

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

**ISOLAMENTO DE APTÂMEROS LIGANTES À SEQUÊNCIA 3'-UTR DO RNA  
DO VÍRUS DA DENGUE**

**Amanda Gabrielle da Silva**

Catalão - GO  
2015

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

**ISOLAMENTO DE APTÂMEROS LIGANTES À SEQUÊNCIA 3'-UTR DO RNA  
DO VÍRUS DA DENGUE**

**Aluna:** Amanda Gabrielle da Silva

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dra. Adriana Freitas Neves

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  
2015

Ficha catalográfica elaborada automaticamente  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Silva, Amanda Gabrielle da  
Isolamento de aptâmeros ligantes à sequência 3'-UTR do RNA do  
vírus da dengue [manuscrito] / Amanda Gabrielle da Silva. - 2015.  
LXV, 65 f.: il.

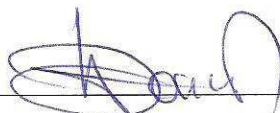
Orientador: Profa. Dra. Adriana Freitas Neves.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Regional  
Catalão, Programa de Pós-Graduação em Química, Catalão, 2015.  
Bibliografia.  
Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, lista de figuras.

1. Selex. 2. Ácido Ribonucleico. 3. Aedes aegypti. 4. DENV. I. Neves,  
Adriana Freitas, orient. II. Título.

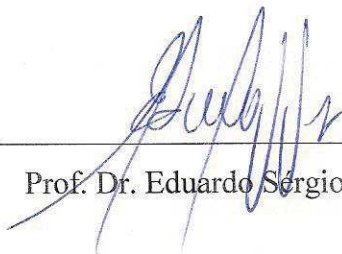
*Assinatura dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Amanda Gabrielle da Silva realizada em 09 de setembro de 2015.*



Prof. Dra. Adriana Freitas Neves



Prof. Dr. Jonny Yokosawa



Prof. Dr. Eduardo Sérgio de Souza

## DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais, **Roberto e Ângela**,  
pelo incentivo, compreensão e carinho.

Aos meus queridos e insuportáveis irmãos,  
**Victor e Sarah**, pelo apoio e companheirismo.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar e me guiar durante este caminhada.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Adriana Freitas Neves, minha orientadora, a quem agradeço em especial pelo incentivo, apoio, confiança e disposição bem como pelos conselhos que contribuíram não somente para o desenvolvimento deste trabalho, mas também para minha formação acadêmica.

A todos os docentes do Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão pela atenção e ajuda que de uma maneira ou outra, contribuíram para minha formação.

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart, pela parceria no desenvolvimento do projeto.

Ao Prof. Dr. Jonny Yokosawa pela contribuição cedendo às amostras da cultura de células C6/36.

A Super Prof.<sup>a</sup> Dra. Jupyraciara Barros pelos conselhos, ajuda e por permitir a utilização do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia (LABIM).

À técnica Vânia agradeço pelo carinho e atenção.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, Írlei, Thyago e Rívia, muito obrigado por dividirem comigo as mágoas e alegrias comendo batata com queijo e bacon. Além disso, gostaria de agradecer a ajuda e suporte que me deram não somente dentro do laboratório.

Às minhas amigas mestres e mestrandas, Marisa, Marta, Rafaela, Francielle, Cida e Paula, agradeço pelos momentos de gordice, companheirismo, descontração e reflexão que fizeram com que eu pudesse chegar ao final do mestrado um pouco sã.

Aos meus pais e meus irmãos pelo carinho, compreensão, incentivo e principalmente pelo apoio durante a realização deste projeto.

À Fundação Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) pela bolsa concedida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto.

*“Todos nós fazemos o que podemos, e isso tem que ser bom o bastante... E se não é bom o bastante, temos de continuar fazendo. Nada jamais é perdido... Não há nada que não possa ser encontrado”*

*A Zona Morta – Stephen King*

## RESUMO

Dentre os potenciais métodos moleculares para o diagnóstico e/ou terapêutica de doenças que acometem a saúde humana, tais como a dengue, destaca-se a seleção de ligantes pela utilização da química combinatória, conhecida como SELEX. Nesse método, os ligantes a um alvo são enriquecidos exponencialmente tendo como produto final a obtenção de aptâmeros de DNA ou RNA com elevada especificidade, sendo considerados como anticorpos artificiais. No presente trabalho foi realizado o isolamento de aptâmeros de RNA ligantes à extremidade 3'-UTR (*untranslated region*) do RNA do vírus da dengue (DENV), por apresentar elementos de RNA conformacionais e funcionais importantes no processo infeccioso. A partir do RNA extraído de células C6/36 infectadas foi feita a transcrição reversa (RT) para produção de cDNA viral (sorotipos 2 e 3) e amplificação por PCR simétrica e/ou assimétrica para a produção do alvo 3'-UTR do DENV, na forma de RNA-like por conter desoxiuridina trifosfatada (dUTP) e biotina na extremidade 5'. A biblioteca randômica de ligantes de RNA foi obtida por sonicação de um *pool* de DNA genômico humano utilizado como alvo em três PCRs sucessivas sendo que na última reação foi introduzido o promotor da T7 RNA polimerase e cujos fragmentos variaram de 80 a 600-pb. Foram realizados oito rounds de seleção entre alvo e biblioteca utilizando partículas paramagnéticas revestidas com estreptavidina. A cada round, após o período de incubação, os oligonucleotídeos não ligantes foram removidos com o auxílio de plataforma magnética, e os ligantes foram eluídos com NaOH. Os ligantes eluídos foram precipitados e submetidos à RT-PCR e transcrição *in vitro*, finalizando um round de seleção. Para verificar a variabilidade de ligantes, o produto do oitavo round foi clonado e 14 clones foram selecionados aleatoriamente para amplificação. Os resultados demonstraram que os aptâmeros isolados possuem tamanhos distintos, com pesos moleculares estimados variando de 80 a 100-pb. Os dados aqui obtidos indicaram a viabilidade do processo de isolamento de aptâmeros para elementos conformacionais presentes na extremidade 3'-UTR do RNA do vírus da dengue os quais poderão contribuir para pesquisas futuras com foco na prevenção e/ou controle da doença.

**Palavras-chave:** SELEX, Ácido Ribonucleico, *Aedes aegypti*, DENV.

## ABSTRACT

Considering potential molecular methods for diagnostic and/or therapeutic purpose of infectious human diseases, such as dengue, highlights the systematic evolution of ligands by exponential enrichment, known as SELEX. In this method, ligands to a target are exponentially enriched generating aptamers of DNA or RNA with high specificity, being considered as artificial antibodies. In this work, we aimed to realize the isolation of aptamers binding to 3'-UTR (untranslated region) of the RNA from dengue virus (DENV), because present important conformational structures that act as functional elements into RNA necessary in the infectious process. Total RNA of C6/36 infected cells was extracted, submitted to reverse transcription reaction to obtain viral cDNA (serotypes 2 and 3) and amplified by symmetric and/or asymmetric PCR technique to produce the 3'-UTR from DENV as target, generating RNA-like by containing deoxyuridine triphosphate (dUTP) and biotin in the 5' region of the target. The random library of RNA ligands was obtained by sonication of a pool from human genomic DNA used in three successive PCR, and in the last reaction was introduced the promoter of T7 RNA polymerase, presenting fragments ranging from 80 to 600-bp. Eight rounds of selection were performed between the target and the library by using paramagnetic particles coated with streptavidin. For each round, after the incubation, the non-ligands were removed by using magnetic platform, and the ligands were eluted with NaOH. The eluted ligands were precipitated, submitted to RT-PCR and transcription *in vitro*, completing one round of selection. For analysis of variability of ligands, the product obtained from the eighth round was cloned and fourteen clones were randomly selected for amplification. The results demonstrated that the aptamers presented sizes with estimated molecular weights varying from 80 to 100-bp. These data indicated the viability of aptamers isolation against conformational elements present in the 3'-UTR of RNA from dengue virus, which may contribute to future research focusing on prevention and/or control of the disease.

**Keywords:** SELEX, Ribonucleic Acid, *Aedes aegypti*, DENV.

**LISTA DE FIGURAS**

FIGURA 1: Incidência e número de casos de dengue no Brasil de 2004 a 2014.....	17
FIGURA 2: Vírus da dengue: representação de sua estrutura e genoma viral.....	19
FIGURA 3: Representação esquemática da 5' UTR do genoma do vírus da dengue.....	20
FIGURA 4: Representação esquemática dos elementos de RNA preditos na 3'-UTR do genoma do DENV.....	21
FIGURA 5: Representação esquemática do genoma do DENV que mostra a localização das sequências complementares 5'-3'UAR e 5'-3'CS.....	23
FIGURA 6: Diagrama simplificado do SELEX.....	26
FIGURA 7: Esquema dos ciclos térmicos da PCR.....	28
FIGURA 8: Representação esquemática do SELEX utilizando partículas paramagnéticas.....	30
FIGURA 9: Representação esquemática da funcionalidade dos aptâmeros.....	31
FIGURA 10: Esquema da PCR semi- <i>nested</i> para a 3'-UTR do RNA do DENV.....	40
FIGURA 11: Esquematização do teste de incorporação de biotina na molécula alvo.....	41
FIGURA 12: Esquema da construção da biblioteca.....	42
FIGURA 13: Eletroforese em gel de agarose 1,2% (p/v) dos produtos de PCR do cDNA de DENV.....	46
FIGURA 14: Eletroforese em gel de agarose 1,2% (p/v) dos produtos da PCR Assimétrica.....	47

FIGURA 15: Eletroforese em gel de agarose 1,2% (p/v) dos produtos da PCR do teste de <i>primers</i> reversos com diferentes plasmídeos da 3'-UTR.....	48
FIGURA 16: Resultado referente ao teste da incorporação de biotina à molécula alvo.....	49
FIGURA 17: Eletroforese do pool de DNA genômico em tempos distintos de sonicação.....	50
FIGURA 18: Eletroforese correspondente aos produtos amplificados para incorporação do promotor da T7 RNA polimerase.....	51
FIGURA 19: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos com DNA plasmidial dos aptâmeros selecionados no oitavo <i>round</i> .....	53
FIGURA 20: <i>Dot blot</i> para análise da afinidade entre alvo, pool de DENV-2 e -3, e pool de aptâmeros do 2º ao 8º <i>rounds</i> .....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

%	porcentagem
°C	graus Celsius
3'CS	sequência conservada da 3'-UTR ( <i>conserved sequence</i> )
5'CS	sequência conservada da 5'-UTR ( <i>conserved sequence</i> )
3'SL	<i>stem loop</i> da 3'-UTR
3'UAR	<i>upstream AUG Region</i> da 3'-UTR
5'UAR	<i>upstream AUG Region</i> da 5'-UTR
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
CaCl <sub>2</sub>	cloreto de cálcio
cDNA	DNA complementar
cHP	capsídeo <i>Hairpin</i>
CS	sequência conservada
CS1	sequência conservada 1 presente na 3'-UTR
CS2	sequência conservada 2 presente na 3'-UTR
DAR	sequência <i>downstream</i> à região AUG
DB1	estrutura haltere 1 ( <i>haltere structure</i> )
DB2	estrutura haltere 2
DENV	vírus da dengue
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	desoxirribonucleotídeos fosfatados (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
dsDNA	DNA de fita dupla
dTTP	desoxitimina trifosfatada
dUTP	desoxiuridina trifosfatada
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FHD	febre hemorrágica da dengue
g	Gramas
IgM	imunoglobulina M
IPTG	isopropil-β-D tiogalactopiranosídeo
kb	quilobases
KCl	cloreto de potássio

LB	Luria Bertani
M	molar
mL	mililitro
mg	miligrama
MgCl <sub>2</sub>	cloreto de magnésio
mM	milimolar
M-MLV RT	<i>Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase</i>
NaCl	cloreto de sódio
NaN <sub>3</sub>	azida de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
NBT	azul de nitrotetrazólio
ng	nanogramas
nm	nanômetros
nmoles	nanomoles
ORF	sequência codificante ( <i>open reading frame</i> )
Pb	pares de base
PCR	reação em cadeia da polimerase ( <i>polymerase chain reactio</i> )
pmoles	picomoles
RCS2	repetição da sequência conservada 2
RNA	ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
RT	transcrição reversa ( <i>reverse transcription</i> )
RT-PCR	transcriptase reversa- reação em cadeia da polimerase
SA-PMs	partículas paramagnéticas recobertas com estreptavidina
SELEX	evolução sistemática de ligantes por enriquecimento exponencial ( <i>systematic evolution of ligands by exponential enrichment</i> )
SL	<i>stem loop</i>
SLA	<i>stem loop A</i>
SLB	<i>stem loop B</i>
SFB	soro fetal bovino
ssDNA	DNA de fita simples ( <i>single strand DNA</i> )
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>

TBE	tampão Tris/Borato/EDTA
U	unidade (s) de enzima
UAR	<i>upstream AUG Region</i>
UTR	região não traduzida do RNA ( <i>untranslated region</i> )
VR	região variável ( <i>variable region</i> )
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactosidase
$\mu$ g	micrograma (s)
$\mu$ L	microlitro (s)
$\mu$ M	micromolar

## SUMÁRIO

<b>1- Introdução</b>	16
1.1 - Dengue e dados epidemiológicos	16
1.2 - Vírus da dengue: estrutura viral	18
1.3 - Quadro clínico, diagnóstico e terapia	23
1.4 – SELEX	25
1.4.1 – Procedimentos de seleção de ligantes de RNA por SELEX	28
1.4.2 – Aplicações terapêuticas (aptâmeros e suas especificações)	31
<b>2- Objetivo Geral</b>	34
2.1 - Objetivos específicos	34
<b>3- Materiais</b>	35
<b>4- Metodologia</b>	36
4.1 – Obtenção do alvo	36
4.1.1 – Cultura de células C6/36 ( <i>Aedes albopictus</i> )	36
4.1.2 – Extração de RNA total	36
4.1.3 – Transcrição reversa (RT)	36
4.1.4 – Reação em cadeia da polimerase	37
4.1.5 – Eletroforese em gel de agarose e purificação dos produtos da PCR	37
4.1.6 - Clonagem do produto de PCR no vetor <i>pGemT-easy</i> e transformação das bactérias TOP10	38
4.1.7 – Transformação das bactérias competentes	38
4.1.8 – Extração do DNA plasmidial	39
4.1.9 – PCR semi- <i>nested</i>	39

4.1.10 – Molécula alvo com biotina	40
4.1.11 – Teste da marcação com biotina	41
4.2 - Construção da biblioteca	41
4.2.1 – DNA genômico	41
4.2.2 – Fragmentação do DNA humano genômico	42
4.2.3 – Construção da biblioteca randômica por PCR	42
4.3 – Isolamento de aptâmeros de RNA	43
4.4 – Hibridização por <i>dot blot</i>	45
<b>5 – Resultados e Discussão</b>	<b>46</b>
5.1 – Obtenção do alvo	46
5.2 – Biblioteca randômica	50
5.3 – Seleção de aptâmeros	51
<b>6 – Considerações Finais</b>	<b>56</b>
<b>Referências</b>	<b>57</b>

## 1. Introdução

### 1.1 - Dengue e dados epidemiológicos

Considerada a doença mais comum por infecção viral transmitida por artrópodes, a dengue é uma doença infecciosa, sendo ocasionada por um arbovírus do gênero *Flavivirus*, cujo contágio se dá pela picada do mosquito *Aedes aegypti* ou *Aedes albopictus* (VARELLA; JARDIM, 2009), causando sintomas similares aos de uma gripe severa. A dengue foi disseminada rapidamente nas regiões tropicais e subtropicais, com uma incidência 30 vezes maior ao longo dos últimos 50 anos nas regiões da Ásia, África e Américas Central e do Sul, constituindo assim, um grave problema de saúde pública em nível mundial (WHO, 2009). Segundo Gubler (2012) ocorreram no ano de 2012 cerca de 230 milhões de infecções e que aproximadamente 3,6 bilhões de pessoas correm o risco de contrair a doença nos países endêmicos.

