

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
CAMPUS CATALÃO
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE APTÂMEROS DE RNA LIGANTES À
REGIÃO 5'-UTR DO GENOMA DO VÍRUS DA DENGUE**

Elismar de Jesus Nunes Clossen

Catalão - GO
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
CAMPUS CATALÃO
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE APTÂMEROS DE RNA LIGANTES À
REGIÃO 5'-UTR DO GENOMA DO VÍRUS DA DENGUE**

Aluna: Elismar de Jesus Nunes Cnossen
Orientadora: Prof. Dr^a Adriana Freitas Neves
Co-Orientadora: Prof. Dr^a Karina Marangoni

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

Catalão - GO
2014

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
GPT/BSCAC/UFG**

C651s Cnossen, Elismar de Jesus Nunes.
Seleção e caracterização de aptâmeros de RNA ligantes à região 5'-UTR do genoma do vírus da Dengue [manuscrito] / Elismar de Jesus Nunes Cnossen. - 2014.
105 f.

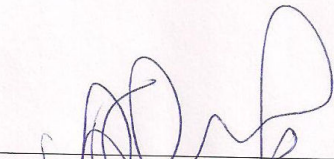
Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Adriana Freitas Neves; Co-Orientadora: Karina Marangoni.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Campus de Catalão, Departamento de Química, 2014.
Bibliografia.


1.Dengue. 2. SELEX Genômico. 3. Ribonucleotídeo. 3. Aptâmeros de RNA. I. Título.

CDU: 616.98

*Assinatura dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de
Dissertação de Mestrado do candidato **Elismar de Jesus Nunes Cnossen**, realizada
em 21 de janeiro de 2014.*



Prof. Dra. Adriana Freitas Neves



Prof. Dr. João Marcos Madurro



Prof. Dra. Maria Rita de Cássia Santos

Dedico este trabalho...

Ao meu esposo, **Klaus Cnossen**

...meu porto seguro.

AGRADECIMENTO

A minha fortaleza e esperança, Jesus Cristo, por esta conquista.

A Prof^a. Dr^a. Adriana Freitas Neves, agradeço a oportunidade de desenvolver este trabalho, a orientação, o incentivo e a confiança depositada em mim na realização deste projeto.

A minha co-orientadora Prof^a. Dr^a Karina Marangoni, agradeço pelas sugestões, apoio, paciência e pela grande ajuda no desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart, agradeço por ter aberto as portas do Laboratório de Nanobiotecnologia (UFU), pois sem esta parceria não seria possível à concretização deste projeto.

A Prof^a. Dr^a Ana Maria Bonetti e Prof. Dr. Carlos Ueira, por ter aberto as portas do Laboratório de Genética (UFU); além de toda sua equipe.

A Prof^a. Dr^a. Neila Coelho pelas palavras amigas e de incentivo.

Ao meu esposo, pelo amor, incentivo e dedicação incondicional a mim. A minha ausência foi muito difícil para nós dois e você sempre estava do meu lado me dando força.

Aos meus familiares e do meu esposo pelo apoio e compreensão, em especial as minhas irmãs Gleice e Lisinha. A minha ausência em muitos momentos, em especial naqueles em que a família estava toda reunida, e eu não estava junto, me doeu muito, mas foi necessário.

As minhas companheiras do Laboratório de Genética Molecular e Biotecnologia (UFG), em especial a Írlei, pela ajuda, companheirismo e pelo carinho. Agradeço também a Amanda pelos testes de sonda e toda a sua ajuda. A técnica Vânia pelas palavras amigas. A toda equipe do Laboratório de Nanobiotecnologia (UFU), em especial a Patrícia Tieme, por ter me ensinado os passos iniciais no laboratório, pelo cultivo das células do mosquito, infecção, extração de RNA, envio do cDNA e por todo o apoio. A Fabiana por todo o trabalho em especial pelas clonagens e a Aline, que me auxiliou em muitos momentos e pelo carinho. Ao João Paulo, agradeço em especial pelos sequenciamentos. Sem a ajuda de vocês eu não teria conseguido.

A minha amiga Hérica pelos anos de amizade, pelos bons momentos, por sempre ouvir minhas angústias quando as coisas não iam bem e pelas palavras amigas.

Aos meus colegas de curso: Lara, Bruno e Marta, pelas discussões nas disciplinas e pela amizade. Que bom que vocês existem e pela oportunidade de conhecê-los.

A minha amiga e melhor companheira de república que conheci, Luíza. Obrigada pelo companheirismo, cuidado, pelas risadas e pelo carinho.

E a todos aqueles, que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Donde, pois, vem a sabedoria? Onde está o lugar do entendimento? Está encoberta aos olhos de todo vivente, e oculta às aves do céu. O Abadom e a morte dizem: Ouvimos com os nossos ouvidos um rumor dela. Deus entende o seu caminho, e ele sabe o seu lugar. Porque ele perscruta até as extremidades da terra, sim, ele vê tudo o que há debaixo do céu. Quando regulou o peso do vento, e fixou a medida das águas; quando prescreveu leis para a chuva e caminho para o relâmpago dos trovões; então viu a sabedoria e a manifestou; estabeleceu-a, e também a esquadrinhou. E disse ao homem: Eis que o temor do Senhor é a sabedoria, e o apartar-se do mal é o entendimento.

(Jó 28, 20-28)

RESUMO

O aumento do número de notificações de infecções causadas pela dengue está se tornando uma grande preocupação para os programas globais de saúde. Tecnologias combinatórias destinadas à seleção de ligantes específicos de ácidos nucleicos curtos conformacionais contra alvos virais, também chamados aptâmeros, podem ser conseguidos pelas seleções em larga escala, utilizando a tecnologia do *SELEX* genômico. Nossa hipótese é que os aptâmeros podem ser selecionados diretamente contra as estruturas conformacionais de RNA da dengue, as quais apresentam elementos funcionais na sequência 5'-UTR, que formam interações RNA-RNA e RNA-proteína, e desempenham papéis importantes no processo de infecção. O nosso objetivo foi selecionar e caracterizar aptâmeros que se ligam a região 5'-UTR utilizando o método *matrix-free SELEX*. Produtos do oitavo ciclo de seleção foram isolados, clonados e sequenciados, e 14 ligantes foram escolhidos para a caracterização *in silico*. Os aptâmeros foram agrupados em três famílias de acordo com a homologia das sequências, e ribonucleotídeos conservados geraram motivos lineares específicos. Sequências motivos foram detectadas em regiões aleatórias de nucleotídeos variando de 31-40 nt que apresentaram a maior afinidade para DENV1 e 3. As novas moléculas e processos descritos neste estudo abrem novas perspectivas para a pesquisa e aplicações na dengue, e os aptâmeros selecionados podem ser usados tanto como ferramentas diagnósticas ou terapêuticas. As análises *in silico* revelaram que a ligação do aptâmeros ao seu alvo de RNA pode levar a alterações na estrutura secundária do RNA viral, e provavelmente levando à perda da sua conformação original e impedindo a sua replicação e/ou o processo de transcrição. As análises também demonstraram que os aptâmeros apresentaram um largo espectro de hibridação ao DENV1 e 3, mesmo na presença de mutações em diferentes subtipos, o que sugere a sua possível utilização nos outros dois sorotipos, DENV2 e 4. Esta é a primeira descrição de aptâmeros contra a estrutura de RNA do Vírus da Dengue com implicações importantes no controle da doença.

Palavras-chave: Dengue, *SELEX*, Aptâmeros, Ribonucleotídeo

ABSTRACT

The increasing number of notifications of dengue infections is becoming a very important concern for global healthcare programs. Combinatorial technologies aiming the selection of specific short conformational nucleic acid ligands against viral targets, also called aptamers, can be achieved by large-scale selections using the genomic SELEX technology. Our hypothesis is that aptamers can be directly selected against dengue RNA conformational structures that present functional elements in the 5'-UTR sequence, which form RNA-RNA and protein-RNA interactions, and play significant roles in the infection process. Our aim was to select and characterize aptamers that bind to the 5'-UTR using the matrix-free SELEX method. Products from the eighth selection cycle were isolated, cloned and sequenced, and 14 ligands were chosen for *in silico* characterization. Aptamers were grouped into three families according to their sequence homology, and conserved ribonucleotides generated specific linear motifs. Sequences motifs were detected in random nucleotides regions ranging from 31 to 40 nt, which showed higher affinity to DENV1 and 3 virus. The novel molecules and processes described in this study open new insights for dengue research and applications, and the selected aptamers can be used either as diagnostic or therapeutic tools. *In silico* analyses revealed that aptamer binding to its RNA target may lead to alterations of viral RNA secondary structures, and is probably leading to the loss of its original conformational and preventing its replication and/or the transcription process. The analyses also demonstrated that aptamers presented a broad hybridization spectrum to DENV1 and 3 even in the presence of mutations in different subtypes, which suggest its possible use in the other two serotypes, DENV2 and 4. This is the first description of aptamers against the RNA structure of Dengue Virus with important implications in the disease control.

Key-words: Dengue, SELEX, Aptamers, Ribonucleotide

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1.1- Representação esquemática da organização do genoma RNA do vírus da Dengue.....	17
FIGURA 1.2- Estrutura secundária da 5'-UTR do genoma do DENV.....	20
FIGURA 1.3- Estrutura secundária da 3'-UTR do genoma do DENV.....	21
FIGURA 4.1- Esquema da Reação em Cadeia da Polimerase.....	32
FIGURA 4.2- Representação esquemática da ligação entre a biotina e estreptavidina.....	36
FIGURA 4.3- Reação química entre NBT e BCIP como substrato da fosfatase alcalina	36
FIGURA 4.4- Diagrama da construção da biblioteca.....	37
FIGURA 4.5- Representação esquemática do SELEX genômico.....	40
FIGURA 5.1- Eletroforese do DENV1 e 3 e Sequências do DENV1 e 3 disponíveis no <i>GenBank</i>	45
FIGURA 5.2- Teste de sonda biotinilada.....	44
FIGURA 5.3- Eletroforese da biblioteca e enriquecimento a partir dos rounds.....	46
FIGURA 5.4- <i>Dot Blot</i> do <i>pool</i> de aptâmeros.....	47
FIGURA 5.5- Frequência dos aptâmeros ranqueados pelo tamanho das sequências de nucleotídeos presentes na região variável e das famílias de motivos lineares.....	50
FIGURA 5.6- <i>Cluster</i> dos aptâmeros.....	51
FIGURA 5.7- Representação da predição da estrutura secundária dos aptâmeros.....	54
FIGURA 5.8- Quadro representativo de algumas das bases comuns e não sequenciais presentes nos <i>hairpins</i> e/ou <i>loops</i> internos das estruturas secundárias dos aptâmeros.....	55
FIGURA 5.9- Representação esquemática das estruturas biomoleculares de RNAs do vírus da dengue tipo I (DENV1) e 3 (DENV3) e aptâmeros.....	57
TABELA 5.1- Organização de sequências com base na presença dos motivos GGGGW e/ou GGGWW e suas variações.....	48
TABELA 5.2- Dados das estruturas biomoleculares dos 14 aptâmeros selecionados.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

%	porcentagem
A	adenina
°C	graus Celsius
C	citosina
CaCl ₂	cloreto de cálcio
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
cHP	capsídeo <i>Harpin</i>
CS	sequência de ciclização
DAR	região <i>downstream</i> à região AUG
DENV	vírus da dengue
DNA	ácido desoxirribonucléico
dsDNA	DNA de fita dupla
ELISA	ensaio imunoenzimático
FD	febre da dengue
FHD	febre hemorrágica da dengue
FOR	<i>forward</i>
g	grama
G	guanina
KCl	cloreto de potássio
kd	constante de dissociação
kDa	unidade de massa atômica (dalton)
LB	Luria Bertani
M	molar
mL	mililitro
mg	miligrama
MgCl ₂	cloreto de magnésio
mM	milimolar
MMLV	<i>Murine Moloney Leukemia Virus Reverse Transcriptase</i>
NaCl	cloreto de sódio

NaOH	hidróxido de sódio
NaN ₃	azida de sódio
nm	nanômetros
nmoles	nanomoles
ORF	fase aberta de leitura
pb	pares de base
PCR	reação em cadeia da polimerase
pmoles	picomoles
REV	<i>reverse</i>
RNA	ácido ribonucléico
RNAm	ácido ribonucléico mensageiro
RT	transcrição reversa
RT-PCR	reação em cadeia da polimerase-transcriptase reversa
SELEX	<i>Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment</i>
SCD	síndrome do choque por dengue
SFB	soro bovino fetal
ssDNA	<i>single strand</i> DNA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	tampão Tris/Borato/EDTA
U	unidade (s) de enzima
UAR	região <i>upstream</i> à região AUG
UTR	região não-codificante
μg	micrograma (s)
μl	microlitro (s)
μM	micromolar

SUMÁRIO

1- Introdução	14
1.1- Dados epidemiológicos	14
1.2- O vírus da Dengue	16
1.3- Diagnóstico e Terapia	22
1.4- SELEX Genômico	24
1.5- Os aptâmeros e suas aplicações	26
2- Objetivo Geral	29
2.1- Objetivos Específicos	29
3- Materiais	30
4- Parte Experimental	31
4.1- Cultura de células C6/36 (<i>Aedes albopictus</i>)	31
4.2- Extração de RNA total e Transcrição Reversa	31
4.3- Reação em Cadeia da Polimerase	31
4.4- Preparo, Transformação de Bactérias Competentes e Clonagem do cDNA	32
4.5- Extração de Plasmídeos e Sequenciamento	33
4.6- Alinhamento	34
4.7- Molécula alvo biotinizada	34
4.8- Teste de Sonda biotinizada	35
4.9- Construção da Biblioteca	37
4.10- Seleção <i>in vitro</i> de aptâmeros de RNA	39

4.11- Clonagem e sequenciamento dos aptâmeros	41
4.12- Análise <i>in silico</i> dos aptâmeros	41
4.13- <i>Dot blot</i>	42
5- Resultados e Discussão	43
5.1- Seleção <i>in vitro</i> de ligantes à região 5'-UTR do vírus da Dengue	43
5.2- Caracterização <i>in silico</i> de aptâmeros selecionados contra a 5'-UTR do vírus da Dengue	47
6- Considerações Finais	58
7- Conclusão	60
8- Referências Bibliográficas	61

INTRODUÇÃO

1.1- Dados epidemiológicos

A dengue é causada por um vírus classificado como arbovírus (vírus transmitido a humanos por insetos) pertencente ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae* (MACIEL *et al.*, 2008). O vírus é mais prevalente em áreas tropicais e subtropicais, onde as condições eco-epidemiológicas parecem sustentá-lo.

Atualmente as infecções provocadas pelo vírus da dengue (DENV) são causa séria de mortalidade na maioria das regiões tropicais e subtropicais do mundo: cerca de 50-100 milhões de pessoas são infectadas anualmente (GUZMAN & VASQUEZ, 2010), mais de 2,5 bilhões de pessoas habitam em áreas consideradas endêmicas e mais de 100 países estão em risco de transmissão da doença (GUZMÁN & KOURÍ, 2004).

O primeiro isolamento do DENV (DENV1 e 4) no Brasil ocorreu em 1981, no norte do estado de Roraima, a partir de pacientes com quadro de febre aguda (OSANAI, 1983). No período de 1990 a 1999 foram registrados 479.848 casos e de 2000 até 2005, o número anual de casos foi de 925.896, quase o dobro dos registros da década de 90 (NATHAN & DAYAL-DRAGER, 2007). Nas últimas décadas tem aumentado, significativamente, o número de casos notificados da doença, levando muitas pessoas a óbito.

