiz-forte), são as enzimas mais empregadas por serem estáveis e de menor custo. No caso dessas enzimas, são utilizados substratos artificiais cujo produto, a partir da reação catalisada, é passível de detecção, como o BCIP (Fosfato de bromo-cloro indolila) juntamente com o NBT (Azul de nitro-tetrazólio) (LARA, 2002; THERMO SCIENTIFIC, 2012).

As sondas são comumente marcadas com biotina (vitamina H), que se liga à proteina estreptavidina (extraída de *Streptococus*). De acordo com Lara (2002), a ligação entre a biotina e a estreptavidina é a interação não covalente biológica mais forte conhecida, apresentando K_d ~10^{-15} M. A formação do complexo é um processo muito rápido e, depois de formado, não é afetado por fatores externos. A estreptavidina é acoplada com a fosfatase alcalina (AP), que na presença do substrato, produz um sinal quimiluminescente ou colorimétrico (Figura 1.8). Desse modo, esse conjugado é amplamente empregado na detecção de ácidos nucleicos biotinilados.

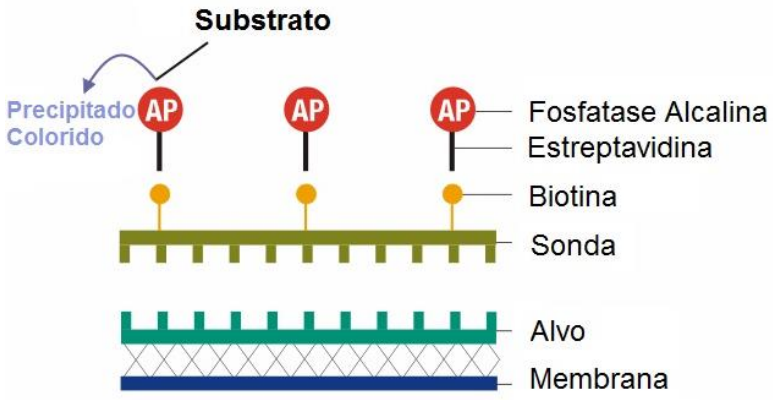

FIGURA 1.8: Representação esquemática do funcionamento do teste de hibridização por *dot blot*. A estreptavidina, conjugada com a fosfatase alcalina, se liga com a biotina incorporada a sonda. Ao adicionar o substrato (que reage com a AP), se a sonda tiver se ligado ao alvo plotado na membrana, irá marcar a membrana, e dessa forma, verifica-se a afinidade de interação entre a sonda e o alvo. Adaptado de Thermo Scientific, 2012.

Na detecção a partir da reação colorimétrica de NBT/BCIP, a fosfatase alcalina cliva o substrato BCIP, o qual é suplementado com o cromogênio intensificador de NBT. Isto resulta na formação de um precipitado azul insolúvel, que aparece como uma mancha bem definida ou banda no local de reação sobre a membrana (THERMO SCIENTIFIC, 2012).

1.8 Técnicas Baseadas em Fluorescência: PCR em Tempo Real e FRET

1.8.1 O fenômeno da fluorescência

As técnicas experimentais fundamentadas no fenômeno da fluorescência têm se tornado populares em muitos ramos das ciências químicas e biológicas. Atualmente, são ferramentas importantes em estudos da estrutura e interação entre moléculas.

A emissão de luz por alguma substância, ocorrendo a partir de estados eletrônicos excitados, é chamada *Luminescência*, a qual é dividida em duas categorias dependendo da natureza do estado excitado: a fluorescência e a fosforescência. A fluorescência ocorre se o estado excitado envolvido é o singleto, onde o spin do elétron no orbital excitado mantém sua orientação original. Assim, o retorno ao estado fundamental é permitido e ocorre rapidamente via emissão de fóton. A taxa de emissão de fluorescência é tipicamente da ordem de 10^8 s^{-1} e o tempo de vida de fluorescência típico é da ordem de 10^{-9} s (LAKOWICZ, 2006).

A fosforescência é a emissão de luz a partir de um estado excitado tripleto, onde a orientação do elétron que foi promovido ao estado excitado é invertida. As transições para o estado fundamental são proibidas, as taxas de emissão mais lentas (10^3-10^0 s^{-1}) e os tempos de vida mais longos (GUILBAULT, 1990).

Desse modo, a fluorescência é intrinsicamente um fenômeno luminescente mais comum que a fosforescência e compete de forma eficiente com processos de desativação não-radiativos do estado excitado. Por esse motivo, é possível observar facilmente fluorescência na temperatura ambiente e diretamente em solução, o que viabiliza o procedimento experimental fluorimétrico (MAXWELL, 2010).

Os fluoróforos, ou fluorocromos, são corantes que emitem luz após serem excitados. No estudo de biomoléculas, os fluoróforos utilizados absorvem e emitem radiação na região do UV-visível. Essas moléculas podem ser classificadas como intrínsecas ou extrínsecas, sendo que, fluoróforos intrínsecos são aqueles que ocorrem naturalmente, enquanto os extrínsecos são aqueles adicionados a uma amostra que não possui as propriedades espectrais desejadas (LAKOWICZ, 2006).

Geralmente, a emissão de luz pelos fluoróforos ocorre na faixa de comprimentos de onda do espectro visível e o seu tempo de vida é a média de tempo que ele passa no seu estado excitado, antes de retornar ao estado fundamental. Em compostos orgânicos, as estruturas aromáticas são responsáveis pelo fenômeno da fluorescência (AMORIM, 2012).

Os espectros de fluorescência são comumente demonstrados como espectro de emissão, o qual corresponde a uma curva de intensidade de fluorescência (I) *versus* comprimento de onda (λ) em nanômetros ou número de onda (cm^{-1}) (LAKOWICZ, 2006). O comportamento do espectro de emissão apresenta alta sensibilidade à estrutura química dos fluoróforos e polaridade do solvente (MAXWELL, 2010).

1.8.2 PCR em tempo real

A PCR em Tempo Real ou qPCR (quantitativa), assim como a convencional, possibilita a amplificação de fragmentos genômicos. Todavia, são utilizados marcadores fluorescentes (fluoróforos) que proporcionam o acompanhamento da reação ao longo dos ciclos e a detecção dos produtos é feita diretamente na plataforma de instrumentação, que contém um termociclador com sistema ótico para excitação da fluorescência e captação da emissão e um computador com um *software* para aquisição de dados e análise da reação (NOVAIS & PIRES-ALVES, 2004).

A emissão dos compostos fluorescentes gera um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR. A detecção do produto amplificado pode ser realizada utilizando *molecular beacons,* sondas de hidrólise, sondas de hibridização e corantes intercalantes (WATZINGER *et al.*, 2006).

Na qPCR, é gerado um gráfico em tempo real (Figura 1.9) que relaciona os ciclos de termociclagem com a intensidade da fluorescência emitida durante a amplificação do DNA nas amostras. É traçada uma linha de maneira paralela ao eixo referente ao número de ciclos (abcissa), na altura onde há o início da fase exponencial da amplificação. Esse parâmetro representa o número mínimo de ciclos para a amplificação (limiar de detecção), sendo denominado *threshold* (MACKAY *et al*., 2002).

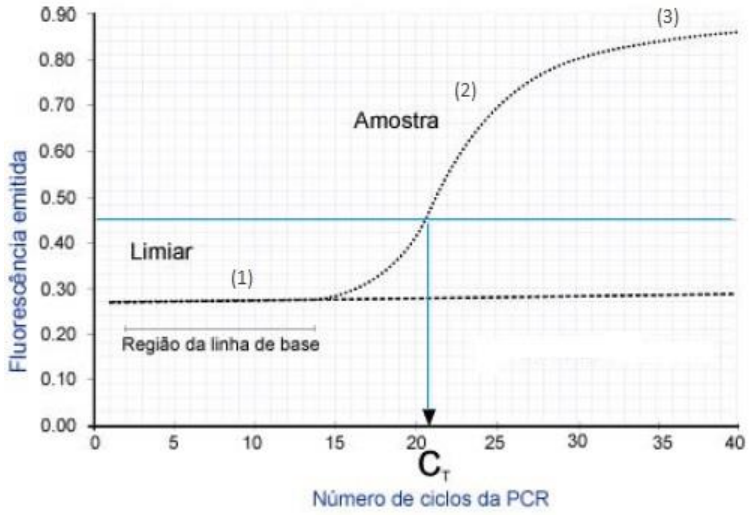

FIGURA 1.9: Curva de amplificação da PCR em Tempo Real. C_T – Cycle Threshold. A amplificação mostra três fases distintas, (1) linha basal: não houve produtos da PCR suficientes para detectar a fluorescência; (2) fase log: a quantidade de produtos da PCR dobra a cada ciclo e (3) fase platô: não há mais aumento na quantidade de produto. Adaptado de Novais & Pires-Alves, 2004.

O ponto em que o *threshold* cruza com a linha de amplificação da amostra em fase exponencial, possibilita a determinação do número de ciclos necessários para o início da amplificação da sequência alvo presente na amostra. Esse valor é denominado Ct (*Cycle threshold*) e permite a quantificação relativa do DNA de cada amostra, após a correção pelos Ct dos genes-controle endógenos e das amostras controle. O Ct é proporcional ao número de cópias do alvo presente na amostra (NASCIMENTO *et al*., 2010).

Devido à diminuição do número de etapas pela realização da amplificação de ácidos nucleicos e detecção do produto amplificado em um único tubo, a PCR em Tempo Real proporciona inúmeras vantagens na utilização dessa técnica como ferramenta na pesquisa e diagnóstico. O risco de

contaminação cruzada é reduzido, o tempo necessário para execução da técnica é mais curto e a manipulação das amostras é menor, permitindo resultados rápidos associados à excelente sensibilidade e especificidade (CHIEN *et al*., 2006; NASCIMENTO *et al*., 2010).

1.8.3 Transferência ressonante de energia de fluorescência (FRET)

1.8.3.1 Transferência de energia

O fenômeno da transferência de energia, em que se baseia a técnica FRET, foi descrito pela primeira vez por Theodor Förster, na década de 50. Essa técnica é importante para o entendimento de alguns sistemas biológicos e está sendo cada vez mais utilizada em pesquisas biomédicas, no desenvolvimento de sensores para diagnóstico de doenças, descoberta de medicamentos, imageamento óptico, entre outros. Possibilita a medição de distâncias em escalas nanométricas e alterações nas distâncias, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Devido à sua sensibilidade à distância, a técnica FRET é aplicada na investigação de interações em nível molecular (HUSSAIN, 2007; PIETRASZEWSKA-BOGIEL & GADELLA, 2011).

Os métodos baseados em FRET para a detecção de ácidos nucleicos têm sido investigados em pesquisas envolvendo *molecular beacons* (JOCKUSH *et al*., 2006), sondas duplex (KONG *et al*., 2003) e ensaios de polarização de fluorescência (KWOK, 2002). Recentes avanços na técnica levaram a melhorias qualitativas e quantitativas, incluindo o aumento da resolução espacial, faixa de distância e sensibilidade (HUSSAIN, 2007).

O fenômeno eletrodinâmico FRET pode ser explicado pela física clássica. Envolve um mecanismo, por meio do qual, ocorre a transferência de energia de forma não radiativa entre um fluoróforo doador (D), excitado pela incidência de luz, para um cromóforo aceitador (A), no estado fundamental, através de interações dipolo-dipolo de longo alcance (MASSEY *et al*., 2006). As moléculas doadoras emitem em comprimentos de onda que se sobrepõem ao espectro de absorção da molécula aceitadora (Figura 1.10).

A transferência de energia se manifesta pela diminuição ou extinção da fluorescência do doador e uma redução do tempo de vida do estado

excitado, acompanhada também por um aumento na intensidade de fluorescência do aceitador, se este for fluorescente (HELD, 2012).

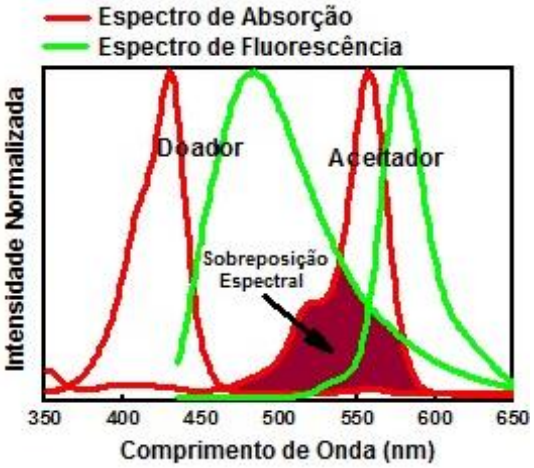

FIGURA 1.10: Representação de um espectro de absorção e emissão ideal de um par doador-aceitador para ensaios por FRET. Para que ocorra a transferência de energia deve haver sobreposição entre o espectro de fluorescência da molécula doadora e o espectro de absorção da molécula aceitadora. Adaptado de Hussain, 2007.

Os processos de absorção e emissão que ocorrem no processo de FRET são ilustrados pelo diagrama de Jablonski, apresentado de forma simplificada na Figura 1.11. No diagrama, pode-se observar que a energia de emissão é menor que a energia de absorção. Diz-se então que a fluorescência ocorre em energias menores ou comprimentos de onda maiores. A diferença de energia entre a excitação e a emissão é observada de maneira universal para todas as moléculas fluorescentes em solução.

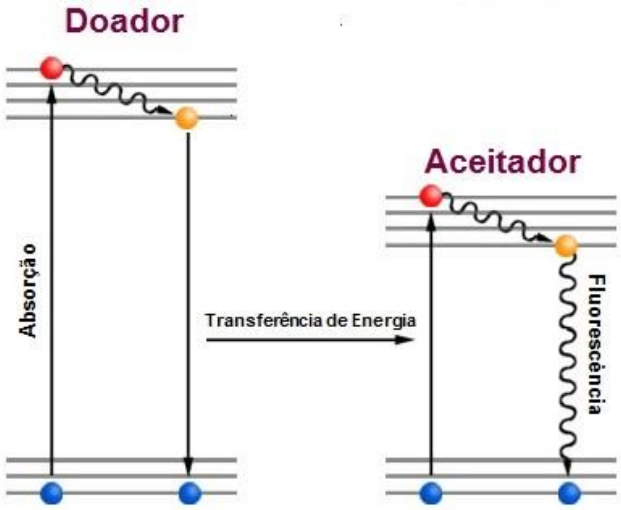

FIGURA 1.11: Diagrama de Jablonski simplificado ilustrando o processo de FRET. Adaptado de Hussain, 2007.

O fenômeno de FRET não é mediado por emissões e reabsorções de fótons, e não requer que o cromóforo aceitador seja fluorescente, apesar de serem utilizados doador e aceitador fluorescentes na maioria das aplicações (HUSSAIN, 2007).

A transferência de energia baseia-se no conceito do fluoróforo como um dipolo oscilante, o qual pode trocar energia com outro dipolo que possua uma frequência de ressonância similar. A taxa para o decaimento por transferência de energia é da ordem da taxa para o decaimento por fluorescência. Logo, a transferência de energia pode suprimir a fluorescência (HELD, 2012).

O processo de transferência de energia é dependente da superposição entre os espectros de emissão do doador e absorção do aceitador, da orientação relativa dos dipolos de transição das moléculas doadora e aceitadora e da distância entre essas moléculas (tipicamente 10-100 Å) (PIETRASZEWSKA-BOGIEL & GADELLA, 2011; HELD, 2012).

Förster demonstrou que a taxa para o processo de transferência de energia depende da distância de separação entre o doador e o aceitador (r_{DA}), e o cálculo da Eficiência do processo (E) é decorrente dessa taxa. Para um único par DA, esta dependência é descrita na Eq. (1), se a distância entre doador e aceitador for igual a R_0 (raio Förster) a eficiência de FRET será de 0,5 (50%):

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r_{DA}^6} \qquad \text{Eq. (1)}$$

O raio de Förster R_0 depende do rendimento quântico de fluorescência de D (Q_D), do coeficiente de absorção de A (ε_A) (pelo parâmetro J, integral de sobreposição), do índice de refração (n) e das disposições orientações relativas dos momentos de dipolo de emissão dos doadores e dos momentos de dipolo de absorção do aceitador (através do parâmetro: k^2) (Eq. 2), em que *C* é uma constante (8,79 x 10^{-11} M cm nm^2) (PIETRASZEWSKA-BOGIEL & GADELLA, 2011):

$$R_0^6 = Cn^{-4}\, Q_D k^2\, J \quad \text{(unidades nm}^6\text{), onde} \qquad \text{Eq. (2)}$$

$$J = \int F_D\,(\lambda).\varepsilon_A(\lambda).\lambda^4 d\lambda \,/\, \int F_D(\lambda) d\lambda$$

A magnitude de R_0 é dependente das propriedades espectrais do doador e do aceitador. As distâncias de Förster, que variam de 20 a 90 Å, são as mais úteis para os estudos de macromoléculas biológicas (HELD, 2012).

1.8.3.2 Instrumentação

A obtenção de medidas de FRET é realizada utilizando um equipamento denominado Fluorímetro. Em seu sistema de funcionamento (Figura 1.12), uma lâmpada de xenônio é responsável pelo feixe de luz que excita a amostra. Essa luz inicialmente emitida, possui um espectro com uma banda larga que se estende de ~ 240 nm até ~ 700 nm, tendo seu máximo em ~467 nm.

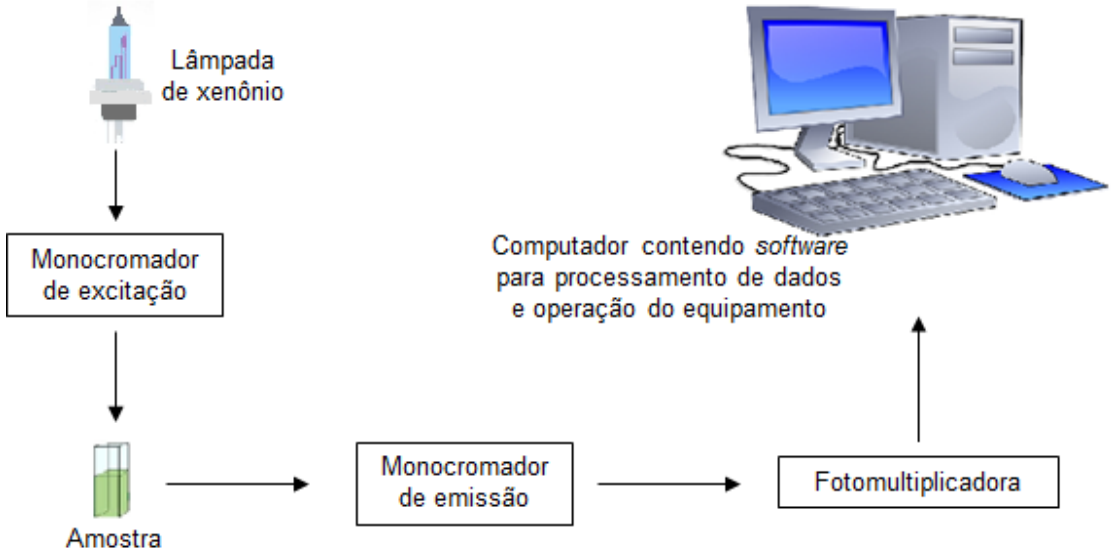

FIGURA 1.12: Esquema geral do funcionamento de um espectrofluorímetro utilizado na aquisição das medidas de FRET. Autoria própria.