De acordo com dados do Ministério da Saúde (2015a), o aumento de casos e a incidência (número de casos de dengue/ 100 mil habitantes) causados pela dengue tem-se constituído em um crescente motivo de apreensão para a sociedade em geral e também para as autoridades de saúde, em razão da grande quantidade de obstáculos enfrentados para o controle das epidemias e surtos causados pelos quatro sorotipos virais do *vírus da dengue* (DENV) (Figura 1).

A transmissão do vírus para os humanos é intermediada pelas fêmeas dos mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente o *A. aegypti* e *A. albopictus* (HOLMES; TWIDDY, 2003), apesar de outras espécies, como o *A. scutellaris* e o *A. polynesiensis*, também poderem transmitir o vírus, principalmente na Ásia e na Oceania (GUBLER, 1998). Existem quatro tipos virais da dengue, sendo denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, cuja classificação desses sorotipos não está relacionada à gravidade do quadro clínico, mas de acordo com a reatividade de anticorpos e ordem de suas descoberta; contudo o DENV-3 parece ser o que apresenta maior virulência seguida do DENV-2, DENV-4 e o menos virulento é o DENV-1 (GUZMÁN; KOURÍ, 2004).

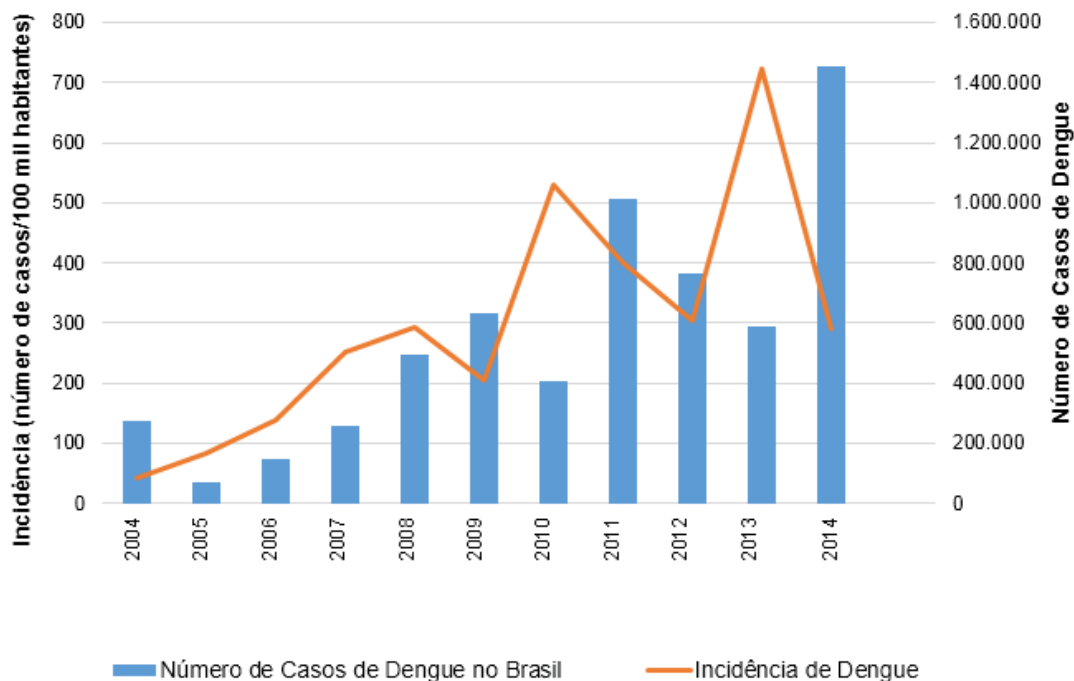


FIGURA 1: Incidência e número de casos de dengue no Brasil de 2004 a 2014. Adaptado de: SVS-MS, 2015a; 2015b.

Os primeiros casos da dengue no Brasil datam desde do século XIX até o início do século XX, sendo que os primeiros casos que foram documentados clínica e laboratorialmente no Brasil aconteceram em Boa Vista, Roraima em 1982, durante uma epidemia que identificou os sorotipos DENV-1 e DENV-4 (BARRETO; TEIXEIRA, 2008). Atualmente, a dengue encontra-se presente em todos os estados brasileiros, constituindo assim um dos maiores problemas de saúde pública do país.

O Ministério da Saúde apontou que houve um aumento de 57% de casos graves de dengue em um comparativo do primeiro semestre de 2015 com o ano anterior, no qual foram notificados 561 casos graves contra 995 casos registrados em 2015. Ainda comparando o primeiro semestre de 2015 com o mesmo período de 2014, a região sudeste registrou o maior número de casos prováveis com 810 mil casos em relação ao total do país (1.2 milhões de casos de dengue). Quanto à incidência de casos prováveis de dengue, as regiões centro-oeste e sudeste apresentam as maiores incidências, com 985,7 e 952,3 casos, respectivamente. Dentre os estados com maiores incidências, destacaram-se Goiás, São Paulo e Minas Gerais (SVS-MS, 2015c).

No primeiro semestre de 2015, o estado de Goiás registrou um aumento de 67% de casos notificados em relação ao ano de 2014; dentre os estados da região centro-oeste somente o Distrito Federal não apresentou um aumento nos casos notificados quando comparado o mesmo período de 2015 e 2014 (SVS-MS, 2015c).

Ocorreram grandes investimentos em políticas para o controle da dengue, que tiveram o objetivo de intensificar as ações de vigilância e prevenção. Com o aumento no número de casos de dengue, o custo econômico para manutenção destas ações aumentou. Segundo o Ministério da Saúde (2015c), nos últimos quatro anos, os gastos aumentaram cerca de 32%, passando de R\$ 947,7 milhões, em 2012, para R\$ 1,25 bilhões no ano de 2015.

## **1.2 - *Vírus da dengue: estrutura viral***

Ainda não se sabe ao certo a origem do *vírus da dengue*. Especula-se que possa ser de origem africana, principalmente porque muitos dos flavivirus transmitidos por mosquitos circulem exclusivamente na África e muitas vezes infectando primatas. Além disso, acredita-se que o *A. aegypti* também tenha sido originado na África, embora esta espécie só tenha sido adotada como um vetor para a transmissão de humano no passado relativamente recente (HOLMES; TWIDDY, 2003). O vírus se espalhou para as Américas juntamente com seu vetor o mosquito *A. aegypti*, como resultado do tráfico de escravos (AASKOV, 2003).

Por outro lado, existe uma proposta de que o vírus possa ter evoluído de um ciclo enzoótico envolvendo os macacos que habitavam a península da Malásia (UJVARI, 2008), pois a presença de todos os quatro sorotipos virais em humanos e nos macacos da Ásia e, em particular, a análise filogenética sugere que o vírus tem origem asiática ao invés de africana (HOLMES; TWIDDY, 2003).

O gênero flavivirus inclui outros importantes patógenos humanos, como os vírus da febre amarela (YFV), do Nilo Ocidental (WNV) e a encefalite japonesa (JEV). Assim como outros flavivirus, o DENV possui uma estrutura esférica relativamente pequena (40-50 nm) (GUBLER, 1998), composta pelo nucleocapsídeo onde estão RNA genômico viral e o capsídeo (formado pela proteína C). O nucleocapsídeo é circundado pelo envelope, que é formado por uma bicamada fosfolípida, as proteínas do envelope (E) e proteínas da membrana (M) ou pré-membrana (prM) (Figura 2A) (STIASNY; HEINZ, 2006; KUHN *et al.*, 2002).

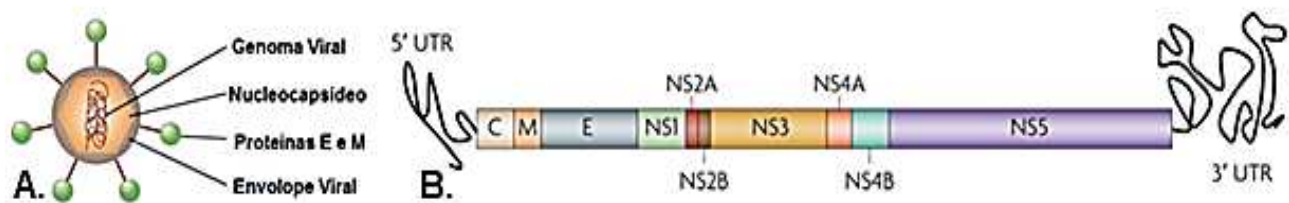


FIGURA 2: Vírus da dengue: representação de sua estrutura e genoma viral. A) Esquema da organização genômica do vírus da dengue B) Representação esquemática da ORF do DENV. Fontes: NATURE, 2011<sup>1</sup> adaptado; GUZMAN, *et al.*, 2010.

O DENV tem um genoma de RNA (ácido ribonucleico) de aproximadamente 11 kb (quilobases) de comprimento com polaridade positiva. Apresenta uma sequência codificante (ORF - *open reading frame*) flanqueada por duas regiões não traduzidas (UTR - *untranslated regions*), denominadas 5'-UTR e 3'-UTR. A tradução do genoma (Figura 2B) resulta em uma poliproteína que é clivada por proteases do vírus e da célula hospedeira, gerando três proteínas estruturais e outras sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, e NS5) (FRIEBE; SHI; HARRIS, 2011; WEI *et al.*, 2009).

Após a infecção da célula, o genoma viral serve como RNA mensageiro (RNAm) para a tradução e, subsequentemente, como molde para a síntese de outras moléculas de RNA, que podem ser usadas para um novo ciclo de tradução ou como substrato para a encapsidação e formação de novas partículas virais (GEBHARD *et al.*, 2011). A utilização eficiente do genoma

<sup>1</sup>Disponível em: <<http://www.nature.com/scitable/topicpage/dengue-viruses-22400925>>. Acessado em 06/08/2014.

durante o processo de tradução pode ser temporariamente regulado para assegurar a propagação viral.

Os elementos funcionais de RNA do vírus presentes tanto na sequência codificante quanto nas regiões não codificantes 5'-UTR e 3'-UTR que formam estruturas conformacionais (*stem loop*) são responsáveis por essa regulação do processo de infecção viral. As estruturas conformacionais encontradas na porção 5' do RNA genômico parecem funcionar como promotores para ação da RNA polimerase (RdRp) (NS5) (Figura 3) (GEBHARD; FILOMATORI; GAMARNIK, 2011).

As proteínas não estruturais estão primeiramente envolvidas na replicação do RNA viral, como componentes de um complexo de replicação, e também desempenham um papel na montagem viral e na interação do vírus com a célula hospedeira (WEI *et al.*, 2009). A 5'-UTR apresenta um comprimento pequeno, com aproximadamente 100 nucleotídeos, e com uma estrutura CAP (resíduo 7-metil-guanosina ligado a um trifosfato), na extremidade 5' (ALVAREZ *et al.*, 2005a).

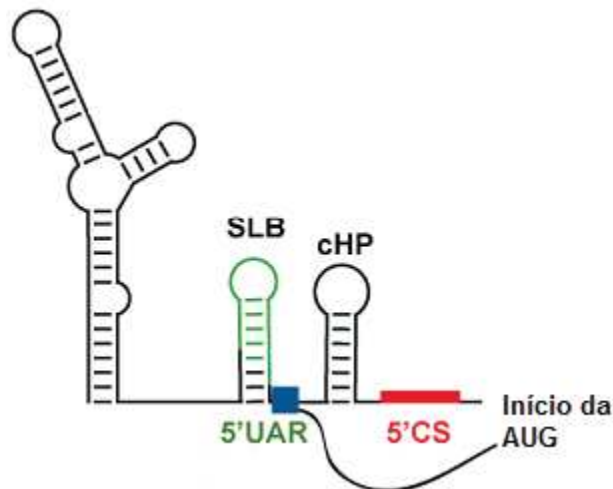


FIGURA 3: Representação esquemática da 5'-UTR do genoma do vírus da dengue. A região apresenta três estruturas conformacionais e duas sequências conservadas, a 5'CS e 5' AUG. Estas sequências são complementares a sequências presentes na 3'-UTR. O códon de iniciação AUG está localizado logo após o SLB. Adaptado de: GEBHARD *et al.*, 2011.

Com sequências conservadas quase completas entre os diferentes sorotipos, a 5'-UTR possui predileção da estrutura conformacional que consiste em dois *stem loops*, “haste alça”, estruturas que possuem sequências de nucleotídeos complementares, onde pares de bases se emparelham formando uma haste “*stem*” e termina em ciclo desemparelhado

“loop” (WATSON *et al.*, 2006). O primeiro *stem loop* presente na 5'-UTR é o *stem loop* A (SLA), que demonstrou ser importante para a ligação da proteína NS5 como elemento promotor reconhecido pela RdRP para síntese de RNA (ALVAREZ; FILOMATORI; GAMARNIK, 2008; YU *et al.*, 2008). Além do SLA, a 5'-UTR apresenta um segundo *stem loop* pequeno B (SLB), que termina no códon de iniciação da tradução AUG. O SLB possui uma sequência conhecida como 5'UAR (*Upstream AUG Region*), que é complementar a uma sequência localizada na extremidade 3'-UTR (ALVAREZ; FILOMATORI; GAMARNIK, 2008).

Além destes *stem loops*, a 5'-UTR possui uma região de codificação do capsídeo *hairpin* (cHP), e logo após apresenta uma sequência conservada (CS) localizada *downstream* ao códon AUG (5'DAR). A 5'CS e a 5'UAR exibem uma complementaridade com a 3'CS1 e a 3'UAR, respectivamente, localizado na 3'-UTR (PARANJAPE; HARRIS, 2010).

A 3'-UTR não possui uma cauda poli (A) e apresenta um comprimento de 400–700 nucleotídeos (WEI *et al.*, 2009), sendo que a sequência destes e a presença de estruturas de RNA específicas influenciam diretamente na tradução do genoma e parecem ser essenciais para a replicação do DENV, assim como de outros flavivirus (ALVAREZ *et al.*, 2005a). A sequência de nucleotídeos da 3'-UTR pode ser dividida em três domínios (Figura 4). O domínio I está localizado imediatamente após o códon de parada de tradução e é a região mais variável dentro da 3'-UTR viral. Esse domínio apresenta uma extensa modificação de tamanho entre os sorotipos, variando entre o aumento de 120 nucleotídeos ou uma redução de 50 nucleotídeos. Deleções nessa região diminuem a síntese de RNA viral (GEBHARD *et al.*, 2011).

O domínio II inclui uma estrutura característica denominada haltere (DB), a qual aparece duplicada (DB1 e DB2). Os elementos de DB contêm sequências conservadas que são nomeadas CS2 e RCS2 (repetição de CS2) presentes em todos os flavivirus (GEBHARD; FILOMATORI; GAMARNIK, 2011; ALVAREZ *et al.*, 2005a). O domínio III é a região mais conservada da 3'-UTR, tendo um elemento de CS1 seguido por uma estrutura terminal de *stem loop* (3'SL). A CS1 possui 25 nucleotídeos (CS1), é bem

conservada entre os quatro sorotipos virais e apresenta complementaridade com a 5'CS, localizada a mais de 10 kb de distância (KOFLEK *et al.*, 2006).