Em 2002, com a introdução do DENV3, foi registrado o maior pico epidêmico da doença no país com uma taxa de mortes muito elevada (BRASIL, 2007), sendo que as maiores incidências de casos da doença foram registradas em indivíduos adultos. Contudo, entre 2007 e 2008 uma nova e severa epidemia foi registrada no Rio de Janeiro, iniciada por DENV3 e depois por DENV2, o qual foi responsável por muitos casos fatais em crianças (SAN MARTÍN *et al.*, 2010).

O DENV4 não havia sido registrado na Amazônia Oriental Brasileira desde 1982; contudo, em 2008 esse sorotipo viral foi registrado em três pacientes com nenhum histórico de viagem para fora de Manaus. As autoridades de saúde brasileiras descartaram o trabalho considerando que em suas últimas análises não houve surto de dengue por DENV4 no país, mas

existem evidências de que o genótipo tipo I do DENV4 pode ter circulado no Brasil (FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

Em 2010, outro genótipo do DENV4 foi detectado no Estado de Roraima, o genótipo tipo II, que rapidamente se espalhou pelo Brasil, produzindo surtos em áreas do nordeste e sudeste do país. Tanto a origem e evolução dos genótipos (I e II) do DENV4 no norte e nordeste do Brasil foram analisados e as análises filogeográficas confirmaram a co-circulação dos dois genótipos no Brasil. A presença de um sorotipo contra o qual a população não é imunizada indica que o país está em risco de um aumento no número de infecções pelo vírus, incluindo casos graves. (NUNES *et al.*, 2012).

Em nota técnica da Secretaria do Estado de Goiás (setembro/2011) foi relatado o isolamento do DENV4 em estados que fazem divisa com o estado de Goiás. Até agosto do ano anterior, foram isolados os três sorotipos virais comuns no estado, sendo que nos estados da Bahia e Minas Gerais também foi isolado o DENV4, aumentando as chances de entrada desse vírus em Goiás. Em novembro de 2011 foi confirmado um caso autóctone de dengue pelo sorotipo 4 do vírus em um indivíduo de Aparecida de Goiânia. O município encontra-se em situação de alerta para ocorrência de uma epidemia pelo DENV-4 com possível dispersão do sorotipo para outros municípios goianos (BRASIL, 2011).

O risco contínuo da entrada de novos sorotipos no país é preocupante, principalmente, pelas autoridades de saúde. Segundo HALSTEAD (1988), a segunda infecção adquirida pelo DENV pertencente a um sorotipo diferente daquele causador da primeira infecção (infecção cruzada), que desencadeia uma resposta imunológica e esta condição favoreceria um aumento na permeabilidade vascular agravando a doença e elevando o risco de morte. A infecção secundária do DENV ocorre quando uma pessoa que já foi infectada com um sorotipo é exposta a outro sorotipo diferente e isto pode ser um fator de risco importante para o desenvolvimento da forma mais grave da doença (KYLE & HARRIS, 2008).

De janeiro a abril de 2011 foram confirmados 8.630 casos graves no país, já no mesmo período de 2012, esse número de casos graves foi reduzido

a 1.083, o que representa uma redução de 87%. No Centro-Oeste (com 193 casos graves), destacam-se Goiás (104) e Mato Grosso (69). No período, de janeiro a abril de 2011 e 2012 foram analisadas 8.160 amostras no país, das quais 2.098 amostras eram positivas, representando uma positividade global de 25,7%. A proporção das amostras positivas por sorotipo viral demonstra o predomínio nos isolamentos do sorotipo DENV4 (59,3%). O sorotipo DENV1 foi isolado em 36,4% das amostras; DENV2, em 4,1%; e o DENV3, em 0,2%. Nas regiões Norte e Nordeste, observa-se um maior predomínio do DENV4. Existe um equilíbrio entre os sorotipos DENV4 e DENV1 na Região Sudeste, já nas regiões Centro-Oeste e Sul, o predomínio é do DENV1. (BRASIL, 2012).

De acordo com dados do Ministério da Saúde de 1º de janeiro até 16 de fevereiro de 2013, foram feitas 204.650 notificações, contra 70.489 no mesmo período do ano anterior representando um aumento de 190%. Neste período foram confirmados 324 casos graves – contra 577 em 2012 – e 33 mortes – contra 41 no ano passado. Comparado a 2010, o desempenho representa uma redução de 91% nos casos graves e de 77% para as mortes. Segundo o estudo do Ministério da Saúde, Mato Grosso do Sul é o estado com maior número de casos registrados foram 42.015 notificações e Minas Gerais é o segundo lugar onde mais se registrou a doença, com 35.334 casos, seguido por Goiás, com 27.376 notificações (BRASIL, 2013).

O grande crescimento da população mundial associado à urbanização das cidades sem planejamento e/ou controle, a fragilidade do sistema público de saúde, a falta de controle efetivo do mosquito transmissor em áreas endêmicas e a rápida expansão dos sorotipos DENV cria condições ideais para o aumento da ocorrência da doença representando uma ameaça para uma pandemia e causando muitos casos fatais.

1.2- O vírus da Dengue

Nas Américas a principal espécie transmissora é o mosquito *Aedes aegypti*, (BARRETO & TEIXEIRA, 2008), mas outras espécies, como o *A. albopictus*, o *A. scutellaris* e o *A. polyniensis*, também transmitem o vírus

principalmente na Ásia e na Oceania. O vírus da Dengue possui alta eficácia na transmissão da doença através de mosquitos vetores ao homem devido ao alto nível de viremia resultante da infecção em humanos, bem como a replicação viral que ocorre no inseto.

O genoma do vírus da dengue apresenta 10.700 nucleotídeos, o mesmo é composto por uma fita simples de ácido ribonucléico (RNA), senso positivo, revestido por um envelope lipoprotéico em formato icosaédrico, sendo as partículas virais esféricas, com aproximadamente 50 nm de diâmetro (KUHN *et al.*, 2002).

O vírus está organizado em uma única fase aberta de leitura (ORF), responsável por codificar 10 proteínas, sendo três destas estruturais (capsídeo, C; membrana, M; envelope, E). As sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5) estão envolvidas em diferentes funções do ciclo de replicação viral (Figura 1.1) (GEBHARD *et al.*, 2011).

Genoma do Vírus da Dengue

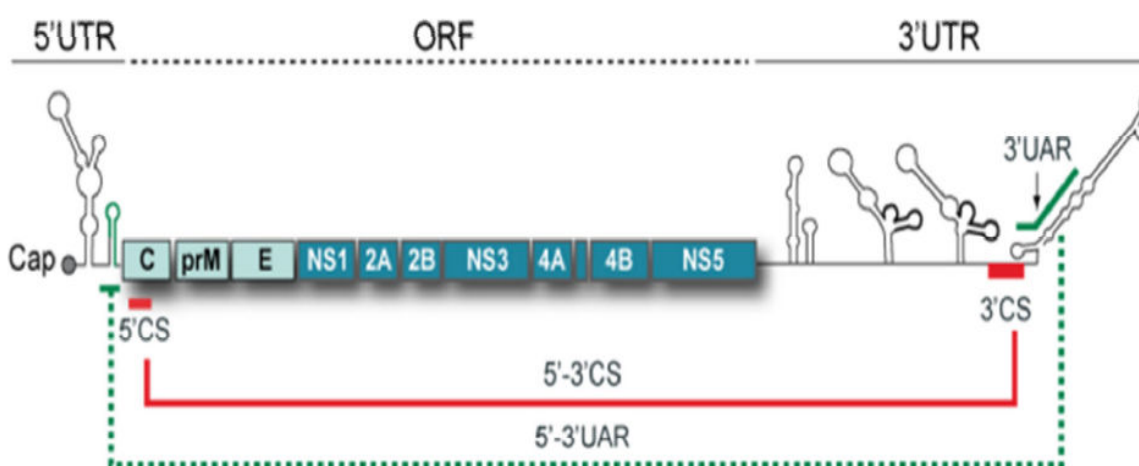


FIGURA 1.1- Representação esquemática da organização do genoma RNA do vírus da dengue: *cap* na região 5', extremidade 5'-UTR, fase aberta de leitura do genoma mostrando as proteínas estruturais e não estruturais do vírus, extremidade 3' UTR não poliadenilada.

Fonte: GEBHARD *et al.*,(2011).

O vírus se divide nos sorotipos: D(ENV1, ENV2, ENV3 e ENV4), antigenicamente distintos que podem causar a forma clássica e hemorrágica da doença (BARRETO & TEIXEIRA, 2008). Os quatro tipos virais são capazes de

produzir casos de Febre Hemorrágica da Dengue (FHD), contudo o DENV3 parece ser o que apresenta maior virulência, seguido do DENV2, DENV4 e o menos virulento é o DENV1 (GUZMÁN & KOURÍ, 2004).

Os quatro sorotipos utilizam como primeiro passo na via de entrada do vírus na célula, a ligação da glicoproteína E a um receptor celular, o agente infeccioso deve reconhecer uma molécula de superfície celular utilizando múltiplos receptores que viabilizam sua entrada (RODENHUIS-ZYBERT *et al.*, 2010).

Após a infecção, o genoma viral serve como RNAm para a tradução e, subsequentemente, como molde para a síntese de RNA que pode ser usado para uma nova tradução ou como substrato para a encapsidação. A utilização eficiente do genoma durante este processo pode ser temporariamente regulado para assegurar a propagação viral. Os elementos funcionais de RNA do vírus, presentes tanto na seqüência codificante quanto nas regiões não codificantes 5'-UTRs e 3'-UTRs que formam estruturas conformacionais (*stem loop*), são responsáveis por essa regulação do processo de infecção viral. (GEBHARD *et al.*, 2011).

A ORF possui 100 nucleotídeos na 5'-UTR, que contém um *cap* do tipo I, e aproximadamente 450 nucleotídeos na 3'-UTR a qual não possui cauda poli (A) (POLACEK *et al.*, 2009). As extremidades das duas regiões 5' e 3' interagem através da hibridização das duas regiões RNA-RNA, a seqüência de ciclização (CS) (CLYDE & HARRIS, 2008) e a região *upstream* ao códon de iniciação da tradução AUG (UAR) resultam na circularização do genoma viral. Tanto CS, que é uma seqüência altamente conservada, bem como UAR são cruciais para a replicação do DENV e síntese de RNA (ALVAREZ *et al.*, 2008).

A 5'UTR do DENV contém dois domínios de RNA com funções distintas durante a síntese de RNA viral, sendo que a extremidade 5' do genoma do vírus abriga pelo menos mais dois elementos funcionais de RNA, a estrutura conformacional *stem-loop A* (SLA) e a região de codificação do capsídeo *hairpin* (cHP). O primeiro domínio é constituído de aproximadamente 70 nucleotídeos sendo necessário para formar as SLA as quais tem sido

propostas para agir como promotor para ação da RNA *polimerase* RdRp (NS5) viral (GEBHARD *et al.*, 2011).

O segundo domínio da 5'-UTR do DENV é essencial para formar SLB, que são estruturas conformacionais curtas, as quais contém sequências essenciais para a interação RNA-RNA e replicação do genoma viral (ALVAREZ *et al.*, 2005).

Estudos realizados por CLYDE e colaboradores (2008) mostraram que o capsídeo *hairpin* (cHP) presente na sequência de codificação está *downstream* ao códon de iniciação da tradução AUG encontrado no genoma do DENV e é necessário para a replicação do RNA viral, os dados mostraram que a ruptura do elemento de cHP do DENV2 resultou em um defeito na replicação viral. O cHP provavelmente estabiliza o conjunto 5'-3' da estrutura *panhandle* ou participa do recrutamento de fatores associados com a maquinaria da replicase. A estrutura *panhandle* é formada pelo emparelhamento da sequência conservada da porção 5' e 3' de cada RNA genômico, serve tanto como um promotor do RNA viral dependente da *polimerase* como um elemento de regulação do ciclo de transcrição / replicação (BRINSON *et al.*, 2011).

As observações contemporâneas suportam a ideia de que as conformações linear e circular do RNA viral (Figura 1.2a e 2b) co-existem e que as dinâmicas dos RNAs são necessárias para a replicação. Como o genoma viral é uma molécula flexível, isso ajudará a compreender a função de estruturas alternativas de RNA formadas em diferentes estágios do ciclo de vida do vírus (GEBHARD *et al.*, 2011).

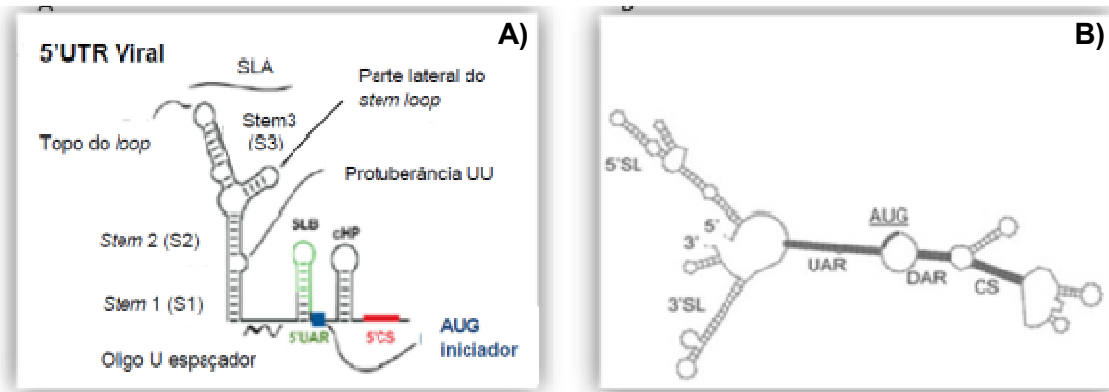


FIGURA 1.2- Estrutura secundária da 5'-UTR do genoma do DENV. (A) Conformação linear mostrando elementos estruturais localizados na porção 5': *stem loop* A (SLA), *stem loop* B (SLB), região do capsídeo *hairpin* (cHP), região *upstream* ao códon de iniciação da tradução AUG (UAR) e elementos 5'CS (sequência de ciclização). (B) Conformação circular mostrando a hibridização 5'- 3' e os elementos estruturais, UAR, DAR e CS.

Fonte: GEBHARD *et al.*, (2011) (2a); LI *et al.*, (2011) (2b) com modificações.

Um motivo encontrado e designado de elementos *downstream* a região AUG (5'DAR) com a contrapartida na extremidade 3' designado 3'DAR foi descrita por FRIEBE & HARRIS (2010) demonstrando que 5'DAR modula a interação e replicação RNA-RNA e restaura a complementaridade entre 5'DAR e 3'DAR resgatando efeitos prejudiciais causados pelas mutações na 5'DAR na circularização do genoma e replicação de RNA viral. O papel da 3'DAR ainda é pouco compreendido.

Estudos de DONG e colaboradores (2008) indicam que a NS5 se liga a nucleotídeos da sequência 5'DAR e também protege os nucleotídeos na 3' DAR na formação panhandle 5'-3', indicando um papel para os elementos DAR no recrutamento de proteínas virais e sugerindo que a complementaridade entre as porções terminais virais também pode ser necessária para outras funções de circularização do genoma.