O comprimento de onda da luz é selecionado por um monocromador de excitação e sua intensidade é regulada através da abertura de uma fenda. Após o comprimento de onda do feixe de luz ser selecionado, ocorre a incidência do mesmo sobre a amostra fluorescente, excitando-a. Ao

retornar ao estado fundamental, observa-se a emissão de luz, a qual também possui o seu comprimento de onda selecionado por um monocromador e intensidade ajustada por uma fenda. A luz emitida, após passar por essas etapas, atinge uma fotomultiplicadora, cujos sinais são tratados por um conversor analógico digital e enviados a um computador, onde são processados por um software responsável pela operação do equipamento (TAKARA, 2006).

2. JUSTIFICATIVA

A ocorrência de epidemias de dengue nos centros urbanos é favorecida pela dispersão e elevação da densidade das populações do mosquito vetor, em função das falhas nas estratégias de combate. A rápida propagação viral e potencial gravidade dos casos de FHD caracteriza a dengue como uma doença de alto impacto econômico e importância na saúde pública internacional (SUAYA *et al*., 2007).

Nesse sentido, é crescente a necessidade de investimento em pesquisas para obtenção de tecnologias cada vez mais eficientes para prevenção, diagnóstico e tratamento eficaz dessa doença. A seleção e caracterização de aptâmeros têm sido apresentadas pela literatura (BRUNO *et al*., 2012; CHEN *et al*., 2015; FAN *et al*., 2016; HUANG *et al*., 2016), demonstrando seu uso no estudo de função de vias celulares envolvidas no desenvolvimento de doenças infecciosas, tais como a dengue, e apresentando potencial para adaptação para testes diagnósticos em larga escala e/ou miniaturizados.

Conforme apresentado anteriormente, existem várias e importantes técnicas utilizadas para a caracterização de aptâmeros selecionados contra um alvo, bem como para investigação de suas potencialidades aplicadas à terapêutica e/ou diagnóstico de doenças. Diante do exposto, o presente trabalho foi realizado a fim de se verificar a afinidade do complexo aptâmero:dengue. Os aptâmeros aqui utilizados haviam sido previamente selecionados por Cnossen (2014), contra uma região não codificante presente no genoma do vírus da dengue.

As técnicas de biologia molecular, tais como *dot-blot* e PCR em Tempo Real, e de biofísica molecular baseadas em fluorescência, como o FRET, foram aqui exploradas para análises de afinidade e especificidade de ligação dos aptâmeros A03 e C10 contra a porção 5’UTR do RNA do vírus da dengue.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Diante do exposto, o presente trabalho objetivou investigar a interação entre alvo e aptâmeros selecionados contra a região 5'UTR do genoma do DENV, por meio de técnicas colorimétricas (*dot blot*) e fluorescentes (PCR em Tempo Real e FRET), além de análises *in silico*, a fim de demonstrar a potencial aplicação desses oligonucleotídeos no diagnóstico e na terapêutica da dengue.

3.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar os aptâmeros A03 e C10 (CNOSSEN, 2014), selecionados contra a região 5'UTR do genoma do DENV, avaliando a estrutura conformacional por testes *in silico* e FRET (A03), bem como o perfil de interação com a molécula alvo;

- Analisar as interações entre o DENV e os aptâmeros A03 e C10, utilizando as técnicas *dot blot*, PCR em tempo real e FRET (A03), para comprovação da afinidade de ligação e especificidade dos aptâmeros selecionados.

4. MATERIAIS

O pré-mix *Big Dye® Terminator Cycle Sequencing* foi adquirido da *Applied Biosystems* (Foster City-CA, EUA). Dietil pirocarbonato (DEPC), RNase e meio LB (*Luria Bertanni*) foram obtidos da Amresco (São Paulo-SP, Brasil). Agarose foi adquirida da Agaren (BIOMOL, Riberão Preto-SP, Brasil). Brometo de etídeo, membrana de nylon e kit *Alkhaphos Direct Labellings Reagent* foram obtidos da GE Healthcare (Little Chalfont, Reino Unido). As sequências liofilizadas dos aptâmeros marcados com fluoróforos foram adquiridas da Genone (Rio de Janeiro-RJ, Brasil). Ácido bórico e azul de bromofenol foram obtidos da IMPEX™ (Contagem-MG, Brasil). Ampicilina, hexâmeros, tripsina, *Escherichia coli* competente TOP 10, Soro Fetal Bovino (SFB), RNase *out,* TOPO® TA *clonning* kit e as sequências liofilizadas dos aptâmeros sem marcação foram obtidos da Invitrogen™ (Carlsbad-CA, USA). Desoxirribonucleotídeos (dNTPs) e Tris base foram obtidos da Ludwig Biotecnologia Ltda (Alvorada-RS, Brasil). BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato), IPTG (isopropil β-D-1- tiogalactopiranosídeo), lã de vidro, LB ágar, *Murine Moloney Leukemia Virus Reverse Transcriptase* (M-MLV RT), penicilina, estreptomicina, meio de cultura L-15, NBT (azul de nitrotetrazólio), TRI Reagent® e X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosídeo) foram obtidos da Sigma-Aldrich (São Paulo-SP, Brasil). As partículas paramagnéticas revestidas com estreptavidina foram obtidas da Promega (Madison-WI, USA). O kit de detecção de sondas marcadas com biotina (*Biotin Chromogenic Detection*) e Taq DNA polimerase, foram obtidos da Thermo Scientific (Sinapse Biotecnologia). 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX) foi adquirido através da *Solis BioDyne* (Tartu, Estônia). Acetato de potássio, Tween 20 e álcool etílico foram obtidos da Vetec (Rio de Janeiro-RJ, Brasil). Acetato de sódio, acetato de amônio e cloreto de sódio foram adquiridos da Proquímicos. Cloreto de cálcio foi adquirido da Dinâmica (Diadema-SP, Brasil). Cloreto de magnésio e hidróxido de sódio foram obtidos da Neon Reagentes Analíticos (São Paulo-SP, Brasil).

5. METODOLOGIA

5.1 Obtenção do DENV

5.1.1 Cultivo de Células: clone C6/36 – larva de Aedes albopictus

A propagação dos quatro sorotipos do vírus da Dengue (DENV1-4) foi realizada através da infecção em monocamada de células C6/36 aderentes, em cultura. Essa linhagem de células foi cedida pelo Prof. Dr. Jonny Yokosawa do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia (ICBIM-UFU), assim como as cepas virais do DENV. As células foram semeadas em garrafas de 25 cm^2 (GREINER), contendo 5 mL de meio Leibovitz 15 (L-15), na concentração 5% de Soro Fetal Bovino (SFB) e suplementado com Penicilina/Estreptomicina a 10.000 $U.mL^{-1}$ e 10.000 $\mu g.mL^{-1}$, respectivamente; e, ainda, Anfotericina B (2 $mg.mL^{-1}$). As culturas foram incubadas a 29 °C em atmosfera padrão, sem suplementação de CO_2.

5.1.2 Inoculação do DENV: sorotipos 1-4 em C6/36

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

As células foram analisadas utilizando um microscópio ótico invertido, com um aumento de 400x. Após a visualização do efeito citopático (alterações nas células causadas pelos vírus), ou totalizado os sete dias após a infecção, o meio de cultura foi removido das garrafas, armazenado em criotubos de 2 mL e estocado a -70 °C, diretamente. Sendo que, uma alíquota de cada

sorotipo viral produzida anteriormente foi inoculada por, no mínimo, três vezes, sucessivamente, em novas culturas com a finalidade de se obter uma maior titulação viral.

5.1.3 Extração e transcrição reversa do RNA viral em DNA complementar (cDNA)

A extração para obtenção do RNA viral foi feita utilizando TRI REAGENT®, de acordo com as instruções do fabricante e pelo método direto (CALVO *et al.*, 2015). No método direto, uma amostra de cada sorotipo foi descongelada em temperatura ambiente (aproximadamente 28 °C) e, em seguida, uma alíquota de 50 µL do meio de cultura contendo as partículas virais foi submetida ao seguinte tratamento: agitação rápida em vórtex, por 20 s para promover a homogeneização do material, seguido de uma incubação a 95 °C, por 10 min; e por fim uma nova agitação em vórtex por 10 s. O RNA extraído foi quantificado através da leitura em espectrofotômetro L-Quant (*Loccus* Biotecnologia, São Paulo, Brasil) em comprimento de onda de 260 nm e 280 nm, para análises da relação RNA/proteína nas amostras, e analisado por eletroforese em gel de agarose, em uma concentração de 0,8% (0,8 g agarose/100 mL tampão TBE – tris 0,9M; ácido bórico 0,8 M; EDTA 0,5 M pH 8,0) corado com brometo de etídio a 0,5 $\mu g.mL^{-1}$. Considerando que o RNA é muito sensível à extensa manipulação, o mesmo foi convertido em DNA pelo processo de RT-PCR, para utilização nos experimentos.

Para a reação de transcrição reversa, foi utilizado 1 µg do RNA total, 2 µL de tampão 1X da M-MLV, 126 pmoles de hexâmeros randômicos, 1 U de M-MLV, 0,2 mM de dNTPs, água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato) para completar um volume final de 20 µL. A reação foi incubada a 37 °C por 1h 20min em banho-seco.

5.1.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Três microlitros (~200 ng) da reação de transcrição reversa foram utilizados para a amplificação do cDNA obtido na etapa anterior. Os componentes da reação foram: 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTPs, 7 pmoles

de cada primer (*FOR* e *REV*) (AQUINO *et al*, 2006), 2,5 U de Taq DNA polimerase, 1X tampão da Taq e água ultrapura para completar um volume final de 20 µL. Para a amplificação, o programa utilizado foi: desnaturação inicial por 30 s a 95 °C, seguido de 35 ciclos (95 °C por 30 s, 55 °C por 45 s e 72 °C por 2 min), e uma extensão final de 10 min a 72 °C, em termociclador *AmpliTherm Thermal Cycler*. O produto obtido nessa etapa foi avaliado em eletroforese em gel de agarose 1,2% (1,2 g agarose/100 mL tampão TBE), corado com brometo de etídio (EtBr) e fotodocumentado em transiluminador (L-Pix/*Loccus* Biotecnologia).

5.1.5 Purificação dos produtos da PCR

Os produtos obtidos na amplificação foram purificados a partir da agarose, utilizando lã de vidro e precipitação com acetato de amônio 7,5 M. A banda de gel de agarose foi cortada e colocada em um aparato para filtração, previamente preparado: um tubo de 0,6 mL contendo lã de vidro e um pequeno furo na parte inferior, colocado dentro de um tubo de 1,5 mL. Esse material foi centrifugado a 13000 rpm por 15 min, e o líquido coletado e distribuído em tubos de 1,5 mL. Adicionou-se acetato de amônio 7,5 M, na proporção de 2µL de acetato de amônio para cada 8 µL de produto, homogeneizou-se levemente a amostra, e, em seguida, adicionou-se etanol absoluto na proporção de 30 µL de etanol para cada 10 µL de produto. A amostra foi incubada a -20 °C *overnight* e posteriormente foi centrifugada a 13000 rpm por 30 min. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 200 µL de etanol 70% no tubo, o qual foi centrifugado novamente por 10 min a 13000 rpm. O sobrenadante foi removido e o *pellet,* após secagem, foi suspendido em 10 µL de água e quantificado através da leitura em espectrofotômetro L-Quant.

5.1.6 Clonagem do produto de PCR com vetor TOPO TA e transformação das bactérias TOP10

Os produtos da sequência 5’UTR do DENV-2 e -4, amplificados e purificados, foram clonados utilizando o Kit *TOPO*® TA *Cloning* de acordo com

as instruções do fabricante. Somente esses dois sorotipos foram submetidos ao processo de clonagem porque já haviam clones dos demais estocados.

As bactérias *Escherichia coli* da cepa TOP10 estocadas a -80 °C foram descongeladas, e 100 µL foram colocados em 10 mL de meio LB (sem antibiótico) e incubados a 36,9 °C por 12 h em estufa. Foram transferidos 500 µL da cultura para 10 mL de meio LB líquido e novamente incubados a 36,9 °C sob agitação durante aproximadamente 1h30min, atingindo densidade óptica (A_{600}) entre 0,1-0,3. Posteriormente, o meio foi centrifugado a 3000 rcf por 15 min. e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 2 mL de solução de $CaCl_2$ 50 mM gelada ao sedimento de bactérias, agitando suavemente. O material foi centrifugado novamente a 3000 rcf por 15 min, o sobrenadante descartado e o "*pellet*" ressuspendido em 1 mL da solução gelada de $CaCl_2$. A suspensão foi incubada por mais 1 h no gelo, obtendo-se assim as células competentes.

5.1.7 Transformação das bactérias competentes e preparo de placas de cultivo dos transformantes

Foram incubados 200 µL de células competentes com 3 µL da reação de ligação em banho de gelo por cerca de 30 min. Em seguida, foi realizado o choque térmico a 37 °C por 5 min e, em seguida, banho de gelo por 5 min. Foi adicionado 1 mL de meio LB aos tubos submetidos ao choque térmico, sendo incubados a 37 °C por 1 h.

Após a transformação, foram semeados 100 µL de células transformadas em placa de Petri esterilizadas, contendo LB ágar suplementado com 40 $mg.mL^{-1}$ de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-Dgalactosidase), 100 mM de IPTG (isopropil-β-D Tiogalactopiranosídeo) e 50 $\mu g.mL^{-1}$ de ampicilina. As placas foram vedadas com parafilme e incubadas *overnight* a 37 °C.

5.1.8 Extração de DNA plasmidial

Após o crescimento das colônias de bactérias, aquelas que continham o inserto do DNA de interesse foram isoladas e inoculadas em 5 mL de meio LB contendo 50 $\mu g.mL^{-1}$ de ampicilina, sendo posteriormente incubadas em estufa, a 37 °C por 16 h. A extração do DNA plasmidial foi feita por meio de

lise alcalina e o material obtido foi quantificado através da leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm e 280 nm. O material obtido foi analisado em gel de agarose 0,8% (m/v). Os clones positivos foram utilizados como molde para a amplificação do alvo para os testes de afinidade de ligação com aptâmeros e também para o sequenciamento.

5.1.9 Sequenciamento

Os produtos de PCR purificados dos sorotipos virais 2 e 4 foram submetidos a um sequenciador capilar ABI 3500 (*Applied Biosystems,* Califórnia*,* EUA) do Laboratório de Genética e Biodiversidade da UFG - Regional Goiânia, coordenado pela Prof.ª Dra. Mariana P. de Campos Telles. As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o pré-mix *Big Dye® Terminator Cycle Sequencing* e 2,5 pmoles dos *primers foward* e *reverse* específicos do DENV 5'UTR, em um programa de 25 ciclos, sendo cada ciclo executado sob as seguintes condições: 95 °C por 20 s; 50 °C por 15 s e 60 °C por 1 min.

Para a precipitação do DNA, foram adicionados 40 µL de isopropanol 65%, vórtex por 30 s e incubou-se as amostras em temperatura ambiente por 20 min. Em seguida, centrifugou-se a 2000 rcf durante 45 min e removeu-se o líquido completamente. Adicionou-se 250 µL de etanol 60%, centrifugando, em seguida, a 2000 rcf por 10 min. O etanol foi descartado completamente e foi feita uma nova lavagem com 100 µL de etanol e centrifugação a 2000 rcf por 10 min. O etanol foi totalmente removido e a placa submetida ao processo de secagem por 10 min à temperatura ambiente.

Após processo de precipitação, as amostras foram preparadas para o sequenciamento, com adição de 10 µL de formamida *Hi-Di* e incubação a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, foram vortexadas durante 1 min e desnaturadas em termociclador à 95 °C por 5 min, dando choque térmico por 1 min. Ao final, as amostras foram injetadas no sequenciador.

Os resultados foram analisados utilizando o *Sequence Scanner Software* (*Applied Biosystems*) e as sequências foram alinhadas utilizando *GenBank*, BLAST- NCBI.

5.1.10 Geração de RNA-like e marcação de moléculas alvo com biotina

Para os testes de afinidade, fez-se necessária a obtenção de moléculas alvo (DENV) de ssDNA contendo a base nitrogenada uracila, ao invés da timina (RNA-*like*) e também moléculas de ssDNA marcadas com biotina na posição 5' da fita. Essas moléculas foram obtidas a partir de reamplificação do alvo purificado dsDNA obtido anteriormente por PCR.

Foi feita a PCR assimétrica (uso de apenas um *primer*) para obtenção das moléculas de RNA-*like,* utilizando 7 pmoles de *primer forward* e dUTP (desoxiuridina trifosfatada) em substituição ao dTTP (desoxitimina trifosfatada). As demais condições da reação foram as mesmas descritas no item 3.1.4 e o programa de termociclagem utilizado também foi o mesmo já descrito anteriormente, diferindo apenas na quantidade de ciclos, sendo reduzido para 29 ciclos na PCR assimétrica*.* Para a produção de moléculas biotiniladas também foi realizada PCR assimétrica, onde a incorporação da biotina se deu através do *primer* biotinilado *forward.*

Os produtos amplificados obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2% (tampão TBE contendo 0,5 $\mu g.mL^{-1}$ de brometo de etídeo), visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotodocumentados. A purificação dos produtos foi realizada conforme especificado no item 3.1.5.

5.1.11 Teste de marcação com biotina

Os produtos amplificados marcados com biotina foram submetidos a um teste para comprovação da incorporação da biotina na molécula alvo. Para isso, os produtos de interesse foram aplicados em uma membrana de nylon *Hybond-N*$^{+}$ carregada positivamente, juntamente com controles positivo (*primers* biotinilados) e negativo (amostra amplificada não biotinilada). A detecção foi feita utilizando o Kit *Biotin Chromogenic Dete*ction e o procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante.

Esse teste fundamenta-se na afinidade existente entre a biotina e a estreptavidina. O alvo biotinilado se liga à estreptavidina, que é conjugada à fosfatase alcalina (AP), o que facilita a detecção cromogênica, a qual foi feita

utilizando como substrato o azul de nitro-tetrazolio/ 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (NBT / BCIP).

5.2 Obtenção dos Aptâmeros

Os estudos de afinidade entre aptâmero e alvo foram feitos utilizando os aptâmeros A03 e C10, selecionados contra a região 5'UTR do genoma do vírus da dengue (CNOSSEN, 2014). As sequências liofilizadas dos aptâmeros foram sintetizadas pela Invitrogen (Carlsbad-CA, EUA). Já as sequências liofilizadas do aptâmero A03 marcadas com os fluoróforos FAM e TAMRA, para os testes de FRET, foram adquiridas da Genone (Rio de Janeiro-RJ, Brasil).