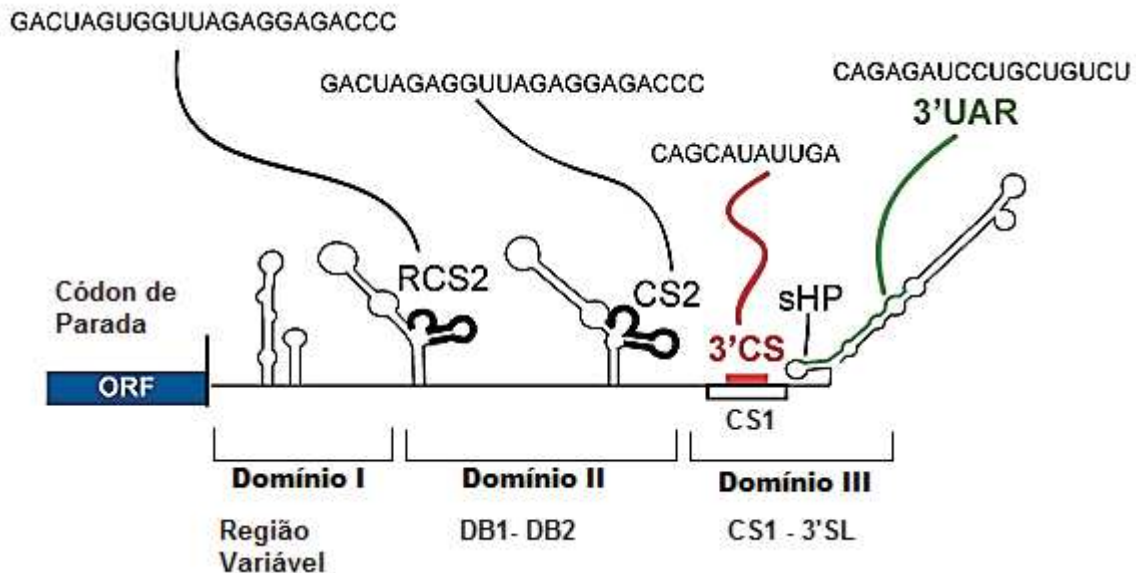


FIGURA 4: Representação esquemática dos elementos de RNA preditos na 3'-UTR do genoma do DENV. Apresenta três domínios, sendo: domínio I (região variável, VR), domínio II (estruturas com halteres, DB1 e DB2), domínio III (sequência conservada de CS1 e 3'SL). Além disso, são mostradas a localização e sequência de cada um dos elementos conservados que correspondem a RCS2, CS2, 3'CS e 3'UAR. Adaptado de GEBHARD *et al.*, 2011.

Outra função importante a ser destacada para a 3'-UTR do DENV, é que a CS1 contém uma sequência envolvida na interação RNA-RNA entre as extremidades do genoma viral. A estrutura terminal 3' contém um curto *stem-loop* de 14 nucleotídeos (sHP), seguido por uma estrutura conformacional maior apresentando 79 nucleotídeos. As duas estruturas adjacentes apresentam um total de 93 nucleotídeos e são referidos como 3'SL. A metade posterior do 3'SL contém a sequência 3'UAR que é complementar à 5'UAR localizado na 5'-UTR (ALVAREZ; FILOMATORI; GAMARNIK, 2008; ALVAREZ *et al.*, 2005a).

A existência e o papel essencial do 3'SL foram apoiados por previsões da estrutura secundária e estudos funcionais envolvendo DENV e outros membros da família *Flaviviridae*. A análise detalhada desta estrutura nos vírus do Nilo Ocidental, da febre amarela e da dengue revelou a importância deste elemento para a replicação do RNA viral (GEBHARD; FILOMATORI; GAMARNIK, 2011; ALVAREZ; FILOMATORI; GAMARNIK, 2008).

Estudos de mutação realizados na 3'-UTR do DENV sugerem que a deleção nessa região levam a uma perturbação na estrutura secundária resultando em um decréscimo na eficiência da replicação do RNA viral. Acredita-se que a 3'-UTR pode desempenhar um papel chave na regulação da replicação viral pelo controle da síntese de RNA, pois fatores virais e celulares são conhecidos por se ligarem à 3'-UTR, e estas interações parecem regular a eficiência da replicação do RNA (BLANEY *et al.*, 2008).

Segundo Chiu, Kinney e Dreher (2005), a sequência 3'SL interfere na tradução do RNAm e também interage com proteínas de relevância funcional, incluindo as enzimas virais NS3 (protease) e NS5. A ciclização do genoma dos flavivirus mediada por sequências complementares foi proposta como sendo necessária para a replicação do RNA viral. Apesar de vários estudos extensivos a respeito da 3'SL, as funções de outras estruturas e elementos conservados presentes dentro da 3'-UTR do DENV ainda são desconhecidas. Estudos, *in vitro*, usando ensaios de ligação de RNA ajudaram a entender a interação de dois pares de sequências complementares, 5'CS-3'CS e 5'UAR-3'UAR, para interação final entre extremidades 5' e 3' do RNA viral (Figura 5) (ALVAREZ *et al.*, 2005b).

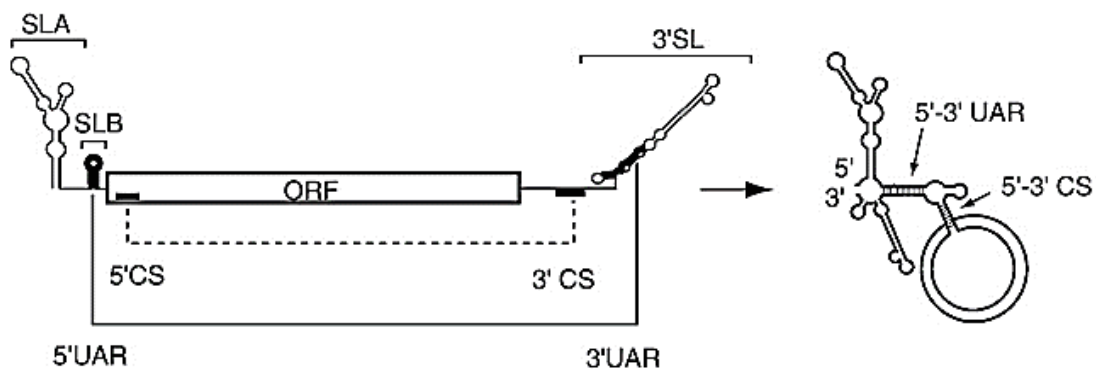


FIGURA 5: Representação esquemática do genoma DENV que mostra a localização das sequências complementares 5'-3'UAR e 5'-3'CS. Localização dos *stem* loops previstos: 5'SLA, 5' SLB, 3'SL. Uma conformação circular do RNA é esquematicamente mostrada à direita. São indicadas as regiões híbridas entre as regiões 5'-3'UAR e 5'-3'CS. Fonte: ALVAREZ; FILOMATORI; GAMARNIK, 2008.

### 1.3 - Quadro clínico, diagnóstico e terapia

A infecção causada pelo *vírus da dengue* apresenta um quadro clínico variável, podendo ser assintomática ou evoluir para quadros graves com

ou sem hemorragia, por vezes resultando em óbito. Os quatro tipos virais da dengue podem causar a forma clássica e hemorrágica da doença (FHD) (BARRETO; TEIXEIRA, 2008). A identificação precoce da doença é fundamental para a tomada de ações, tendo em vista a prevenção da morbidade e mortalidade.

A dengue clássica constitui a forma mais comum da doença, manifestando-se por um início súbito de febre elevada (39-40°C), aparecendo de modo inesperado ou após alguns sintomas característicos, tais como mal estar, calafrios e dores de cabeça, juntamente com mialgias intensas e cefaleias frontais e dores retro orbitárias. A FHD representa a forma mais grave da dengue e seus sintomas são similares ao da forma clássica, diferenciando-se somente pelo extravasamento difuso de plasma pelos capilares, pelas hemorragias e pela trombocitopenia (BRASIL, 2015b).

O diagnóstico específico de infecções causadas por DENV pode ser realizado por meio de técnicas de isolamento viral, métodos sorológicos ou moleculares. O diagnóstico laboratorial é essencial, já que os sinais clínicos da doença podem ser confundidos com influenza, malária, rubéola, sarampo, leptospirose, bem como outras hemorragias de causas virais. O isolamento viral pode ser feito com linhagem celular dos mosquito *A. albopictus* C6/36, por meio da inoculação do soro de pacientes colhido até 5 dias após o início da febre (período da viremia). Depois do isolamento, o DENV pode ser identificado e sorotipado (GUBLER, 1998; WHO, 2009).

Diversas metodologias baseadas em técnicas de biologia molecular têm sido utilizadas na tentativa de melhorar o diagnóstico da doença, utilizando a detecção de ácido nucleico viral por transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e RT-PCR em tempo real (VAUGHAN *et al.*, 2008). A RT-PCR também vem sendo utilizada para sorotipagem viral, com a utilização de iniciadores sorotipo específicos (WHO, 2009).

O teste sorológico pode ser realizado por inibição da hemoaglutinação pela fixação do complemento e pelo ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). O ELISA geralmente é o teste de escolha pela identificação do anticorpo IgM (imunoglobulina M), que aparece a partir do

sexto dia após o início dos sintomas e desaparece dentro de dois meses (WHO, 2009). Entretanto, ainda existem desafios no estudo da dengue e dengue hemorrágica, incluindo a aplicação de técnicas mais sensíveis pelo uso de novos biomarcadores para evitar a reação cruzada entre diferentes sorotipos de vírus da dengue e outros flavivirus (KAO *et al.*, 2005).

Comumente, recomenda-se aos pacientes que estão com infecção viral pela dengue, repouso, reidratação oral e uso de antitérmicos, pois, até o momento não existe uma droga eficaz contra o DENV. Dentre as dificuldades para o desenvolvimento de uma vacina efetiva, está a proteção simultânea contra os quatro sorotipos virais. Após a eliminação do vírus pelo indivíduo infectado por um sorotipo do DENV, não há imunidade protetora contra os demais sorotipos (INNIS; ECKELS, 2003). Além disso, não se tem muito conhecimento a respeito da proteção conferida pela resposta imune contra as proteínas não estruturais do DENV, bem como dos epítomos que são responsáveis pela ligação e penetração do vírus nas células do hospedeiro, dificultando desta forma o desenvolvimento de vacinas (DEEN, 2004).

#### **1.4 - SELEX**

A química combinatória representa uma importante tecnologia para a indústria, bem como para a investigação biotecnológica e vem sendo utilizada para o desenvolvimento de novos materiais e drogas. Dentre as classes de macromoléculas, os ácidos nucleicos são compostos atraentes para a química combinatória, devido à capacidade de se dobrarem em estruturas secundárias e terciárias bem definidas e, além disso, poderem ser amplificados por síntese enzimática. A evolução sistemática de ligantes por enriquecimento exponencial (SELEX) se sobressai na seleção em larga escala de ligantes específicos a uma molécula alvo, estes ligantes que podem ser selecionados, *in vitro*, são oligonucleotídeos denominados aptâmeros (STOLTENBURG; REINEMANN; STREHLITZ, 2007).

Este método foi descrito concomitantemente por Tuerk e Gold (1990), Ellington e Szostak (1990) e Robertson e Joyce (1990) e vem sendo

largamente aplicado. Envolve a seleção progressiva de aptâmeros por repetição de séries de ligação, eleição e amplificação de ligantes a partir de uma biblioteca randômica de ácidos nucleicos (TUERK; GOLD, 1990; ELLINGTON; SZOSTAK, 1990), sendo que cada série ou ciclo completo do SELEX é denominado *round* (Figura 6). O SELEX é um método eficiente para identificar aptâmeros que se ligam a uma molécula, podendo gerar aptâmeros com potencial para desenvolvimento de teste diagnóstico e terapêutico (STOLTENBURG; REINEMANN; STREHLITZ, 2007).

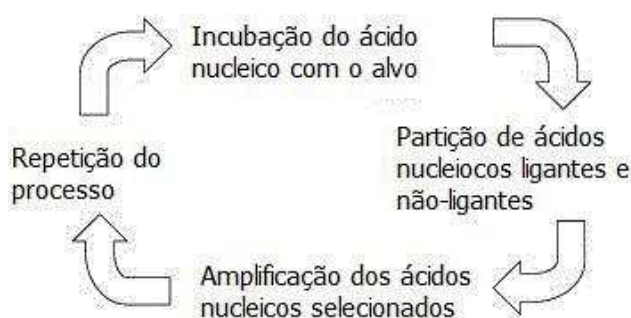


FIGURA 6: Diagrama simplificado do SELEX. Primeiramente ocorre ligação da biblioteca com o alvo, em seguida a separação das sequências ligadas daquelas não ligantes. Os oligonucleotídeos ligantes separados são selecionados e submetidos à transcrição reversa, amplificação e transcrição, para a geração de uma nova biblioteca que será usada no próximo ciclo de seleção. Adaptado de: RAVELET; GROSSET; PEYRIN, 2006.

O isolamento de ligantes baseia-se nas interações de oligonucleotídeos com proteínas como no caso de interação DNA ou RNA-proteína, propriedade dos ácidos nucleicos de reconhecer epítomos proteicos específicos. Tais interações estão relacionadas com as correlações entre sequência e estrutura, ligações de hidrogênio e encaixe induzido. De modo que, partindo de um elevado número de sequências distintas e, por conseguinte estruturas diferentes, deveria ser possível a identificação de oligonucleotídeos funcionais para qualquer proteína, ácidos nucleicos e células inteiras utilizadas como alvos de seleção, *in vitro* (NERY, 2014). Em suma, com uma biblioteca randômica, têm-se sequências, seja de DNA ou RNA, diferentes e, conseqüentemente, propriedades específicas de interações não covalentes com outras moléculas, devido às sequências e suas conformações secundárias.

Os *rounds* do SELEX são dependentes de amplificação dos ligantes para enriquecimento. A amplificação é normalmente realizada pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Desenvolvida em meados da década de 80 por Kary Mullis (COX; DOUDNA; O'DONNELL, 2009), a PCR é uma tecnologia importante sendo imprescindível na pesquisa de diagnóstico de infecções virais e bacterianas, bem como utilizada na medicina forense. É um procedimento que envolve a síntese enzimática, *in vitro*, gerando milhões de cópias de um molde específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase a partir de substrato de desoxirineucleotídeos. Dois oligonucleotídeos, sintetizados artificialmente e complementares às duas extremidades (5' e 3') do fragmento que se quer amplificar, são utilizados como iniciadores (*primers*) da reação (PASTERNAK, 2002; LODISH *et al.*, 2014). A hibridização do *primer* a uma região complementar do molde de DNA de fita simples, na presença da DNA polimerase inicia a reação pela extremidade 3' do *primer*, gerando uma região estendida de DNA fita dupla (WATSON *et al.*, 2006).

A PCR (Figura 7) baseia-se na alternância de ciclos térmicos que são: desnaturação, hibridização e extensão. Inicialmente, a fita dupla de DNA molde é desnaturada em temperaturas elevadas. Com a diminuição da temperatura acontece a hibridização do DNA molde com o *primer*, de modo que cada *primer* se hibridiza com a sequência complementar da região alvo. E na última etapa do ciclo, a DNA polimerase realiza a extensão da fita, adicionando os desoxirineucleotídeos presentes na reação. Assim, a repetição destes ciclos permite a amplificação do fragmento, cujo tamanho é delimitado pela sequência dos *primers* (WATSON *et al.*, 2006; INNIS; GELFAND, 2012).

O isolamento de uma DNA polimerase (*Taq* Polimerase) da bactéria *Thermus aquaticus* que vive em fontes termais permitiu aumentar a especificidade da PCR, visto que polimeriza à 72°C, e a enzima não é afetada pela etapa de desnaturação, pois é estável à 95°C (MADIGAN *et al.*, 2010).