A 3'-UTR desempenha um papel central na biologia viral possuindo de 388-462 nucleotídeos contendo uma região de elementos altamente conservados CS₁ (sequências complementares ou ciclização), CS₂ (sequência conservada) e RCS₂ (CS₂ repetido) bem como na extremidade 3' uma estrutura *hairpin* longa (LSH) e estável, a qual é conservada entre todos os membros da família *Flaviviridae* (HAHN *et al.*, 1987).

A 3'-UTR é dividida em três domínios, sendo o domínio I, localizado após o códon de parada NS5, considerado a região mais variável, apresentando grande heterogeneidade no comprimento e sequências de nucleotídeos nos diferentes sorotipos (SHURTLEFF *et al.*, 2001). O domínio II possui conservação moderada, que compreende vários motivos *hairpins*, CS₂ e RCS₂. Os elementos de RNA dentro dos domínios I e II são considerados dispensáveis para replicação viral, mas servem como aperfeiçoadores do processo viral (LO *et al.*, 2003).

O domínio III é a região mais conservada da 3'-UTR, com CS₁ seguido por *stem loop* terminal (3'SL) (IGLESIAS & GAMARNIK, 2011), sendo que CS₁ contém uma sequência envolvida na interação RNA-RNA entre as extremidades do genoma viral (HAHN *et al.*, 1987). A estrutura 3' terminal contém um *stem loop* curto de 14 nucleotídeos (sHP), seguido de um longo *stem loop* de 79 nucleotídeos, os dois juntos são referidos como 3'SL (Figura 1.3). O papel desempenhado pela 3'-UTR na determinação da gravidade da dengue ainda não está claro.

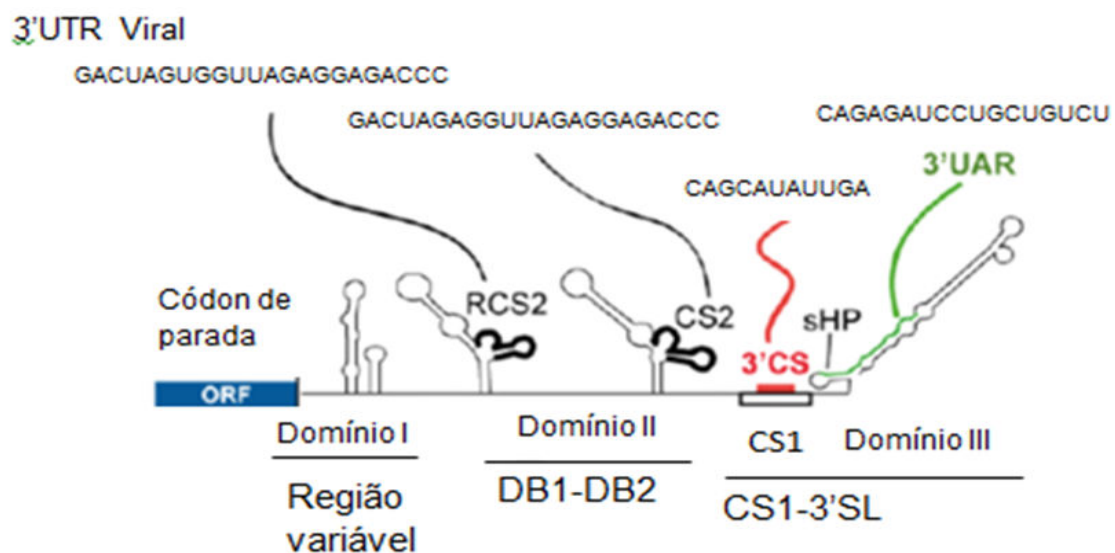


FIGURA 1.3- Estrutura secundária da 3'-UTR do genoma do DENV. São apresentados os três domínios presentes na 3'-UTR sendo o domínio I a região variável, domínio II com as estruturas CS₂ e RCS₂ e domínio III a sequência conservada CS₁ e 3'SL. Além disso, a localização de 3'CS e 3'UAR são mostrados.

Fonte: GEBHARD *et al.*, (2011) com modificações.

As proteínas não-estruturais desempenham um importante papel no processo de replicação e determinante na patogenicidade da doença. A NS5 é a maior proteína codificada pelo vírus da dengue contendo 104 KDa, a mesma foi encontrada formando um complexo com NS3 em células de macaco infectadas com DENV2 (KAPOOR *et al.*, 1995). A função das proteínas hidrofóbicas NS2a, NS2b, NS4a, NS4b não está bem esclarecida, mas estudos indicam o envolvimento das mesmas na formação de complexos de replicação ou atuando como co-fatores.

Estudos feitos por SUZUKI e colaboradores (2007) através da construção de um cDNA infeccioso utilizando o DENV1 (DV1-BR/90), contendo mutações em regiões conservadas de NS1 mostraram que esta proteína também está relacionada com a replicação do vírus. A presença de altos níveis desta proteína no soro de pacientes infectados pelo DENV tem sido correlacionada com a severidade da doença (ALCON *et al.*, 2002).

1.3- Diagnóstico e Terapia

A infecção pelo vírus da dengue pode apresentar formas assintomáticas ou dois quadros clínicos diferentes: Febre da Dengue (FD), também conhecida como dengue clássica, cuja manifestação sintomática é mais branda; e a Febre Hemorrágica da Dengue/Síndrome do Choque por Dengue (FHD/SCD), caracterizada por extravasamento capilar (GUZMÁN & KOURI, 2003).

O indivíduo quando infectado pelo vírus apresenta como sintomas gerais: febre, cefaléia e mal-estar geral os quais surgem após o período de incubação que varia de quatro a sete dias. Durante esse período febril agudo, que pode variar de 2 a 10 dias, o vírus pode circular no sangue periférico. Nesse estágio da doença, é muito difícil distinguir as formas clínicas da dengue e muitas vezes, a dengue de outras infecções, principalmente virais (GUBLER, 1998).

Os métodos comumente usados para confirmar a infecção pela dengue envolvem o isolamento do vírus, a detecção do antígeno ou RNA do vírus no plasma ou soro ou tecidos, e a presença de anticorpos vírus-específicos no

soro e outros fluidos (KAO *et al.*, 2005). Para se ter um diagnóstico mais preciso da doença são necessárias análises sorológicas, detecção de vírus ou agentes virais e mesmo análise nos óbitos suspeitos para notificações.

O diagnóstico sorológico detecta anticorpos anti-dengue utilizando a técnica ELISA, que é uma das mais utilizadas para a confirmação da doença devido à possibilidade de uma grande quantidade de testes rápidos e de baixo custo. A técnica detecta a proteína NS1 do DENV nas amostras (BLACKSELL *et al.*, 2006).

A imuno-histoquímica realizada em tecidos também detecta antígenos virais e a RT-PCR (reação em cadeia da polimerase-transcriptase reversa) faz a detecção do RNA do DENV em amostras humanas. Estudos de POLONI e colaboradores (2010) mostram que além do soro, foi detectado o vírus em amostras de urina e de saliva ambos por RT-PCR em tempo real. Porém, o vírus da dengue foi detectado dois dias após o início dos sintomas, mas não depois de nove dias. A carga viral mais baixa encontrada na urina e saliva em comparação com o soro sugere que o vírus seria detectado nestas amostras clínicas por um curto período de tempo.

O desenvolvimento de uma vacina é muito difícil devido à complexidade das respostas imunes contra a dengue, atualmente não existe nem vacina ou terapias específicas para combater a doença (BARRETO & TEIXEIRA, 2008). Basicamente, a terapia é feita através de repouso, antitérmicos, analgésicos e reidratação oral. Mas, há uma busca constante de diversos pesquisadores por fármacos que combatam a dengue como, por exemplo, os estudos de ZANDI e colaboradores (2011) que mostraram que o flavonóide fitesina possui propriedades anti-DENV agindo na replicação do vírus.

Existem terapias realizadas com corticosteroides e imunoglobulinas intravenosas, porém apresentam pouco sucesso. OSTRONOFF e colaboradores (2003) mostraram uma grave trombocitopenia em cinco pacientes brasileiros com dengue, que foram tratados com imunoglobulina intravenosa. É de suma importância conhecer os mecanismos moleculares envolvidos no ciclo de vida do vírus para que se possam desenvolver tratamentos antivirais eficazes.

Os desafios ainda existem no estudo da dengue clássica e dengue hemorrágica, no diagnóstico e no tratamento da doença incluindo a aplicação de técnicas mais sensíveis pelo uso de novos biomarcadores para evitar a reação cruzada entre diferentes sorotipos do vírus da dengue e outros flavivírus (KAO *et al.*, 2005). Um diagnóstico precoce e preciso pode auxiliar no tratamento do paciente, direcionar atenção clínica para o aparecimento de sinais importantes ou mesmo facilitar as atividades de controle do vetor.

Várias técnicas baseadas na biologia molecular têm sido utilizadas na tentativa de melhoria diagnóstica e terapêutica. Nesse sentido, o *SELEX* genômico representa uma ferramenta útil na identificação de ligantes específicos podendo gerar alvos com potencial não somente diagnóstico, mas também terapêutico para diversas doenças.

1.4- SELEX Genômico

A química combinatória é uma das ferramentas mais promissoras para a descoberta e o desenvolvimento de novas moléculas com potencialidades terapêuticas tendo como meta reduzir o tempo necessário para a obtenção de um novo fármaco, sendo os ácidos nucleicos compostos importantes nesta modalidade da química. Bibliotecas combinatórias destes nucleotídeos, são utilizadas para identificar compostos em particular, tal como alta afinidade de ligação a um determinado alvo (aptâmeros) ou atividade catalítica (ribozimas e DNAzimas) (STOLTENBURG *et al.*, 2007, ULRICH & TRUJILLO, 2008)

Um dos métodos utilizados para a identificação de ligantes é o *SELEX* (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment*) genômico, que consiste na construção de bibliotecas combinatórias de oligonucleotídeos que seleciona ligantes com afinidade elevada a partir de moléculas alvo, incluindo peptídeos ou células (Cell-SELEX) (ULRICH & WRENGER, 2009).

Na década de 1990, os métodos de seleção *in vitro*, permitindo obter ácidos nucleicos com propriedades predeterminadas, foram descritos por três grupos de pesquisadores independentes: Tuerk e Gold, Ellington e Szostak e Robertson e Joyce. TUERK & GOLD (1990) tentaram compreender a interação

ácido nucléico-proteína a partir de uma população de moléculas em uma diversidade de sítios de ligação, e de elucidar qual a responsabilidade dos *loops* de nucleotídeos na interação do operador na tradução.

Já ELLINGTON & SZOSTACK (1990) estudaram a probabilidade de conformação tridimensional estável de uma dada sequência randômica de polinucleotídeo ou peptídeo na tentativa de estimar o número de diferentes classes estruturais capazes de exercerem atividade catalítica importante na teoria da evolução, pois acredita-se que as primeiras moléculas catalíticas eram provenientes de polímeros randômicos.

Ainda na década de 90, Robertson e Joyce estudaram a identificação de RNAs com atividade catalítica pela seleção *in vitro* as quais foram denominadas aptazimas, moléculas úteis na incorporação em matrizes de biossensores (HESELBERTH *et al.*, 2003).

A utilização de oligonucleotídeos como ligantes ou inibidores de proteínas baseia-se na propriedade de reconhecimento específico de epítomos protéicos pelas moléculas de RNA ou DNA, semelhante à interação RNA-proteína e DNA-proteína existente na célula. Tais ligações ocorrem pela interação de cargas entre o aptâmero e o alvo de seleção. As ligações ocorrem pela formação de ligações de hidrogênio entre os aminoácidos do alvo e a cadeia do aptâmero ou ligação de *van der Waals* entre as cadeias de açúcar e grupamentos fosfato (GOLD, 1999).

Depois de vários ciclos repetitivos de enriquecimento, com o uso inicial da biblioteca de RNA ou DNA, há a seleção do aptâmero com capacidade de interação à molécula alvo. A amplificação da biblioteca de cDNA é realizada através de PCR e obtenção da biblioteca de RNA, por transcrição *in vitro* utilizando, por exemplo, a enzima T7 RNA polimerase. Durante os ciclos de seleção *in vitro* de aptâmeros com alta afinidade, recupera-se o RNA ligado ao receptor no sítio específico do alvo. O mesmo é purificado e utilizado como molde nas reações de RT-PCR.

Para aumentar a biodisponibilidade e bioestabilidade das moléculas selecionadas, a técnica de SELEX tem sido aperfeiçoada em vários pontos como, por exemplo: o emprego de ribonucleotídeos de pirimidina modificados

no anel da ribose na posição 2'OH por 2'F ou 2'NH₂ resultando em moléculas com maior estabilidade e menor custo. As moléculas de RNA selecionadas modificadas com 2'F têm maior rigidez em sua estrutura e afinidade ao alvo comparado a aptâmeros com 2'NH₂ (PAGRATIS *et al.*, 1997).

A estabilidade também foi aumentada pela adição de outros nucleotídeos modificados, 2'-O-metil nucleotídeo e 4'-tio pirimidina (CHELLISERRYKATILL & ELLINGTON, 2004, KATO, *et al.*, 2005). Outras alterações têm sido realizadas para elevar o tempo de meia-vida e de distribuição dos aptâmeros em sistemas fisiológicos como a adição de um grupamento lipídico inserido no aptâmero para ancoragem em lipossomos (WILLIS *et al.*, 1998).

A técnica de *SELEX* pode ser aplicável a qualquer classe de alvos podendo ser: moléculas simples, complexas ou mistura de compostos que podem ser utilizados para a seleção de aptâmeros com alta afinidade e especificidade obtendo resultados bastante satisfatórios.

1.5- Os aptâmeros e suas aplicações

Os aptâmeros podem ser definidos como oligonucleotídeos funcionais de fita simples selecionados *in vitro*. Em geral, são capazes de formar uma estrutura tridimensional estável e podendo ligar-se a diversas moléculas alvo devido sua alta afinidade e seletividade. Normalmente, possuem cerca de 20-80 nucleotídeos de cadeia simples de DNA ou de RNA e sua estrutura é responsável pelas interações intramoleculares (KANWAR *et al.*, 2010).

Muitas vezes os aptâmeros são comparados com os anticorpos, devido à sua elevada especificidade e afinidade para os alvos, no entanto, eles têm algumas vantagens em relação aos anticorpos, como por exemplo: a síntese química é gerada *in vitro*, o que permite a modificação química para controlar a sua estabilidade ou adicionar corante fluorescente. Além disso, os anticorpos basicamente funcionam em regiões extracelulares, enquanto aptâmeros são facilmente introduzidos no compartimento intracelular por transfecção (MIYAZAKI & FUJITA, 2012).

Como uma ferramenta de diagnóstico, os aptâmeros têm propriedades ideais, tais como: afinidade altamente específica à molécula alvo, facilidade de modificação e estabilidade (BINNING *et al.*, 2012). Devido a estas vantagens, a síntese química e enzimática dos aptâmeros são ativamente investigadas como uma ferramenta de diagnóstico, bem como para a descoberta de drogas (GREEN *et al.*, 2001). Além disso, os aptâmeros podem ser acoplados a biossensores, obtendo uma sensibilidade muito elevada (ZHOU *et al.*, 2010), representando uma alternativa interessante para o biossensoriamento.