A partir dos aptâmeros ssDNA adquiridos, sem marcação, foram feitas amplificações por PCR para obtenção dos mesmos em dsDNA e ssDNA biotinilado.

5.2.1 Amplificação de aptâmeros dsDNA e ssDNA biotinilados

Foram utilizados 30 ng do aptâmero, a partir da solução estoque, juntamente com 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTPs, 5 pmoles de cada primer (A e B), 2,5 U de Taq DNA polimerase, 1X tampão da Taq e água ultrapura para completar um volume final de 20 µL. O programa utilizado foi: desnaturação inicial por 3 min a 93 °C, seguido de 26 ciclos (93 °C por 20 s, 50 °C por 40 s e 72 °C por 40 s), e uma extensão final de 10 min a 72 °C. O produto obtido foi avaliado em eletroforese em gel de agarose 1,5% (1,5 g agarose/100 mL tampão TBE), corado com brometo de etídio (EtBr) e fotodocumentado em transiluminador. A purificação dos produtos foi realizada conforme já descrito no item 4.1.5.

Após obtenção do aptâmero dsDNA purificado, o mesmo foi utilizado na PCR assimétrica com *primer foward* biotinilado, para obtenção de ssDNA biotinilado. O programa de termociclagem utilizado possui as mesmas condições daquele utilizado para obtenção de dsDNA, apenas diminuindo o número de ciclos para 22. A análise do produto por eletroforese e purificação

foram feitos conforme mencionado anteriormente. Para os produtos biotinilados, realizou-se o teste de marcação, conforme item 4.1.11.

5.3 Testes *in silico:* Predição da Estrutura Secundária dos Aptâmeros, Interação entre os Aptâmeros A03 e C10 com DENV e Definição de Controle Negativo dos Testes de *Dot Blot*

Foi feita uma previsão da estrutura secundária dos aptâmeros A03 e C10 utilizando o *web server* NUPACK (ZADEH *et al.*, 2011), o qual fornece uma estrutura baseada na probabilidade de interação dos pares de bases, a fim de se analisar a estrutura por meio da energia livre (ΔG) e relacionar o perfil de dobramento estrutural dos aptâmeros com o seu comportamento nos ensaios de afinidade.

Ensaios de hibridização das sequências dos aptâmeros A03 e C10 e as sequências dos quatro sorotipos do DENV foram realizados utilizando o MFOLD (ZUKER, 2003), no módulo DINAMelt

As sequências utilizadas como controles negativos nos ensaios de *dot blot* foram definidas a partir de análises *in silico* utilizando o *web server* MFOLD, no módulo DINAMelt. Foram feitos testes de interação bimolecular entre a sequência do aptâmero A03 e 13 sequências de ligantes disponíveis no LabioMol (A05, A11, B07, B10, C03, C10, C11, D04, E03, E07, F08, G02 e G03) (CNOSSEN, 2014). A hibridização com energia livre mais alta (menor estabilidade) apontou a sequência utilizada como controle negativo.

5.4 Técnicas de Biologia Molecular

5.4.1 Hibridização por dot blot

A afinidade e especificidade dos aptâmeros A03 e C10 com o seu alvo (DENV 5'UTR) foi inicialmente avaliada pelo teste *Dot Blot*. Os produtos purificados obtidos da região 5'UTR do RNA DENV, dos quatro sorotipos, aplicados em membrana de nylon carregada positivamente (*Hybond-N*$^{+}$*),* foram testados separadamente e também em forma de *pool* com a sonda de aptâmero biotinilado. Esse teste foi realizado para cada aptâmero separadamente.

5.4.1.1 Preparo da sonda e membrana, hibridização e detecção

O material utilizado como sonda (aptâmeros A03 e C10), preparado anteriormente através de PCR assimétrica com *primer* senso biotinilado, foi desnaturado a 95 °C por 5 min e submetido ao choque térmico em gelo durante 5 min. Foram utilizados 200 ng de cada aptâmero biotinilado para o preparo das sondas.

A membrana foi lavada em SSC 1x por 2 min, tendo o excesso de umidade retirado rapidamente em papel de filtro, e, em seguida, foram aplicadas 400 ng das amostras de DENV, 200 ng de cada controle positivo (*pool* de DENV e aptâmero dsDNA) e 400 ng de cada controle negativo (sequências ssDNA de outros aptâmeros), conforme esquema da Figura 5.1.

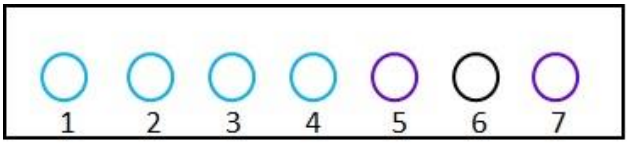

FIGURA 5.1: Esquema geral da aplicação das amostras na membrana para os testes de afinidade com os aptâmeros A03 e C10. (1) DENV-1; (2) DENV-2; (3) DENV-3; (4) DENV-4; (5) Pool de DENV; (6) Controle negativo; (7) Controle positivo: aptâmero dsDNA.

Após a aplicação das amostras, a membrana foi colocada na estufa de secagem a 80 °C por 10 min e, em seguida, exposta à radiação UV por 2 min. A membrana foi hidratada com 5 mL de tampão de hibridização (Kit *Alkhaphos Direct Labellings Reagen*t) durante 15 min à temperatura ambiente. Em seguida, a sonda previamente preparada, foi adicionada ao tampão, permitindo a hibridização entre o material imobilizado na membrana e a sonda. O processo de hibridização ocorreu por 36 h em temperatura ambiente e com leve agitação.

Ao final da etapa de hibridização, a membrana foi submetida ao processo de lavagem e detecção utilizando o Kit *Biotin Chromogenic Detection* e o procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante.

5.4.2 Testes de captura de ligantes e detecção por PCR em Tempo Real

A afinidade dos aptâmeros com o alvo foi avaliada utilizando os aptâmeros A03 e C10, como moléculas de captura do DENV e também pelo ensaio reverso, onde os aptâmeros foram capturados por *pool* de DENV. Esferas magnéticas recobertas com estreptavidina foram utilizadas para imobilização do aptâmero e DENV biotinilados, viabilizando a captura das moléculas de DENV e aptâmeros em solução. As moléculas capturadas foram detectadas por PCR em tempo real, através da utilização de *primers* específicos e confirmadas por eletroforese em gel de agarose 1,2% para DENV e 1,5% para os aptâmeros, corado com brometo de etídeo 0,5 $\mu g.mL^{-1}$ e fotodocumentada.

5.4.2.1 Preparo das partículas magnéticas

Para a quantidade de alvo utilizada nos testes, foram preparadas 2,86 x 10^{-3} mg de partículas paramagnéticas recobertas com estreptavidina (SA-PMs), seguindo as recomendações do fabricante (Promega). As partículas foram lavadas 2 vezes com SSC 0,5 x e 1 vez com o tampão de ligação.

5.4.2.2 Captura de DENV por aptâmeros

Foram preparadas alíquotas de 100 ng de *pool* de DENV ssDNA (4 sorotipos) e uma alíquota de 100 ng de cada aptâmero (A03 e C10) biotinilados, as quais foram submetidas à desnaturação a 95 °C em termociclador durante 10 min. Após a desnaturação, cada amostra de aptâmero foi incubada à temperatura ambiente com o *pool* de DENV durante 1 h em tampão de ligação (100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.6, 2 mM $MgCl_2$, 5 mM KCl, 1 mM $CaCl_2$ e 0.02% Tween 20).

Após o tempo de incubação dos aptâmeros com o *pool* de DENV, as partículas magnéticas foram adicionadas aos tubos contendo os complexos aptâmero-alvo, sendo incubados à temperatura ambiente por 30 min. Considerando que o aptâmero possui a biotina, o mesmo se ligou à partícula magnética recoberta com estreptavidina, devido à interação entre biotina e estreptavidina. O DENV ligado ao aptâmero A03 e C10 individualmente, após o

período de incubação, foi eluído, enquanto o tampão contendo as moléculas que não se ligaram foi totalmente removido, com auxílio da plataforma magnética (*BioLabs*®).

As partículas magnéticas contendo o complexo aptâmero-alvo foram ressuspendidas em 5 µL de água ultrapura e submetidas à incubação por 15 min a 95 °C, para que ocorresse a separação das fitas dos aptâmeros ligados ao DENV. Para esse fim, a mistura contendo os SAPs-biotina-aptâmeros foi separada por plataforma magnética, e os 5 µL de água ultrapura contendo o DENV foram recuperados e utilizados na PCR em tempo real para detecção viral.

5.4.2.3 Ensaio reverso

Esse experimento foi utilizado para confirmar o ensaio anterior, no entanto, de forma reversa. Alíquotas de cada aptâmero A03 e C10 foram utilizadas separadamente para teste de ligação ao *pool* de DENV ssDNA (4 sorotipos) biotinilado. Cada amostra de aptâmero foi incubada à temperatura ambiente com o *pool* de DENV durante 1 h em tampão de ligação. Os demais passos de imobilização e captura dos ligantes foram realizados de acordo com o anteriormente descrito. Os 5 µL de água ultrapura contendo o aptâmero A03 e C10 foram recuperados, após a separação das fitas promovida pela incubação à 95 °C, e utilizados na PCR em tempo real para detecção dos ligantes. Esse ensaio foi realizado em duplicata.

5.4.2.4 PCR em Tempo Real

Os produtos recuperados nos ensaios de captura pelos aptâmeros e captura por DENV, foram amplificados por PCR em Tempo Real (*Applied Biosystems*® 7500 *Real-Time PCR Systems*), utilizando o tampão 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX) contendo o corante intercalante das fitas amplificadas. Utilizou-se na reação 1X qPCR Mix, 7 pmoles dos *primers forward e reverse* (reação DENV), 5 pmoles dos *primers* A e B (reação aptâmeros), o material recuperado nos testes de captura e água ultrapura para completar 10 µL de reação. Foram realizados 40 ciclos de amplificação compostos por: 95 °C por 15 s, 53 °C por 40 s e 72 °C por 20 s, precedidos de

uma desnaturação inicial a 95 °C durante 15 min e finalizados por uma etapa de extensão final da fita a 60 °C por 1 min. A curva de *melting* (dissociação dos produtos amplificados) foi analisada após PCR.

A amplificação foi analisada pela curva obtida e o Ct (*Cycle Threshold*) após estabelecimento do *Threshold* na fase exponencial.

5.5 Ensaios por Biofísica Molecular – FRET

5.5.1 Instrumentação

As medidas de FRET foram obtidas utilizando um fluorimetro (Fluorolog FL3-221- Horiba Jobin-Yvon) do Laboratório de Materiais do Instituto de Física da UFG - Regional Goiânia, sob a supervisão da Prof.ª Dra. Cássia Alessandra Marquezin. A fluorescência das amostras foi coletada na faixa entre 500 e 650 nm, utilizando cubeta de quartzo 10 x 2 mm. Essas medidas foram padronizadas considerando que o FAM excitado a 490 nm transfere energia para TAMRA, onde FAM retorna para o estado fundamental e gera em TAMRA um estado eletronicamente excitado. A perda de fluorescência a 520 nm de FAM é proporcional à quantidade de ganho de fluorescência a 580 nm para o TAMRA. Para as medidas com FAM a excitação foi feita em 490 nm e para TAMRA, 560 nm. A abertura das fendas foi regulada para 2 mm e o tempo de integração das medidas foi de 0,5 s.

5.5.2 Fluoróforos utilizados

Para os experimentos de FRET, foi utilizado somente o aptâmero A03, o qual foi marcado com fluoróforos em suas extremidades 5’ e 3’, sendo uma molécula doadora (*reporter*) e uma aceitadora (*quencher*), viabilizando a ocorrência de FRET. As marcações foram feitas de três formas diferentes: somente com FAM (fluoresceína – Figura 5.2a) na extremidade 5’, somente com TAMRA (tetrametilrodamina – Figura 5.2b) na 3’ e duplamente: FAM-5’-A03-3’-TAMRA.

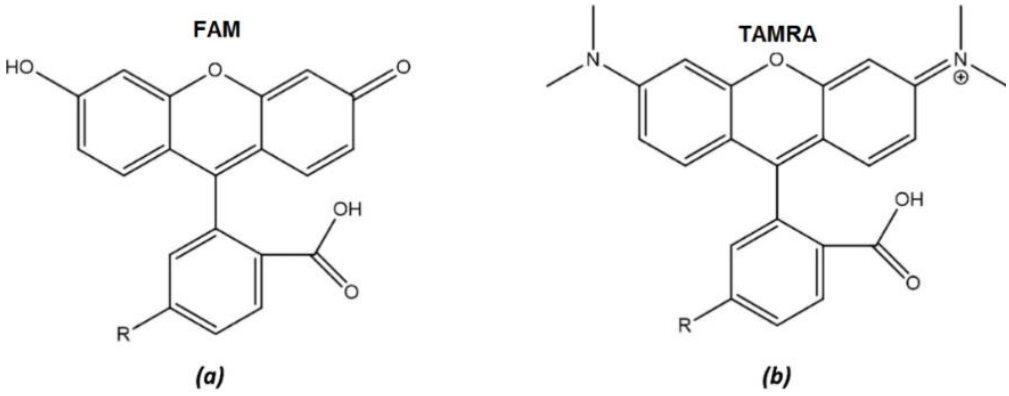

FIGURA 5.2: Representação das estruturas químicas dos fluoróforos FAM e TAMRA. (a) FAM, (b) TAMRA, utilizados no experimento de FRET para marcações do aptâmero A03 para estudos estruturais. Adaptado de Gracie *et al*., 2014.

Esse par doador-receptor foi escolhido devido à boa sobreposição espectral entre a fluorescência do FAM e curvas de absorção TAMRA.

5.5.3 Experimentos FRET

As leituras foram feitas em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,6 e tampão salino (Tris-HCl 20 mM pH 7,6, NaCl 100 mM, $MgCl_2$ 4 mM, KCl 5 mM e $CaCl_2$ 30 mM), a fim de se avaliar a influência dos sais nos experimentos. As medidas de branco foram realizadas com os tampões e de DENV em tampão, para garantir a ausência de interferência no sinal de fluorescência emitido pelos fluoróforos.

5.5.3.1 Avaliação do perfil de emissão dos fluoróforos FAM E TAMRA ligados ao aptâmero A03

O aptâmero A03, marcado com FAM-5', foi utilizado para otimizar a concentração a ser utilizada para os testes, baseando-se no perfil dos espectros de fluorescência apresentados, considerando a realização de leituras com 10, 50 e 100 nM do aptâmero. Essas concentrações foram escolhidas para realização dos experimentos baseadas nos trabalhos publicados por Nagatoishi e cols. (2006), Verdian-Doghaei & Housaindokht (2015) e Mairal e cols. (2014), considerando que a intensidade não poderia ultrapassar o limite máximo estabelecido (ordem de 10^6), para evitar danos no detector.

O perfil de emissão fluorescente de cada um dos fluoróforos ligados ao oligonucleotídeo A03 foi avaliado a partir de leituras com 50 nM do A03 marcado somente com FAM (F) na extremidade 5’ da fita de ssDNA, A03 marcado somente com TAMRA (T) na extremidade 3’ e para A03 com dupla marcação: F-A03-T (FT). As leituras foram feitas em tampão Tris e tampão salino.

5.5.3.2 Efeito da concentração dos íons Mg^{2+} e Na^{+} e temperatura na estrutura do aptâmero A03

O aptâmero F-A03-T foi utilizado no teste para verificação da influência da concentração de íons e variação da temperatura na estrutura do aptâmero. Nos experimentos com F-A03-T o comprimento de onda de excitação utilizado foi de 490 nm.

No teste para estudo do efeito da concentração de íons, $MgCl_2$ e o NaCl, que possuem cátions bivalentes e monovalentes, respectivamente, foram escolhidos por fazerem parte da composição do tampão salino utilizado nos experimentos. Para isso, foram feitas leituras com 50 nM do aptâmero adicionando 10, 40, 80, 120, 200 e 400 mM de $MgCl_2$, e medidas com 50 nM de aptâmero em 10 mM de $MgCl_2$ e adições de 40, 80, 120, 200 e 400 mM de NaCl.

Na avaliação do efeito da temperatura, a fluorescência das amostras em Tris e tampão salino foram medidas em temperatura ambiente e em aproximadamente 70 °C.

5.5.3.3 Interação aptâmero A03 e DENV: influência da concentração de DENV, tempo de incubação e presença de íons

A interação entre F-A03-T:DENV foi investigada por leituras mantendo-se a concentração do aptâmero em 50 nM e variando-se as concentrações do *pool* dos quatro sorotipos de DENV em 25, 50 e 100 nM.

Para cada concentração do *pool* de DENV avaliada, analisou-se também o tempo de incubação do F-A03-T:DENV, sendo feitas leituras com 1, 20 e 40 min de incubação. Todas as medidas foram realizadas em tampão Tris e repetidas em tampão salino, para observação da influência dos sais na ligação.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Obtenção do DENV

6.1.1 Inoculação do DENV em células C6/36

Os efeitos citopáticos começaram a ser observados nas células C6/36 após cinco dias da inoculação dos vírus no meio, o que confirmou a presença dos vírus da dengue e permitiu a extração do RNA viral de cada sorotipo após a coleta dos mesmos depois de sete dias de infecção (alta concentração viral).

A Figura 6.1 demonstra as alterações celulares provocadas pela infecção das células com o DENV. Nas imagens a, b e c pode-se observar a formação de vacúolos, que são espaços vazios devido à morte e agregação celular e a formação de sincícios, que se refere à presença de células gigantes, multinucleadas, resultantes da fusão de várias células infectadas pelo vírus. A imagem d apresenta as células normais, sem a presença dos vírus (controle negativo). Esses resultados foram observados para todos os sorotipos do DENV.

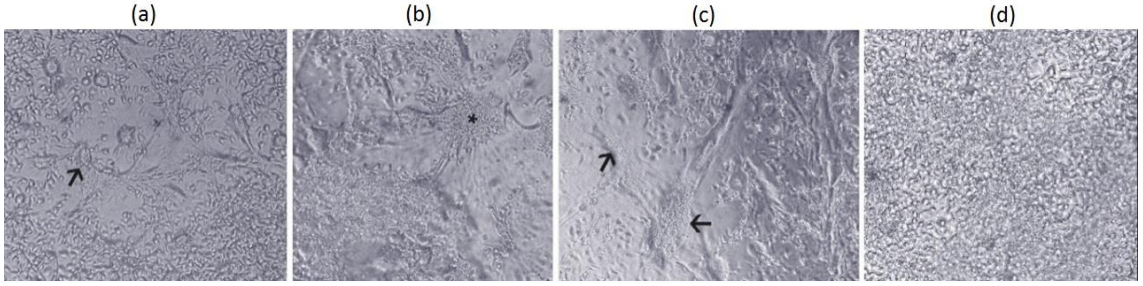

FIGURA 6.1: Fotomicrografia do cultivo de células C6/36, em aumento de 400 x, com efeito citopático proveniente da inoculação do DENV. (a) 2 dias após a infecção (DAI); (b) 3 DAI; (c) 5 DAI; (d) Controle negativo (não infectadas) 7 dias. **Setas**: sincícios celular. **Asterisco**: granulação citoplasmática anormal.