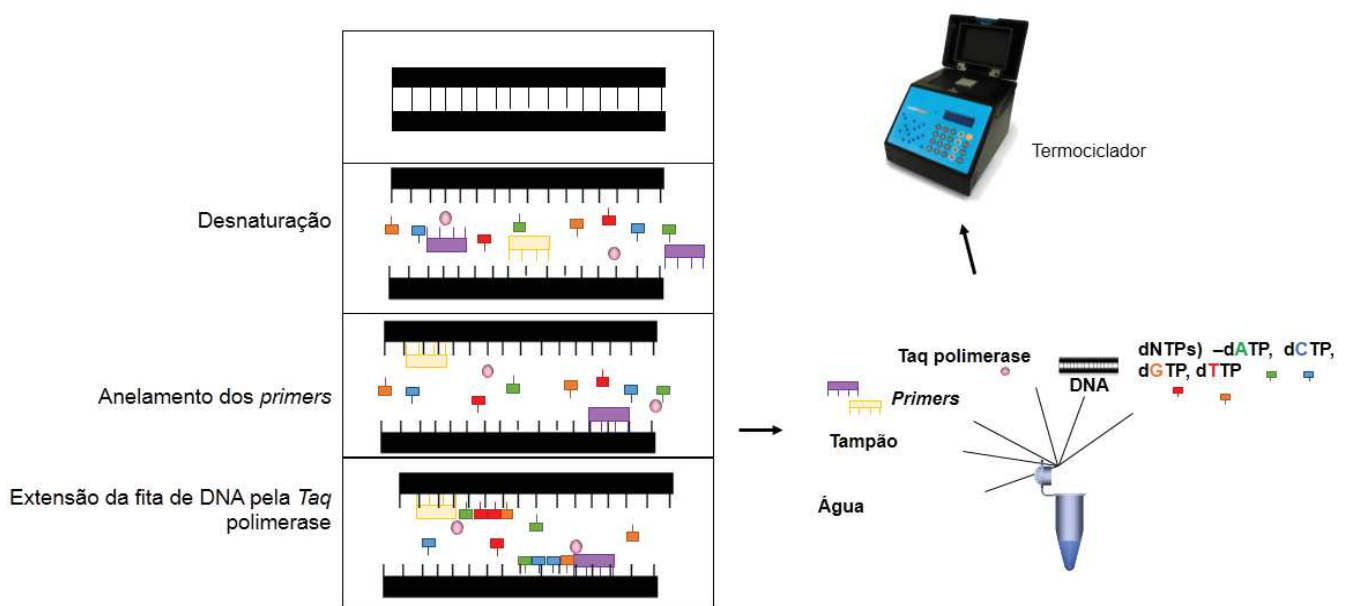


FIGURA 7: Esquema dos ciclos térmicos da PCR. Inicialmente o DNA molde é desnaturado por aquecimento, em seguida, ocorre a etapa de pareamento dos *primers* e, por fim, a extensão de novas fitas. Os fragmentos amplificados são gerados exponencialmente na reação.

#### 1.4.1 - Procedimentos de seleção de ligantes de RNA por SELEX

A primeira etapa do processo do SELEX é a construção de uma biblioteca randômica de oligonucleotídeos de DNA quimicamente sintetizados. Tal biblioteca consiste de um amplo número de fragmentos de ssDNA (*single strand* de DNA) ( $\sim 10^{15}$  moléculas), e um dos pontos importantes a ser considerado é o tamanho da sequência randômica, região central, que pode compreender aproximadamente 20-80, sendo flanqueados por sequências específicas (ULRICH *et al.*, 2006; STOLTENBURG; REINEMANN; STREHLITZ, 2007).

A complexidade da biblioteca pode ser aumentada com a incorporação de novas características como, por exemplo, grupos funcionais orgânicos aos oligonucleotídeos, permitindo assim, novas interações entre a molécula e alvo. Além disso, possíveis modificações podem estabilizar estruturas conformacionais ou também possibilitar o aumento da resistência à nucleases. Essas mudanças geram bibliotecas de oligonucleotídeos

quimicamente modificadas com propriedades importantes para muitas aplicações de aptâmeros (KLUSSMANN, 2006).

Na seleção de ligantes de DNA, a biblioteca pode ser utilizada diretamente no primeiro *round* do SELEX, porque os *primers* (senso e antisenso) resultam das sequências específicas nas terminações 5' e 3', o que possibilita a amplificação dos oligonucleotídeos selecionados. As moléculas de DNA sintetizadas quimicamente podem ser amplificadas pela polimerase com distintas eficiências, de modo que no primeiro *round* algumas sequências de ligantes podem ser perdidas.

Em relação à seleção de aptâmeros de RNA, primeiramente a biblioteca randômica de DNA deve ser transcrita *in vitro* em uma biblioteca de RNA para que se possa começar os *rounds* de seleção. Portanto, é imprescindível que o *primer* senso contenha uma sequência promotora para RNA polimerase. Dessa forma, antes de cada *round* do SELEX, o *pool* de aptâmeros selecionados deve ser reversamente transcrito, subsequentemente amplificado por PCR e, por fim, transcrito, *in vitro* (Figura 8) (STOLTENBURG; REINEMANN; STREHLITZ, 2007).

Os oligonucleotídeos ligantes eluídos e amplificados são enriquecidos, ou seja, têm a quantidade aumentada a cada *round* (ULRICH *et al.*, 2006). O número de *rounds* depende de vários parâmetros, dentre eles: as características do alvo, a concentração da biblioteca de oligonucleotídeos utilizada, as condições de seleção e a eficiência do método de separação (STOLTENBURG; REINEMANN; STREHLITZ, 2007; BUNKA; STOCKLEY, 2006; ULRICH *et al.*, 2006).

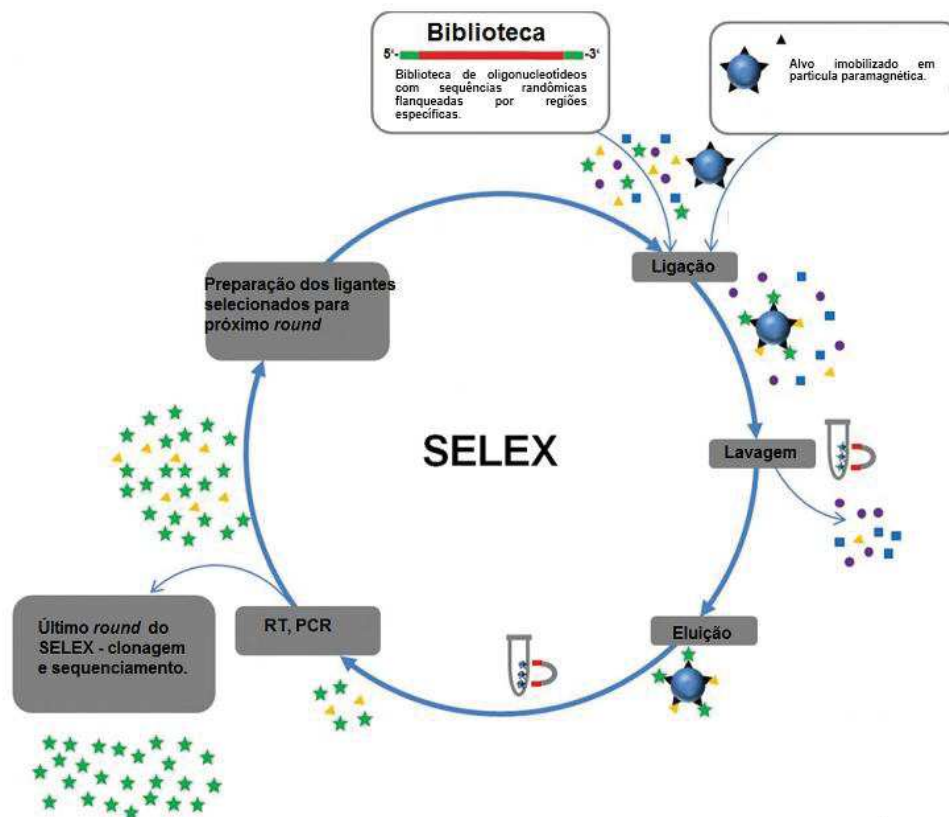


FIGURA 8: Representação esquemática do SELEX utilizando partículas paramagnéticas. A separação dos fragmentos de ácidos nucleicos ligados requer a utilização plataforma magnética. Adaptado de: LABMORE<sup>1</sup>, 2015.

Com a obtenção da biblioteca, parte-se para etapa de incubação, visando selecionar as moléculas com maior afinidade com o alvo em estudo. A biblioteca é incubada com a molécula alvo, as sequências que possuem baixa ou nenhuma afinidade tendem a permanecer livres na solução, enquanto que as demais se ligam ao alvo, formando o complexo aptâmero/alvo. A separação dos oligonucleotídeos ligantes dos não ligantes é o passo crucial para a seleção de aptâmeros bem sucedida. Um método de separação convencional é a cromatografia de afinidade em que os alvos são imobilizados nas colunas. Outro método é a separação por filtração utilizando, por exemplo, filtros de nitrocelulose (SONG; LEE; BAN, 2012; GOPINATH, 2007; TOMBELLI; MINUNNI; MASCINI, 2005). A imobilização do alvo em partículas paramagnéticas é outra opção, visto que é um método mais rápido, fácil e

<sup>1</sup> Disponível em: < <http://www.int.laborundmore.com/archive/826310/Aptamers-as-a-new-alternative-to-antibodies.html>>. Acessado em: 28/07/2015.

eficaz, no entanto, dependente de uma plataforma magnética (STOLTENBURG; REINEMANN; STREHLITZ, 2005).

#### 1.4.2 - Aplicações terapêuticas (aptâmeros e suas especificações)

Os aptâmeros são oligonucleotídeos de cadeia simples (ssDNA ou RNA) capazes de formar estruturas tridimensionais bem definidas e se ligam com alta afinidade e especificidade contra uma variedade de alvos, que incluem proteínas, carboidratos, antibióticos, ácidos nucleicos ou células (Figura 9) (STOLTENBURG; REINEMANN; STREHLITZ, 2007; KLUSSMANN, 2006; ULRICH *et al*, 2006). O termo aptâmero advém da palavra latina “*aptus*” que significa encaixe e “*meros*” que vem do grego que significa partícula.

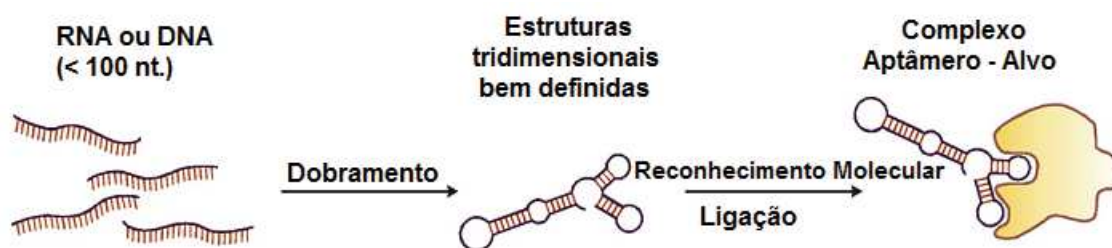


FIGURA 9: Representação esquemática da funcionalidade dos aptâmeros. Adaptado de: STOLTENBURG; REINEMANN; STREHLITZ, 2007.

Os aptâmeros ligam-se aos seus alvos pela combinação de complementaridade na forma, interações de emparelhamento entre compostos aromáticos e as bases dos aptâmeros, interações de *van der Waals*, interações eletrostáticas entre grupos carregados ou ligações de hidrogênio. Além disso, os aptâmeros sofrem mudanças conformacionais adaptativas na presença do alvo e na formação do complexo de ligação. A característica de dobrar-se em uma estrutura tridimensional definida permite ao aptâmero envolver completamente substâncias pequenas devido a geração de um sítio de ligação específico. Enquanto que para as moléculas com alta massa molecular, tais como proteínas, diferentes estruturas da superfície do alvo são envolvidas pela interação com o aptâmero (HERMANN; PATEL, 2000).

Durante décadas, os anticorpos têm sido a classe mais popular de moléculas de reconhecimento molecular em uma grande variedade de aplicações. Os aptâmeros têm atraído o interesse dos pesquisadores por serem uma nova classe de componentes de reconhecimento molecular, atuando como ferramentas promissoras para superar as desvantagens dos anticorpos; por isso, os aptâmeros têm se tornado conhecidos amplamente como um substituto desta classe de moléculas (HAN; LIANG; ZHOU, 2010).

Entre as desvantagens apresentadas pelos aptâmeros, pode ser mencionado o custo elevado para produção em larga escala, e caso sejam necessárias modificações químicas, a fim de protegê-los contra degradação ou melhorar suas propriedades farmacocinéticas, os custos de produção podem aumentar ainda mais (FERREIRA; MISSAILIDIS, 2007). Além dessas desvantagens, não é possível prever o sucesso de seleção da técnica SELEX, sendo necessários testes complementares para verificação da especificidade do aptâmero para molécula alvo (MAYER, 2009). Essa inabilidade de predição pode ser explicada pela falta de um protocolo padronizado que seja aplicável para qualquer tipo de alvo. As condições para seleção dos ligantes devem ser adaptadas para cada circunstância em questão (MAYER, 2009; STOLTENBURG; REINEMANN; STREHLITZ, 2007; ULRICH *et al.*, 2006)

Por outro lado, dentre as vantagens pode-se citar que aptâmeros são selecionados através de um processo *in vitro* e que a técnica SELEX também é aplicável em condições não fisiológicas. Quando comparados aos anticorpos, os aptâmeros apresentam um tamanho relativamente pequeno, o que facilita sua síntese química e possíveis modificações (STOLTENBURG; REINEMANN; STREHLITZ, 2007). Foram descritos como sendo pouco imunogênicos. De modo que os aptâmeros conseguem distinguir domínios extracelulares ou intracelulares, podendo alcançar epítomos pequenos e protegidos de vírus, os quais não podem ser diferenciados por anticorpos (GOPINATH *et al.*, 2006).

No que se refere às estruturas do vírus da dengue que são potenciais alvos de aptâmeros, tem sido sugerido que os elementos funcionais de RNA do vírus presentes em sequências traduzidas, como também em não

traduzidas (5'-UTR e 3'-UTR), que formam estruturas conformacionais (*stem loop*), do genoma viral e suas interações RNA-RNA e RNA-proteína desempenham importantes papéis no processo infeccioso; contudo, ainda existem falhas em se explicar como esses elementos participam nesse processo (GEBHARD; FILOMATORI; GAMARNIK, 2011).

Diante do exposto, a caracterização e a produção de ligantes específicos aos elementos conformacionais na 3'-UTR do DENV utilizando o método SELEX poderão gerar resultados, a serem explorados como ferramentas diagnósticas e terapêuticas para o controle e a prevenção da infecção viral. Além de auxiliar na elucidação da função de genes e vias celulares importantes associadas ao processo infeccioso e mecanismo de ação viral, assim como na identificação de moléculas biológicas relevantes a RNAs estruturalmente conformacionais.

## 2. Objetivo Geral

Realizar o isolamento de aptâmeros de RNA ligantes à região 3'-UTR do genoma do DENV, a fim de produzir ligantes para fins diagnósticos e/ou terapêuticos.

### 2.1 - Objetivos Específicos

- Obter a sequência 3'-UTR do RNA do DENV de dois tipos virais contendo biotina para ligação às partículas paramagnéticas revestidas com estreptavidina;
- Construir uma biblioteca combinatória de DNA genômico humano que contenha a sequência promotora da T7 RNA polimerase utilizando *primers* específicos para obtenção de ligantes de RNA
- Realizar o processo de seleção de ligantes à 3'-UTR do RNA do DENV, por meio de hibridização em plataforma magnética, a fim de caracterizar os aptâmeros selecionados por clonagem.

### 3. Materiais

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). Ampicilina, hexâmeros, tripsina, *Escherichia coli* competente TOP 10, *Platinum Taq DNA polymerase*, Soro Fetal Bovino (SFB), RNase *out* e TOPO TA *cloning* kit 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  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo), lâ 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).

O meio SOC foi adquirido da Phoneutria Biotecnologia (Belo Horizonte- MG, Brasil). Brometo de etídeo, membrana de náilon e kit de marcação com estreptavidina foram obtidos da GE Healthcare Life (São Paulo-SP, Brasil). *RNAsin*, *pGEM® – T Easy Vector*, partículas paramagnéticas revestidas com estreptavidina e *T7 RiboMAX™* foram obtidos da Promega (Madison - WI, USA). O kit de detecção de sondas marcadas com biotina foi obtido da Thermo Scientific (Sinapse Biotecnologia).