Os aptâmeros virais podem ser utilizados para inibir a infecciosidade viral em qualquer fase do ciclo de replicação viral, e foi nesse âmbito que se desenvolveu os aptâmeros contra o vírus da imunodeficiência humana HIV-1. A fim de orientar a entrada do HIV em células T auxiliares aptâmeros foram gerados contra a glicoproteína 120 (gp120) do HIV, que compete com o receptor-HIVco, CCR5. O sítio de ligação do aptâmero está localizado numa região altamente conservada da gp120, permitindo a neutralização de uma variedade de isolados de HIV por interromper a interação gp120-CCR5 (DEY *et al.*, 2005 a) (DEY *et al.*, 2005 b).

Os aptâmeros denominados de L13 e L19 foram desenvolvidos contra partículas do citomegalovírus humano (HCMV), os quais inibem a atividade antiviral do HCMV, pois os mesmos ligam-se as glicoproteínas B e H do HCMV e bloqueiam a entrada viral (WANG *et al.*, 2000).

O vírus influenza A (IAVs) tem sido relatado como agente infeccioso para uma grande variedade de espécies animais, incluindo os seres humanos. Aptâmeros de DNA com alta afinidade contra a proteína HA de H3N2 IAVs de origem suína foram desenvolvidos e os resultados mostraram que os aptâmeros selecionados podem ser usados para detectar e diferenciar os subtipos de IAVs (WONGPHATCHARACHAI *et al.*, 2013).

Estes oligonucleotídeos também podem ser desenvolvidos e utilizados para fins terapêuticos. Em 2004 iniciou a comercialização do primeiro aptâmero para o tratamento da neovascularização coroidal (AMD) conhecido como Macugen™, o qual melhora a acuidade visual (NG *et al.*, 2006). Estas moléculas tem sido relatadas também como agentes terapêuticos contra

moléculas de imunoglobulina E (IgE), *interferon gama* (γ IFN), α -trombina, PTPase (proteína tirosina fosfatase) demonstrando grande eficácia em testes em cultura de células e em animais (LEE *et al.*, 2006).

Atualmente, o aptâmero AS1411, que passará por ensaios clínicos de fase II, é um potencial terapêutico anticâncer cujos efeitos biológicos está na capacidade de alterar a localização subcelular de certos complexos de nucleolina (REYES-REYES *et al.*, 2010). Esta é uma proteína multifuncional presente no núcleo da maioria das células, bem como no citoplasma e na superfície de algumas células, incluindo células cancerosas e células endoteliais angiogênicas (BATES *et al.*, 2009) sendo participante da transformação maligna e progressão do câncer (STORCK *et al.*, 2007).

Os aptâmeros também são alvo de estudos para infecções parasitárias com: *Trypanosomes*, *Plasmodium* e *Leishmania*. Resultados recentes proporcionam uma prova de conceito para o uso do Apt68, um aptâmero ligante para *T. cruzi* utilizado para concentrar parasitas a partir de amostras de sangue e seu potencial para facilitar a detecção de agentes patogênicos através de ensaios baseados em PCR (NAGARKATTI *et al.*, 2012).

A produção e caracterização de ligantes específicos de moléculas de RNA ou DNA por meio da tecnologia de aptâmeros poderão resultar em ferramentas diagnósticas e terapêuticas, bem como descoberta e validação de drogas e elementos de reconhecimento biológico, auxiliando na elucidação da função de genes e vias celulares importantes na gênese e progressão das mais diversas doenças.

2- OBJETIVO GERAL

Realizar a seleção e caracterização de moléculas de RNA como ligantes potenciais à região 5'-UTR do vírus da dengue para fins diagnósticos e/ou terapêuticos .

2.1- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Utilizar o método *SELEX* (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*) por hibridização entre alvo e biblioteca em solução (*matrix-free method*) para a produção de aptâmeros ligantes à região 5'-UTR do genoma do vírus da dengue;
- Realizar a caracterização dos aptâmeros candidatos por meio de análises *in silico* conformacionais para predição de ΔG de ssDNA (aptâmeros) e RNA-RNA (aptâmeros-alvo).

3- MATERIAIS

Primers, Taq polimerase, Trizol Reagent®, *Dynabeads® My One™ Streptavidin T1*, *E.coli* competente TOP 10, *E.coli* competente DH5α e marcador de 50 e 100 pb, foram obtidos da Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). RNase out , desoxirribonucleotídeos (dNTPs), hexâmero, *Moloney murine leukemia virus-reverse transcriptase* (M-MLV RT), lâ de vidro, IPTG (isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo) X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosídeo), ampicilina, gentamicina, fenol, meio completo (L-15), soro bovino fetal (SFB), LB, LB ágar, Tris-HCl, álcool isoamílico e dietil pirocarbonato (DEPC), foram obtidos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil).

Todas as soluções foram preparadas usando água DEPC para degradação de RNases. Azida de sódio, Tween 20, álcool etílico e clorofórmio foram obtidos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Acetato de sódio, acetato de amônio, cloreto de cálcio, cloreto de magnésio, cloreto de sódio, hidróxido de sódio foram obtidos da Neon Reagentes Analíticos (São Paulo, Brasil). Brometo de etídeo, agarose, kit *illustra GPX PCR DNA and Gel Band Purification*, Membrana *Hybond-N+*, kit *Alkaphos Direct Labellings Reagents e DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing* kit foram obtidos da GE Healthcare Life Sciences (São Paulo, Brasil). *T7 RiboMAX™* e *pGEM® – T Easy Vector* foram obtidos da Promega (Madison, WI, USA). O kit *QIAprep Spin Miniprep* foi obtido da QIAGEN (QIAGEN® Inc., CA, USA). O kit *TaqMan® Universal PCR Master Mix* foi obtido da Applied Biosystems (Foster City, CA). O Kit *Biotin Chromogenic Detection* foi obtido da Thermo Scientific (Sinapse Biotecnologia).

4- PARTE EXPERIMENTAL

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

A linhagem celular C6/36 originárias de larvas de mosquitos *A. albopictus*, foi infectada com os vírus tipo 1 e 3 e mantidas pelo Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), sendo a mesma cultivada em meio completo (L-15) contendo gentamicina (10ug/mL); suplementado com 5% soro bovino fetal (SFB) e mantido em estufa tipo *Biologic Oxigen Demand* (B.O.D.) à 28°C. A célula foi tripsinizada juntamente com o sobrenadante para a extração do RNA viral e posterior síntese de cDNA.

4.2- Extração de RNA total e Transcrição reversa

A extração do RNA total dos sorotipos do DENV foi realizada utilizando o Trizol Reagent® de acordo com as instruções do fabricante. A integridade do ácido nucléico foi observada por eletroforese em gel de agarose numa concentração de 1,2% (1,2 agarose/100 ml tampão TBE) corado com brometo de etídio a 0,5 µg/ml e a quantificação foi feita através da leitura em espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc. Wilmington, DE USA) em comprimento de onda de 260 nm e 280 nm para análises da relação RNA/proteína nas amostras.

Um micrograma do RNA total foi utilizado como molde para a síntese de cDNA na presença de 126 pmol de hexâmero, 1U de M-MLV RT (*Moloney murine leukemia virus*-reverse transcriptase), 0,25U de RNase out, 0,2 mM de dNTPs, tampão 1X da M-MLV RT para um volume final de 20 µL. Seguindo as recomendações do fabricante, a RT ficou a 37°C por uma hora no termociclador (AmpliTherm Thermal Cycler, Madison, WI, USA).

4.3- Reação em Cadeia da Polimerase

Dois microlitros da reação de transcrição reversa foram utilizados para amplificação da sequência do DENV. A PCR foi efetuada com 1,5mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 7 pmoles de cada primer (FOR e REV) 2,5U de Taq polimerase e tampão 1X da Taq para volume final de 20µL.

Para a reação de amplificação, foram padronizados 35 ciclos (95°C – 30 s; 55°C – 45 s; 72°C – 2 min) e a temperatura de anelamento dos *primers* foi de 72°C. As sequências dos *primers* utilizados são: *sense* AGTTGTTAGTCTACGTGGACCGA e *antisense* CGCGTTTCAGCATATTGAAAG (AQUINO *et al.*, 2006) (Figura 4.1). O produto amplificado do D(ENV1 e ENV3) possui, respectivamente, 151 e 150 pb. O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,2%. O fragmento esperado foi purificado a partir da agarose utilizando lã de vidro e precipitação com acetato de amônio (7,5M).

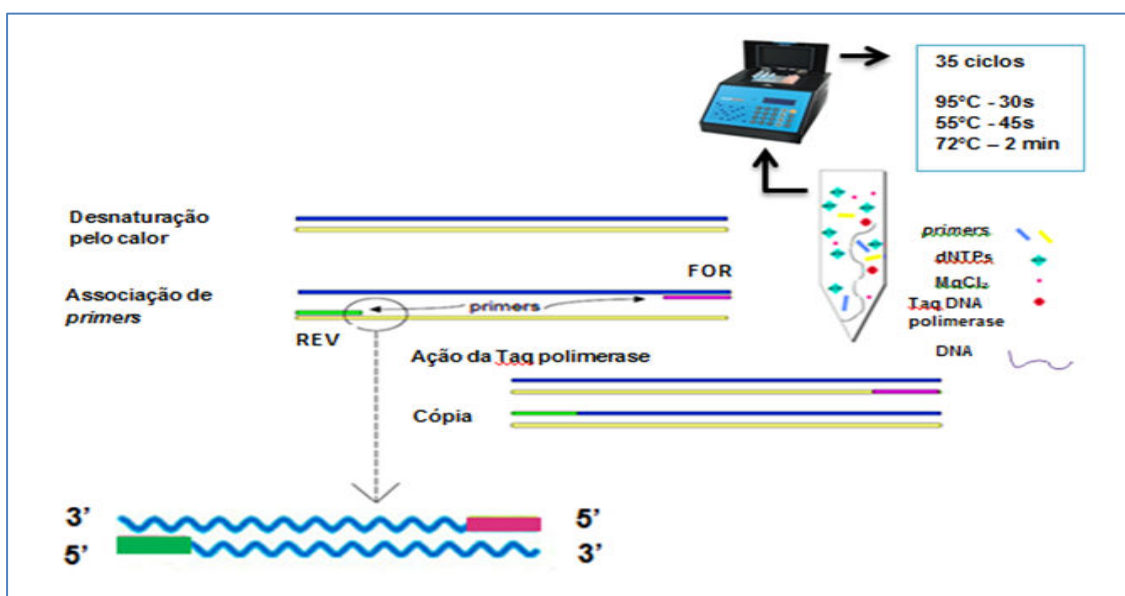


FIGURA 4.1- Esquema da Reação em Cadeia da Polimerase. Após preparação do mix de reação, o mesmo foi colocado no termociclador, onde foram utilizados 35 ciclos (95°C – 30 s; 55°C – 45 s; 72°C – 2 min) para a reação de amplificação. Através da oscilação da temperatura o DNA sofreu desnaturação, anelamento e extensão da fita, gerando várias cópias a partir do DNA molde.

4.4- Preparo, Transformação de Bactérias Competentes e Clonagem do cDNA

O produto purificado do DENV foi clonado usando *pGEM*[®] – *T Easy Vector* em *E.coli* competente TOP 10 usando as instruções do fabricante.

A bactéria *Escherichia coli* TOP 10, estocada à -80°C foi cultivada em meio LB (triptona 1%; extrato de levedura 1%; cloreto de sódio 0,5%; pH 7,5;

ágar bacteriológico 1,5%) e incubada a 37°C durante 16 horas. Uma colônia desta cultura foi inoculada em 100 mL de meio LB e incubada por 3 horas a 37°C sob agitação até atingir a DO_{600nm} de 0,5. Após o crescimento, as bactérias foram coletadas por centrifugação a 3.000 rpm por 10 minutos à 4°C. O sedimento foi suspenso em 10mL de $CaCl_2$ (0,1M) filtrado e mantido em gelo. Após centrifugação a 4.000 rpm durante 15 minutos à 4°C, as células foram ressuspensas em 2 mL de $CaCl_2$ para cada 50 mL de cultura original. As células competentes foram aliquotadas e usadas imediatamente ou estocadas à -80°C na presença de glicerol.

Para a transformação bacteriana foi adicionado a um microtubo de centrifuga de 1,5 ml, 100 μ L de bactéria competente juntamente com 2 μ L do produto de ligação. Este material foi mantido em gelo por 10 minutos. Após este período, as células sofreram um choque térmico por 2 minutos e acrescentou-se 250 μ L de meio SOC à temperatura ambiente, posteriormente, foram agitadas por cerca de uma hora a 37°C de acordo com a turbidez da amostra.

As células foram suspensas em meio LB, plaqueadas em meio LB ágar suplementado com 80 μ L (20mg/mL) de IPTG (isopropil- β -D-Tiogalactopiranosídeo) e 800 μ L (200 mg/mL) de X-Gal 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosidase), 400 μ L (100mg/mL) de ampicilina e crescidas a 37°C por 16 horas. As colônias brancas contendo o inserto foram isoladas e incubadas em 25 ml de meio LB contendo ampicilina e crescidas a 37°C sob agitação por 16 horas.

4.5- Extração de Plasmídeos e Sequenciamento

O DNA plasmidial das bactérias foi obtido utilizando o kit *QIAprep Spin Miniprep* seguindo as instruções do fabricante. A qualidade do ácido nucléico foi observada por eletroforese em gel de agarose numa concentração de 1,2% corado com brometo de etídio a 0,5 μ g/ml e a quantificação foi feita através da leitura em espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc. Wilmington, USA) a um comprimento de onda de 260 nm e 280nm.

Os plasmídeos contendo inserto foram sequenciados, sendo que as

reações de sequenciamento foram realizadas utilizando em média 200 ng de DNA molde, 5 pmol do primer M13 sense (5'-GGTTTTCCCAGTCACGAC-3'), premix (Dyynamic ET Dye Terminator Kits) e água para um volume final de 10 µL. Para montar a reação utilizou-se um termociclador de placas (Master Cycler Eppendorf) com 35 ciclos nas seguintes condições: (95° C – 20 s; 50°C - 15 s 60°C - 1 min).

Ao final o DNA foi precipitado com 1 µl de acetato de amônio e 27,5 µl de etanol absoluto. A placa foi centrifugada por 45 minutos a 3700 rpm, numa temperatura de 4°C e o sobrenadante descartado, 150 µl de etanol 70% foram adicionados e uma nova centrifugação foi realizada por 15 minutos, numa rotação de 3700 rpm a 4°C. Sequencialmente, descartou-se o sobrenadante e centrifugou-se a placa invertida por 1 segundo (800 rpm). A placa deve ser coberta por um papel alumínio protegida da luz por 10 minutos para evaporar o etanol. Então, 10 µl do reagente *Loading Buffer* foi adicionado com o objetivo de ressuspender o precipitado resultante.

A leitura do sequenciamento foi feita no sequenciador de DNA automático *MegaBace 1000 (GE Healthcare)* no laboratório de Nanobiotecnologia (UFU). Após o sequenciamento verificou-se que o fragmento clonado e sequenciado era idêntico à sequência do DENV depositada no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

4.6- Alinhamento

A estrutura de consenso prevista para a extremidade 5' do DENV 1 e 3 correspondendo a 5'-UTR+55, a qual representa 96 nucleotídeos da 5'-UTR incluindo 55 nucleotídeos do gene do capsídeo, foi obtida por alinhamento múltiplo utilizando CLUSTAL W.