Quando inoculados, os vírus iniciam a sua multiplicação logo após entrar na célula, provocando uma série de alterações fisiológicas e morfológicas na célula infectada. De acordo com Alberts e cols. (2010), as modificações observadas na célula após a infecção viral são decorrentes da inibição da síntese de ácidos nucleicos e proteínas celulares, da fusão de células, liberação de

enzimas lisossômicas, modificações na permeabilidade celular e nas estruturas intracelulares e, também, aberrações cromossômicas.

Essas alterações são denominadas efeito citopático (EC) e podem ser visualizadas por microscopia óptica (BVS, 2015). Utilizando um microscópio é possível observar a desorganização celular, o aparecimento de espaços vazios devido à lise e agregação celular, aumento de tamanho, dentre outras características. Além disso, vários vírus induzem apoptose nas células infectadas, o que corresponde a um processo ativo de autodestruição celular geneticamente regulado, no qual é ativada uma cadeia enzimática complexa. Como consequência da morte celular, as células em monocamada, aderidas ao vidro ou plástico da parede da garrafa, passam a ser observadas em suspensão (ALBERTS *et al*., 2010).

A morte celular por apoptose vem sendo descrita para infecções por Flavivírus, sendo responsável por um mecanismo citopatológico em resposta à infecção por DENV, *in vitro* e *in vivo,* em vários tipos celulares. Estudos utilizando uma cepa neurovirulenta mutante do vírus DENV-1 (FGA/89) mostraram a capacidade desta em induzir apoptose em neurônios corticais e em regiões do hipocampo de camundongo neonato (DESPRÈS *et al*., 1998).

A função de proteínas virais do DENV na indução de apoptose em células-alvo foi sugerido por Catteau e cols. (2003). Esse estudo mostrou propriedades pró-apoptóticas de resíduos de aminoácidos da proteína M viral (ApoptoM), gerando disfunção mitocondrial e ativação de caspase em linhagens de células epiteliais HeLa infectadas com DENV-2.

Limonta e cols. (2007) demonstraram que citocinas secretadas por linfócitos T induzem apoptose de células infectadas, sugerindo um mecanismo de controle da viremia. Em uma investigação da interação do vírus da dengue com as células, utilizando a infecção de monócitos humanos primários com o DENV-2, foi observado o papel da via intrínseca mitocondrial na indução de apoptose de monócitos infectados (CARVALHO *et al*., 2009).

O DENV pode induzir apoptose de forma a disseminar a progênie viral a células vizinhas através da fagocitose de corpos apoptóticos, num processo mimetizando a resposta imune ou, inibir a morte celular e garantir sua sobrevivência e replicação (CARVALHO *et al*., 2009). As plaquetas também exibem sinais da via intrínseca da apoptose causada por DENV, apresentando

aumento da exposição da fosfatidilserina na superfície da membrana, despolarização mitocondrial e ativação da caspase 9 e 3 (HOTTZ *et al*., 2013).

6.1.2 Amplificação e Sequenciamento

Após coleta do lisado celular e extração de RNA, os produtos por RT-PCR apresentaram um tamanho aproximado de 150 pb, como pode ser observado na Figura 6.2. O sequenciamento alinhado ao banco de dados do GenBank – NCBI confirmou os sorotipos virais. A região 5'UTR possui aproximadamente 100 nucleotídeos e os 55 nucleotídeos adicionais foram incorporados na obtenção do alvo da 5'UTR uma vez que esses nucleotídeos são provenientes da região codificante e contém a sequência conservada (CS) e o hairpin (cHP), que estão envolvidos na tradução e síntese de RNA viral (POLACEK *et al*., 2009).

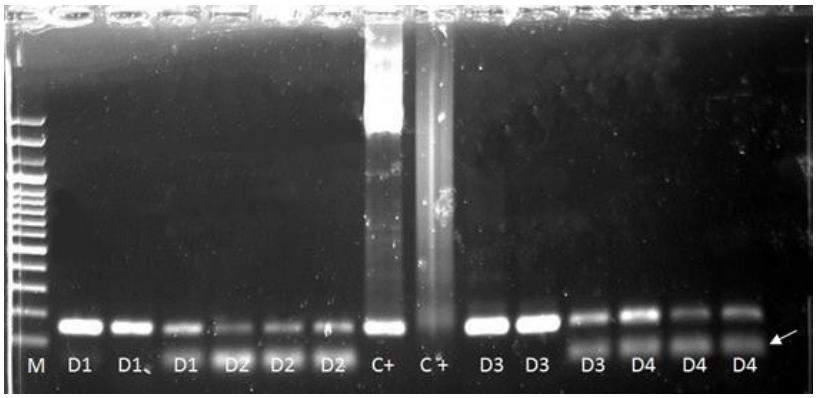

FIGURA 6.2: RT-PCR do RNA do vírus da dengue a partir de células C6/36 contaminadas e mantidas em meio de cultura L15. D1: DENV-1; D2: DENV-2; D3: DENV-3; D4: DENV-4; C+: controle positivo (~150 pb); M - marcador de peso molecular de 100 pb; Seta: dímeros de primers.

A finalização do processo de obtenção do alvo na forma de ssDNA (RNA *like*) da 5'UTR dos quatro sorotipos do DENV está apresentada na Figura 6.3, demonstrando os produtos com aproximadamente 150 pb. A PCR assimétrica por reamplificação foi utilizada, uma vez que possibilita a síntese de uma única fita do DNA original a baixo custo, conforme proposto por Avci-Adali e cols. (2010) e Citartan e cols. (2012).

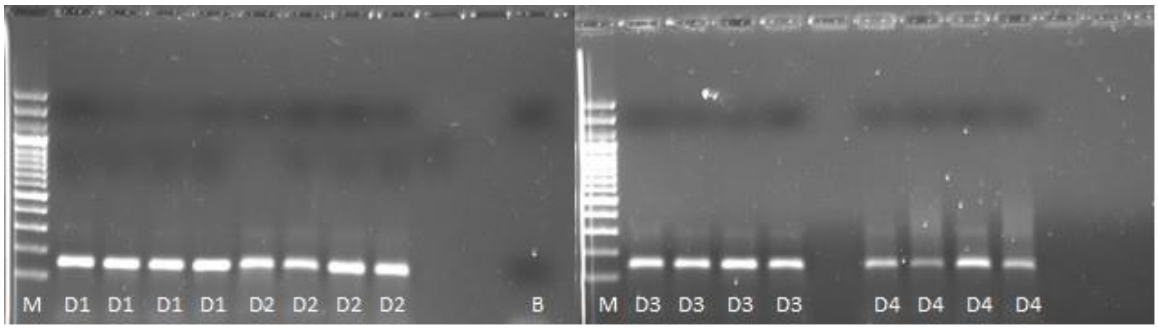

FIGURA 6.3: PCR assimétrica para obtenção de RNA *like*. D1: DENV-1; D2: DENV-2; D3: DENV-3; D4: DENV-4; M: marcador de peso molecular de 100 pb; B: branco.

Uma desvantagem da PCR assimétrica é que essa técnica fornece uma quantidade de produto amplificado menor que a PCR para produção de dsDNA. O rendimento da PCR assimétrica é em torno de 60-70%, enquanto a PCR convencional possui rendimento em torno de 90% ou mais (CITARTAN *et al.*, 2012).

6.2 Ensaios *in silico*

Foram obtidas estruturas secundárias para os aptâmeros A03 e C10 que indicaram que os mesmos são termodinamicamente estáveis em solução tampão, apresentando valores de energia livre (ΔG) de -25,9 e -22,10 kcal.mol^{-1}, respectivamente. As duas estruturas são semelhantes entre si e possuem *loops* que podem estar associados aos locais de ligação com o DENV (Figura 6.4).

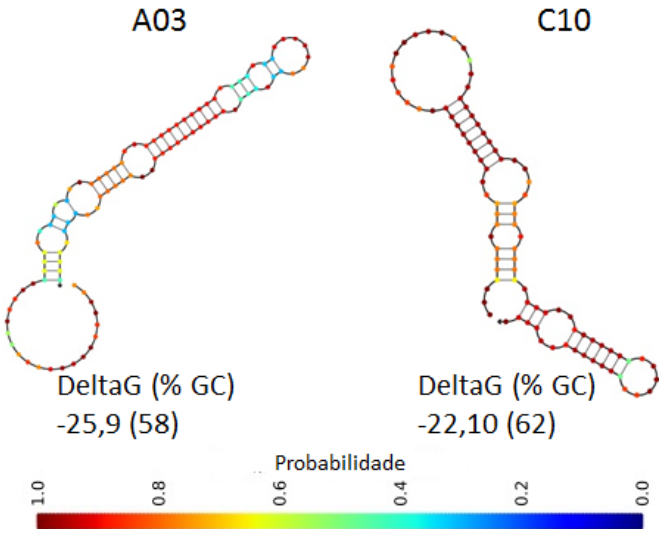

FIGURA 6.4: Representação da predição da estrutura secundária dos aptâmeros A03 e C10 obtidas pelo *web server* NUPACK.

As estruturas secundárias são construídas a partir de subestruturas que contribuem para a energia livre da molécula e são importantes no reconhecimento molecular e interação de ácidos nucleicos com ligantes (PATEL & SURI, 2000). Os *loops* e *hairpins* são as estruturas mais prováveis de interagirem com o alvo, pois as bases de RNA desemparelhadas são mais flexíveis e podem alterar sua conformação para formar uma “bolsa” de ligação e acomodar um ligante e/ou para a formação de ligações de hidrogênio (CHUSHAK & STONE 2009).

Os valores de ΔG obtidos para as hibridizações entre os aptâmeros e os quatro sorotipos do DENV variaram entre -42,11 e -50,64 kcal.mol^{-1}, conforme pode ser observado na Figura 6.5a. Isso indica que os aptâmeros ligados ao alvo são mais estáveis do que em sua interação intramolecular, uma vez que os valores de ΔG para a hibridização aptâmero:DENV são mais negativos (indicam maior estabilidade nas interações) que os valores de ΔG obtidos nas interações aptâmero:aptâmero, o que confirma a afinidade entre A03 e C10 com o DENV.

Na Figura 6.5b estão representadas as estruturas conformacionais obtidas para a hibridização entre os aptâmeros e o DENV-4.

(a)

		DENV 1	DENV 2	DENV 3	DENV 4
A03	Região de Hibridização (pb)	5-134	5-149	5-149	5-137
	ΔG Hibridização (kcal.mol^{-1})	-50,00	-49,05	-47,51	-50,64
C10	Região de Hibridização (pb)	5-134	5-86	5-84	5-137
	ΔG Hibridização (kcal.mol^{-1})	-49,85	-42,11	-45,68	-49,92

(b)

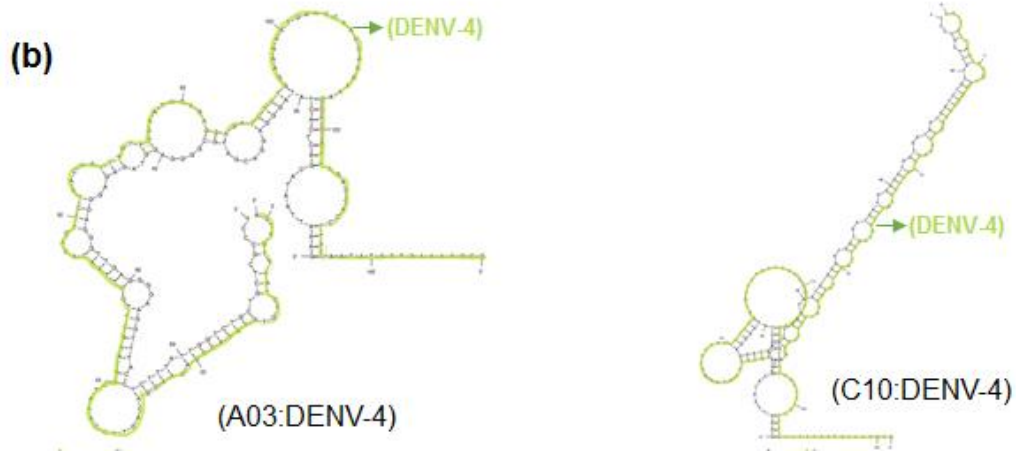

FIGURA 6.5: Resultados dos testes *in silico* para a hibridização dos aptâmeros A03 e C10 com os quatro sorotipos do DENV (MFOLD). Regiões de hibridização e ΔG (a); Estruturas conformacionais da interação A03:DENV-4 e C10:DENV-4 (b).

As estruturas conformacionais obtidas nos testes de hibridização entre A03 e C10 com os quatro sorotipos do DENV apresentaram perfis semelhantes de regiões de pareamento de bases e *loops*, sendo apresentadas somente as estruturas obtidas para um sorotipo para fins ilustrativos.

As semelhanças estruturais observadas entre os aptâmeros A03 e C10 podem indicar que suas capacidades de ligação com o alvo são semelhantes. Isso foi confirmado pelos testes de hibridização *in silico*, os quais demonstraram valores de ΔG muito próximos para as interações de ambos os aptâmeros com o DENV, principalmente para os sorotipos 1 e 4. Os locais de início e fim do pareamento de bases (Figura 6.5a) no sentido 5'-3' da sequência do vírus (região de hibridização) são semelhantes para os sorotipos 1 e 4, sendo repetidos para a interação com ambos os aptâmeros.

Esses dados sugeriram que os resultados obtidos nos ensaios de interação por *dot blot* e de captura de ligantes seriam semelhantes para ambos os aptâmeros, considerando também que foi utilizado um *pool* dos quatro sorotipos do DENV.

Os resultados das interações bimoleculares entre o aptâmero A03 e os demais, definiram a utilização dos aptâmeros A03 e C10 como controles negativos um do outro no *dot blot*. Conforme mostrado na Figura 6.6, a interação entre as sequências desses aptâmeros apresentou o maior valor de energia livre (ΔG = -6,72 kcal.mol^{-1}), em relação à interação com os outros aptâmeros, o que indica a baixa estabilidade dessa ligação, devido a menor espontaneidade. Esses oligonucleotídeos funcionam bem como controle negativo, considerando que a probabilidade de se ligarem e gerar um resultado falso positivo é mínima.

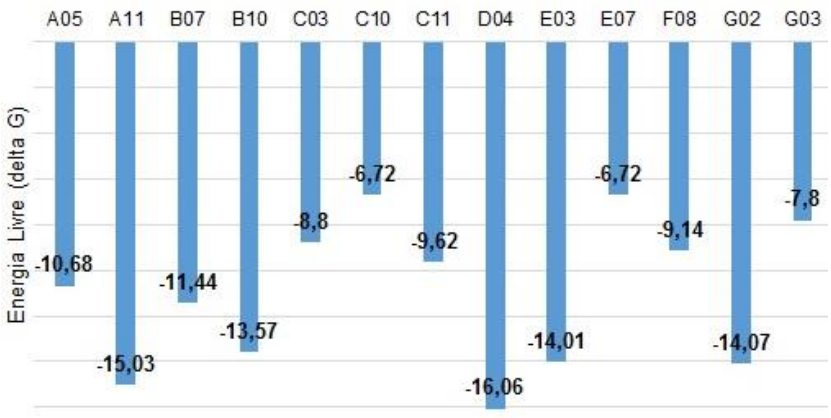

FIGURA 6.6: Estabilidade da interação entre a sequência do aptâmero A03 e os demais aptâmeros avaliada por teste de interação bimolecular utilizando o *web server* MFOLD.

A interação do A03 com o aptâmero E07 apresentou o mesmo valor de ΔG, entretanto, optou-se por utilizar o C10 como controle negativo, considerando que este aptâmero também é alvo de estudo nesse trabalho.

6.3 Hibridização por *Dot Blot*

A incorporação da biotina nos oligonucleotídeos A03 e C10 foi feita por PCR assimétrica com primer senso biotinilado (Figura 6.7a). O tamanho dos produtos amplificados, próximos a 100 pb para os aptâmeros A03 e C10, correspondem aos pesos moleculares esperados de 98 e 89 pb, respectivamente.

As marcações resultantes da formação do produto final insolúvel, NBT diformazano podem ser verificadas na Figura 6.7b, o que comprovou a incorporação da biotina nas moléculas dos aptâmeros. A coloração mais intensa observada para a marcação do A03 (1) comparada ao C10 (2) foi devida à quantidade plotada na membrana, que foi de 45 e 30 ng, respectivamente. Como esperado, um forte sinal de marcação foi observado no controle positivo (3), para o qual 90 ng de *primer* biotinilado foram plotados na membrana de nylon e não houve sinal correspondente à sequência não biotinilada do A03 no controle negativo (4).

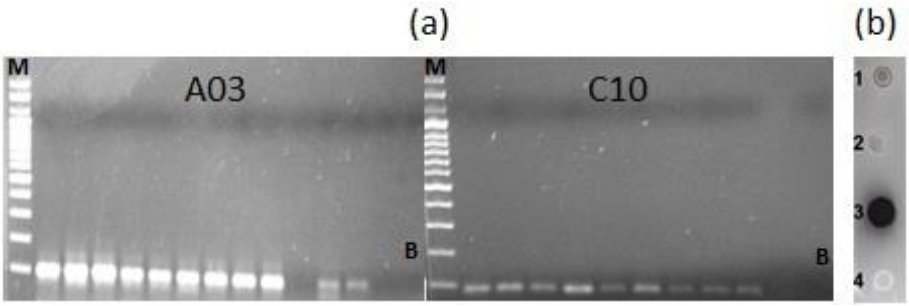

FIGURA 6.7: Ensaios de PCR e *dot blot* para obtenção dos aptâmeros ssDNA A03 e C10 biotinilados. a) Eletroforese dos produtos de PCR assimétrica dos aptâmeros A03 e C10, com peso molecular esperado de 98 e 89 pb, respectivamente; M: marcador de 100 pb; B: branco de reação. b) Teste de incorporação da biotina nas moléculas dos aptâmeros por ensaio colorimétrico: 1) 1,5 µL A03 ssDNA biotinilado (30 ng/µL); 2) 1,5 µL C10 ssDNA biotinilado (20 ng/µL); 3) 1,5 µL Controle positivo: *primer* biotinilado (60 ng/µL). 4) Controle negativo: aptâmero A03 sem biotina.