Ácido bórico e azul de bromofenol foram obtidos da IMPEX™ (Contagem – MG, Brasil). Acetato de potássio, azida de sódio, tween 20 e álcool etílico foram obtidos da Vetec (Rio de Janeiro-RJ, Brasil). Acetato de sódio, acetato de amônio, cloreto de sódio e clorofórmio foram adquiridos da Proquímicos. Álcool isoamílico e cloreto de cálcio foram adquiridos da Dinâmica (Diadema – SP, Brasil). Cloreto de magnésio, fenol e hidróxido de sódio foram obtidos da Neon Reagentes Analíticos (São Paulo – SP, Brasil).

## **4. Metodologia**

### **4.1 -Obtenção do alvo**

#### **4.1.1- Cultura de células C6/36 (*Aedes albopictus*)**

A linhagem celular C6/36 originária de larvas de mosquitos *Aedes albopictus* foi cedida pelo Laboratório de Virologia, do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). As células foram mantidas em frascos de cultura (25 cm<sup>2</sup>) (GREINER), cultivadas em meio L-15 contendo penicilina e estreptomicina (100 U/mL e 100 µg/mL, respectivamente), suplementado com 5% soro bovino fetal (SFB) e em estufa a 28°C.

Alguns frascos de cultura foram utilizados para realizar culturas de DENV-2 e -3. Os frascos que continham as culturas infectadas foram utilizadas para a extração do RNA viral e posterior síntese de cDNA (DNA complementar).

#### **4.1.2 - Extração de RNA**

A extração do RNA foi realizada utilizando o TRI Reagent® de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, foi analisada a integridade do RNA por eletroforese em gel de agarose em uma concentração de 0,8% (0,8 g agarose/100 mL tampão TBE – tris 0,9 M; ácido bórico 0.8 M; EDTA 0,5 M pH 8,0) corado com brometo de etídio a 0,5 µg/mL e a quantificação foi feita através da leitura em espectrofotômetro L-Quant (Loccus Biotecnologia, Cotia – SP, Brasil) em comprimento de onda de 260nm e 280nm para análises da relação RNA/proteína nas amostras.

#### **4.1.3 - Transcrição reversa (RT)**

A transcrição reversa (RT) é a reação da síntese de moléculas de DNA (cDNA), utilizando RNA como molde (WATSON *et al.*, 2006). Para a reação de transcrição reversa deste trabalho, foi utilizado um micrograma do

RNA total como molde para a síntese de cDNA na presença de 126 pmol de hexânucleotídeos randômicos, 1 U de M-MLV RT (*Moloney murine Leukemia virus* reverse transcriptase), 0,25 U de inibidor de RNase, 0,2 mM de dNTPs, 1X do tampão da M-MLV RT para um volume final de 20 µL. Seguindo as recomendações do fabricante, a reação foi incubada a 37°C por uma hora.

#### 4.1.4 - Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A amplificação por PCR foi realizada nas seguintes condições: 2 µL do cDNA, 1X do tampão, 2,5 U da enzima *Platinum Taq DNA polymerase*, 25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de cada dNTP, 7 pmoles de cada *primer* (*forward* e *reverse*) e completou-se com água ultrapura para volume final de 20 µL.

As condições de termociclagem foram padronizadas com 40 ciclos (95°C – 30 s, 60°C – 50 s - 72°C – 2 min) seguidos por 10 minutos de extensão final a 72°C. Foi utilizado o termociclador (AmpliTherm Thermal Cycler). As sequências dos *primers* utilizados foram: *forward* GCCCAGAACATACTCACAGCA e *reverse* (Rev-1) AGAACCTGTTGATTCAACAGCACC (AQUINO *et al.*, 2006).

#### 4.1.5 - Eletroforese em gel de agarose e purificação dos produtos da PCR

Os géis foram preparados utilizando-se agarose na concentração de 1,2 % em tampão TBE contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo. A eletroforese foi realizada em tampão TBE, sob tensão de 121 V por cerca de 50 minutos. Os produtos das reações foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (Transiluminator, Loccus Biotecnologia) e o gel foi fotografado.

Posteriormente, os produtos amplificados foram purificados a partir da agarose utilizando lã de vidro e precipitação com acetato de amônio 7,5 M. Para isso, a banda de gel de agarose foi cortada e colocada em um tubo de 0,6 mL que continha lã de vidro e um pequeno furo posicionado na parte inferior do tubo. O tubo de 0,6 mL foi colocado dentro de um tubo de 1,5 mL e, em seguida, foi centrifugado por 15 minutos a 13000 rpm.

Com a centrifugação, a amostra que estava no tubo de 1,5 mL foi

coletada e o acetado de amônio 7,5 M foi adicionado na proporção de 2µL de acetato de amônio para cada 8 µL de produto. Depois foi adicionado 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 centrifugada 30 minutos a 13000 rpm. O sobrenadante foi removido e 200 µL de etanol 70% foram adicionados ao sobrenadante. A amostra foi centrifugada novamente por 5 minutos a 13000 rpm, o sobrenadante foi removido e o *pellet* foi ressuspensão em 15 µL de água.

#### **4.1.6 - Clonagem do produto de PCR no vetor *pGemT-easy* e transformação das bactérias TOP10**

Os produtos amplificados e purificados da sequência 3'-UTR do DENV-2 e -3 foram clonados utilizando o Kit *pGEM® - T Easy Vector System I* (Promega Corporation, Madison, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

As bactérias *Escherichia coli* da cepa TOP10 estocadas a -80°C foram descongeladas, cultivadas em meio LB (sem antibiótico) e incubadas a 7°C por 16 horas. Foram transferidos 500 µL da cultura para 50 mL de meio LB líquido e reincubados a 37° C sob agitação de 200 rpm até atingir a densidade óptica ( $A_{600}$ ) entre 0,1–0,3. A cultura foi então centrifugada a 3000 g por 15 min a 4°C. Após descartar o sobrenadante, o sedimento de bactérias foi ressuspensão em 10 mL de solução gelada de CaCl<sub>2</sub> 50 mM com suave agitação e mantido em gelo. A cultura foi centrifugada novamente e ressuspensão lentamente com 1 mL da solução gelada de CaCl<sub>2</sub>. A suspensão foi reincubada por mais 1 hora no gelo. A partir deste momento as células foram consideradas competentes.

#### **4.1.7 - Transformação das bactérias competentes**

Para a transformação das bactérias, foi utilizado o choque térmico, em que foram incubados de 100 a 200 µL de células competentes com 100 a 500 ng de DNA da reação de ligação em banho de água/gelo por cerca

de 30 minutos. Em seguida, foi realizado o choque térmico a 42°C por 2 minutos e subsequente banho de gelo por 5 minutos. Foi adicionado posteriormente 1 mL de meio SOC aos tubos submetidos ao choque término, que foram incubados por 1 hora a 37°C. Após a transformação foram semeados de 50 a 100 µL de células transformadas em placa contendo LB ágar suplementado com 40 mg/mL de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosidase), 100 mM de IPTG (isopropil-β-D Tiogalactopiranosídeo) e 50 µg/mL de ampicilina. As placas foram vedadas com parafilme e incubadas *overnight* a 37°C.

#### **4.1.8 - Extração de DNA plasmidial**

As colônias de bactérias que continham o inserto do DNA desejado, foram isoladas e inoculadas em 5 mL de meio LB com ampicilina e incubadas a 37°C por 16 horas. Após este período de incubação, foi realizada a extração do DNA plasmidial por meio de lise alcalina. A qualidade foi feita com a quantificação através da leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260nm e 280nm. A integridade das amostra foi analisada em gel de agarose 0,8% (p/v). Os clones positivos foram encaminhados para sequenciamento e serviram também como molde para a amplificação do alvo para seleção de aptâmeros.

#### **4.1.9 – PCR semi – *nested***

A PCR semi-*nested* (Figura 10) foi realizada para aumentar a eficiência durante o processo de reamplificação do alvo após a primeira PCR, utilizando três *primers* reversos distintos: Rev-2 (AACCTGTTGATTCAACAGCACCC), Rev-3 (CCATTTTCTGGC GTTCTGTG) e Rev-4 (TGTGCCTGGATGATGCTGA), que abrangem regiões mais internas do que o *primer* reverso anteriormente utilizado. Como o *primer forward* foi conservado na segunda amplificação, essa reação foi caracterizada como semi-*nested* (VILJOEN; NEL; CROWTHER, 2005). Os *primers nested* foram

desenhados utilizando o software *Primer Express*® *Software Version 3.0* (Applied Biosystems).

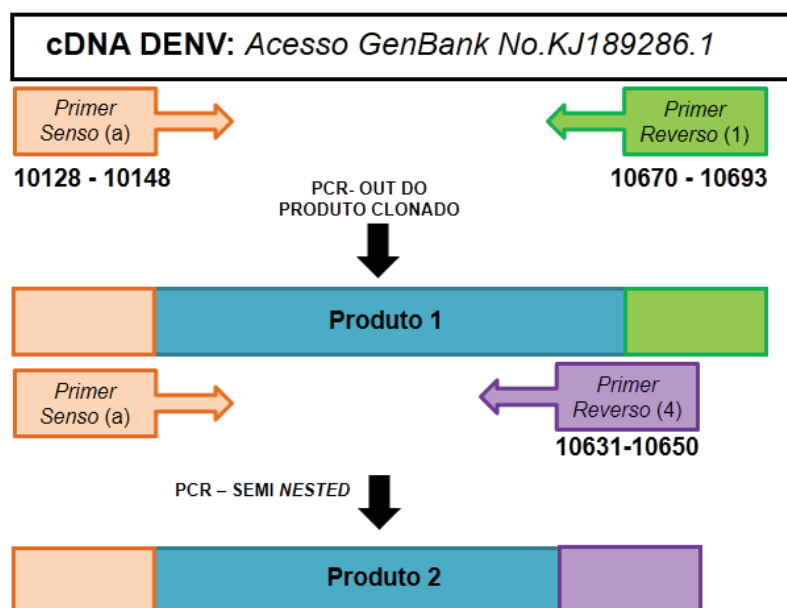


FIGURA 10: Esquema da PCR semi-nested para a 3'-UTR do RNA do DENV. As posições de anelamento dos primers (a), (1) e (4) foram indicadas considerando o acesso no *GenBank* número *KJ189286.1*. O primer senso se anelou no final da região codificante da proteína não estrutural NS5 e no início do domínio I da 3'-UTR, enquanto os *primers reversos* se anelaram no final do domínio III presente na 3'-UTR.

#### 4.1.10 - Molécula alvo biotinizada

A incorporação da biotina à molécula alvo foi realizada por PCR, pois a imobilização do alvo foi feita utilizando partículas paramagnéticas recobertas com estreptavidina, de forma que a partir da interação estreptavidina-biotina, o alvo pudesse ser imobilizado na partícula. A partir do produto purificado (item 4.1.5) foi realizada a PCR assimétrica utilizando 7 pmoles de *primer* biotinizado *forward* e dUTP (desoxiuridina trifosfatada) em substituição de dTTP (desoxitimina trifosfatada). As condições de termociclagem utilizadas foram as mesmas descritas no item 4.1.4, como resultado dessa reação, foram geradas moléculas RNA-like, ou seja, moléculas de ssDNA que continham a base nitrogenada uracila, ao invés da timina.

Os produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose 1,2 % em tampão TBE contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo. Após a corrida eletroforetica, o gel de agarose foi visualizado em transiluminador de luz

ultravioleta e em seguida, fotodocumentado. A purificação dos produtos foi realizada como descrita no item 4.1.5.

#### 4.1.11 - Teste de marcação com biotina

Com a finalidade de verificar se o alvo estava biotilado, foi realizado um teste de marcação com biotina. Para isso, utilizou-se uma membrana de náilon carregada positivamente, onde foram depositadas (Figura 11A) as seguintes amostras: um controle positivo (*primer forward* biotilado), os produtos biotilados e purificados de DENV-2 e DENV-3 e uma amostra amplificada sem biotina.

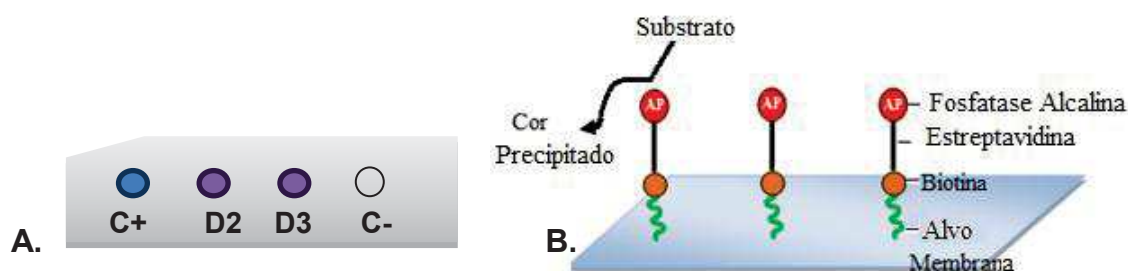


FIGURA11: Esquemática do teste de incorporação de biotina na molécula alvo. A) Esquema de como as amostras foram plotadas na membrana. B) Representação esquemática do teste de detecção do alvo biotilado.

O teste (Figura 11 B) baseia-se na afinidade existente entre a biotina e a estreptavidina, em que o alvo biotilado liga-se à estreptavidina que está conjugada com a fosfatase alcalina. Como meio de detecção, foram utilizados os substratos: 0,19 mg/mL de NBT (azul de nitrotetrazólio) e 0,4 mg/mL de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato).

## 4.2 - Construção da biblioteca

### 4.2.1 - DNA genômico

Para a construção da biblioteca, foi coletado DNA genômico humano, seguindo os procedimentos empregados para manipulação do material biológico de acordo com as normas do Código de Ética Médica, com No. 005/2001 de aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade

Federal de Uberlândia (UFU). Após a coleta, o DNA de diferentes indivíduos foram transferidos para um único microtubo formando um *pool*, cuja qualidade e integridade foi analisada em gel de agarose 1%.

#### 4.2.2 - Fragmentação do DNA humano genômico

A fragmentação do *pool* de 12 µg do DNA genômico humano, em aparelho Ultrasonic Cleaner (1440D, Odontobras), foi realizada com sonicação por 40, 45 e 60 minutos, para se obter fragmentos de tamanhos variados. Os produtos sonicados foram analisados em gel de agarose 1% e fotodocumentados utilizando o aparelho LPix (Loccus).

#### 4.2.3 – Construção da biblioteca randômica por PCR

O produto fragmentado foi submetido à incorporação de *primers* com sequência fixa e randômica (Figura 12). As condições das PCRs utilizadas para a construção da biblioteca seguiram-se conforme descrito por Silva (2015).

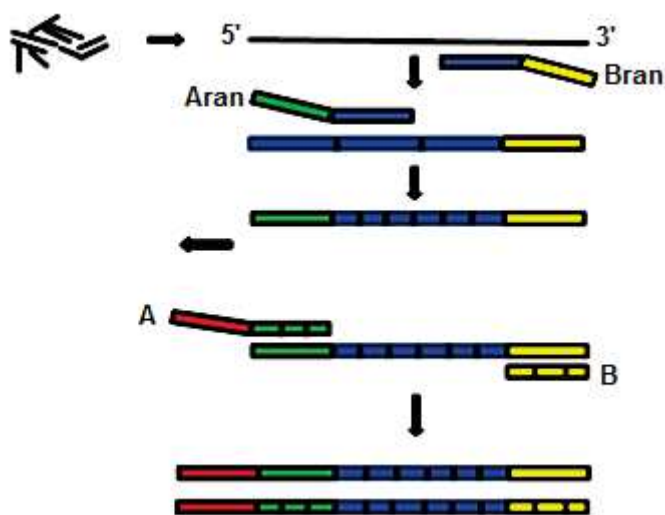


FIGURA 12: Esquema da construção da biblioteca. Com a fragmentação do *pool* de DNA por sonicação, uma síntese de DNA foi realizada com o *primer* Bran. Após purificação, uma segunda síntese foi realizada com o *primer* Aran, seguida por uma nova purificação. A construção da biblioteca randômica termina com uma amplificação por PCR utilizando os *primer* A e o *primer* B. Adaptado de: SINGER *et al.*, 1997.