4.7- Molécula alvo biotinizada

Para a seleção de aptâmeros de RNA para a molécula alvo, utilizou-se cDNA dos sorotipos do DENV-1 e 3. Para a seleção bem sucedida de aptâmeros com elevada afinidade e especificidade, a molécula alvo deve estar presente em quantidade suficiente e com pureza elevada.

Os fragmentos do D(ENV1 e ENV3) foram purificados e depois clonados como descrito anteriormente. Posteriormente, a biotina foi incorporada a um filamento do DENV durante a amplificação por PCR assimétrica utilizando 10 pmoles de *primer* biotilado *forward*-(5'biotina - AGTTGTTAGTCTACGTGGACCGA 3') e o kit *TaqMan® Universal PCR Master Mix* seguindo as recomendações do fabricante.

A PCR foi realizada utilizando 35 ciclos na reação de amplificação (50°C – 2 min; 95°C – 10 min; 95°C – 15 s; 55°C – 1 min). Fragmentos RNA-like (ssDNA com uracila) foram produzidos a partir da PCR e purificados utilizando o kit *illustra GPX PCR DNA and Gel Band Purification*. Posteriormente, submetido à eletroforese em gel de agarose 1,2%, corado com brometo de etídio a 0,5 µg/ml e a quantificação foi realizada através da leitura em espectrofotômetro *Nanodrop ND-1000* (NanoDrop Technologies, Inc. Wilmington, USA) em comprimento de onda de 260 nm e 280 nm.

4.8- Teste de Sonda biotilada

Com o propósito de verificar se o alvo estava biotilado, foi realizado o teste de sonda utilizando uma membrana de náilon carregada positivamente, *Hybond-N+* e o kit *Biotin Chromogenic Detection* seguindo as recomendações do fabricante.

O teste baseou-se na afinidade existente entre a biotina e a estreptavidina. Neste caso o alvo que estava biotilado ligou-se a estreptavidina que estava conjugada a fosfatase alcalina. Esta foi acoplada pela ligação heterobifuncional dos reagentes éster NHS maleimido-hexanóico e éster NHS S-acetiltioacético (SATA), que incorporam braços espaçadores. A ligação se dá através da ligação amida da proteína e os braços espaçadores que estão acoplados através do tioéter estável.

Um certo número de resíduos de aminoácidos da estreptavidina em contato com biotina é o que proporciona a elevada estabilidade do complexo de estreptavidina-biotina (SANO, *et al.*, 1996) como mostra a Figura 4.2.

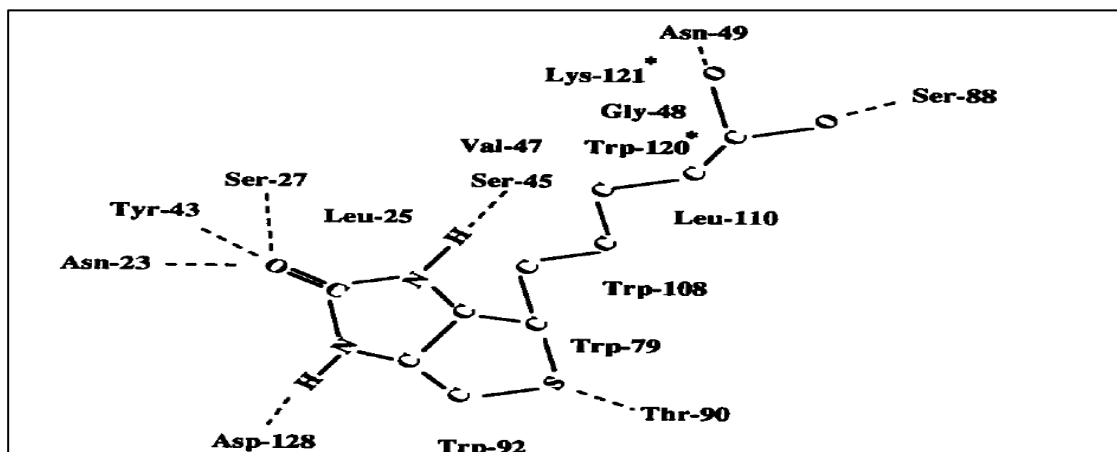


FIGURA 4.2- Representação esquemática da ligação entre a biotina e a estreptavidina. Ligações de hidrogênio entre a biotina e os resíduos de aminoácidos da estreptavidina são mostradas por linhas tracejadas. Trp-120 e Lis-121, marcados com asteriscos, são derivados a partir de uma subunidade adjacente através da interface do dímero-dímero.

Fonte: VAJDAS *et al.*, (1994); SANO *et al.*, (1996).

A estreptavidina é usada nas sondas de ácidos nucleicos, utilizando nitroazul tetrazolio/5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (NBT / BCIP) como substrato da fosfatase alcalina em procedimentos de coloração. A reação cromatogênica é iniciada pela clivagem do grupamento fosfato presente no BCIP pela fosfatase alcalina, a reação produz um próton que reduz o NBT a um produto final insolúvel NBT diformazano (Figura 4.3) que é de cor azul e pode ser observado visualmente (SIGMA ALDRICH).

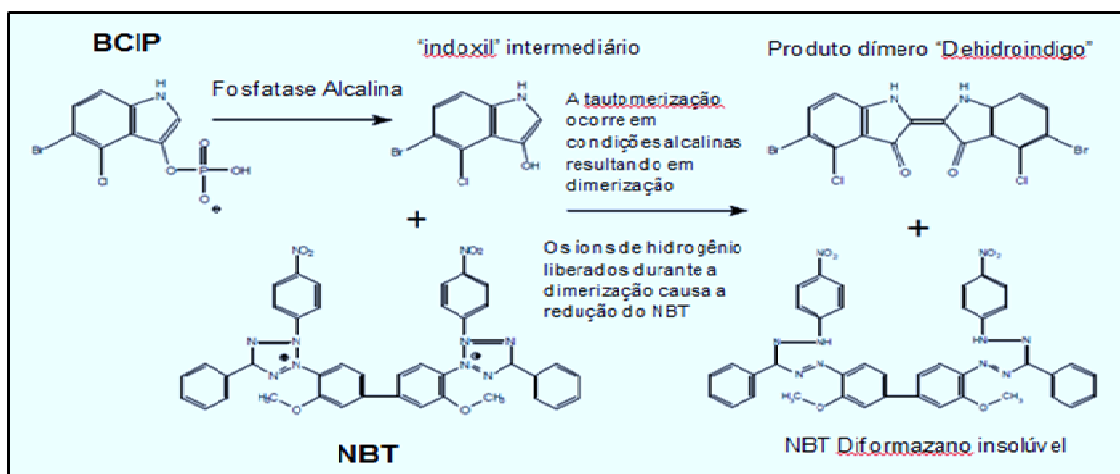


FIGURA 4.3- Reação química entre NBT e BCIP como substrato da fosfatase alcalina. O BCIP é hidrolisado pela fosfatase alcalina para formar um produto intermediário que é submetido à dimerização para produzir um corante índigo. O NBT é reduzido para o NBT-diformazano por duas reduções equivalentes geradas pela dimerização.

Fonte: SIGMA ALDRICH com modificações.

4.9- Construção da Biblioteca

Para a construção da biblioteca foi utilizado 1 μ g de DNA genômico humano, a mesma foi gerada através da fragmentação randômica do DNA por ultrassom, utilizando um aparelho sonicador (Lavadora Ultrasonic 1440D – Odontobras) por 15 minutos e o produto sonicado foi analisado eletroforicamente em gel de agarose 1%.

Dois pares de primers chamados B_{ran} e A_{ran} foram utilizados, bem como os primers A contendo o promotor T7 e o *primer* B, os mesmos correspondem perfeitamente a região 5' constante do respectivo *primer* $_{ran}$ (16nt FOR, 16nt REV) (SINGER *et al.*, 1997).

A primeira parte do processo de construção da biblioteca consiste na síntese de uma primeira cadeia de nucleotídeos e depois de uma segunda cadeia de nucleotídeos, em que os *primers* B_{ran} e A_{ran} são utilizados, respectivamente (Figura 4.4). Ambos os *primers* consistem de uma região de sequência única constante, seguido por, aproximadamente, nove nucleotídeos aleatórios na porção final da 3'. Estas regiões aleatórias servem para selecionar regiões genômicas aleatórias para inclusão na biblioteca.

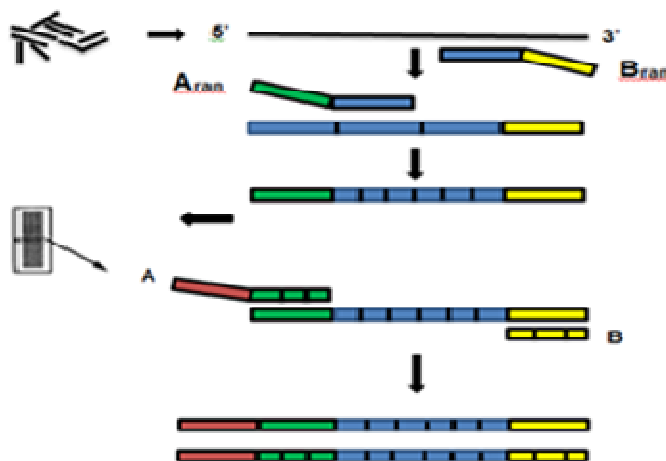


FIGURA 4.4- Diagrama da construção da biblioteca. Através da sonicação houve cortes aleatórios de DNA para a inserção do *primer* B_{ran} na primeira PCR, após a purificação uma nova PCR foi realizada para inserção do *primer* A_{ran} . Por fim, uma nova amplificação foi feita usando o *primer* A juntamente com o *primer* B.

Fonte: SINGER *et al.*, (1997) com modificações.

Para amplificar a biblioteca, foi utilizado na primeira reação de PCR: DNA genômico (1 µg), *primer* B_{ran} (5 pmols), *Platinum* Taq DNA Polimerase (1 U), dNTPs (200 mM), MgCl₂ (1.5 mmol/L) e tampão 1X da Taq para volume final de 50µL. A reação foi incubada por 26 ciclos de 93°C – 20 s, 50°C – 40 s, 72°C – 40 s, precedida por desnaturação inicial de 93°C - 3 minutos e extensão final de 72°C - 10 minutos.

A purificação foi realizada através da precipitação do DNA com acetato de sódio (3M) e o pellet foi ressuscitado em 10 µL de água. Em seguida foi realizada uma nova PCR utilizando o *primer* A_{ran} nas mesmas condições supracitadas.

A preparação da biblioteca finaliza com a introdução do promotor T7 através da amplificação por PCR usando *primer* A juntamente com o *primer* B. Desta forma, a biblioteca pode ser expressa como RNA. A segunda reação de PCR foi à mesma da primeira síntese. O produto da reação foi fracionado por eletroforese utilizando gel de agarose 1% e fragmentos de vários tamanhos (com insertos genômicos variando de aproximadamente 40–700 nucleotídeos) foram isolados e purificados a partir da agarose e precipitados com acetato de sódio (3M) conforme descrito anteriormente.

4.10- Seleção *in vitro* de aptâmeros de RNA

O passo inicial de cada *round* do SELEX genômico representa a construção do *pool* de RNA por transcrição *in vitro* da biblioteca de DNA. A reação de transcrição *in vitro* foi realizada por expressão de RNA em larga escala utilizando T7 RiboMAX™ de acordo com as instruções do fabricante.

Em seguida, realiza-se a seleção ou etapa de ligação. Neste trabalho, o SELEX foi efetuado utilizando 200 pmoles de um *pool* de DENV1 e 3 biotilado (151 e 150 pares de bases, respectivamente) com 5 nmoles de um *pool* randômico de 10¹⁴ oligonucleotídeos de RNA (aptâmeros).

O produto de PCR que continha o genoma específico com *primer* biotilado foi inicialmente purificado com *beads* (Dynabeads® My One™ Streptavidin T1) contendo estreptavidina. Uma alíquota de 3,5x10⁸ mg/ml de *beads* magnéticos foi lavada três vezes com tampão de ligação (100 mmol L⁻¹

NaCl, 20 mmol L⁻¹ Tris-HCl pH 7.6, 2 mmol L⁻¹ MgCl₂, 5 mmol L⁻¹ KCl, 1 mmol L⁻¹ CaCl₂, 0.02% Tween 20) antes de cada *round* de seleção. O *pool* de DENV1 e 3 biotinilado foi colocado a 55°C por 10 minutos, imediatamente resfriado e mantido a 4°C durante 10 minutos, seguido de uma curta incubação de 7 minutos a temperatura ambiente antes da sua utilização na reação de ligação. Foram acrescentados 260 µL de tampão de ligação ao *pool* do DENV e a ligação foi efetuada a 36°C durante 30 minutos com agitação suave.

Após a imobilização, o complexo *bead*/DENV foi lavado com 1 mL de NaOH (0,1M) para remover os produtos amplificados não ligados. Logo após os beads foram lavados por duas vezes com 1 mL de tampão de lavagem (100mmol L⁻¹ Tris-HCl, 2.500 mmol L⁻¹ NaCl , 0,02% NaN₃ pH 8.0).

Para o *round* inicial de seleção, o complexo *bead*/DENV foi ressuspendido em 500 µL de tampão de ligação contendo 5 nmoles do *pool* da biblioteca randômica de RNA. Após uma incubação desta mistura a 37°C durante 1 hora com agitação suave, os aptâmeros não ligados foram removidos a partir de quatro lavagens com tampão de ligação.

Subsequentemente, os oligonucleotídeos ligados foram eluídos por incubação do complexo de ligação com 200 µL de NaOH (0,1M) a 36°C por 10 min com agitação suave. Este passo foi repetido por quatro vezes, obtendo desta forma os aptâmeros selecionados. A quantidade de RNA recuperado é um indicador de enriquecimento de espécies de ligação no *pool*. O *pool* de aptâmeros foi extraído com uma solução de fenol, clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 125:24:1 seguido de precipitação com etanol.

Durante o processo do SELEX o RNA selecionado de cada *round* deve ser reversamente transcrito e subsequentemente amplificado por RT-PCR utilizando os *primers* A e B. O novo *pool* de RNA para o próximo *round* de SELEX é então gerado de novo por transcrição *in vitro* (Figura 4.5).