Nos experimentos *dot blot,* para os aptâmeros A03 e C10 (Figura 6.8), foram obtidas marcações para os quatro sorotipos virais e o controle

negativo (C-) não apresentou sinal, indicando afinidade entre aptâmero:DENV e especificidade do aptâmero. O controle positivo (C+: aptâmero dsDNA) resultou em uma forte marcação, como esperado, pois a fita complementar se liga completamente à fita senso do aptâmero presente na sonda, por complementaridade de bases.

FIGURA 6.8: *Dot blot* para análise da afinidade entre o DENV e os aptâmeros A03 e C10. As sondas utilizadas foram os aptâmeros biotinilados e os alvos marcados na membrana, foram os quatro sorotipos do DENV individuais (400 ng) e um *pool* de todos (D1, D2, D3 e D4). O controle negativo aplicado no experimento do A03 foi o aptâmero C10 ssDNA sem biotina (400 ng), enquanto o controle negativo do experimento do C10 foi o aptâmero A03 ssDNA sem biotina (400 ng). O controle positivo de cada experimento corresponde ao próprio aptâmero na forma dsDNA (200 ng).

Os ensaios de *dot blot* foram escolhidos para o estudo de interação entre aptâmeros:DENV por serem úteis no monitoramento do processo de seleção de ligantes e ensaios de afinidade e especificidade dos mesmos. Essa técnica já foi utilizada para avaliação de aptâmero DNAzima ligada (DLAA) para detecção de trombina em amostras biológicas (ZHU *et al*., 2010), detecção de imunoglobulina E (IgE) (WANG; YE *et al*., 2013) e ensaios preliminares de afinidade e especificidade de ligantes selecionados para detecção de vírus da gripe aviária H5N1 (WANG; ZHAO *et al*., 2013).

6.4 Captura de Ligantes e Detecção por PCR em Tempo Real

Nos ensaios de captura de DENV pelos aptâmeros A03 e C10 e teste reverso (captura dos aptâmeros pelo DENV) foi possível realizar a detecção por qPCR de todas as espécies testadas. Na Figura 6.9 pode-se observar as

curvas de amplificação obtidas, bem como a análise dos produtos de amplificação por eletroforese em gel de agarose e as curvas de dissociação dos produtos *(melting curve)*.

De acordo com o gráfico de amplificação (Figura 6.9I), no teste de captura de DENV, foi obtido Ct de 17 (curva a) para amplificação de DENV capturado pelo aptâmero A03, enquanto para captura pelo C10 apresentou Ct de 14 (curva b). No ensaio reverso, de captura de aptâmeros pelo *pool* de DENV foram observados Cts próximos de 15 e 14 para amplificação de A03 (curva c) e de C10 (curva d), respectivamente. Ambos os ensaios são indicativos de que uma maior quantidade de C10 se ligou ao DENV em comparação à quantidade de A03 ligante.

A eletroforese em gel de agarose (Figura 6.9II) confirmou a captura desses aptâmeros pelo *pool* de DENV e vice-versa, cujos fragmentos amplificados tiveram seus tamanhos próximos ao esperado para DENV (a e b: 150 pb), A03 (c: 98 pb) e C10 (d:89 pb).

A inclusão da curva de dissociação é essencial para verificar se houve formação de um único produto ou se produtos inespecíficos também foram formados. O surgimento de um único pico na curva de *melting* sugere a formação apenas do produto de interesse, enquanto o aparecimento de vários picos indica a formação de produtos inespecíficos na reação ou a eventual formação de dímeros de *primers* (NASCIMENTO *et al.,* 2010).

Conforme representado na Figura 6.9III, para cada reação foi obtido apenas um pico. Como esperado, as curvas a e b, referentes ao DENV, demonstraram uma mesma Tm (temperatura de *melting*) de 76 °C, indicando a amplificação de um mesmo produto. Já as curvas c e d indicaram temperaturas diferentes, a aproximadamente 84,5 °C para o A03 e 85,5 °C para o C10. Esses dados, juntamente com a eletroforese, podem confirmar a ausência de produtos inespecíficos.

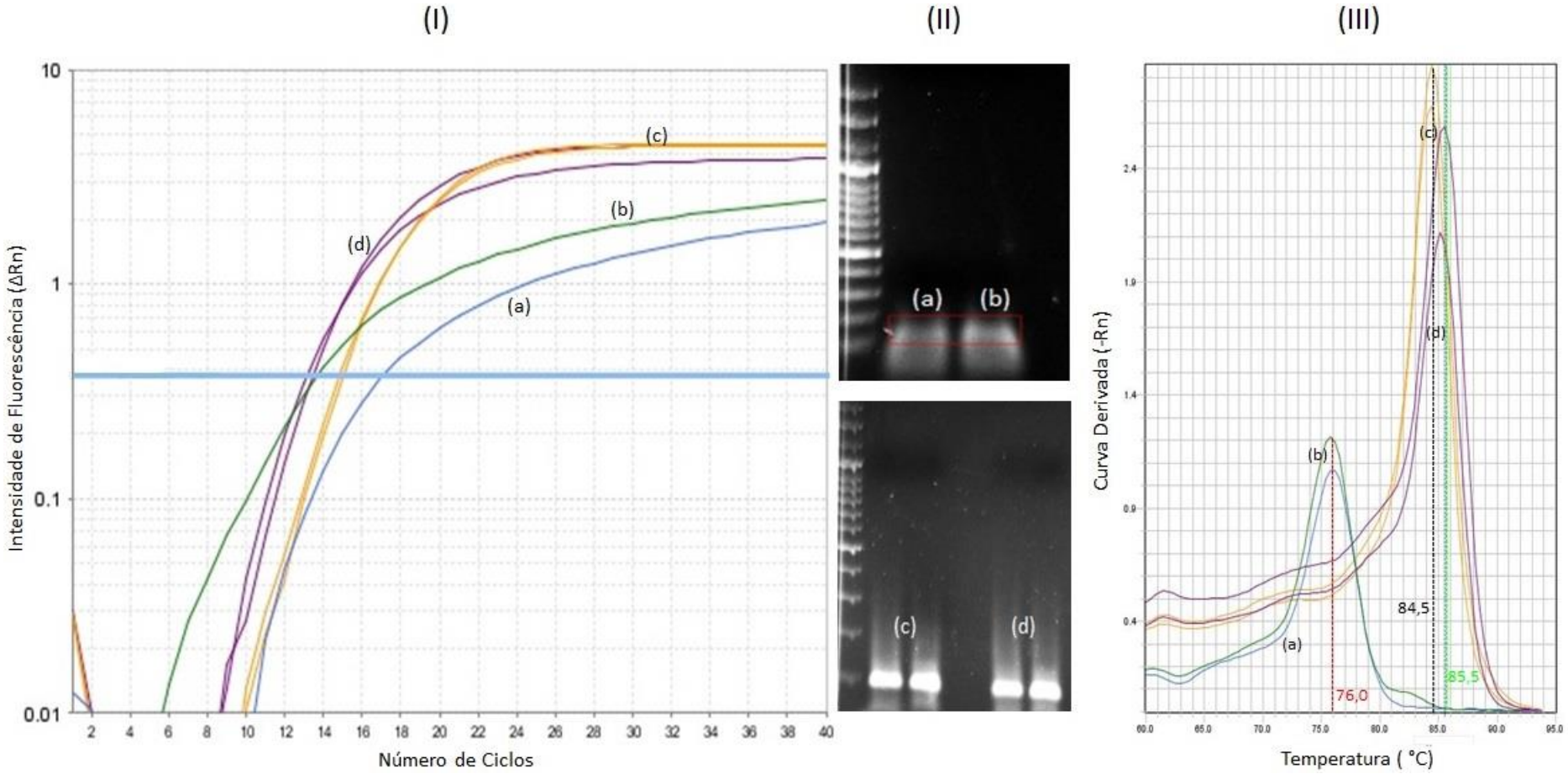

FIGURA 6.9: Curvas de amplificação dos produtos obtidos nos ensaios de captura de DENV e aptâmeros (I), eletroforese em gel de agarose das amostras amplificadas (II) e curva de dissociação dos *primers* (*melting)* (III). (a) DENV (~150 pb) capturado pelo A03; (b) DENV (~150 pb) capturado pelo C10; (c) A03 (98 pb) capturado pelo DENV; (d) C10 (89 pb) capturado pelo DENV; M: marcador de 100 pb.

Na detecção da amplificação por corante intercalante, durante as fases de anelamento e extensão, as moléculas do corante se ligam às fitas duplas de DNA recém sintetizadas (Figura 6.10). O aumento de fluorescência gerado por essa ligação é detectado em tempo real, sendo essa fluorescência proporcional à quantidade do segmento de DNA amplificado (NOVAIS & PIRES-ALVES, 2004).

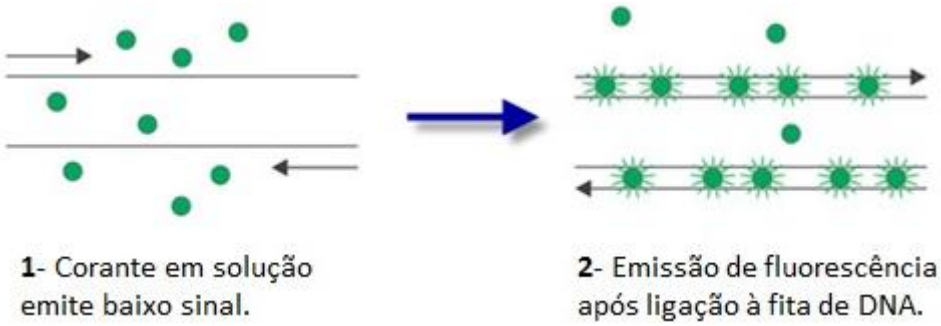

FIGURA 6.10: Representação esquemática do mecanismo de atuação do corante intercalante. Adaptado de Sigma-Aldrich, 2014.

Quando livre em solução, com a presença apenas de ssDNA, o corante intercalante emite sinal de baixa intensidade. À medida que a reação progride e a quantidade de dsDNA aumenta, mais corante se liga aos fragmentos amplificados e, por conseguinte, a intensidade do sinal aumenta (SIGMA-ALDRICH, 2014).

A PCR em tempo real é comumente utilizada como método de detecção em ensaios de afinidade entre ligantes e alvo, devido à sua alta sensibilidade. Fredriksson e cols. (2002) utilizaram a qPCR em um ensaio de proximidade de ligação, empregando o duplo reconhecimento de dois aptâmeros de trombina. Os autores obtiveram um limite de detecção três vezes maior, em comparação com o método ELISA.

A ligação de aptâmeros selecionados contra *E. coli* foi estudada por Marton e cols. (2016), utilizando qPCR como método de detecção. Para os quatro aptâmeros avaliados, foram obtidas constantes de dissociação (K_d) estimadas em valores entre 11,97 e 161,0 nM.

No presente estudo, ainda é necessária a realização de mais testes para determinar quantitativamente o grau de afinidade e especificidade entre esses aptâmeros e o DENV, uma vez que existem algumas variáveis a serem avaliadas nesse experimento, como a pureza das amostras, eficiência dos

processos de imobilização nas partículas magnéticas, de eluição das moléculas capturadas, testes com sorotipos individualizados, bem como testes em variadas concentrações de alvo e aptâmero e com repetições das reações.

6.5 Ensaios FRET

As leituras do aptâmero A03 marcado somente com FAM demonstraram picos de emissão característicos do fluoróforo, os quais tiveram sua intensidade aumentada de acordo com a concentração (10, 50 e 100 nM), como pode ser observado na Figura 6.11. Conforme o esperado, os tampões Tris e salino (TS) não exibiram sinal, confirmando a ausência de interferência.

Nas medidas feitas em Tris, os picos apresentaram o máximo de emissão em 516 nm, enquanto nas leituras feitas em TS foi observado um deslocamento do comprimento de onda do máximo de emissão para 518 nm. Outro efeito verificado foi a redução na intensidade de fluorescência, causado pela presença dos sais.

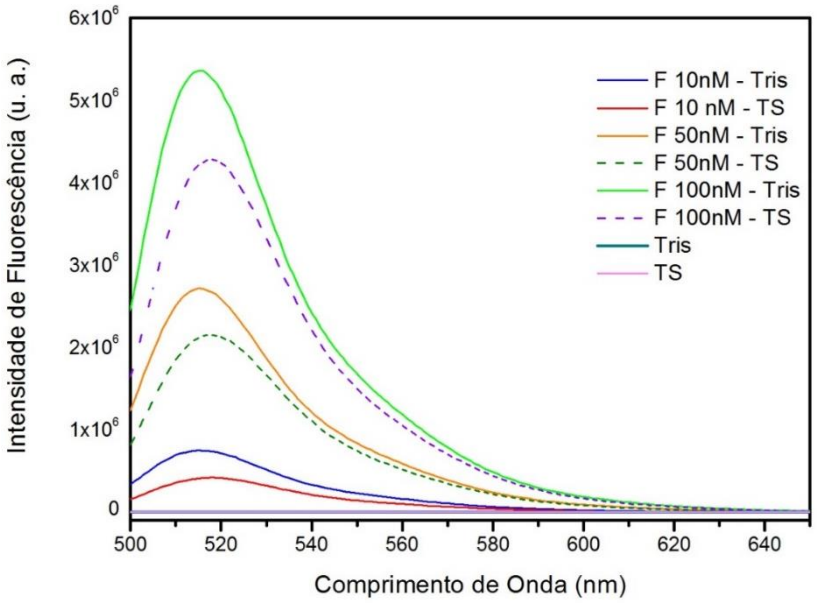

FIGURA 6.11: Espectro de emissão fluorescente do fluoróforo FAM (excitado a 490 nm) ligado ao aptâmero A03 na extremidade 5', nas concentrações de 10, 50 e 100 nM, na presença de Tris e tampão salino (TS).

A partir dos espectros obtidos, a concentração intermediária (50 nM) foi adotada para realização dos demais testes. Nas leituras realizadas para

o A03 marcado somente com TAMRA foi observada uma pequena redução na intensidade de fluorescência na presença dos íons provenientes dos sais, e um deslocamento no comprimento de onda máximo do pico de emissão de 578 para 576 nm quando há dupla marcação, como está demonstrado na Figura 6.12. Além disso, na presença do TAMRA, o fluoróforo FAM apresenta uma grande queda na intensidade de fluorescência, quando comparados aos espectros da molécula marcada somente com FAM. Pode-se notar também o pequeno aumento na intensidade do TAMRA, na presença do FAM. Na dupla marcação também é possível observar um comportamento semelhante na presença de sais, com redução na intensidade de fluorescência de ambos, FAM e TAMRA.

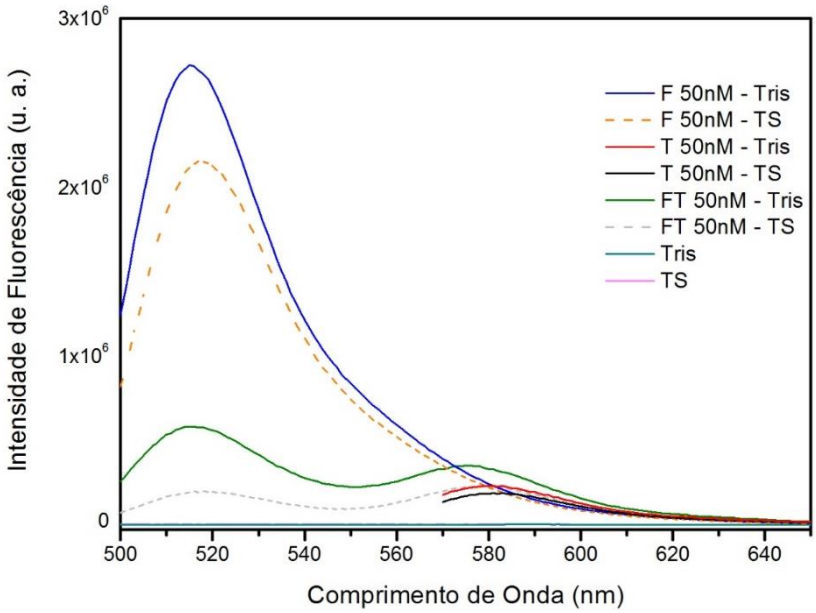

FIGURA 6.12: Espectro de emissão fluorescente das moléculas de A03 marcadas individualmente com FAM (F) na extremidade 5' (λ_{ex} – 490 nm), TAMRA (T) na extremidade 3' (λ_{ex} – 560 nm) e com marcação dupla FT (λ_{ex} – 490 nm). As medidas foram realizadas com 50 nM do aptâmero, na presença de Tris e tampão de salino (TS).

Essas alterações verificadas nas intensidades de fluorescência apresentadas pelos fluoróforos, quando estão presentes simultaneamente na molécula do aptâmero, indicam que a conformação estrutural do oligonucleotídeo possibilita a ocorrência de FRET, onde FAM transfere energia para TAMRA, ocasionando a diminuição da fluorescência do *reporter* e um aumento na intensidade de fluorescência apresentada pelo *quencher*.

Quando a molécula doadora está distante do *quencher,* a mesma emite fluorescência normalmente, porém, quando estão próximas, devido à

transferência de energia que ocorre entre o doador e o aceitador, a fluorescência do doador diminui, e, dependendo do grau de proximidade, pode ser suprimida. Esse comportamento está esquematizado na Figura 6.13.

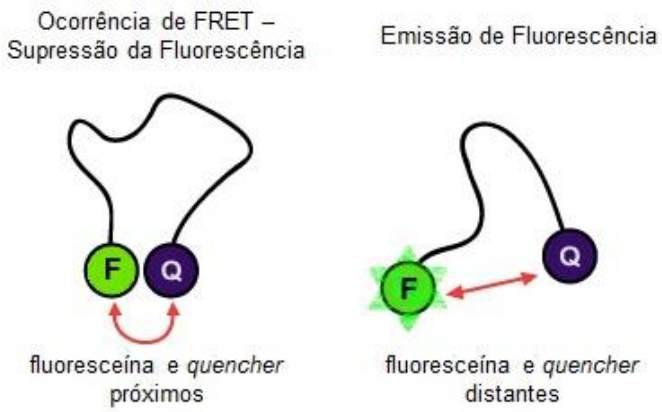

FIGURA 6.13: Relação entre a distância dos fluoróforos fluoresceína (F) e *quencher* (Q); emissão e supressão de fluorescência. Adaptado de Biosearch Technologies, 2016.

O espectro de fluorescência obtido é altamente sensível ao ambiente bioquímico do fluoróforo. Assim, a partir das medidas de fluorescência realizadas, o estudo estrutural do aptâmero A03 pode ser feito, bem como a avaliação de alterações estruturais em função de sais, temperatura e possíveis ligantes.

Diversos fatores como a temperatura, pH, solvente e a presença de outras espécies podem ter um profundo efeito nas características fluorescentes de uma substância, afetando não somente a velocidade dos processos fluorescentes, mas também a natureza e a energia relativa do estado excitado de menor energia (MAXWELL, 2010).