Inicialmente realizou-se uma PCR utilizando o DNA fragmentado

como molde e o *primer Bran*, que contém uma sequência randômica. Depois da amplificação, o produto da reação foi purificado com acetato de sódio (3 M) na proporção de 2 µL de acetato de sódio para 8 µL e etanol absoluto na proporção de 30 µL etanol para 10 µL de produto.

O produto foi incubado a  $-20^{\circ}\text{C}$  *overnight*, e posteriormente foi centrifugado por 30 minutos a 13000 rpm. O sobrenadante foi removido e 200 µL de etanol 70% foram adicionados, após uma centrifugação de 10 minutos a 13000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspenso em 10 µL de água ultrapura.

Após a purificação, uma nova PCR foi realizada com o *primer Aran* nas mesmas condições supracitadas utilizando o material purificado como molde, após a amplificação o produto desta nova reação também foi purificado. Outra PCR foi realizada com o *primer B* e o *primer A*, que possui sequência fixa de pareamento ao produto anterior, bem como a sequência do promotor da T7 RNA polimerase.

A construção da biblioteca randômica finaliza com a incorporação dos *primers A* e *B*, assim o produto da última reação foi analisado por eletroforese usando gel de agarose 1% e os produtos obtidos foram purificados a partir da agarose sendo precipitados com acetato de sódio (3 M).

### 4.3 - Isolamento de aptâmeros de RNA

Antes de realizar as etapas para seleção de aptâmeros de RNA, a biblioteca randômica de DNA foi transcrita, *in vitro*, em uma biblioteca de RNA. A reação de transcrição foi feita com o kit T7 RiboMAX™, para síntese de RNA em larga escala (Promega), de acordo com as instruções do fabricante.

Neste trabalho, foram utilizados 5 nmoles de um *pool* da biblioteca de RNA  $10^{15}$  oligonucleotídeos. Após a transcrição *in vitro* da biblioteca ocorreu a preparação do alvo, onde 200 pmoles de um *pool* do alvo, DENV-2 e -3 biotilado (essa quantidade de alvo foi mantida em todos os *rounds* de seleção), foi submetido à desnaturação a  $95^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos, depois resfriado e mantido a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos, seguido de uma curta incubação de 7 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se ao alvo 260 µL de

tampão de ligação (NaCl 0.1 M, Tris 0.02 M pH 7.6, MgCl<sub>2</sub> 0.004 M, KCl 0.005 M, CaCl<sub>2</sub> 0.03 M, Tween 20 0.02%) e 70 µg de partículas paramagnéticas recobertas com estreptavidina (SA-PMs) que foram preparadas antes do uso, seguindo a recomendação do fabricante (Promega). A reação de ligação biotina-estreptoavidina ocorreu a 36°C durante 30 minutos com leve agitação, realizando assim a imobilização do alvo às SA-PMs e a formação do complexo SA-PMs/alvo.

Para remoção de fitas não biotiniladas, lavou-se o complexo SA-PMs/alvo com 1 mL de NaOH (0,1 M) e posteriormente foram realizadas duas lavagens com 1 mL de tampão de lavagem (Tris 0.1 M, NaCl 2.5 M, NaN<sub>3</sub> 0,02% pH 8.0).

A seleção dos ligantes iniciou-se com a ressuspensão do complexo SA-PMs/alvo em 500 µL de tampão de ligação e adição de 5 nmoles do *pool* da biblioteca randômica de RNA. Esta solução foi incubada a 37°C durante 1 hora com agitação por inversão e, em seguida, os oligonucleotídeos não ligantes foram removidos, com o auxílio da plataforma magnética (*BioLabs*®), a partir de quatro lavagens com o tampão de ligação.

A eluição dos oligonucleotídeos ligantes foi feita com 200 µL de NaOH 0,1 M a 36°C por 10 minutos com agitação por inversão, este passo foi repetido por quatro vezes, obtendo desta forma os aptâmeros selecionados. A quantidade de RNA que foi recuperada após cada *round* indicou o enriquecimento de ligantes presentes no *pool*.

O *pool* de aptâmeros foi extraído com uma solução de fenol, tamponado com água pH 5, clorofórmio e álcool isoamílico (na proporção de 834 µL de fenol + 160 µL de clorofórmio + 6 µL de álcool isoamílico), seguido de precipitação com etanol. Para início do próximo *round*, os RNAs selecionados foram reversamente transcritos e posteriormente amplificados por RT-PCR utilizando os *primers* A e B. Assim um novo *pool* de RNAs foi gerado para o para o próximo *round* de SELEX.

Ao todo, foram realizados 8 *rounds* empregando o uso de SA-PMs para separar os oligonucleotídeos ligantes dos não ligantes. Os produtos da RT-PCR obtidos com RNA da seleção do último *round* foram clonados utilizando o kit TOPO TA *cloning* e 14 clones foram escolhidos aleatoriamente,

variabilidade dos aptâmeros selecionados previamente ao sequenciamento (dados ainda não obtidos). Depois da extração do DNA plasmidial, foi realizada a amplificação deste material por PCR, com as mesmas condições descritas anteriormente que foram utilizadas para construção da biblioteca randômica, e o produto foi analisado em gel de agarose 2% (p/v).

#### **4.4 – Hibridização por *dot blot***

A especificidade e a afinidade dos aptâmeros com o alvo foram verificadas com o teste de *dot blot*. Um *pool* dos produtos purificados, da 3'-UTR do RNA do DENV-2 e -3, foi marcado com estreptavidina conjugada com fosfatase alcalina para que pudesse ser utilizado como sonda.

Os produtos purificados da PCR da biblioteca do 2º ao 8º *round* (400 ng) foram plotadas separadamente em uma membrana e após secagem 80°C, a membrana foi exposta à luz ultravioleta. Em seguida, a membrana foi hidratada com 5 mL do tampão de hibridização por 15 minutos a 36°C, e depois deste tempo, a sonda foi adicionada para que pudesse ocorrer a hibridização da sonda com os alvos que estavam na membrana.

A etapa de hibridização seguiu as recomendações do fabricante do kit de marcação com estreptavidina (GE Healthcare), com a finalização desta etapa, foi realizada a detecção colorimétrica, na qual foram utilizados os reagentes NBT e BCIP na mesma concentração descrita no item 4.1.11.

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1- Obtenção do alvo

No método da seleção de ligantes, é necessário incubar um *pool* de uma biblioteca randômica juntamente com a molécula alvo para posterior separação dos oligonucleotídeos ligantes dos não ligantes (STOLTENBURG; REINEMANN; STREHLITZ, 2007). Neste trabalho, o alvo em questão foi a sequência 3'-UTR do DENV dos sorotipos 2 e 3. Assim, inicialmente, após extração e transcrição reversa do RNA viral proveniente das células C6/36 infectadas em cultura, foram realizadas otimizações da PCR para amplificação da região alvo. Os produtos da RT-PCR do DENV-2 e -3 foram amplificados e tiveram aproximadamente 566-pb como pode ser observado, nas bandas do gel de eletroforese (Figura 13).

Segundo Ivanyi-Nagy e Darlix (2012) a 3'-UTR possui em torno de 400-800 nucleotídeos, com estruturas secundárias de RNA altamente conservadas. Entretanto, para Aquino *et al.* (2006), o resultado esperado para o produto amplificado seria de 500-pb para a região 3'-UTR, utilizando os mesmos pares de *primers* descritos anteriormente. Os dados do sequenciamento do alvo confirmarão a sequência amplificada.

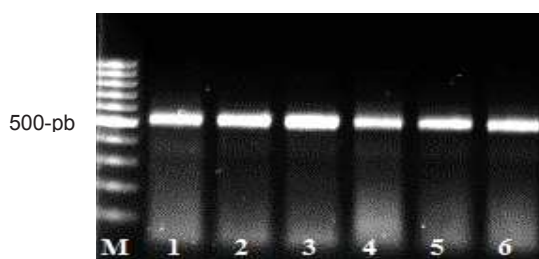


FIGURA 13: Eletroforese em gel de agarose 1,2% (p/v) dos produtos de PCR do cDNA de DENV. M - marcador de peso molecular de 100pb. 1-3 produtos amplificados de DENV-3. 4 a 6 produtos amplificados de DENV-2.

Essa divergência quanto ao tamanho das 3'-UTR pode ser explicada pela variação presente no domínio I dessa região. Shurtleff *et al.* (2001) analisaram a variação na sequência dos nucleotídeos das 3'-UTR de diferentes localizações geográficas. Segundo esses pesquisadores, a

variabilidade entre cepas estudadas estava presente principalmente na região imediatamente a seguir ao códon de terminação da NS5, e incluiu deleções, mutações, e repetições imperfeitas.

Como a separação dos oligonucleotídeos ligantes dos não ligantes foi feita através da imobilização do alvo em partículas paramagnéticas recoberta com estreptavidina, foi necessário fazer a incorporação da biotina na molécula alvo. Inicialmente, a técnica utilizada foi a PCR assimétrica por reamplificação, técnica preferencialmente utilizada para sintetizar uma única fita do DNA original (AVCI-ADALI *et al.*, 2010) e, além disso, um método com custo mais acessível para a produção de ssDNA (CITARTAN *et al.*, 2012).

Por meio do *primer forward* biotilado, foi realizada uma PCR para fazer a incorporação da biotina no alvo, e também, foram utilizados dNTPs contendo dUTP com a finalidade de gerar moléculas RNA-*like*. Entretanto, quando o produto amplificado (Figura 14) passava pelo processo de purificação, a concentração de alvo resultante era baixa, havendo grandes perdas do alvo durante esse processo.

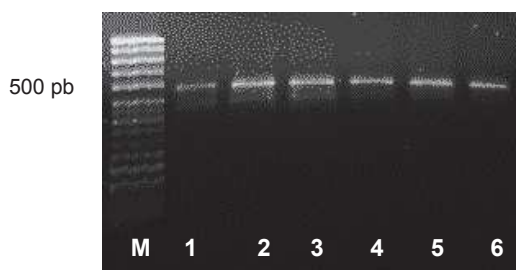


FIGURA 14: Eletroforese em gel de agarose 1,2% (p/v) dos produtos da PCR assimétrica. M - marcador de peso molecular de 50pb. 1-3 produtos amplificados de DENV-2. 4 a 6 produtos amplificados de DENV-3.

Para Avci-Adali *et al.* (2010), o produto amplificado da PCR assimétrica é uma mistura de ssDNA e dsDNA, requerendo assim um bom método de purificação de forma a purificar seletivamente o ssDNA. Outro fator importante a ser ressaltado é que o rendimento da PCR assimétrica é em torno de 60-70% quando comparado ao de uma PCR convencional que é de 90% ou mais (CITARTAN *et al.*, 2012). Como o resultado da purificação do produto da PCR assimétrica não foi eficiente, optamos aqui pela utilização da PCR semi *nested*.

A PCR *nested* e sua variante – semi *nested* são técnicas utilizadas para melhorar a sensibilidade, especificidade e eficiência da PCR. Para isso, após o término da primeira PCR, uma nova reação foi feita fazendo uso de *primers nested*, que flanqueiem regiões mais internas do que o conjunto de *primers* utilizados na primeira reação (RAPLEY; WHITEHOUSE, 2014).

A escolha desta técnica foi devido à melhoria na eficiência de amplificação do alvo pós-purificação. Pela análise dos *primers* que estavam sendo utilizados até o momento com o software *Primer Express* (*Applied Biosystems*), verificou-se que o *primer* reverso que estava sendo utilizado formava *self*-dímeros, possuía complementaridade de bases, de forma que ao invés de hibridizar ao DNA molde, ele fazia pareamento de bases consigo mesmo, dificultando a amplificação do alvo que estava clonado.

Assim, foi realizado um teste (Figura 15) de amplificação a partir dos fragmentos clonados, utilizando os *primers* reversos desenhados neste trabalho. Dentre os três *primers* sintetizados, o que apresentou melhores resultados de amplificação da região clonada foi o *primer* Rev-4, sendo este o mais interno dos *primers*.

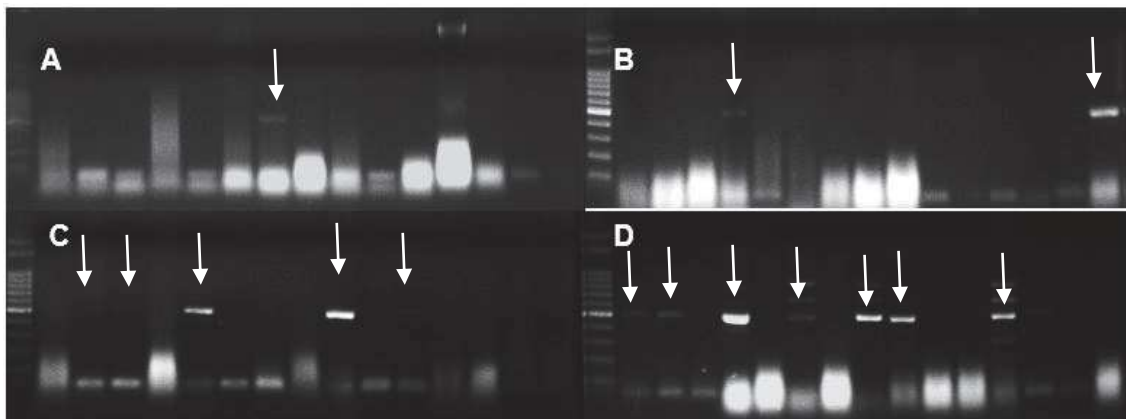


FIGURA 15: Eletroforese em gel de agarose 1,2% (p/v) dos produtos da PCR do teste de *primers* reversos com diferentes plasmídeos da 3'-UTR. A) Produto amplificado com *primer* Rev-1. B) Produto amplificado com Rev-2. C) Produto amplificado com Rev-3. D) Produto amplificado com Rev-4. Setas: indicam o produto esperado de aproximadamente 566, 564, 539, 523-pb; respectivamente.

A reação do alvo clonado utilizando os *primers* Rev-4, senso biotinilado e dUTP gerou um DNA de fita dupla contendo biotina e uracila com maior intensidade de fluorescência pela intercalação do brometo de etídeo, e foi, portanto, o método de escolha para obtenção do alvo durante o processo

de seleção. Após a amplificação e purificação desse produto, foi realizado um teste para verificar se biotina foi realmente incorporada à molécula alvo.

A biotina, também conhecida como vitamina H, é uma vitamina hidrossolúvel de papel importante na expressão gênica, na gliconeogênese e síntese de ácidos graxos atuando como cofator de enzimas carboxilase (RUSSEL; SUETER, 2014). A estreptavidina é uma proteína tetramérica de 60 kDa que possui alta afinidade de ligação à biotina, é normalmente isolada da bactéria *Streptomyces avidinii* e obtida comercialmente, livre ou conjugada à peroxidase ou fosfatase alcalina. A ligação entre a biotina e a estreptavidina é considerada como a interação não covalente mais forte conhecida, com uma constante de dissociação (Kd) aproximadamente  $10^{-15}$  M, fazendo com que a detecção de um alvo em uma reação enzimática seja de alta sensibilidade (DIAMAND; CHRISTOPOULOS, 1991).

A ligação da biotina com a estreptavidina pode ser detectada por meio de uma enzima, como a fosfatase alcalina, que na presença do substrato, produz um sinal quimiluminescente ou colorimétrico. Na reação colorimétrica utilizando o NBT/BCIP como substrato, a fosfatase alcalina (Figura 16 A) cliva o grupamento fosfato presente no substrato BCIP, produzindo NBT diformazano (precipitado), cuja coloração azul indica a biotinilação do alvo (KARCHER, 1995).