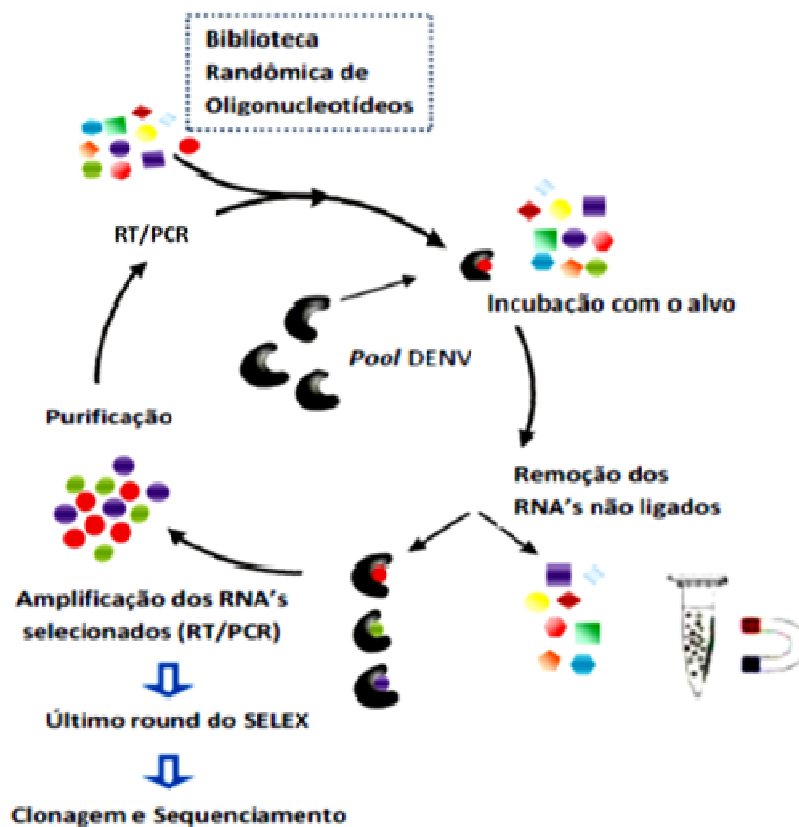


FIGURA 4.5- Representação esquemática do *SELEX* genômico. A biblioteca combinatória de RNA foi incubada com o complexo-alvo (beads magnéticos acoplados com estreptavidina + pool do DENV-1 e 3 marcado com biotina) para a ligação. O procedimento é caracterizado pela repetição dos passos sucessivos consistindo de seleção (ligação, lavagem e eluição), amplificação e purificação. No primeiro *round* a biblioteca e as moléculas alvo são incubadas para a ligação. Oligonucleotídeos não ligados são removidos e os oligonucleotídeos alvo ligados são eluídos e subsequentemente amplificados por PCR ou RT-PCR. Um novo *pool* enriquecido de oligonucleotídeos selecionados é gerado por uma preparação do DNA para a transcrição *in vitro*. Este *pool* selecionado é então utilizado para o próximo *round* de seleção. No último *round* o *pool* de aptâmeros enriquecidos é clonado e sequenciado, posteriormente vários aptâmeros individuais são caracterizados.

Fonte: RAY & WHITE (2010) com modificações.

Ao fim de cada transcrição *in vitro* foi realizada a quantificação deste *pool* de RNA através da leitura em espectrofotômetro *Nanodrop ND-1000* (NanoDrop Technologies, Inc. Wilmington, USA) em comprimento de onda de 260 nm e 280 nm, a fim de fazer uma análise quantitativa do enriquecimento da biblioteca de oligonucleotídeos ao longo dos oito *rounds* de seleção. Para obter

a quantidade da biblioteca recuperada no fim da cada *round* foi realizado o seguinte cálculo:

Concentração da biblioteca ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) \times 1.000.000(constante) / n° de pb do alvo \times 325 (constante) = pmoles/ μL .

4.11- Clonagem e sequenciamento dos aptâmeros

Para a identificação dos aptâmeros selecionados a partir dos ciclos de enriquecimento, uma alíquota do produto de PCR do oitavo *round* foi clonado utilizando *pGEM*® – *T Easy Vector* em *E.coli* competente DH5 α usando as instruções do fabricante. Após extração do DNA plasmidial, sequências de noventa e seis clones foram submetidas a um sequenciador capilar (MegaBace 1000), usando o DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit.

4.12- Análise *in silico* dos aptâmeros

Foram desenvolvidos alguns critérios para criar uma lista de aptâmeros de RNA (a partir de 8 *rounds* de *SELEX*) com potencial de afinidade de ligação para o DENV-1 e 3.

A abordagem consiste em três etapas:

Etapa 1: Seleção de sequências baseadas em motivos.

Etapa 2: Sequência de tamanhos de 23 a 54 nucleotídeos na porção variável.

Etapa 3: Características energéticas de hibridação entre a estrutura secundária do DENV transcrito e aptâmeros selecionados ($\Delta G_{\text{hybrid}} \leq -14$ a -20).

Somente as sequências que passaram nos critérios de seleção foram encaminhadas para a próxima etapa. O software web *Mfold* foi usado para hibridização (módulo de aplicação: (DINAMelt) e predições das estruturas secundárias de ácido nucléico de vários aptâmeros. A análise da estrutura secundária foi realizada por meio da minimização da energia livre.

¹Os motivos foram analisados no CMfinder.Web Server da Universidade de Washington.

²Os cálculos das energias livres foram feitos de acordo com GIEGERICH *et al.*, (2004).

³As estruturas secundárias foram obtidas de acordo com ZUKER (2003).

4.13– *Dot Blot*

A fim de realizar uma rápida análise da afinidade do *pool* de aptâmeros ao alvo através dos *rounds* de seleção do SELEX foi realizado o *dot blot*. Para o desenvolvimento da técnica foi utilizada uma membrana de náilon carregada positivamente, Hybond-N+ onde foram inseridas as seguintes amostras: DENV1, DENV3, um *pool* de DENV1 e 3, DNA genômico utilizado para construir a biblioteca e DNA genômico aleatório (*scramble*) como controle negativo, um *pool* de aptâmeros como controle positivo, sendo o volume de 2 μ L (100ng/ μ L) para todas as amostras.

Uma sonda para um *pool* de aptâmeros do 2° e 6° *rounds* foi marcada usando o kit *Alkaphos Direct Labellings Reagents*, seguindo as recomendações do fabricante utilizando detecção colorimétrica por NBT/BCIP.

¹Disponível em

<<http://wingless.cs.washington.edu/htbinpost/unrestricted/CMfinderWeb/CMfinderInput.pl>>

Acesso em: 01 outubro 2013.

²Disponível em <<http://bibiserv2.cebitec.uni-bielefeld.de/rnashapes>> Acesso em: 01 outubro 2013.

³Disponível em <<http://mfold.rna.albany.edu>> (DINAMelt) Acesso em: 01 outubro 2013

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- Seleção *in vitro* de ligantes à região 5'-UTR do vírus da Dengue

A PCR é uma técnica chave utilizada para amplificar o DNA, baseia-se no fato de que o emparelhamento das fitas duplas do DNA pode atuar como um modelo para si. Esta amplificação depende de ciclos de aumento e diminuição de temperatura. Foi descoberta por Mullis em 1983 e dez anos depois ele recebeu o prêmio Nobel de Química e desde então, a PCR proporcionou inúmeras aplicações biotecnológicas como, por exemplo, a clonagem e sequenciamento de genes, relações genéticas e evolutivas são facilmente estudadas, mesmo a partir de fósseis antigos que contêm apenas fragmentos de DNA. A PCR é uma ferramenta de pesquisa indispensável na concepção de medicamentos, diagnóstico de infecções virais e bacterianas, bem como utilizada na medicina forense (CHEMISTRY WORLD, 2011).

No presente trabalho, essa técnica foi amplamente utilizada. Primeiramente para amplificar o cDNA flanqueando o genoma viral em 151 e 150 pb do DENV1 e 3, respectivamente, como pode ser observada nas bandas presentes nos poços correspondentes aos controles positivos (Figura 5.1a). Estes fragmentos obtidos correspondem a 5'-UTR+55. Os 55 nucleotídeos adicionais na região de codificação contém a região CS e o capsídeo *hairpin* (cHP), que está envolvido na tradução e síntese de RNA viral (POLACEK *et al.*, 2009).

O produto purificado a partir do cDNA foi clonado e sequenciado como descrito anteriormente e o alinhamento das sequências obtidas para o DENV1 e DENV3 confirmou o alvo. As sequências produzidas estão de acordo com as disponíveis no *GenBank* via BLAST, acessos US/Hawaii/1944-EU848545.1 e 424/BR-PE/06-JX669508.1 para os tipos 1 e 3, respectivamente (Figura 5.1c e 1d). A região de consenso dos dois sorotipos, a partir do sequenciamento em comparação com as sequências do *GenBank* foi obtida por alinhamento múltiplo utilizando CLUSTAL W, apresentando homologia entre as sequências.

O DNA plasmidial tanto do DENV1 e 3 foi submetido a PCR obtendo os fragmentos esperados (151 e 150 pb, respectivamente), os mesmos foram

purificados como descrito anteriormente e submetidos a PCR assimétrica para incorporação da biotina (Figura 5.1b). A estratégia de amplificação assimétrica do produto clonado utilizando o primer senso com biotina e kit Taqman® foi eficiente na produção de moléculas RNA-*like*-DENV-biotinilado, as quais foram utilizadas como alvo em sistemas biotina-estreptavidina, aplicáveis na seleção dos aptâmeros.

A fim de confirmar se o alvo tinha incorporado à biotina através da PCR assimétrica foi realizado o teste de sonda biotinilada descrito anteriormente. A estreptavidina é uma proteína tetramérica composta de subunidades idênticas e é caracterizada pela sua elevada afinidade com a biotina. Cada subunidade associa-se a uma unidade da molécula de biotina com um kd de $\sim 1 \times 10^{-15}$ M (GREEN, 1975). A cor azul observada visualmente mostrou que foi formado o produto final insolúvel NBT diformazano indicativo da biotinilação. Desta forma o teste de sonda mostrou um resultado rápido e satisfatório indicando que o alvo estava biotinilado e pronto para a seleção de aptâmeros utilizando o sistema biotina-estreptavidina (Figura 5.2).

O SELEX genômico utiliza bibliotecas combinatórias de oligonucleotídeos para selecionar ligantes por meio de ciclos reiterativos de enriquecimento, que possuam alta afinidade contra uma diversidade de alvos (GOMES, 2010).

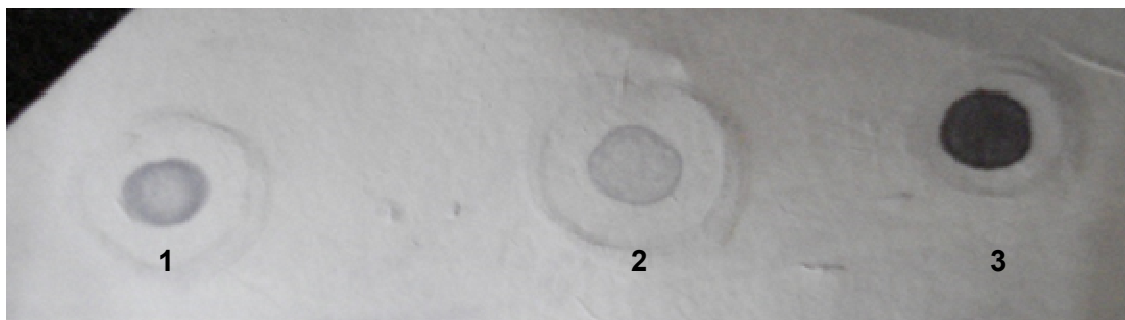


FIGURA 5.2- Teste de sonda biotinilada. 1: DENV1 biotinilado; 2: DENV3 biotinilado; 3: primer com biotina utilizado como controle positivo.

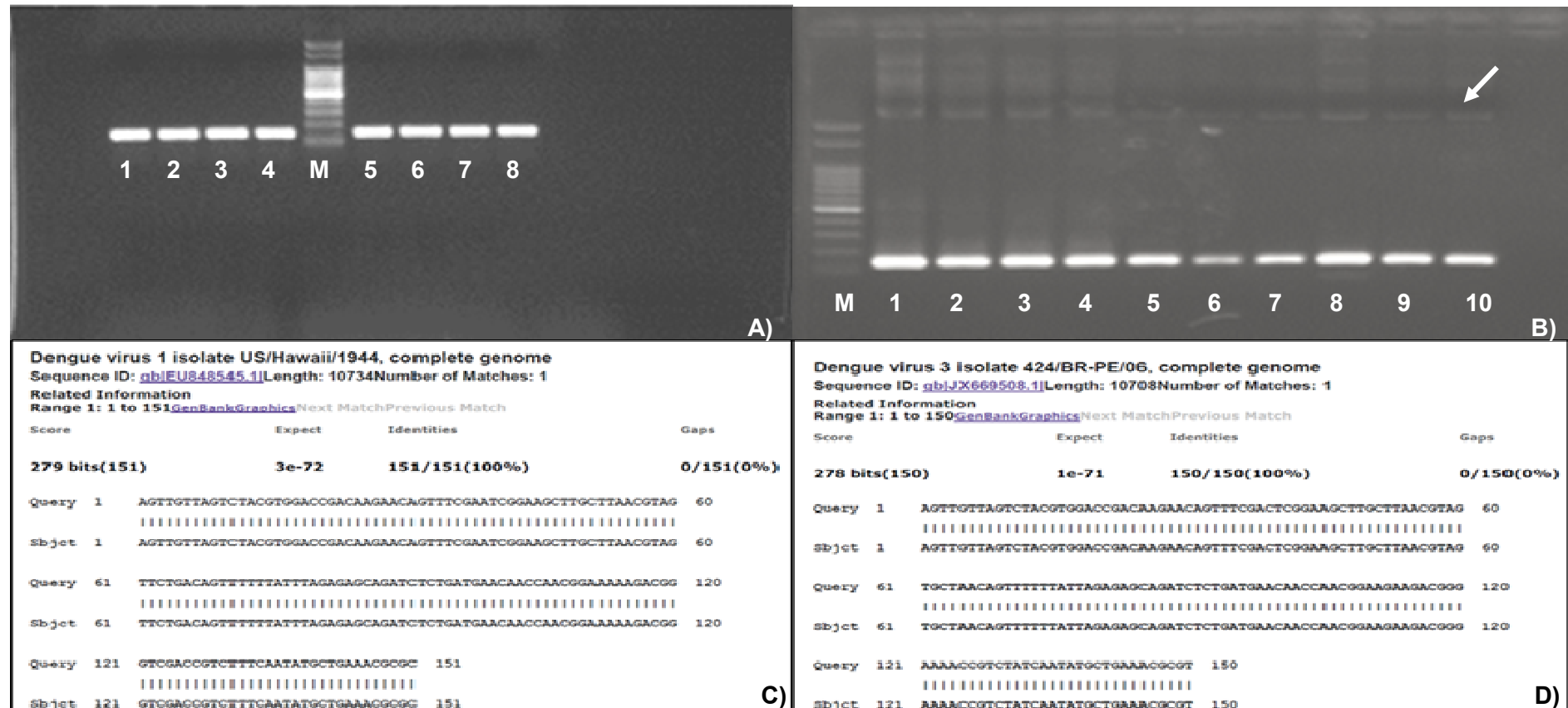


FIGURA 5.1- Eletroforese do DENV1 e 3 e Sequências do DENV1 e 3 disponíveis no *GenBank*. (A) Eletroforese em gel de agarose 1,2% (p/v) do produto de PCR do cDNA, as bandas correspondentes aos números de 1 a 4 pertencem ao DENV1, M (marcador de peso molecular de 100 pb), as bandas correspondentes aos números de 5 a 8 pertencem ao DENV3. (B) Eletroforese em gel de agarose 1,2% (p/v) do produto de PCR do DNA plasmidial, as bandas correspondentes aos números de 1 a 5 pertencem ao DENV1, as bandas correspondentes aos números de 6 a 10 pertencem ao DENV3, M (marcador de peso molecular de 100 pb). A seta está apontando o DNA do plasmídeo. (C) Sequência do DENV1 disponível no *GenBank*, acesso US/Hawaii/1944-EU848545.1. (D) Sequência do DENV3 disponível no *GenBank*, acesso 424/BR-PE/06-JX669508.1.