A presença de íons dissociados no solvente altera a polaridade do meio, provocando deslocamentos nos espectros de emissão e afetando energia do estado excitado (LAKOWICZ, 2006). Nas transições entre os orbitais Pi ligantes e Pi* antiligantes, comuns na fluorescência, a molécula no estado excitado é mais polar e tem caráter mais básico do que quando ela se encontra no estado fundamental. O aumento da polaridade do solvente ocasiona uma diminuição da energia relativa do estado excitado, uma vez que o excesso de energia vibracional é perdido para o solvente. Assim, a emissão de energia pode diminuir devido a estabilização do estado excitado pelo solvente polar (INGLE &

CROUCH, 1988; LAKOWICZ, 2006). Esse efeito é denominado *contact quenching* (extinção de contato) (LI *et al*., 2008).

Analisando individualmente a influência dos cátions Na^+ e Mg^{2+}, pode-se notar que o Mg^{2+} tem maior influência na emissão de fluorescência pelo fluoróforo, uma vez que, à medida que a concentração de $MgCl_2$ foi sendo aumentada, ocorreu uma diminuição da emissão fluorescente de FAM e um aumento no pico do TAMRA, conforme mostrado na Figura 6.14a, com maiores diferenças observadas na variação entre 10 e 40 mM e poucas diferenças na variação entre 80 a 400 mM. Esse comportamento sugere o favorecimento da transferência de energia entre doador e aceitador com o aumento de magnésio no meio. Não foi verificada variação da emissão fluorescente em decorrência do aumento da concentração de sódio (Figura 6.14b) e as variações nas concentrações comportaram-se nas curvas de fluorescência como repetições.

Chen e cols. (2012) verificaram em suas investigações sobre a dependência da força iônica no dobramento e na dinâmica das moléculas de ssDNA e RNA, através de medidas de comprimentos de persistência (*lp*), que os íons divalentes Mg^{2+} apresentam influência significativamente maior sobre a estrutura de ácidos nucleicos do que íons monovalentes Na^+, devido ao maior efeito de blindagem das cargas negativas da fita.

Um estudo de força iônica com os cátions Na^+ e Mg^{2+} realizado por Li e cols. (2008), onde desenvolveram uma sonda-aptâmero (duplamente marcado com FAM e TAMRA) baseada em FRET, para detecção rápida e quantitativa de angionina (Ang), demonstrou a diminuição da intensidade de fluorescência dos fluoróforos na presença desses íons e um aumento da razão entre I_D e I_A, apresentada em maior grau na adição de Mg^{2+}. Esses resultados estão de acordo com os aqui obtidos, onde foi observada uma grande influência do Mg^{2+} na fluorescência emitida pelos fluoróforos, entretanto o Na^+ não apresentou efeito.

A temperatura também é outro fator importante a ser analisado no comportamento das biomoléculas. Em geral, o aumento da temperatura tem como consequência um aumento na eficiência dos processos de relaxamento vibracional na desativação do estado excitado. No entanto, por ser um fenômeno de tempo de vida relativamente curto, esse fator é menos crítico no caso da

fluorescência, o que permite fácil observação de emissão fluorescente em temperatura ambiente (INGLE & CROUCH, 1988).

Utilizando a razão entre as intensidades de fluorescência do doador-FAM (I_D) e aceitador-TAMRA (I_A), obtida utilizando os valores de integração sobre todo o espectro, constatou-se uma diminuição da razão entre as intensidades de emissão dos fluoróforos e um aumento da estabilidade estrutural do aptâmero na presença de TS após o aumento da temperatura (Figura 6.14c).

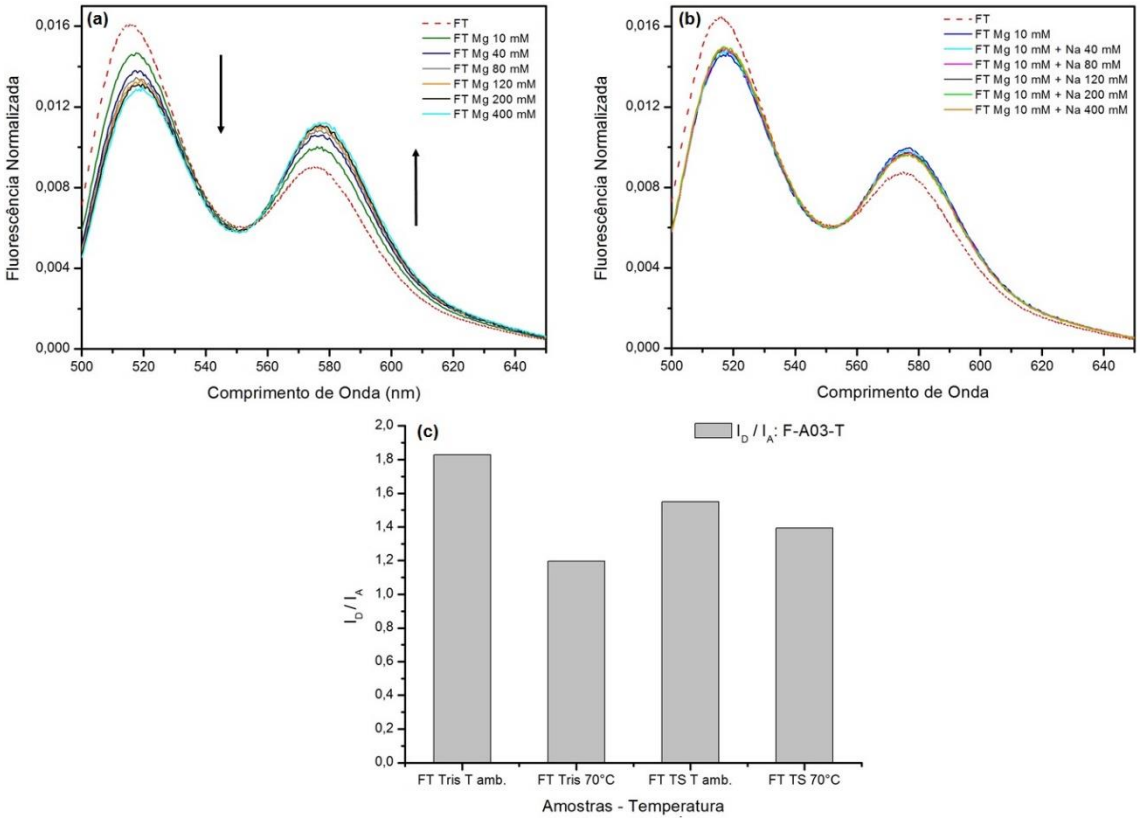

FIGURA 6.14: Espectros de emissão fluorescente demonstrando o efeito da adição de Mg^{2+} e Na^{+} e da temperatura na conformação estrutural do aptâmero A03. (a) Adição de $MgCl_2$: resulta em abaixamento do pico de fluorescência do FAM e aumento do TAMRA; (b) Adição de NaCl: não gera efeito; (c) Gráfico da razão entre as intensidades de fluorescência do doador (I_D) e aceitador (I_A) obtidas nas leituras do A03 marcado com FT em temperatura ambiente e a aproximadamente 70 °C, demonstrando diminuição da razão da intensidade dos picos com o aumento da temperatura.

Ao elevar a temperatura para 70 °C ocorreu redução da emissão de FAM e aumento da emissão de TAMRA, o que é indicativo de FRET, resultando na redução da razão entre as intensidades de fluorescência. Na presença de íons (TS) essa diminuição da razão incidiu em menor grau,

indicando uma menor influência da temperatura. Esse resultado sugere o aumento da estabilidade estrutural do oligonucleotídeo, causado pela presença de íons na solução.

A estabilidade térmica da estrutura quadruplex de um aptâmero ligante de trombina foi avaliado por Rache e Mergny (2015). Nesse estudo, leituras foram realizadas entre 25-95 °C e tampão cacodilato de lítio10 mM (pH 7,2) e 100 mM de sais (KCl e LiCl), sendo demonstrada uma influência da concentração de sais na estabilidade térmica do oligonucleotídeo. O aumento da força iônica da solução gerou aumento da estabilidade do aptâmero, resultando em uma elevação no ponto de fusão do mesmo. Esses resultados corroboram com os dados obtidos para o aquecimento do oligonucleotídeo na presença de sais, onde foi observada uma maior estabilidade estrutural, uma vez que foi verificada uma menor razão entre as intensidades de fluorescência em função do aumento da temperatura, em comparação ao teste com ausência de sais (tampão tris).

6.5.1 Interação aptâmero A03 e DENV: influência da concentração de DENV, tempo de incubação e presença de íons

Ao ser incubada com o alvo (*pool* dos quatro sorotipos de DENV) em tampão Tris, a molécula F-A03-T não apresentou variações na distância entre doador (FAM) e aceitador (TAMRA) (Figura 6.15a). Entretanto, nas leituras feitas em tampão salino, a adição de DENV provocou a alteração estrutural do aptâmero (Figura 6.15b).

Nos espectros de fluorescência normalizados (Figura 6.15), observa-se que a presença dos sais provoca aproximação das extremidades da fita do aptâmero e, consequentemente, a ocorrência de FRET. A transferência de energia entre doador e aceitador é demonstrada pela diminuição no pico de emissão fluorescente apresentado pelo FAM e consequente aumento no pico referente ao TAMRA.

Ao adicionar DENV, a interação entre as moléculas é evidenciada pelo aumento do pico de fluorescência do FAM e diminuição de TAMRA, indicando um distanciamento dos fluoróforos devido à alteração na estrutura

tridimensional provocada por um possível desdobramento da molécula, resultante da formação do complexo aptâmero:alvo (Figura 6.15b).

Com a adição do dobro da quantidade de DENV (50 nM), a intensidade de fluorescência do fluoróforo doador apresentou um pequeno aumento e, proporcionalmente, uma pequena diminuição na intensidade de fluorescência do aceitador. Ao dobrar novamente a quantidade de DENV (100 nM), foi verificado o mesmo comportamento anterior, cuja diferença maior na intensidade de fluorescência do doador comparado ao controle foi observada para a concentração de 25 nM de DENV.

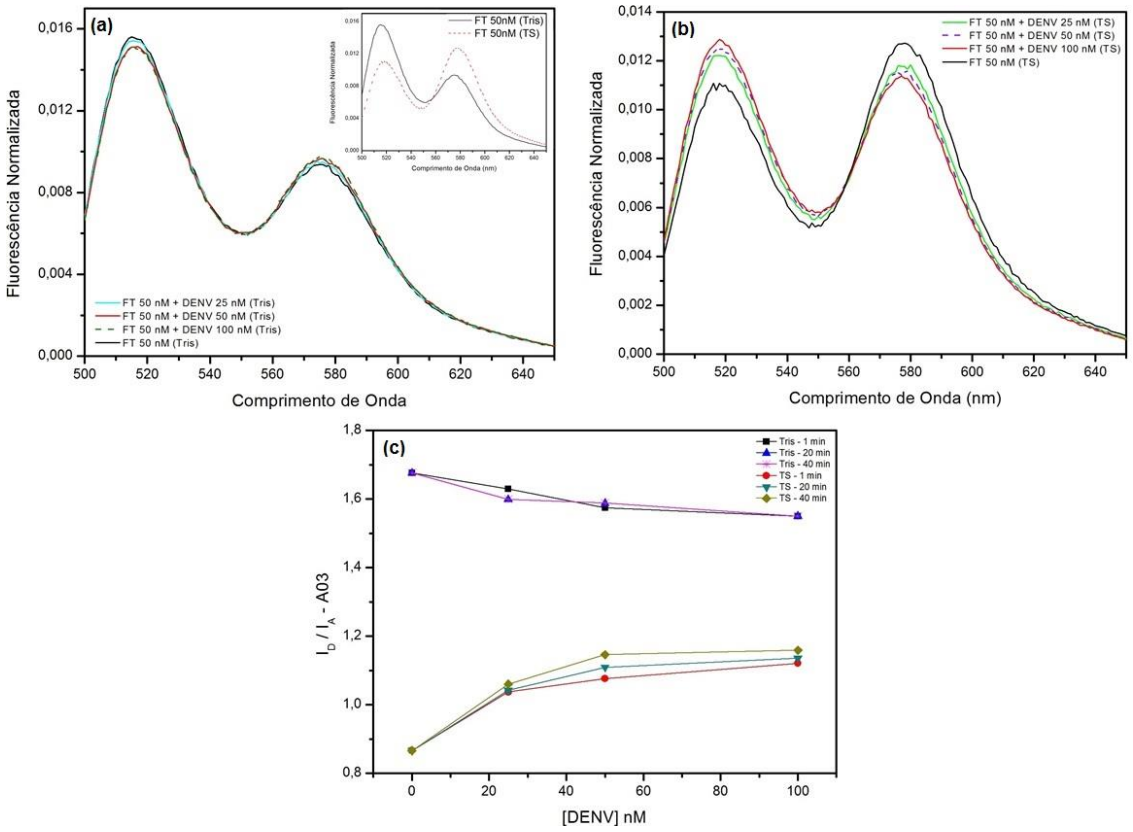

FIGURA 6.15: Espectros de emissão fluorescente das moléculas de A03, marcadas duplamente com FAM (F) na extremidade 5' e TAMRA (T) na extremidade 3', na presença de DENV (25, 50 e 100 nM).(a) A03 + DENV em tampão Tris/ espectros de fluorescência do A03 marcado com FT em Tris e TS; (b) A03 + DENV em tampão salino; (c) Gráfico da razão entre as intensidades de fluorescência do doador (I_D) e aceitador (I_A) obtidas nas leituras do A03 marcado com FT na presença de DENV (25, 50 e 100 nM) e tempos de incubação de 1, 20 e 40 min.

A diferença de fluorescência pode ser analisada também pela razão das intensidades do doador (I_D – em 516 nm nos ensaios com Tris e 518

nm em TS) e aceitador (I_A – em 576 nm nos ensaios com Tris e 578 nm em TS) antes e depois da adição de DENV, representada na Figura 6.15c.

Na presença de 25 nM de DENV o tempo de incubação não apresenta influência na ligação, indicando que todo o DENV presente no meio se ligou nos primeiros minutos de incubação. No teste com 50 nM de DENV, devido a maior quantidade de alvo, houve variação na fluorescência de acordo com o tempo de incubação, sugerindo a ocorrência de modificação estrutural com o passar do tempo. A adição de 100 nM de DENV demonstrou uma influência do tempo bem menor, comparada ao teste com 50 nM de DENV.

Esses dados sugerem que a estequiometria de ligação entre A03 e DENV é de 1:1, considerando as curvas obtidas, as quais demonstram a ocorrência de uma maior quantidade de alterações estruturais das moléculas de aptâmero (50 nM) após a adição de 25 nM e 50 nM de DENV, e uma tendência à estabilização após adição de 100 nM de DENV, onde as diferenças de fluorescência observadas foram menores devido a possível saturação das ligações entre aptâmero e alvo.

Os experimentos mostraram que a presença dos íons provenientes do tampão salino é de extrema importância para a visualização de ligação entre aptâmero e alvo. As leituras feitas em tampão Tris não apresentaram indícios de modificação estrutural, enquanto as medidas realizadas em tampão salino evidenciaram a ocorrência de transferência de energia.

Esses íons, provavelmente, geram uma alteração na estrutura do aptâmero que resulta na aproximação das extremidades e ocorrência de FRET. Para que haja ligação entre o alvo e o aptâmero, os sítios de ligação são liberados pelo desdobramento da molécula, o que resulta em um aumento da distância entre os fluoróforos, diminuindo a ocorrência de FRET e, dessa forma, permitindo a visualização da ligação.

Nagatoishi e cols. (2006) estudaram os efeitos da adição do íon potássio (K^+) na estrutura de um aptâmero ligante de trombina (TBA), marcado com FAM e TAMRA. Em seus experimentos, constatou-se uma diminuição das intensidades de fluorescência dos fluoróforos com o aumento da concentração do íon (0-100 mM) e um aumento na razão entre as intensidades do doador (I_D) e aceitador (I_A). A adição do íon proporcionou a aproximação dos fluoróforos, favorecendo a ocorrência de FRET devido à formação de uma estrutura

quadruplex, corroborando com os resultados obtidos nas medidas com presença e ausência de sais, em que os íons provocaram uma diminuição da distância entre os fluoróforos, aumentando a transferência de energia.

7. CONCLUSÃO

A investigação sobre as conformações dos aptâmeros A03 e C10, avaliada por meio de técnicas de biologia e física molecular, demonstrou suas afinidades e especificidades de ligação à porção 5’UTR do vírus da dengue. As alterações ocorridas nos aptâmeros e alvo, em suas estruturas secundárias e terciárias, indicaram suas interações. Particularmente os íons Na^{+} e Mg^{2+} exerceram influência direta sobre a molécula do aptâmero A03, influenciando na sua biodisponibilidade de interação com o alvo.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Para uma melhor compreensão da cinética de ligação entre os aptâmeros A03 e C10 e o DENV, faz-se necessário repetir e otimizar os testes de captura de ligantes com detecção por PCR em Tempo Real e os ensaios de FRET realizados nesse trabalho, bem como a realização do estudo utilizando a técnica FRET para o aptâmero C10. Todas essas medidas devem ser feitas com repetições, a fim de garantir a reprodutibilidade dos experimentos e a confiabilidade dos resultados obtidos.

A influência dos sais na estrutura conformacional dos aptâmeros e, consequentemente na interação com o DENV, precisa ser investigada de maneira mais aprofundada e, para isso, são necessários mais testes com diferentes combinações de sais e concentrações.

Após a compreensão dessas variáveis citadas, a constante de dissociação (K_d) pode ser calculada, a partir da varredura de um amplo espectro de concentrações para cada um dos quatro sorotipos do DENV.

Esse estudo também pode ser complementado pela análise dessas interações entre os aptâmeros A03:DENV e C10:DENV por meio das técnicas de SPR e RAMAN e pela avaliação da afinidade e especificidade da ligação aptâmero:alvo mediada por mutações sítio-dirigidas nos aptâmeros.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. & WALTER, P. Molecular Biology of the Cell. 4.ed. New York: *Garland Science*; 2010. 1616p.

ALESHIN, A. E.; SHIRYAEV S. A.; STRONGIN, A. Y. & LIDDINGTON, R. C. "Structural evidence for regulation and specificity of flaviviral proteases and evolution of the *Flaviviridae* fold". *Protein Sci.*, v.16(5): p.795-806, **2007**.

ALVAREZ, D. E.; DE LELLA EZCURRA, A. L.; FUCITO, S. & GAMARNIK, A. V. "Role of RNA structures present at the 3´UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication". *Virology*, v.339: p.200-212, **2005a**.

ALVAREZ, D. E.; LODEIRO, M. F.; LUDUENA, S. J.; PIETRASANTA, L. I. & GAMARNIK, A. V. "Long-range RNA-RNA interactions circularize the dengue virus genome". *J Virol*., v.79: p.6631-6643, **2005b**.