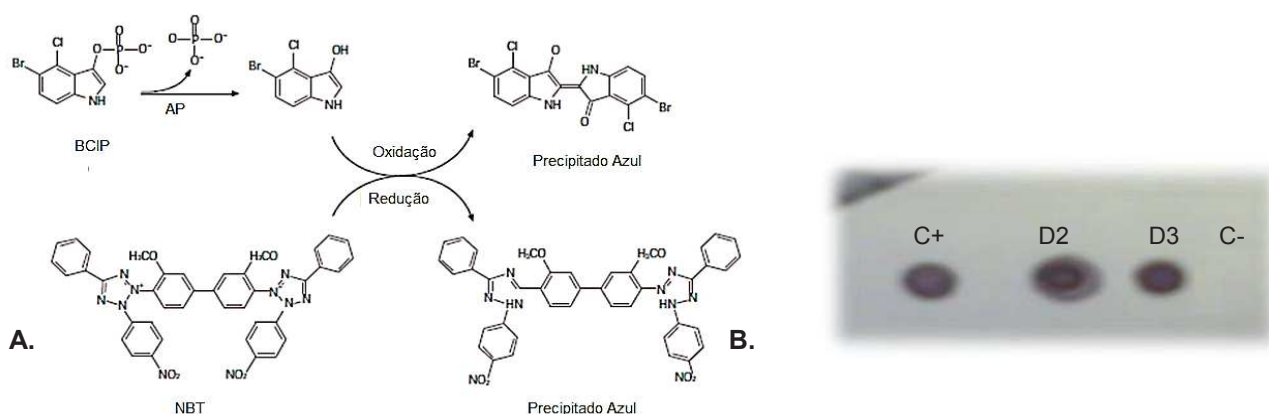


FIGURA 16: Resultado referente ao teste da incorporação de biotina à molécula alvo. A) Representação esquemática da reação redox do teste de marcação da biotina. B) Resultado do teste de marcação da biotina. C+: *primer* biotilado. D2: DENV-2 biotilado. D3: DENV-3 biotilado. C-: amostra amplificada que não possui biotina.

Com o resultado desse teste, verificou-se que a PCR semi *nested* foi eficiente para incorporar biotina à molécula alvo (FIGURA 16B), mostrando

assim que o alvo estava biotilado, sendo necessário para a próxima etapa de seleção de ligantes, a construção de uma biblioteca randômica de oligonucleotídeos.

## 5.2 - Biblioteca randômica

Para a construção da biblioteca randômica, o DNA genômico foi fragmentado. A fragmentação pode ser feita por procedimentos físicos (sonicação, *hydroshear*), como também por meio de métodos enzimáticos (enzimas de restrição e/ou nucleases não específicas) (MARINE *et. al.*, 2011). A fragmentação do DNA foi realizada com sonicador em diferentes tempos, sendo que dentre eles o melhor tempo de sonicação foi de 60 minutos. Neste tempo, a fragmentação (Figura 17) gerou diferentes tamanhos de DNA, aumentando a probabilidade de aleatoriedade da biblioteca randômica para ser construída.

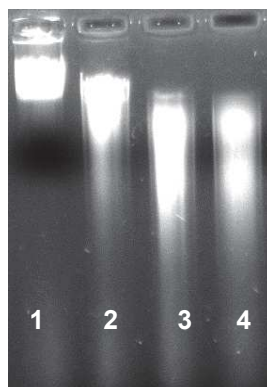


FIGURA 17: Eletroforese do *pool* de DNA genômico em tempos distintos de sonicação. 1- *Pool* de DNA humano genômico não sonicado; 2- *Pool* de DNA sonicado por 40 minutos; 3- *Pool* de DNA sonicado por 45 minutos; 4- *Pool* de DNA Sonicado por 60 minutos.

Após a sonicação, foram realizadas três PCRs: a primeira com o *pool* de DNA fragmentado e o *primers Bran*; a segunda com o produto amplificado da primeira reação e o *primer Aran*; a terceira PCR foi feita com o produto da segunda e com os *primers B e A* sendo que este último o que contém a sequência do promotor da T7 RNA polimerase. Os últimos produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose (Figura 18),

na qual foi possível observar que os fragmentos genômicos variaram de aproximadamente 80 a 600 nucleotídeos.

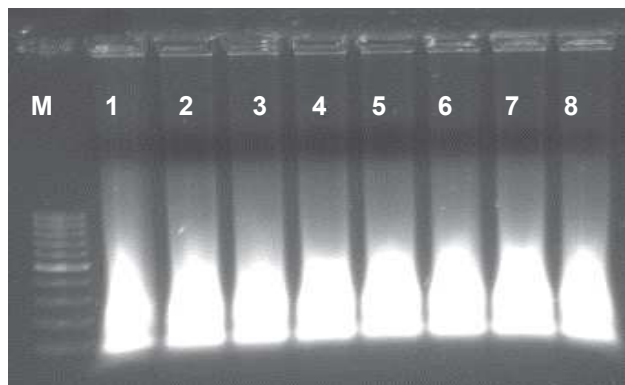


FIGURA 18: Eletroforese correspondente aos produtos amplificados para incorporação do promotor da T7 RNA polimerase. M- Marcador de peso molecular de 100-pb; 1 ao 8 – produtos amplificados.

Como o objetivo foi realizar o isolamento de aptâmeros de RNA ligantes à região 3'-UTR do vírus da dengue, a incorporação de um *primer* que contenha a sequência do promotor da T7 RNA polimerase foi essencial (STOLTENBURG; REINEMANN; STREHLITZ, 2007; SILVA *et al.*, 2015). A enzima T7 RNA polimerase é utilizada para realizar transcrição *in vitro* e é conhecida por ser uma das enzimas mais simples na síntese de qualquer tipo de RNA, em contraste com a maioria das RNA polimerases conhecidas (KOCHETKOV; RUSAKOVA; TUNITSKAYA, 1998). Ao reconhecer o seu promotor específico e por meio de catálise, a T7 RNA polimerase realiza a síntese de RNA com a presença de um molde de DNA (SCHENBORN; MEIRENDORF, 1985).

### 5.3 – Seleção de aptâmeros

Os aptâmeros foram isolados durante a realização de oito *rounds* de seleção. A cada *round*, a biblioteca randômica de DNA foi transcrita, *in vitro*, antes de iniciar as etapas de seleção. O alvo que era dsDNA, DNA de fita dupla, foi desnaturado a 95°C e depois de ser imobilizado na partícula paramagnética foi novamente desnaturado com NaOH. Esses dois passos de desnaturação foram necessários para que o alvo estivesse na conformação de

fita simples, de modo que, ao ser incubado com a biblioteca pudesse ocorrer interação entre alvo e biblioteca.

O enriquecimento de ligantes específicos ao alvo foi acompanhado durante o processo de seleção por meio da quantidade de aptâmeros que eram precipitados no final de cada *round*. Um dos resultados esperados era que, a partir do segundo *round*, a concentração da biblioteca após a transcrição *in vitro*, apresentasse uma diminuição proeminente, devido ao fato de que a metodologia aplicada para seleção de aptâmeros da 3'-UTR do DENV ser semelhante à que utilizada por Cnossen (2014) para seleção de ligantes à 5'-UTR do DENV.

Para Cnossen (2014), a diminuição da concentração da biblioteca pode ser explicada porque os oligonucleotídeos não ligantes foram eliminados nos ciclos iniciais, de forma que a cada *round* os oligonucleotídeos apresentaram maior afinidade e especificidade com o alvo. Entretanto, os resultados obtidos na seleção de ligantes para a 3'-UTR do vírus da dengue não apresentaram esta particularidade, pois a concentração inicial (5 nmoles) da biblioteca foi mantida em todos os *rounds*. Devem-se ser consideradas pequenas discrepâncias, como o tamanho da 3'-UTR que é quase cinco vezes maior que a 5'-UTR e, além disso, as duas UTRs possuem sequências de nucleotídeos distintas, fatores que podem ter influenciado no resultado obtido.

Os produtos obtidos da amplificação dos aptâmeros apresentaram uma pequena variação de peso molecular, entre 80 e 100 pb, indicando que o tamanho dos aptâmeros que foram amplificados divergiram em poucos nucleotídeos (Figura 19). Dentre os aptâmeros caracterizados por Cnossen (2014) para a 5'-UTR, foi verificado que os tamanhos dos aptâmeros variou de 41 a 187 nucleotídeos, considerando as sequências randômicas e fixas (*primers*). Quando analisadas somente as sequências randômicas, o tamanho variou de 10 a 156. Considerando o segmento da região variável, Cnossen (2014) encontrou uma maior frequência de aptâmeros no intervalo de 31 a 40 nucleotídeos, com combinações variáveis entre apenas 10 nucleotídeos. Assim, observa-se que o tamanho dos aptâmeros (sequencia randômica) varia muito pouco entre eles, de forma que a diferença de tamanho não seria

nitidamente observada em gel agarose, e neste trabalho pode ser foi observada apenas uma pequena variação.

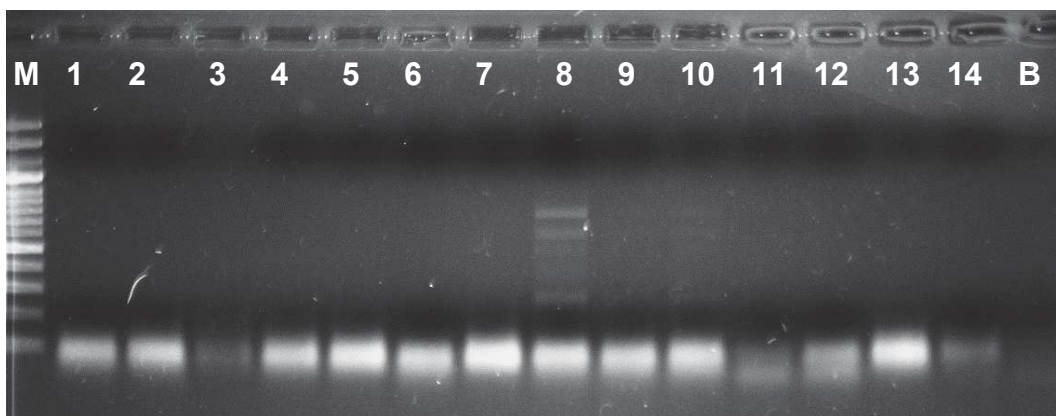


FIGURA 19: Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos com DNA plasmidial dos aptâmeros selecionados no oitavo *round*. M- marcador de peso molecular; 1 ao 14- produtos amplificados; B- branco da reação

A afinidade dos aptâmeros selecionados com o alvo foi observada por meio do teste de *dot blot*. A hibridização em *dot blot* é uma técnica empregada para detecção de sequências específicas de ácidos nucleicos (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014). Consiste na imobilização do DNA em uma membrana e detecção por meio de hibridização com uma sonda marcada, sequência específica que é marcada com um fluoróforo ou enzima (CLARK; PAZDERNIK, 2011).

Neste trabalho, a sonda utilizada foi o *pool* dos produtos purificados de RT-PCR de DENV-2 e -3 que foram ligados covalentemente com a enzima fosfatase alcalina. A hibridização do *pool* de aptâmeros depositados na membrana com a sonda marcada é revelada pela adição dos substratos da fosfatase alcalina, NBT e BCIP, cuja reação colorimétrica foi descrita anteriormente.

O resultado do teste de *dot blot* (Figura 20) demonstrou a afinidade do alvo pelos aptâmeros bem como a especificidade, já que não pode ser notado nenhum sinal no controle negativo. Na membrana podemos observar que os últimos *rounds* foram os que apresentaram sinal como já era esperado, visto que, a cada *round* realizado, a afinidade do aptâmero com o alvo aumento.



FIGURA 20: *Dot blot* para análise da afinidade entre alvo, *pool* de DENV-2 e -3, e *pool* de aptâmeros do 2º ao 8º rounds. A- 2º round; B- 3º round; C- 4º round; D- 5º round; E- 6º round; F- 7º round; G- 8º round; H- controle positivo, *pool* DENV-2 e -3; I – controle negativo, PBS.

A busca por novas moléculas com potencial para desenvolvimento de testes diagnósticos e de terapia das mais diversas doenças que acometem a saúde humana e animal fez com que o número de pesquisa utilizando a técnica SELEX aumentasse nos últimos anos, principalmente devido à promissora possibilidade da descoberta de ligantes que podem ser selecionados contra diversos alvos, os quais são comparáveis aos anticorpos e, no entanto, são menos imunogênicos. Os aptâmeros podem ser utilizados para aplicações *in vivo*, entretanto para isto devem ser realizados testes que permitam verificar sua aplicabilidade nesses sistemas, assim podem ser incluídas modificações químicas em bases específicas, pois devido ao seu pequeno tamanho podem ser suscetíveis à degradação por nucleases (SONG; LEE; BAN, 2012). Os aptâmeros possuem algumas vantagens sobre outros insumos biológicos atualmente utilizados devido a uma ampla gama de aplicações. No campo da pesquisa com vírus, podem ser utilizados na detecção precoce e confiável do patógeno, o que pode ser importante no tratamento e na prevenção de epidemias causadas por vírus, além de poderem ser utilizados na sorotipagem viral (MIYAZAKI; FUJITA, 2012).

Em relação ao DENV, especificamente a 3'-UTR, acredita-se que esta desempenha um papel chave na regulação da replicação viral. Além disso, trabalhos prévios realizados pela introdução de deleção em regiões não traduzidas demonstraram que modificações na 3'-UTR atenuaram o DENV, o que poderia ser uma estratégia atrativa para o desenvolvimento de vacinas atenuadas contra o DENV (BLANEY, 2008).

Os aptâmeros de DNA que foram selecionados por Bruno *et al.* (2012) tiveram seus os sítios de ligação analisados, onde pode ser observado que as sequências destes aptâmeros poderiam provocar mudanças conformacionais ao se ligarem a diferentes arbovírus patogênicos importantes. Em alguns casos pode ser notado que algumas sequências demonstraram

potencial diagnóstico. Balinsky *et al.* (2013) demonstraram que a interação entre a proteína C do DENV e a proteína multifuncional nucleolina do hospedeiro (NLC) é interrompida pela adição de um aptâmero que se liga a NCL, acarretando assim, uma redução pequena, mas significativa do processo infeccioso.

De modo semelhante, com os aptâmeros ligantes aqui obtidos, acredita-se que a ligação entre os aptâmeros selecionados contra a 3'-UTR do DENV possa acarretar em uma mudança conformacional na região alvo, ocasionando modificações na expressão de genes específicos pós-infecção do mosquito pelo vírus, ou mesmo provocar um distúrbio na ligação de proteínas associadas ao processo de replicação viral. Assim, os resultados inéditos alcançados poderão contribuir para o estudos de possíveis ligantes a 3'-UTR e colaborar para o fortalecimento da técnica SELEX.

## 6 – Considerações Finais

A síntese de alvos RNA-*like* marcados com biotina, tendo como alvo a 3'-UTR do DENV, foi eficiente. Além disso, os resultados obtidos demonstraram que a metodologia utilizada resultou na construção de uma biblioteca randômica de oligonucleotídeos.

Os experimentos realizados permitiram a seleção de ligantes de RNA tendo como alvo a 3'-UTR dos sorotipos DENV-2 e 3, confirmando assim a viabilidade para a seleção de ligantes contra elementos regulatórios presentes no genoma do vírus da dengue.

Dentre as perspectivas futuras estão, a análise das sequências dos aptâmeros e seleção daqueles que apresentarem maior interação com alvo. Para os aptâmeros selecionados poderão ser realizadas análises da estrutura secundária, avaliação da estabilidade intramolecular e intermolecular pela hibridização com o RNA genômico do DENV em estudos *in silico* ou por testes celulares e moleculares. Os ensaios de modificações químicas nos aptâmeros poderão ser realizados a fim de aumentar a estabilidade ou eficiência na ligação com o alvo e adaptação a biossensores.