Após a obtenção do alvo biotilado iniciou-se a construção da biblioteca de oligonucleotídeos para a seleção dos aptâmeros. A mesma foi construída conforme descrito anteriormente, após a última PCR utilizada para incorporar os *primers* A e B, o produto da reação foi separado por eletroforese utilizando gel de agarose 1% e fragmentos com insertos genômicos variando de aproximadamente 40–700 nucleotídeos como mostra a Figura 5.3 (a), foram cortados do gel e purificados para serem transcritos.

No final do processo foi obtido uma biblioteca de DNA dupla fita que através da transcrição *in vitro* gerou a biblioteca de RNA, a mesma foi incubada com o alvo passando por vários passos de lavagem e eluição obtendo assim a biblioteca de RNA selecionada. Logo após fez-se transcrição reversa e amplificação por PCR e a cada novo *round* de seleção dos aptâmeros realizou-se a transcrição *in vitro*.

A Figura 5.3 (b) mostra que no primeiro *round* havia 5 nmoles de biblioteca e no segundo *round* houve uma queda acentuada na concentração da biblioteca, reduzindo-a em 1,5 nmoles. Este resultado pode estar atribuído ao fato que os aptâmeros não ligantes ao alvo foram eliminados durante as fases iniciais dos ciclos. Sendo que a cada novo *round* os aptâmeros ligantes ao alvo com maior especificidade foram amplificados por PCR, o que resultou em um aumento na concentração dos mesmos, atingindo uma concentração máxima de 3,8 nmoles a partir do quinto *round*. O processo foi repetido até o oitavo *round*, em que a estringência da ligação foi aumentada, para obtenção de ligantes mais específicos ao alvo.

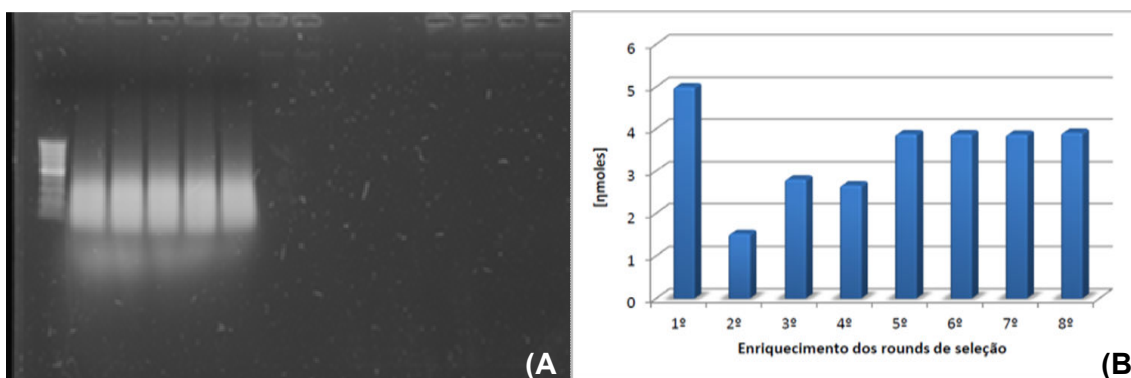


FIGURA 5.3- Eletroforese da biblioteca e enriquecimento a partir dos rounds. (A) Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) do produto de PCR da biblioteca. (B) Enriquecimento da biblioteca de oligonucleotídeos durante os 8 *rounds* de seleção.

Para analisar a afinidade do *pool* de aptâmeros ao alvo foi realizado o *dot blot*. A hibridização das amostras de ácidos nucleicos por *dot blot* demonstrou que a sonda marcada pela incorporação covalente termoestável da enzima fosfatase alcalina é capaz de detectar que houve interação específica entre as sequências de ácido nucleico do vírus da dengue e o *pool* de aptâmeros tanto do 2° como do 6° *round* (Figura 5.4). Nenhum sinal foi observado nas amostras de ácidos nucleicos controle negativo. A utilização do sistema de *dot blot* permitiu a análise rápida de várias amostras simultaneamente, apresentando-se satisfatória para perspectivas de análises rotineiras.

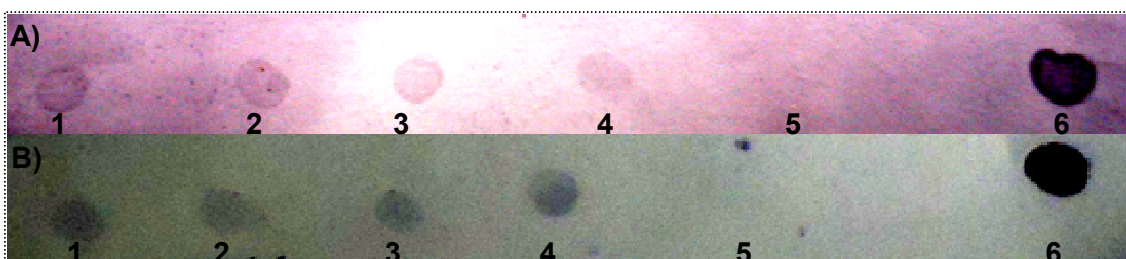


FIGURA 5.4- *Dot Blot* do *pool* de aptâmeros. (A) Imagem do *dot blot* do 2° *round*. 1: ssDNA do DENV1; 2: ssDNA do DENV3; 3: *pool* de ssDNA do DENV1 e 3; 4: controle positivo; 5: DNA *scramble* usado como controle negativo; 6: *pool* de aptâmeros. (B) Imagem do *dot blot* do 6° *round*. 1: ssDNA do DENV1; 2: ssDNA do DENV3; 3: *pool* de ssDNA de DENV1 e 3; 4: controle positivo; 5: DNA *scramble* usado como controle negativo; 6: *pool* de aptâmeros.

5.2- Caracterização *in silico* de aptâmeros selecionados contra a 5'-UTR do vírus da Dengue

Após oito rounds de seleção os aptâmeros foram clonados e sequenciados. Vinte e cinco das sequências obtidas foram comparadas a fim de determinar regiões consenso conservadas nos ciclos de seleção, para isto as mesmas foram alinhadas, semelhantes ao realizado por HARAGUCHI e colaboradores (2009) que após nove rounds de seleção, clonou, sequenciou e caracterizou 22 aptâmeros ligantes à proteína SRP19.

No alinhamento dos aptâmeros foram identificados diversos ribonucleotídeos conservados, estes foram agrupados quanto à similaridade em três Famílias de acordo com a presença de sequências consensos. A Família I apresenta o motivo GGGGW, a Família II possui o motivo GGGWW_a e

a Família III apresenta o motivo GGGWW_b, todas com suas respectivas variações (Tabela 5.1). Vale ressaltar que algumas sequências podem apresentar mais do que um motivo, superposto a outro motivo ou não superposto. Assim eles aparecerão em mais de uma classificação por Família.

Tabela 5.1- Organização de sequências com base na presença dos motivos GGGGW e/ou GGGWW e suas variações

ID Aptâmero	Número de nucleotídeos			Famílias*	Número de Motivos Lineares
	Total	Sequência fixa	Sequência randômica		
H04	67	31	36	FI	3
G08	66	31	35	FI	2
G03	61	31	30	FI	4
F12	63	31	32	FI	1
F09	53	31	22	FI	1
E07	61	31	30	FI-FIII	10
D11	87	31	56	FI	3
D04	85	31	54	FI-FIII	11
D03	65	31	34	FI-FIII	2
C11	59	31	28	FI-FII-FIII	7
C10	68	31	37	FI-FII	16
C06	88	31	57	FI-FII	6
C03	58	31	27	FI-II	4
C01	87	31	56	FI-FII-FIII	5
B08	187	31	156	FI-FII-FIII	8
B07	54	31	23	FI-FII-FIII	7
A11	67	31	36	FI-FII	5
A03	77	31	46	FI-FII-FIII	13
F08	59	31	28	FII	6
E05	68	31	37	FII	1
D07	90	31	59	FII	2
G09	41	31	10	FIII	3
F04	87	31	56	FIII	1
B12	75	31	44	FIII	1
Total					122

* Família I (FI) = GGGGW e variações^(GGGGG, GGGGA, GGGAG, GGAGG, GAGGG, AGGGG, GGGGU, GGGUG, GGUGG, GUGGG, UGGGG)

* Família II (FII) = GGGWW_a e variações^(GGGAU, GGAUG, GAUGG, AUGGG, GGGUA, GGUAG, GUAGG, UAGGG)

* Família III (FIII) = GGGWW_b e variações^(GGGAA, GGAAG, GAAGG, AAGGG, GGGUU, GGUUG, GUUGG, UUGGG)

Nota: W = A OU U; WW_a = AU ou UA; WW_b = UU ou AA

Muitos motivos de RNA desempenham um papel importante na transmissão da informação genética (TOULMÉ *et al.*, 2004). Os motivos da Família I foram os mais frequentes ocorrendo em 40% (49/122) das sequências analisadas. As sequências variando de 31-40 foram as que apresentaram um maior número dos motivos (38/122), sendo 34% (13/38) como parte da Família I e 63 % (24/38) da Família II.

O número de nucleotídeos que representa um motivo linear de RNA varia, como por exemplo, os estudos de ELLENBECKER e colaboradores (2012) trabalhando com caracterização de aptâmeros contra a proteína N do vírus da febre do vale de Rift encontrou um motivo contendo GAUU. Este motivo foi variável no número de repetições por RNA, a prevalência das variações do padrão GAUU numa elevada porcentagem dos RNAs isolados indicaram que pode ser uma sequência de reconhecimento importante para a proteína N.

Os autores DUCONGÉ & TOULMÉ (1999) selecionaram aptâmeros contra um *stem-loop* muito importante para a transcrição do genoma do vírus da imunodeficiência humana (HIV), chamado de elemento responsivo de transativação (TAR). Depois de dez *rounds* de seleção, os aptâmeros revelaram um motivo octâmero (5'-GUCCCAGA-3'), cujas seis bases centrais desta sequência consenso eram complementares ao *loop* de RNA do TAR. De acordo com os autores os ligantes selecionados ao TAR podem impedir a transcrição do genoma do HIV e o desenvolvimento do retrovírus, o que corrobora nossa hipótese para o genoma do DENV.

As frequências dos motivos presentes nas Famílias (I, II e III) e em cada classe de aptâmeros são apresentadas na Figura 5.5. O tamanho total dos aptâmeros escolhidos incluindo tanto a região fixa, composta dos *primers* utilizados na amplificação, como a região randômica variou de 41 a 187 nucleotídeos, e somente considerando a região randômica, o tamanho dos aptâmeros variou de 10 a 156 nucleotídeos com uma maior frequência no grupo ranqueado de 31 a 40 nucleotídeos presentes na região randômica.

Os aptâmeros foram divididos em grupos de acordo com o tamanho das sequências da região randômica. No grupo de tamanho inferior a 20 nucleotídeos e no grupo que possui de 20-30, a Família I foi mais frequente. No

grupo que possui de 31-40 nucleotídeos a Família II teve maior representatividade. O grupo de 41-50 e o que possui tamanho superior a 50 nucleotídeos apresentaram frequências semelhantes da Família I e III para o primeiro e Família I, II e III para o último.

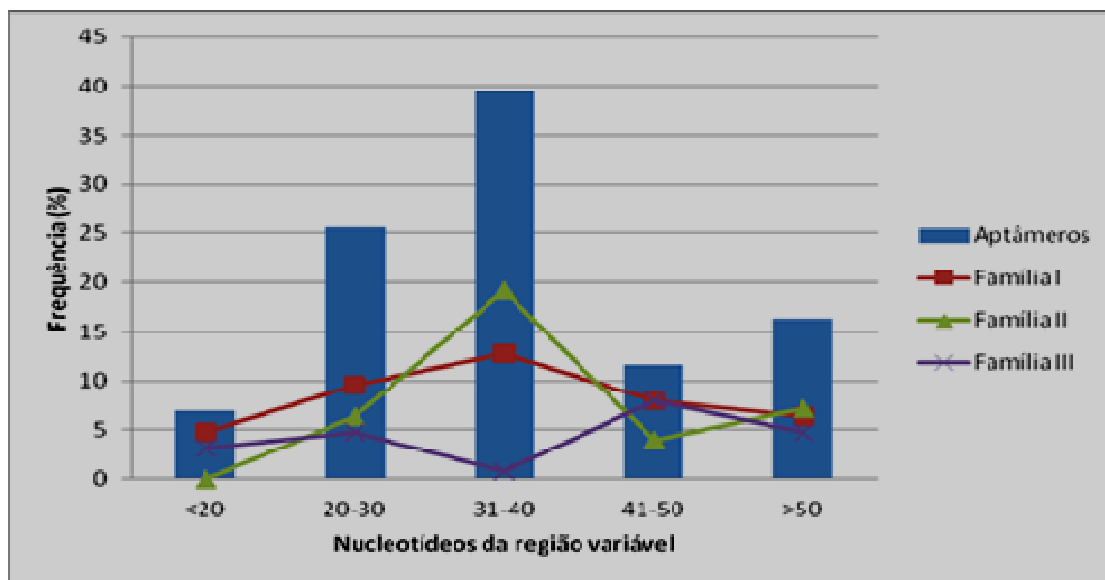


FIGURA 5.5- Frequência dos aptâmeros ranqueados pelo tamanho das sequências de nucleotídeos presentes na região variável e das famílias de motivos lineares, onde na Família I estão os motivos GGGW ($W = A$ ou U) e variações; na Família II os motivos GGGW_a ($W = AU$ ou UA) e variações; e na Família III estão os motivos GGGW_b ($W = UU$ ou AA) e variações.

Baseado nos motivos lineares as sequências que apresentaram número ≥ 4 e/ou contendo representantes de duas das três Famílias caracterizadas, foram agrupadas por *cluster* (Figura 5.6). No cluster A foram agrupados aptâmeros com similaridades baseados nos motivos anteriormente descritos, no cluster B foram agrupados quatro aptâmeros escolhidos aleatoriamente, que apresentam motivos diferentes daqueles apresentados na Tabela 1.

A partir da análise do *cluster* A os aptâmeros B07 e C03 foram considerados mais semelhantes entre si ambos apresentam motivos pertencentes às Famílias I e II. Já no *cluster* B os aptâmeros A05 e G02 foram considerados mais semelhantes entre si e ambos possuem quatro motivos lineares.

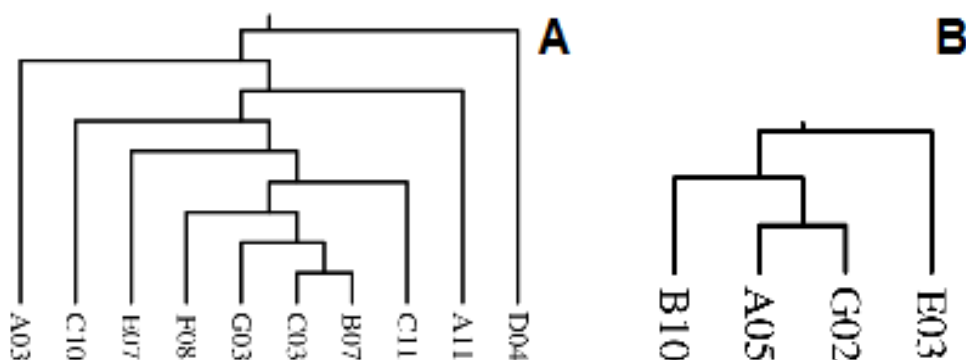


FIGURA 5.6- *Cluster* dos aptâmeros. A) Pareamentos de sequências realizados para sequência contendo pelo menos quatro dos motivos lineares (GGGW e/ou GGGWW e suas variações) e com sequências de tamanho total menor que 80 nucleotídeos. B) Pareamentos de quatro sequências escolhidas aleatoriamente dentre as que não apresentaram os motivos lineares (GGGW e/ou GGGWW e suas variações) e com sequências de tamanho total menor que 80 nucleotídeos.