AMARAL, P. A.; NEVES, G.; FARIAS, F. & EIFLER-LIMA, V. L. "Química Combinatória: moderna ferramenta para a obtenção de candidatos a protótipos de novos fármacos". *Rev. Bras. Ciênc. Farmac*., v. 39(4): p.351-363, **2003**.

AMORIM, A. L. C. S. Design de Novos Fluoróforos Utilizando Metodologias mais Limpas e Eficientes. Porto, Portugal. Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2012. Dissertação de Mestrado, 92 p.

AQUINO, V. H.; ANATRIELLO, E.; GONÇALVES, P. F.; SILVA, E. V.; VASCONCELOS, P. F. C.; VIEIRA, D. S.; BATISTA, W. C.; BOBADILLA, M. L.; VAZQUEZ, C.; MORAN, M. & FIGUEIREDO, L. T. M. "Molecular epidemiology of dengue type 3 virus in Brazil and Paraguay, 2002–2004." *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 75, n.4, p. 710–715, **2006**.

AVCI-ADALI, M.; PAUL, A.; WILHELM, N.; ZIEMER, G. & WENDEL, H. P. "Upgrading SELEX technology by using lambda exonuclease digestion for single stranded DNA generation". *Molecules*, v.15, p.1-11, **2010**.

AZEVEDO, T. S.; PIOVEZAN, R.; ZUBEN, C. J. V.; ANDRÉ, I. R. N. & ALMEIDA, D. "Perfil epidemiológico da dengue no município de Rio Claro no período de 1996 a 2010. HYGEIA, *Rev. Bras. Geog. Med. Saúde*, v.7(12): p.19-30, **2011**.

BARRETO, M. L & TEIXEIRA, M. G. "Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa". *Estud. Av.*, v.22(64), **2008**.

BHATT, S.; GETHING, P. W.; BRADY, O. J.; MESSINA, J. P.; FARLOW, A. W.; MOYES, C. L.; DRAKE, J. M.; BROWNSTEIN, J. S.; HOEN, A. G.; SANKOH, O.; MYERS, M. F.; GEORGE, D. B.; JAENISCH, T.; WINT, G. R.; SIMMONS, C. P.; SCOTT, T. W.; FARRAR, J. J. &HAY, S. I. "The global distribution and burden of dengue". *Nature*, 496(7446): p.504-507, **2013**.

BIOSEARCH TECHNOLOGIES. Quenching Mechanisms in Oligonucleotide Probes. Disponível em: <https://www.biosearchtech.com/support/education/quenching-mechanisms>. Acesso em: 03 de agosto de 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Dengue: aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2002. 20p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos, nº 176).

BRINTON, M. A. & DISPOTO, J. H. "Sequencing and analysis of genomic RNA secondary structure of the 5'-terminal region of flavivirus". *Virology*, v.162(2): p.290-299, **1988**.

BRINTON, M. A.; FERNANDEZ, A. V. & DISPOTO, J. H. "The 3_-nucleotides of flavivirus genomic RNA form a conserved secondary structure". *Virology*, v.153: p.113–121, **1986**.

BRUNO, J. G.; CARRILLO, M. P.; RICHARTE, A. M.; PHILLIPS, T.; ANDREWS, C. & LEE, J. S. "Development, screening, and analysis of DNA aptamer libraries potentially useful for diagnosis and passive immunity of arboviruses". *BMC Res Notes.* v.5(633), p.1-12, **2012**.

BVS. Biblioteca Virtual em Sáude. DECS – Descritores em Ciência da Saúde. Disponível em: <http://decs.bvs.br/cgi-bin/wxis1660.exe/decsserver>. Acesso em: 01 de agosto de 2016.

CAHOUR, A.; PLETNEV, A.; VAZIELLE-FALCOZ, M.; ROSEN, L. & LAI, C.J. "Growth-restricted dengue virus mutants containing deletions in the 5 noncoding region of the RNA genome". *Virology,* v.207: p.68–76, **1995**.

CARVALHO, A. T.; AZEREDO, E. L.; REIS, S. R. , MIRANDA, A. S.; GANDINI, M.; BARBOSA, L. S. & KUBELKA, C. F. "Dengue-2 infection and the induction of apoptosis in human primary monocytes". *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v.104(8): p.1091-1099, **2009**.

CATTEAU, A.; ROUÉ, G.; YUSTE, V. J.; SUSIN, S.A. & DESPRÈS, P. "Expression of dengue ApoptoM sequence results in disruption of mitochondrial potential and caspase activation". *Biochimie*, v.85(8): p.789-793, **2003**.

CHAMBERS, T. J.; HAHN, C. S.; GALLER, R. & RICE, C. M. "Flavivirus genome organization, expression, and replication". *Annu. Rev. Microbiol.*, v.44: p.649-688, **1990**.

CHEN, H.; MEISBURGER, S. P.; PABIT, S. A.; SUTTON, J. L.; WEBB, W. W. & POLLACK, L. "Ionic strength-dependent persistence lengths of single-stranded RNA an DNA". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v109(3): p.799-804, **2012**.

CHEN, H. L.; HSIAO, W. H.; LEE, H. C.; WU, S. C. & CHENG, J. W. "Selection and characterization of DNA aptamers targeting all four serotypes of dengue viruses". *PLoS One*, v. 10(6): p. 1-13, **2015**.

CHIEN, L. J.; LIAO, T. L.; SHU, P. Y.; HUANG, J. H.; GUBLER, D. J.; CHANG, G. J. “Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses”. *J. Clin. Microbiol*., v.44: p.1295-1304, **2006**.

CHUSHAK, Y. & STONE, M.O. “*In silico* selection of RNA aptameros”. *Nucleic Acids Res*., v.37(9), **2009**.

CITARTAN, M.; TANG, T-H.; TAN, S-C.; HOE, C-H.; SAINI, R.; TOMINAGA, J. & GOPINATH, S. C. B. “Asymmetric PCR for good quality ssDNA generation towards DNA aptamer production”. *Songklanakarin J.l Sci. Tech.*, v. 34(2): p. 125-131, **2012**.

CLYDE, K.; KYLE, J. & HARRIS, E. “Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis”. *J. Virol*., v.80(23): p.11418-11431, **2006**.

CNOSSEN, E. DE J. N. Seleção e Caracterização de Aptâmeros de RNA Ligantes à Região 5’UTR do Genoma do Vírus da Dengue. Catalão, Programa de Pós-Graduação em Química – UFG/RC, 2014. Dissertação de mestrado. 71p.

DARMOSTUK, M.; RIMPELOVAA, S.; GBELCOVA, H. & RUMLA, T. “Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology”. *Biotec. Adv*., v.33: p.1141–1161, **2015**.

DE RACHE, A. & MERGNY, J. L. “Assessment of selectivity of G-quadruplex ligands via an optimised FRET melting assay”. *Biochimie*, v.115: p.194-202, **2015**

DESPRÈS, P.; FRENKIEL, M. P.; CECCALDI, P. E.; SANTOS, C. D. & DEUBEL V. “Apoptosis in the mouse central nervous system in response to infection with mouse-neurovirulent dengue viruses”. *J Virol.*, v.72(1): p.823-829, **1998**.

DOS SANTOS, H. W.; POLONI, T. R.; SOUZA, K. P.; MULLER, V. D; TREMESCHIN, F. NALI, L. C.; FANTINATTI, L. R.; AMARILLA, A. A.; CASTRO, H. L.; NUNES, M, R.; CASSEB, S. M.; VASCONCELOS, P. F.; BADRA, S. J.; FIGUEIREDO, L. T. & AQUINO, V. H. “A simple one-step real-time RT-PCR for diagnosis of dengue virus infection”. *J. Med. Virol*., v.80(8): p.1426-1433, **2008**.

DUCLAIR, S.; GAUTAM, A.; ELLINGTON, A. & PRASAD, V. R. “High-affinity RNA aptamers against the HIV-1 protease inhibit both in vitro protease activity and late events of viral replication”. *Mol. Ther. Nuc. Ac*., v.4, **2015**.

ELLINGTON, A. D. & SZOSTAK, J. W. “In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands”. *Nature*, v.346: p.818–822, **1990**.

EYETECH STUDY GROUP. “Preclinical and phase 1A clinical evaluation of an anti-VEGF pegylated aptamer (EYE001) for the treatment of exudative age-related macular degeneration”. *Retina*, v.*22*: p.143–152, **2002**.

EYETECH STUDY GROUP. “Anti-vascular endothelial growth factor therapy for subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration: phase II study results”. *Ophthalmology*, v.110: p.979–986, **2003**.

FAN, X.; GUO, Y.; WANG, L.; XIONG, X.; ZHU, L. & FANG K. “Diagnosis of prostate cancer using anti-PSMA aptamer A10-3.2-oriented lipid nanobubbles”. *Int. J. Nanomedicine*, v.12(11): p.3939-3950, **2016**.

FILOMATORI, C. V.; LODEIRO, M.F.; ALVAREZ, D.E.; SAMSA, M.M.; PIETRASANTA L. & GAMARNIK, A.V. “A 5′ RNA element promotes dengue virus RNA synthesis on a circular genome”. *Genes Dev*., v.20(16): p. 2238–2249, **2006**.

FLETCHER, S. J.; PHILLIPS, L. W.; MILLIGAN, A. S. & RODDA, S. J. “Toward specific detection of Dengue virus serotypes using a novel modular biosensor”. *Biosens. Bioelectron*., v.25(4): p.1696-1700, **2010**.

FREDRIKSSON, S.; GULLBERG, M.; JARVIUS, J.; OLSSON, C.; PIETRAS, K.; GUSTAFSDOTTIR, S. M.; OSTMAN, A. & LANDEGREN, U. “Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays”. *Nat. Biotechnol*., v.20, pp. 473–477, **2002**.

GEBHARD, L. G.; FILOMATORI, C. V. & GAMARNIK, A. V. “Functional RNA elements in the dengue virus genome”. *Viruses*, v.3(9): p.1739-1756, **2011**.

GRACIE, K.; SMITH, W. E.; YIP, P.; SUTTER, J. U.; BIRCH, D. J.; GRAHAM, D. & FAULDS, K. “Interaction of fluorescent dyes with DNA and spermine using fluorescence spectroscopy”. *Analyst*, v.139(15): p.3735-3743, **2014**.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, E.; DE-LOS-SANTOS-ÁLVAREZ, N.; MIRANDA-ORDIERES, A. J. & LOBO-CASTAÑÓN, M. J. “SPR evaluation of binding kinetics and affinity study of modified RNA aptamers towards small molecules”. *Talanta*, v.99: p.767-773, **2012**.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. (Ed). Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever, New York: *CAB International*, 1997, p.1-22.

GUBLER, D. J. “Dengue and dengue hemorrhagic fever”. *Clin. Microbiol. Rev*., v.11(3): p.480-496, **1998**.

GUILBAULT, G. Practical Fluorescence. 2 ed, rev. and expanded. Edited by: George G. Guilbault. New Orleans: *Marcel Dekker*, INC. 1990, 775p.

GUO, W. M.; KONG, K. W.; BROWN, C. J.; QUAH, S. T.; YEO, H. L.; HOON, S. & SEOW, Y. “Identification and characterization of an eIF4e DNA aptamer that inhibits proliferation with high throughput sequencing”. *Mol. Ther. Nuc. Ac*., **2014**.

GUZMAN, M. G.; ALVAREZ, M.; RODRÍGUEZ, R.; ROSARIO, D.; VÁZQUEZ, S.; VALD, S. L.; CABRERA, M. V. & KOURÍ, G. “Fatal dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1997”. *Int. J. Infect. Dis*. v.3(3): p.130–135, **1999**.

GUZMAN, M. G.; HALSTEAD, S. B.; ARTSOB, H.; BUCHY, P.; FARRAR, J.; GUBLER, D. J.; HUNSPERGER, E.; KROEGER, A.; MARGOLIS, H. S.; MARTÍNEZ, E.; NATHAN, M. B.; PELEGRINO, J. L.; SIMMONS, C.; YOKSAN, S. & PEELING, R. W. “Dengue: a continuing global threat”. *Nat. Rev. Microbiol.*, p. S7-S16, **2010**.

HAMMON, W. M.; RUDNICK A.; SATHER, G.; ROGERS, K. D.; MORSE, L. J. “New hemorrhagic fevers of children in the Philipines and Thailand”. *Trans. Assoc. Am. Physicians***,** v.73: p.140-155, **1960**.

HELD, P. An Introduction to Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Technology and its Application in Bioscience. Laboratory Manager, BioTek Instruments, Inc. P.O. Box 998, Winooski. Copyright © 2012.

HENCHAL, E. A. & PUTNAK, J. R. “The dengue viruses”. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.3(4): p.376-396, **1990**.

HERMANN, T. & PATEL, D. J. “Adaptive recognition by nucleic acid aptamers”. *Science*, v. 287(5454): p.820-825, **2000**.

HERR, J. K.; SMITH, J. E.; MEDLEY, C. D.; SHANGGUAN, D. & TAN, W. “Aptamer-conjugated nanoparticles for selective collection and detection of cancer cells”. *Anal. Chem*., v.78(9): p.2918-2924, **2006**.

HERRERA, R. D.; CABRERA, M. V.; GARCIA, S. & GILART, M. “IgM antibodies to dengue virus in dried blood on filter paper”. *Clin. Chim. Acta*, v.367: p.204–206, **2006**.

HOTTZ, E. D.; OLIVEIRA, M. F.; NUNES, P. C.; NOGUEIRA, R. M.; VALLS-DE-SOUZA, R. DA POIAN, A. T.; WEYRICH, A. S.; ZIMMERMAN, G. A.; BOZZA, P. T. & BOZZA, F. A. “Dengue induces platelet activation, mitochondrial dysfunction and cell death through mechanisms that involve DC-SIGN and caspases”. *J. Thromb. Haemost.,* v.11(5): p.951-962, **2013**.

HUANG, C. C.; HUANG, Y. F.; CAO, Z.; TAN, W. & CHANG, H. T. “Aptamer-modified gold nanoparticles for colorimetric determination of platelet-derived growth factors and their receptors”. *Anal. Chem*., v.77(17): p.5735-4571, **2005**.

HUANG, R.; XI, Z.; DENG, Y. & HE, N. “Fluorescence based Aptasensors for the determination of hepatitis B virus e antigen”. *Sci Rep*., v. 8(6): p.1-7, **2016**

HUSSAIN, S. A. An Introduction to Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)**.** Department of Physics, Tripura University, 2007.

IGLESIAS, N. G. & GAMARNIK, A. V. “Dynamic RNA structures in the dengue virus genome”. *RNA Biology*, v.8(2): p.249-257, **2011**.

INGLE, J. D. & CROUCH, S. R. Spectrochemical Analysis. Englewood Cliffs: *Prentice Hall*, 1988. 590 p.

JOCKUSCH, S.; MARTÍ, A. A.; TURRO, N. J.; LI, Z.; LI, X.; JU, J.; STEVENS, N. & AKINS, D. L. “Spectroscopic investigation of a FRET molecular beacon containing two fluorophores for probing DNA/RNA sequences”. *Photochem. Photobiol. Sci*., v.5(5): p.493-498, **2006**.

KAO, C. L.; WU, M. C.; CHIU, Y. H.; LIN, J. L.; WU, Y. C.; YUEH, Y. Y.; CHEN, L. K.; SHAIO, M. F. & KING, C. C. “Flow cytometry compared with indirect immunofluorescence for rapid detection of dengue virus type 1 after amplification in tissue culture”. *J. Clin. Microbiol*., v.39(10): p.3672–3677, **2001**.

KIMURA, R.; HOTTA, S. “Studies on dengue virus (VI). On the inoculation of dengue vírus into mice”. *Nippon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi***,** Tokyo, v.3379: p.629-633, **1944**.

KIRKPATRICK, B. D.; WHITEHEAD, S. S.; PIERCE, K. K.; TIBERY, C. M.; GRIER, P. L.; HYNES, N. A.; LARSSON, C. J.; SABUNDAYO, B. P.; TALAAT, K. R.; JANIAK, A.; CARMOLLI, M. P.; LUKE, C. J.; DIEHL, S. A. & DURBIN, A. P. “The live attenuated dengue vaccine TV003 elicits complete protection against dengue in a human challenge model”. *Sci. Transl. Med.*, v.8: p.330-336, **2016**.

KOFLER, R. M.; HOENNINGER, V. M.; THURNER, C. & MANDL C. W. “Functional analysis of the tick-borne encephalitis virus cyclization elements indicates major differences between mosquito-borne and tick-borne flaviviruses”. *J. Virol.*, v. 80(8): p.4099-4113, **2006**.

KONG D.-M.; HUANG, Y.-P.; ZHANG X.-B.; YANG, W.-H.; SHEN, H.-X. & MI, H.-F. “Duplex probes: a new approach for the detection of specific nucleic acids in homogenous assays”. *Anal. Chim. Acta*, v.491: p.135–143, **2003**.

KUNO, G. “Cultivation of mosquito cell lines in serum-free media and their effects on dengue virus replication”. *In Vitro*, v.19(9): p.707-713, **1983**.

KUNO, G.; MOORE, C. G. & SATHER, G. E. “Factors affecting syncytial development in *Aedes pseudoscutellaris* cells by dengue viruses”. *Am. J. Trop. Med. Hyg.,* v.30(4): p.870-875, **1981**.

KWOK, P. Y. “SNP genotyping with fluorescence polarization detection”. *Hum. Mutat*., v.19(4): p.315-323, **2002**.

LAKOWICZ, J. R. Principles of Fluorescence. 3. ed. Baltimore: *Springer*, 2006. 954 p.

LARA, F. J. S. Hibridação de Ácidos Nucléicos. 2. ed. Ribeirão Preto: *Holos*, 2002. 127 p.

LEVY-NISSENBAUM, E.; RADOVIC-MORENO, A. F.; WANG, A. Z.; LANGER, R. & FAROKHZAD, O. C. “Nanotechnology and aptamers: applications in drug delivery”. *Trends Biotechnol*., v.26(8): p.442-449, **2008**.

LI, W.; YANG, X.; WANG, K.; TAN, W.; LI, H. & MA, C. “FRET-based aptamer probe for rapid angiogenin detection”. *Talanta*, v.75(3): p.770-774, **2008**.

LIMONTA, D.; CAPÓ, V.; TORRES, G.; PÉREZ, A. B. & GUZMÁN, M. G. “Apoptosis in tissues from fatal dengue shock syndrome”. *J. Clin. Virol*., v.40(1): p.50-54, **2007**.

LINDENBACH, B. D.; THIEL, H. & RICE, C. M. “*Flaviviridae*: the viruses and their replication”. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. 5th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins;p. 1101-52, **2007**.

LOPES, N.; NOZAWA, C. & LINHARES, R. E. C. “Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil”. *Rev. Pan-Amaz Saúde,* v.5(3): p.55-64*,* **2014***.*

LORENZI, J. C. C. & CASTELO, A. A. M. C. “Resposta imune contra infecções virais”. *Scire Salutis*, v.1(2): p.35-44, **2011**.