## Referências

AASKOV, J. G. "Dengue". *ADF Health*, v. 4, n. 2, p. 66-71, **2003**.

ALVAREZ, D. E.; EZCURRA, A. L. DE 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, n.2, p.200-212, **2005a**.

ALVAREZ, D. E.; FILOMATORI, C. V.; GAMARNIK, A. V. "Functional analysis of dengue virus cyclization sequences located at the 5' and 3' UTRs". *Virology*, v. 375, n.1, p.223-235, **2008**.

ALVAREZ, D. E.; LODEIRO, M. F.; LUDUEÑA, S. J.; PIETRASANTA, L. I.; GAMARNIK, A. V. "Long-range RNA-RNA interactions circularize the dengue virus genome". *Journal of Virology*, v.79, n. 11, p. 6631-6643, **2005b**.

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**.

BARRETO, M. I.; TEIXEIRA, M. G. "Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa". *Estudos Avançados*, v.22, n.64, p. 53-72, **2008**.

BALINSKY, C. A.; SCHMEISSER, H.; GANESAN, S.; SINGH, K. PIERSON, T. C.; ZOON, K. C. "Nucleolin interacts with the dengue virus capsid protein and plays a role in formation of infectious virus particles". *Journal of Virology*, v. 87, n. 24, p. 13094–13106, **2013**.

BLANEY, J. E.; SATHE, N. S.; GODDARD, L.; HANSON, C. T.; ROMERO, T. A.; HANLEY, K. A.; MURPHY, B. R.; WHITEHEAD, S. S. "Dengue virus type 3 vaccine candidates generated by introduction of deletions in the 3' untranslated region (3'-UTR) or by exchange of the DENV-3 3'-UTR with that of DENV-4". *Vaccine*, v. 26, n.6, p.817–828, **2008**.

BRASIL. Ministério da Saúde. “Dengue: Saúde registra aumento de casos e redução de mortes”, **2015a** Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/16499-dengue-saude-registra-aumento-de-casos-e-reducao-de-mortes>> Acessado em: 18/03/2015.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. “Informações técnicas”, **2015b**. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/informacoes-tecnicas-dengue>. Acessado em: 18/03/2015.

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 Research Notes*, v. 5, n. 633, p. 1-12, **2012**.

BUNKA, D. H. J.; STOCKLEY, P. G. “Aptamers come of age – at last”. *Nature Reviews Microbiology*, v. 4, p. 588-596, **2006**.

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 Journal Science Technology*, v. 34, n.2, p. 125-131, **2012**.

CHIU, W-W.; KINNEY, R. M.; DREHER, T. W. “Control of translation by the 5'- and 3'-terminal regions of the dengue virus genome”. *Journal of Virology*, v. 79, n.13, p.8303-8315, **2005**.

CLARK, D. P.; PAZDERNIK, N. J. *Biotechnology: Academic Cell Update Edition*. Editora: Academic Press, **2011**, 768 p.

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, 2014. Dissertação de mestrado. 71 p.

COX, M. M.; DOUDNA, J. A.; O'DONNELL, M. *Biologia molecular: princípios e técnicas*. 1.ed. Editora: Artmed, **2009**, 944p.

DIAMAND, E. P.; CHRISTOPOULOS, T. K. "The Biotin-(Strept) Avidin System: Principles and Applications in Biotechnology". *Clinical Chemistry*, v. 37, n.5, p. 625-636, **1991**.

DEEN, J. L. "Editorial: the challenge of dengue vaccine development and introduction". *Tropical Medicine and International Health*, v. 9, n.1, p.1-3, **2004**.

ELLINGTON, A. D.; SZOSTAK, J. W. "In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands". *Nature*, v.346, p. 818-822, **1990**.

FERREIRA, C. S. M.; MISSAILIDIS, S. "Aptamer-based therapeutics and their potential in radiopharmaceutical design". *Brazilian archives of Biology and technology*, v.50, p. 63-76, **2007**.

FRIEBE, P.; SHI, P-Y.; HARRIS E. "The 5' and 3' downstream AUG region elements are required for mosquito-borne flavivirus RNA replication". *Journal of Virology*, v. 85, n.4, p. 1900-1905, **2011**.

GEBHARD, L. G.; FILOMATORI, C. V.; GAMARNIK, A. V. "Functional RNA Elements in the Dengue Virus Genome". *Viruses*, v. 3, n.9, p. 1739-1756, **2011**.

GOPINATH, S. C. "Methods developed for SELEX". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 387, n.1, p. 171-182, **2007**.

GOPINATH, S. C.; MISONO, T. S.; KAWASAKI, K.; MIZUNO, T.; IMAI, M.; ODAGIRI, T.; KUMAR, P.K. "An RNA aptamer that distinguishes between closely related human influenza viruses and inhibits haemagglutinin-mediated membrane fusion". *Journal of General Virology*, v. 87, n.3, p. 479-487, **2006**.

GUBLER, D. J. "Dengue and dengue hemorrhagic fever". *Clinical Microbiology Reviews*, v. 11, n. 3, p. 480-496, **1998**.

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

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

GUZMAN, M. G.; HALSTEAD, S. B.; ARTSOB, H.; BUCHY, P.; FARRAR, J.; GUBLER, D. J.; HUNSPERGER, E.; KROEGER, A.; MARGOLIS, H. S.; MARTÍNEZ, E.; NATHAN, M.B.; PELEGRINO, J. L.; SIMMONS, C.; YOKSAN, S.; PEELING, R. W. “Dengue: a continuing global threat”. *Nature Reviews. Microbiology*, v.8, n.12 0, p.7–16, **2010**.

HAN, K.; LIANG, Z.; ZHOU, N. “Design strategies for aptamer-based biosensors”. *Sensors*, v.10, n. 5, p.4541-4557, **2010**.

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

HOLMES, E. C.; TWIDDY, S.S. “The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus”. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 3, p. 19-28, **2003**.

INNIS, B. L.; ECKELS, K. H. “Progress in development of a live-attenuated, tetravalent dengue virus vaccine by the United States army medical research and materiel command”. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 69 (Supl 6), p. 1-4, **2003**.

INNIS, M. A.; GELFAND, D. H. Optimization of PCRs. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SKINSKI, J. J.; WHITE, T. J. *PCR protocols: a guide to methods and application*. Editora: Academic Press, **2012**, 480 p.

IVANYI-NAGY, R.; DARLIX, J-L. “Core protein-mediated 5’ –3’ annealing of the West Nile virus genomic RNA in vitro”. *Virus Research*, v. 167 p. 226–235, **2012**.

KAO, C. C.; KING, C-C.; CHAO, D. Y.; WU, H. L.; CHANG, G-J. L. “Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health”. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, v.38, n.1, p. 5-16, **2005**.

KARCHER, S. J. Southern blot analysis. In: KARCHER, S. J. *Molecular Biology: A Project Approach*. Editora: Academic Press, **1995**, 280p.

KLUSSMANN, S. *The aptamer handbook: functional oligonucleotides and their applications*. Editora: John Wiley & Sons, **2006** p. 521.

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". *Journal of Virology*, v. 80, n. 8, p.4099-4113, **2006**.

KOCHETKOV, S.N.; RUSAKOVA, E.E.; TUNITSKAYA, V.L. "Recent studies of T7 RNA polymerase mechanism". *Febs Letters*, v. 440, n. 3, p.264-267, **1998**.

KUHN, R. J.; ZHANG, W.; ROSSMANN, M. G.; PLETNEV, S. V.; CORVER, J.; LENCHES, E.; JONES, C. T.; MUKHOPADHYAY, S.; CHIPMAN, P. R.; STRAUSS, E. G.; BAKER, T. S.; STRAUSS, J. H. "Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion". *Cell*, v.108, n.5 p.717-725, **2002**.

LABMORE. "Aptamers as a new alternative to antibodies", **2015**. Disponível em: < <http://www.int.laborundmore.com/archive/826310/Aptamers-as-a-new-alternative-to-antibodies.html>>. Acessado em: 28/07/2015.

LODISH, H.; BERK, A.; KAISER, C. A.; KRIEGER, M.; BRETSCHER, A.; PLOEGH, H.; AMON, A. *Biologia Celular e Molecular*. 7.ed. Editora: Artmed, **2014**, 1241p.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. Engenharia Genética. In: MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. *Microbiologia de Brock*. 12.ed. Editora: Artmed Editora, **2010**, 1160p.

MARINE, R.; POLSON, S.W.; RAVEL, J.; HATFULL, G.; RUSSELL, D.; SULLIVAN, M.; SYED, F.; DUMAS, M.; WOMMACK, K.E. "Evaluation of a transposase protocol for rapid generation of shotgun highthroughput sequencing libraries from nanogram quantities of DNA". *Applied and Environmental microbiology*, v. 77, n. 22, p. 8071-8079, **2011**.

MAYER, G. "The Chemical Biology of Aptamers". *Angewandte Chemie International Edition*, v.48, n. 15, p. 2672-2689, **2009**.

MIYAZAKI, Y.; FUJITA, M. "Commentary on aptamers for virus research". *Frontiers in Microbiology*, v 3, n. 52, p. 1-2, **2012**.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. *Microbiologia Médica*. 7.ed. Editora: Elsevier Brasil, **2014**, 888p.

NATURE. “Dengue Viruses”, **2011**. Disponível em: <http://www.nature.com/scitable/topicpage/dengue-viruses-22400925>. Acessado em 06/08/2014.

NERY, A. A. Purificação de células tronco de lipoaspirado humano por aptâmeros de DNA, seguidas de caracterização dos fenótipos obtidos pela diferenciação neuronal. São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - USP, 2014. Tese de doutorado. 141 p.

PARANJAPE, S. M.; HARRIS, E. Control of dengue virus translation and replication. In: Rothman, A. L. (Org.). “Dengue Virus”. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v. 8, p 15-34, **2010**.

PASTERNAK, J. J. *Genética molecular humana*. Editora: Editora Manole, **2002**, 497p.

RAPLEY, R.; WHITEHOUSE, D. *Molecular Biology and Biotechnology*. Editora: Royal Society of Chemistry, **2014** p.555.

RAVELET, C.; GROSSET, C.; ERIC PEYRIN. “Liquid chromatography, electrochromatography and capillary electrophoresis applications of DNA and RNA aptamers”. *Journal of Chromatography A*, v.1117, p. 1-10, **2006**.

ROBERTSON, D. L.; JOYCE, G. F. “Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA”. *Nature*, v.344, pp. 467-468, **1990**.

RUSSEL, R. M.; SUETER, P. M. “Deficiência e excesso de vitaminas e proteínas oligominais”. IN: LONGO, D. L.; FAUCI, A. S. *Gastrenterologia e Hepatologia de Harrison*. 2ed. Editora: AMGH Editora, **2014**, 600 p.

SECRETÁRIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE – MINISTÉRIO DA SAÚDE (SVS-MS). “Incidência de Dengue. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990 a 2014”, **2015a**. Disponível em <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/julho/29/Incidencia-engue-at-2014.pdf>. Acessado em: 27/07/2015

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. “Casos de Dengue. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990 a 2014”. **2015b**. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/julho/29/Dengue-at---2014.pdf> Acessado em 27/07/2015

\_\_\_\_\_. Boletim Epidemiológico Dengue. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Dengue, v. 46, n. 20, **2015c**. “Monitoramento dos casos de dengue e febre de Chikungunya até a Semana Epidemiológica 26, 2015” Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/julho/27/2015-027---Dengue-SE-26--.pdf>>. Acessado em: 18/03/2015.

SHURTLEFF, A. C.; BEASLEY, D. W. C.; CHEN, J. J. Y.; NI, H.; SUDERMAN, M. T.; WANG, H.; XU, R.; WANG, E.; WEAVER, S. C.; WATTS, D. M.; RUSSELL, K. L.; BARRETT, A. D. T. “Genetic variation in the 3’ non-coding region of dengue viruses”. *Virology*, v. 281, p. 75–87, **2001**.

SILVA, A. G.; MARANGONI, K.; GOULART, L. R.; NEVES, A. F. Construção de uma biblioteca randômica de oligonucleotídeos contendo o promotor da T7 polimerase para a síntese, in vitro, de RNA. In: NEVES, A. F.; FERREIRA, I. M.; PAULA, M. H.; ANJOS, P. H. R (Orgs). *Coletânea Interdisciplinar em Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação* - vol. 4, São Paulo: Editora Edgard Blücher, **2015**, p. 117-126. São Paulo: Blucher, 2015. ISBN: 978-85-8039-115-2, DOI 10.5151/978859788580391152-V4\_Cap8

SINGER, B. S.; SHTATLAND, T.; BROWN, D.; G, L. “Libraries for genomic SELEX”. *Nucleic Acids Research*, v. 25, n. 4, p.781-786, **1997**.

SONG, K-M.; LEE, S.; BAN, C. “Aptamers and Their Biological Applications”. *Sensors*, v. 12, n.1, p. 612-631, **2012**.

STIASNY, K.; HEINZ, F. X. “Flavivirus membrane fusion”. *Journal of General Virology*, v.87, p.2755–2766, **2006**.

STOLTENBURG, R.; REINEMANN, C.; STREHLITZ, B. “FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection”. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.383, p 83–91, **2005**.

STOLTENBURG, R.; REINEMANN, C.; STREHLITZ, B. “SELEX—A (r) evolutionary method to generate high -affinity nucleic acid ligands”. *Biomolecular Engineering*, v.24, p 381–403, **2007**.

TOMBELLI, S.; MINUNNI, M.; MASCINI, M. “Analytical applications of aptamers”. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 20, n. 12, p. 2424–2434, **2005**.

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**.

ULRICH, H.; TRUJILLO, C.A.; NERY, A. A.; ALVES, J. M.; MAJUMDER, P.; RESENDE, R. R.; MARTINS, A. H. “DNA and RNA aptamers: from tools for basic research towards therapeutic applications”. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, v. 9, n.8, p 619–632, **2006**.

UJVARI, S. C. *A história da humanidade contada pelos vírus*. 1.ed. Editora: Contexto, **2008**. p. 208

VARELLA, D.; JARDIM C. *Dengue e febre amarela*. 1.ed. Editora: Gold Editora, **2009** p. 63. Coleção Dr. Drauzio Varella – guia prático de saúde e bem estar

VAUGHAN, G.; GONZALEZ-HERNANDEZ, Y.; GUDINO, J.C.; OLIVERA, H.; LANDA-PIEDRA, A.; ESCOBAR-GUTIERREZ, A. “An alternative method for the synthesis of competitor RNA transcripts useful for specific detection and quantitation of dengue virus serotype 2 genome and replicative intermediate RNA”. *Journal of Virological Methods*, v.152, p.72–76, **2008**.

VILJOEN, G. J.; NEL, L. H.; CROWTHER, J. R. *Molecular Diagnostic PCR Handbook*. Editora: Springer Science & Business Media, **2005** p.307.

WATSON, J. D.; BAKER, T. A.; BELL. S. P.; GANN, A.; LEVINE, M.; LOSICK, R. *Biologia Molecular do Gene*. 5.ed. Editora: Artmed, **2006** p.912.

WEI, Y.; QIN, C.; JIANG, T.; XIAOFENG, L.; ZHAO, H.; LIU, Z.; DENG, Y.; LIU, R.; CHEN, S.; YU, M.; QIN, E. “Translational regulation by the 3’ untranslated region of the dengue type 2 virus genome”. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 81, n. 5, p. 817-824, **2009**.

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

YU, L.; NOMAGUCHI, M.; PADMANABHAN, R.; MARKOFF, L. "Specific requirements for elements of the 5' and 3' terminal regions in flavivirus RNA synthesis and viral replication". *Virology*, v. 374, n.1, p. 170–185, **2008**.