MACIEL, I. J.; SIQUEIRA JR., J. B. & MARTELLI, C. M. T. “Epidemiologia e desafios no controle do dengue”**.** *Rev. Pat. Trop.*, v.37(2): p.111-130, **2008**.

MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E. & NITSCHE, A. “Real-time PCR in virology”. *Nuc. Ac. Res.*, v.30(6): p.1292-1305, **2002**.

MAIRAL, T.; NADAL, P.; SVOBODOVA, M. & O'SULLIVAN, C. K. “FRET-based dimeric aptamer probe for selective and sensitive Lup an 1 allergen detection”. *Biosens. Bioelectron*., v.54: p.207-210, **2014**.

MALLIKARATCHY, P.; STAHELIN, R. V.; CAO, Z.; CHO, W. & TAN, W. “Selection of DNA ligands for protein kinase C-delta”. *Chem. Commun. (Camb)., v.*30: p.3229–3231, **2006**.

MAO, X.; MARKY, L. A. & GMEINER, W, H. “NMR structure of the thrombin-binding DNA aptamer stabilized by Sr^{2+}”. *J. Biomol. Struct. Dyn*., v.22(1): p.25-33, **2004**.

MARANGONI, K.; NEVES, A. F.; ROCHA, R. M.; FARIA, P. R.; ALVES, P. T.; SOUZA, A. G.; FUJIMURA, P. T.; SANTOS, F. A.; ARAÚJO, T. G.; WARD, L. S. & GOULART, L. R. “Prostate-specific RNA aptamer: promising nucleic acid antibody-like cancer detection”. *Sci. Rep*., v.5:12090, **2015**.

MARTIN, J. A.; PAREKH, P.; KIM, Y.; MOREY, T. E.; SEFAH, K.; GRAVENSTEIN, N.; DENNIS, D. M. & TAN, W. “Selection of an aptamer antidote to the anticoagulant drug bivalirudin”. *PLoS One*, v. 8, **2013**.

MARTON, S.; CLETO, F.; KRIEGER, M. A. & CARDOSO, J. “Isolation of an aptamer that binds specifically to *E. coli*”. *PLoS One*, v.11(4), **2016**.

MASSEY. M.; ALGAR, W. R. & KRULL, U. J. “Fluorescence resonance energy transfer (FRET) for DNA biosensors: FRET pairs and Förster distances for various dye-DNA conjugates”. *Anal. Chim. Acta*, v.568(1-2): p.181-189, **2006**.

MAXWELL/PUC-RIO. Introdução à Fluorescência. Repositório Institucional da Pontífica Universidade Católica do Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <http://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/15676/15676_3.PDF>. Acesso em: 20 de julho de 2016.

MENCIN, N.; ŠMUC, T.; VRANIČAR, M.; MAVRI, J.; HREN, M.; GALEŠA, K.; KRKOČ, P.; ULRICH, H. & ŠOLAR, B. “Optimization of SELEX: Comparison of different methods for monitoring the progress of in vitro selection of aptamers”. *J. Pharm. Biom. Anal*., v.91: p.151-159, **2014**.

MOSING, R. K.; MENDONSA, S. D. & BOWSER, M. T. “Capillary electrophoresis-SELEX selection of aptamers with affinity for HIV-1 reverse transcriptase”. *Anal. Chem*., v.77(19): p.6107–6112, **2005**.

NAGATOISHI, S.; NOJIMA, T.; GALEZOWSKA, E.; JUSKOWIAK, B. & TAKENAKA, S. “G quadruplex-based FRET probes with the thrombin-binding aptamer (TBA) sequence designed for the efficient fluorometric detection of the potassium ion”. *Chembiochem*., v.7(11): p.1730-1737, **2006**.

NAJIOULLAH, F.; VIRON, F. & CÉSAIRE, R. “Evaluation of four commercial real-time RT-PCR kits for the detection of dengue viruses in clinical samples”. *Virol. J.* v.11(164): p.1-5, **2014**.

NASCIMENTO, S.; SUAREZ, E. H. & PINHAL, M. A. S. “Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica”. *RBM Esp. Oncol*., v. 67: p.7-19, **2010**.

NEVES, M. A.; REINSTEIN, O. & JOHNSON, P. E. “Defining a stem length-dependent binding mechanism for the cocaine-binding aptamer. A combined NMR and calorimetry study”. *Biochemistry*, v.49(39): p.8478-8487, **2010**.

NIH. National Institute of Allergy and Infectious Diseases. Dengue Vaccine Enters Phase 3 Trial in Brazil Investigational Vaccine to Prevent “Breakbone Fever” Developed at NIH. Disponível em: <https://www.niaid.nih.gov/news/newsreleases/2016/Pages/DengueBrazilTrial.aspx>. Acesso em: 20 de julho de 2016.

NOGUEIRA, R. M.; MIAGOSTOVICH, M. P.; DE FILIPPIS, A. M.; PEREIRA, M, A. & SCHATZMAYR, HG. “Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil”. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* v.96: p.925-926, **2001**.

NOVAIS, C. M. & PIRES-ALVES, M. “PCR em Tempo Real: uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase”. *Rev. Biot. Cienc. e Desenv*., v.33: p.10-13, **2004**.

OCHSENKÜHN, M. A. &CAMPBELL, C. J. “Probing biomolecular interactions using surface enhanced Raman spectroscopy: label-free protein detection using

a G-quadruplex DNA aptamer". *Chem. Commun. (Camb)*., v.46(16): p.2799-801, **2010**.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD . Dengue: guías para la atención de enfermos em la Region de las Américas. 2.ed. Washington, DC: OPS, 2016.

OSANAI, C. H.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P.; TANG, A.T.; do AMARAL, R. S.; PASSOS, A. D. & TAUIL, P. L. "Dengue outbreak in Boa Vista Roraima preliminary report". *Rev. Inst. Med. Trop.,* v.25: p.53–54, **1983**.

PAGBA, C. V.; LANE, S. M.; CHO, H. & WACHSMANN-HOGIU, S. "Direct detection of aptamer-thrombin binding via surface-enhanced Raman spectroscopy". *J. Biomed. Opt*., v.15(4), **2010**.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever in the Americas: Guidelines for Prevention and Control. Washington, DC, USA), 1994.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. 2015: Number of Reported Cases of Dengue and Severe Dengue (SD) in the Americas, by Country - June 24, 2016 (EW 52). Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=1&Itemid=40734>. Acesso em: 19 de julho de 2016.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION . 2016: Number of Reported Cases of Dengue and Severe Dengue (SD) in the Americas, by Country - July 15, 2016 (EW 26). Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=1&Itemid=40734>. Acesso em: 19 de julho de 2016.

PAREKH, P.; TANG, Z.; TURNER, P. C.; MOYER, R. W. & TAN, W. "Aptamers recognizing glycosylated hemagglutinin expressed on the surface of vaccinia virus-infected cells". *Anal. Chem.,* V.82: p.8642–8649, **2010**.

PATEL, D.J. & SURI, A. K. "Structure, recognition and discrimination in RNA aptamer complexes with cofactors, amino acids, drugs and aminoglycoside antibiotics". *Rev. Mol. Biotechnol*., v.74(60), **2000**.

PHANTHANAWIBOON, S.; A-NUEGOONPIPAT, A.; PANNGARM, N.; LIMKITTIKUL, K.; IKUTA, K.; ANANTAPREECHA, S. & KUROSU, T. "Isolation and propagation of Dengue virus in Vero and BHK-21 cells expressing human DC-SIGN stably". *J. Virol. Methods,* v.209: p.55-61, **2014**.

PIETRASZEWSKA-BOGIEL, A. & GADELLA, T. W. J. "FRET microscopy: from principle to routine technology in cell biology". *J. Microsc*., v. 241: p.111–118, **2011**.

POLACEK, C.; FOLEY, J.E. & HARRIS, E. "Conformational changes in the solution structure of the dengue virus 5' end in the presence and absence of the 3' untranslated region". *J. Virol*., v.83: p.1161-1166, **2009**.

PORTAL BRASIL. Saiba mais informações sobre a vacina contra a dengue. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/saude/2016/01/saiba-mais-informacoes-sobre-a-vacina-da-dengue-1>. Acesso em: 23 de agosto de 2016.

RADOM, F.; JUREK, P. M.; MAZUREK, M. P.; OTLEWSKI, J. & JELEŃ, F. "Aptamers: molecules of great potential". *Biotechnol. Adv*., v.31(8): p.1260-1274, **2013**.

RAENGSAKULRACH, B.; NISALAK, A.; MANEEKARN, N.; YENCHITSOMANUS, P. T.; LIMSOMWONG, C.; JAIRUNGSRI, A.; THIRAWUTH, V.; GREEN, S.; KALAYANAROOJ, S.; SUNTAYAKORN, S.; SITTISOMBUT, N.; MALASIT, P. & VAUGHN, D. "Comparison of four reverse transcription-polymerase chain reaction procedures for the detection of dengue virus in clinical specimens". *J. Virol. Methods*, v.105(2): p.219–232, **2002**.

ROSEN, L.; DROUET, M. T. & DEUBEL, V. "Detection of dengue virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction in the liver and lymphoid organs but not in the brain in fatal human infection". *Am. J. Trop. Med. Hyg*., v.61: p.720–724, **1999**.

RUSSEL, P. K.; BRANDT, W. E.; DALRYMPLE, J. M. "Chemical and antigenic structure of *Flavivirus*es". In: Schlesinger, R. W. (Ed). The Togaviruses: biology structure, replication. *Academic Press*, p. 503-529, **1980**.

SABIN, A. B. & SCHLESINGER, M. C. "Production of immunity to dengue with vírus modified by propagation in mice". *Science*, v.101: p.640-642, **1945**.

SCHATZMAYR, Hermann. G.; NOGUEIRA, Rita Maria R.; ROSA, A. P. A. T. "An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro-1986". *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.81(2): p.245-246, **1986**.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária De Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico Dengue. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Dengue, v. 47, n. 28, 2016. "Monitoramento dos casos de dengue e febre de Chikungunya até a Semana Epidemiológica 23, 2016". Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-dengue>. Acesso em: 19 de julho de 2016.

SENEVIRATNE, S. L.; MALAVIGE, G. N. & DE SILVA, H. J. "Pathogenesis of liver involvement during dengue viral infections". *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.100(7): p.608-614, **2006**.

SHIRATORI, I.; AKITOMI, J.; BOLTZ, D. A.; HORII, K.; FURUICHI, M. & WAGA, I. "Selection of DNA aptamers that bind to influenza A viruses with high affinity and broad subtype specificity". *Biochem. Biophys. Res. Commun*., v.443(1): p.37-41, **2014**.

SHU, P. Y.; CHEN, L. K.; CHANG, S. F.; YUEH, Y. Y.; CHOW, L.; CHIEN, L. J.; CHIN, C.; LIN, T. H. & HUANG, J. H. "Comparison of capture immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and nonstructural protein NS1 serotype-specific IgG ELISA for differentiation of primary and

secondary dengue virus infections". *Clin. Diagn. Lab. Immunol.,* v.10: p.622-630, **2003**.

SIGMA-ALDRICH. Primers and Fluorescente Probes: For Quantitative Real-Time PCR and other Applications. Sigma-Aldrich Co. LLC. ©2014.

SILVA, A. G. Isolamento de Aptâmeros Ligantes à Sequência 3'-UTR do RNA do Vírus da Dengue. Catalão, Programa de Pós-Graduação em Química – UFG/RC, 2015. Dissertação de mestrado. 65 p.

ŠMUC, T.; AHN, I. Y. & ULRICH, H. "Nucleic acid aptamers as high affinity ligands in biotechnology and biosensorics". *J. Pharm. Biomed. Anal*., v.81-82: p.210-217, **2013**.

SONG, K-M.; LEE, S. & BAN, C. "Aptamers and their biological applications". *Sensors*, v.12(1): p.612-631, **2012**.

STOJANOVIC, M. N. & LANDRY, D. W. "Aptamer-based colorimetric probe for cocaine". *J. Am. Chem. Soc*., v.124(33): p.9678-9679, **2002**.

STOLTENBURG, R.; REINEMANN, C. & STREHLITZ, B. "SELEX — a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands". *Biomol. Eng*., v.24(4): p.381–403, **2007**.

SUAYA, J. A.; SHEPARD, D. S. & BEATTY, M. E. "Dengue: burden of disease and costs of illness". In UNDP, UNICEF, World Bank, WHO, *Scientific working group report on dengue*, p. 35-49, **2007**.

SUN, H.; ZHU, X.; LU, P. Y.; ROSATO, R. R.; TAN, W. & ZU, Y. "Oligonucleotide Aptamers: new tools for targeted cancer therapy". *Mol. Ther. Nuc. Ac*., v.3, **2014**.

SUNDARAM, P.; KURNIAWAN, H.; BYRNE, M. E. & WOWER, J. "Therapeutic RNA aptamers in clinical trials". *Eur. J. Pharm. Sci*., v.48(1-2): p.259-271, **2013**.

SYED, M. A. & PERVAIZ, S. "Advances in aptamers". *Oligonucleotides*, v.20: p.215–224, **2010**.

TAKARA, M. Propriedades Ópticas de Absorção e Emissão Fluorescente do Ácido orto-Aminobenzóico e seus Derivados em meio Solvente. Ribeirão Preto, Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada à Medicina e Biologia – USP, 2006. Dissertação de Mestrado, 141 p.

TEIXEIRA, M. G.; BARRETO, M. L. Epidemiologia e Medidas de Prevenção do Dengue. Informe Epidemiológico do SUS 1999, 8(4): p.5-33.

THERMO SCIENTIFIC. Product Information: Biotin Chromogenic Detection Kit. © 2012 Thermo Fisher Scientific Inc. 11 p.

TUERK, C. & GOLD, L. "Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase". *Science*, v.249: p.505–510, **1990**.

VAZQUEZ, S.; SÁENZ, E.; HUELVA, G.; GONZÁLEZ, A.; KOURÍ, G. & GUZMÁN M. “Detection of IgM against the dengue virus in whole blood absorbed on filter paper”. *Rev. Panam. Salud Publica*, v.3(3): p.174–178, **1998**.

VERDIAN-DOGHAEI, A.; HOUSAINDOKHT, M. R. “Spectroscopic study of the interaction of insulin and its aptamer – sensitive optical detection of insulin”. *J. Lumin.,* v.159: p.1-8, **2015***.*

WANG, R.; ZHAO, J.; JIANG, T.; KWON, Y. M.; LU, H.; JIAO, P.; LIAO, M. & LI, Y. “Selection and characterization of DNA aptamers for use in detection of avian influenza virus H5N1”. *J. Virol. Methods*, v.189(2): p.362-369, **2013**.

WANG, Y.; YE, Z. & YING Y. “Detection of immunoglobulin E using an aptamer based dot-blot assay”. *Chin. Sci. Bul*., v. 58(24): p.2938-2943, **2013.**

WATZINGER, F.; EBNER, K.; LION, T. “Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR”. *Mol. Asp. Med.,* v. 27: p.254-298, **2006**.

WERNER, A.; KONAREV, P. V.; SVERGUN, D. I. & HAHN, U. “Characterization of a fluorophore binding RNA aptamer by fluorescence correlation spectroscopy and small angle X-ray scattering”. *Anal. Biochem*., v.389(1): p.52-62, **2009**.

WESTAWAY, E. G. “*Flavividae*”. Intervirology, v.24, p.183-189, **1985**.

WHO. Immunization, Vaccines and Biologicals. Disponível em: <http://www.who.int/immunization/research/development/dengue_q_and_a/en/> Acesso em: 23 de agosto de 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. “Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control”. New edition. Geneva, World Health Organization, **2009**.

WU, S. J.; GROUARD-VOGEL, G.; SUN, W.; MASCOLA, J. R.; BRACHTEL, E.; PUTVATANA, R.; LOUDER, M. K.; FILGUEIRA, L.; MAROVICH, M. A.; WONG, H. K.; BLAUVELT, A.; MURPHY, G. S.; ROBB, M. L.; INNES, B. L.; BIRX, D. L.; HAYES, C. G. &FRANKEL, S. S. “Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection”. *Nat. Med*., v.6: p.816-820, **2000**.

WU, X.; CHEN, J.; WU, M. & ZHAO, J. X. “Aptamers: active targeting ligands for cancer diagnosis and therapy”. *Theranostics*, v.5(4): p.322–344, **2015**.

XU, H.; DI, B.; PAN, Y. X.; QIU, L. W.; WANG, Y. D.; HAO, W.; HE, L. J.; YUEN, K. Y. & CHE, X. Y. “Serotype 1-specific monoclonal antibody-based antigen capture immunoassay for detection of circulating nonstructural protein NS1: Implications for early diagnosis and serotyping of dengue virus infections”. *J. Clin. Microbiol.*, v.44(8): p.2872-2878, **2006**.

YU, L. & MARKOFF, L. “The topology of bulges in the long stem of the flavivirus 3_ stem-loop is a major determinant of RNA replication competence”. *J. Virol*., v.79: p.2309–2324, **2005**.

ZADEH, J. N., STEENBERG, C. D., BOIS, J. S., WOLFE, B. R., PIERCE, M. B., KHAN, A. R., DIRKS, R. M., & PIERCE, N. A. “NUPACK: Analysis and design of nucleic acid systems”. *J. Comput. Chem*., v.32: p.170−173, **2011**.

ZHANG, J.; WANG, L.; PAN, D.; SONG, S.; BOEY, F. Y.; ZHANG, H. & FAN, C. “Visual cocaine detection with gold nanoparticles and rationally engineered aptamer structures”. *Small*, v.4(8): p.1196-1200, **2008**.

ZHOU, J. & ROSSI, J. J. “Aptamer-targeted RNAi for HIV-1 therapy”. *Met. Mol Biol.*, v.721: p.355-371, **2011**.

ZHOU, Y.; MAMMEN, M. P. JR.; KLUNGTHONG, C.; CHINNAWIROTPISAN, P.; VAUGHN, D. W.; NIMMANNITYA, S.; KALAYANAROOJ, S.; HOLMES, E. C. & ZHANG, C. “Comparative analysis reveals no consistent association between the secondary structure of the 3´untranslated region of dengue viruses and disease syndrome”. *J. Gen. Virol*., v.87: p.2595-2603, **2006**.

ZHOU, Y.; RAY, D.; ZHAO, Y.; DONG, H.; REN, S.; LI, Z.; GUO, Y.; BERNARD, K. A.; SHI, P-Y. & LI, H. “Structure and function of *Flavivirus* NS5 methyltransferase”. *J. Virol.*, v.81(8): p.3891-903, **2007**.

ZHU, J.; LI, T.; HU, J. & WANG, E. “A novel dot-blot DNAzyme-linked aptamer assay for protein detection”. *Anal. Bioanal. Chem*., v.397(7): p. 2923-2927, **2010**.

ZUKER, M. “Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction”. *Nucleic Acids Res*., v.31(13): p.3406-3415, **2003**.