Para realizar a predição da estrutura biomolecular, 14 aptâmeros (Tabela 5.2) foram escolhidos baseados na energia livre (ΔG) variando entre -14 e -20, ou com porcentagem de guanina e citosina (%GC) entre 55 e 60. Considerando que estas condições são importantes nas interações intermoleculares entre o alvo e o aptâmero, podendo conferir maior estabilidade entre essas moléculas. Além desses dados foram obtidos os locais aproximados de hibridização dos 14 aptâmeros ao DENV1 e ao DENV3.

A maioria dos aptâmeros apresentou um local aproximado de hibridização, tanto para o DENV1 quanto para o DENV3 de forma semelhante e variando em poucos pares de bases. Apenas os aptâmeros, C10, F08 e E03 apresentaram locais aproximados de hibridização muito diferentes para os dois sorotipos. Estes dados indicam que o uso combinado de dois ou mais dos aptâmeros selecionados, no presente trabalho, e que se ligam em posições diferentes ao alvo DENV podem ser ferramentas úteis para dificultar ou impedir o processo de replicação e/ou transcrição do DENV, assim como serem adaptados a biossensores para fins diagnósticos.

O possível uso destes aptâmeros na interferência do processo de replicação e/ou transcrição do DENV, baseia-se no fato de que a estrutura SLA presente na 5'-UTR viral revela ser essencial para a ligação específica e atividade da polimerase NS5 (FILOMATORI *et al.*, 2006). Assim, como a

ligação entre a NS5 e SLA demonstra ser necessária para a síntese de RNA viral (YU *et al.*, 2008).

A aplicação de biossensores para detectar o DENV foi descrita no trabalho de FLETCHER e colaboradores (2010) os quais utilizaram um complexo formado por um aptâmero/endonuclease de restrição transdutora de sinal e uma molécula de sinalização fluorescente. Nesse modelo, um *stem loop* acoplado ao oligonucleotídeo adaptado é empregado para a detecção do alvo de interesse e um complexo formado por uma endonuclease de restrição inibidora do aptâmero é o transdutor de sinal. Este sistema foi capaz de detectar especificamente sequências associadas com cada um dos quatro sorotipos do vírus da Dengue, assim como uma sequência de pan-Dengue comum para todos os sorotipos.

No que se refere às análises conformacionais a estrutura secundária é construída de subestruturas que contribuem para a energia livre da molécula fornecendo informações importantes sobre o reconhecimento molecular e interação de ácidos nucléicos com ligantes (PATEL & SURI, 2000), além de contribuir para a estabilidade e propriedades bioquímicas da molécula. Na maioria dos casos os nucleotídeos da região consenso estão localizados nos *loops* e *hairpins* que são estruturas mais prováveis de interagirem com o alvo.

As estruturas secundárias dos aptâmeros foram previstas pelo programa Mfold desenvolvido por ZUKER (2003) (Figura 5.7). O programa leva em consideração as interações entre os ribonucleotídeos e a energia livre da estrutura, o mesmo faz suas previsões considerando a concentração de NaCl (1M) e ausência de cátions divalentes. O tampão em que os aptâmeros foram solubilizados possui 100 mmol L^{-1} NaCl, 2 mmol L^{-1} MgCl_2 , 5 mmol L^{-1} KCl e 1 mmol L^{-1} CaCl_2 . A cadeia fosfodiéster dos oligonucleotídeos é polianiónica e a presença de cátions propicia o dobramento adequado das sequências (LILLEY *et al.*, 2003).

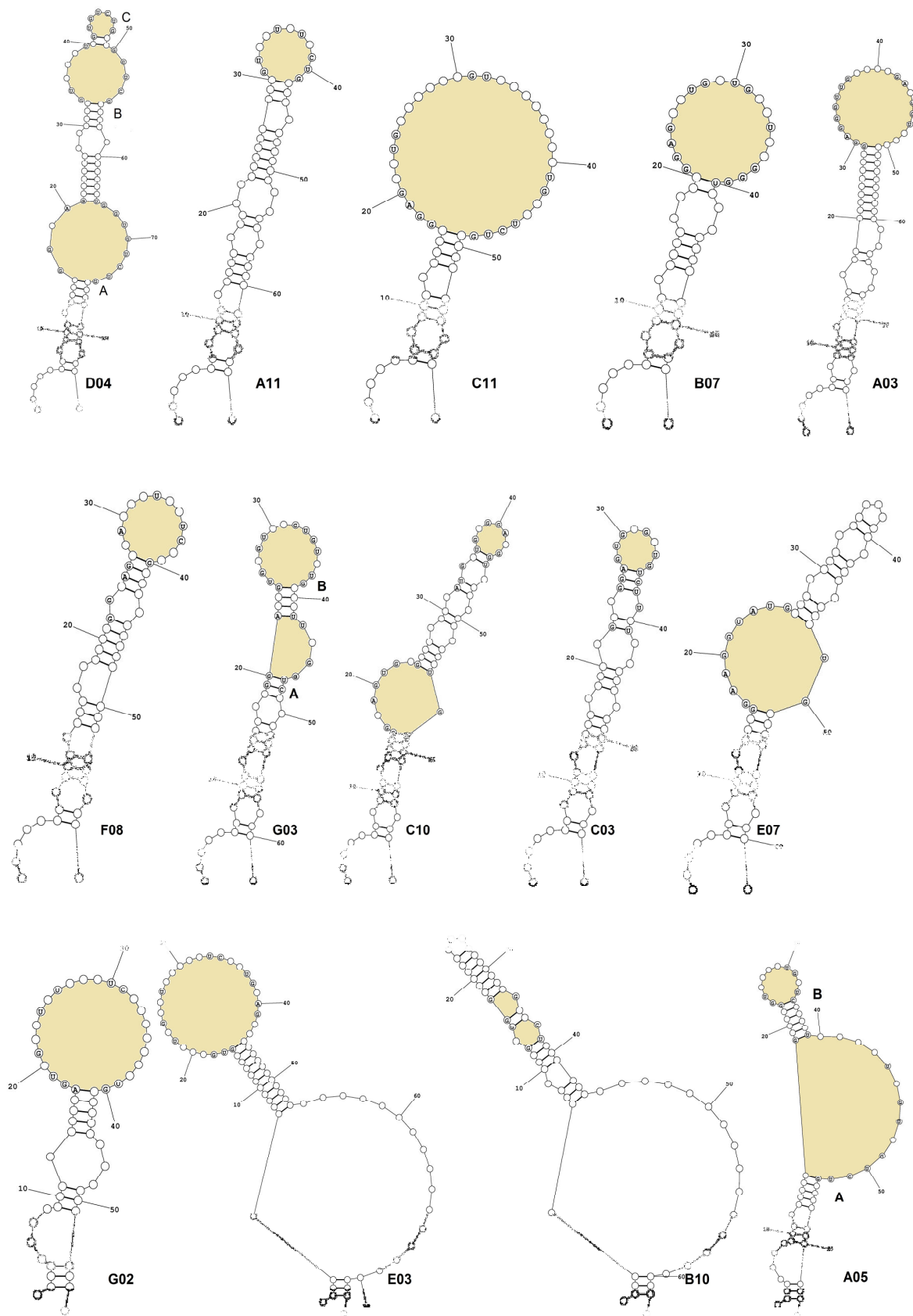


FIGURA 5.7- Representação da predição da estrutura secundária dos aptâmeros. As letras A, B e C representam os *harpins* e/ou *loops* dos aptâmeros apresentados no cluster A e B da figura 14.

As estruturas secundárias dos 14 ligantes selecionados indicaram a presença de um a três *loops/harpins* (Figura 5.7) de possíveis locais de ligação DENV. De acordo com CHUSHAK & STONE (2009) as bases de RNA desemparelhadas são mais flexíveis, podendo facilmente mudar sua conformação para formar uma “bolsa” de ligação e acomodar um ligante e/ou atuarem como doadoras ou receptoras de átomos para a formação de ligações de hidrogênio. As semelhanças estruturais entre estes aptâmeros podem indicar semelhanças funcionais quando ocorrer à hibridização com o alvo.

Algumas das bases comuns e não sequenciais presentes nos *hairpins* e/ou *loops* internos das estruturas secundárias dos aptâmeros apresentados na Figura 5.7 foram representados na Figura 5.8. Os aptâmeros B07 e C11 foram os mais semelhantes entre si, de forma semelhante ao dado obtido pela análise de *cluster*, apresentando as bases G-U-G-A-G-G numa porção do *loop*, podendo indicar motivos conformacionais de ligação ao DENV. Dados semelhantes foram encontrados para os aptâmeros C03 e G03 apresentando as bases U-G-G-U-G numa porção do *loop*.

ID Apt.	Motivos Estruturais (5'→3')																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
B07	G	G	A	G	U	G		U	G	U	G						G	G	U
A03	G	G	A	G		G	G	U		U	G				G	A	G	G	U
C10B			A		U	G		U	G		G				G	A	G	G	U
E03				G	U	G		U	G	U		U	C	U	G	A	G		
C11	G	G	A	G	U	G	G	U	G	U	G	U	C	U	G				
G02			A	G	U		G	U		U		U	C	U	G				
D04A	G	G	A	G	U	G	G	U	G			U	C	U	G				
C03	G	G	A	G	U	G	G	U	G	U	G	U	C	U	G				
F08	G	G	A		U			U				U	C		G				
D04B							G	U		U	G		C	U	G				
D04C							G	U	G			U	C	U	G				
A11							G	U		U		U	C	U	G				
B10	G			G		G	G		G				C	U					
G03A	G	G	A		U			U	G		G	U	C						
G03B				G	U	G	G	U	G	U	G	U		U	G				
E07A	G	G	A			G	G	U		U	G			U	G				
A05A				G	U			U	G	U	G	U	C	U	G				
C10A	G	G	A	G	U	G	G	U	G				C						
A05B					G	G	U		U	G	U	C							

FIGURA 5.8- Quadro representativo de algumas das bases comuns e não sequenciais presentes nos *hairpins* e/ou *loops* internos das estruturas secundárias dos aptâmeros apresentados na Figura 15.

A estrutura secundária da 5'-UTR do DENV1 e 3 também foram preditas (Figura 5.9a), mostrando que há semelhança entre as duas estruturas e

apresentam a mesma energia livre o que contribui para uma estabilidade análoga ao ligarem-se ao alvo. O alinhamento das sequências dos dois sorotipos mostra que há quatro sítios de mutação (A/C, A/G, A/U e U/G) nesta região analisada, a quantidade e o tipo de mutações na 5'-UTR dos dois tipos virais corroboram com os trabalhos de POLACEK e cols. (2009).

Para representar a possível alteração na estrutura conformacional do DENV devido à interação com o ligante foi utilizado o aptâmero B07 (Figura 5.9b). A interação do aptâmero ao alvo por hibridização (ligações Watson & Crick e/ou *wobble* 'G/U') levou a uma alteração na estrutura de ambos sorotipos, DENV1 e 3, sugerindo que o mesmo pode ocorrer também com os sorotipos 2 e 4. Assim como para o aptâmero B07 os demais aptâmeros selecionados podem ser potenciais para uso em estudos funcionais, como alterações na expressão de genes específicos pós-infecção do mosquito pelo vírus, no diagnóstico e/ou terapia da doença.

6- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Segundo MIYAZAKI & FUJITA (2012), cerca de duas décadas se passaram desde a descrição do método de seleção de aptâmeros por SELEX e suas aplicações estão aumentando e se tornando cada vez mais sofisticadas, sendo o atual momento uma oportunidade para que as pesquisas em viroses considerem o uso de aptâmeros.

Dentre as várias novas perspectivas que os dados aqui apresentados abrem no escopo das análises moleculares de aptâmeros e viroses, podem-se destacar algumas. Os aptâmeros aqui selecionados podem ser utilizados como ferramentas diagnósticas e/ou terapêuticas, pois os mesmos mostraram afinidade ao DENV1 e 3, além disso as análises *in silico* indicam que quando há interação do aptâmero ao alvo, o mesmo pode mudar a estrutura conformacional do alvo levando à perda de sua conformação original, podendo desta forma dificultar ou impedir a replicação bem como o processo de transcrição do DENV, o que impediria a tradução das proteínas virais, tais como: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5, necessárias ao processo infeccioso.

Esses aptâmeros ainda indicam ter um amplo espectro de hibridização ao DENV mesmo na presença das mutações que distinguem os tipos virais, os quais poderiam ser utilizados para os outros dois sorotipos, DENV2 e 4, além de novos subtipos virais que possam vir a ser encontrados, uma vez que a 5'-UTR dos quatro sorotipos são estruturalmente semelhantes entre si.

Por fim, esses aptâmeros poderão ser testados *in vitro*, em experimentos com culturas de células pré e pós transfecção dos mesmos e, para isso, realizar testes de modificações para aumentar a estabilidade do ligante no citoplasma celular. Dentre as modificações, destacam-se a troca de um OH na posição 2' da ribose por 2'F ou 2'NH₂ o que leva a uma maior proteção do ligante de RNA ao ataque de nucleases endógenas. Através desse capeamento terminal com moléculas pequenas tais como: amina, grupo fosfato, ou resíduo de timidina e outras bases não naturais (FERREIRA & MISSAILIDIS, 2007). Os nucleotídeos modificados têm sido introduzidos em experiências de seleção, resultando no isolamento de aptâmeros que são

surpreendentemente estáveis *in vivo* (LATHAN & TOOLE, 1994), além disso, os aptâmeros aqui selecionados poderão ser avaliados em testes rápidos de biossensoriamento.

7- CONCLUSÃO

A seleção de RNA ligantes à região 5'-UTR do DENV1 e 3 realizada após oito *rounds* pelo método *SELEX* Genômico e a caracterização *in silico* dessas moléculas demonstrou a potencial aplicação dos aptâmeros aqui caracterizados como ferramenta diagnóstica e/ou terapêutica, bem como sua adaptação para o biossensoriamento com afinidade e seletividade ao DENV1 e 3.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCON, S.; TALARMIN, S.; DEBRUYNE, M.; FALCONAR, A.; DEUBEL, V. & FLAMAND, M. "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Specific to Dengue Virus Type 1 Nonstructural Protein NS1 Reveals Circulation of the Antigen in the Blood during the Acute Phase of Disease in Patients Experiencing Primary or Secondary Infections". *J Clin Microbiol.*, 2: 381, **2002**.

ALVAREZ, D. E.; FILOMATORI, C.V. & GAMARNIK, A.V. 2008. "Functional analysis of dengue virus cyclization sequences located at the 5' and 3'UTRs". *J. Virol.*, 375: 235, **2008**.

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

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". *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 75: 715, **2006**.

BARRETO, M. I & TEIXEIRA, M. G. "Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa". *Estudos Avançados.*, 22: 64, **2008**.

BATES, P.J.; LABER, D.A.; MILLER, D.M.; THOMAS, S.D. & TRENT, J.O. "Discovery and development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer". *Exp Mol Pathol.*, 86: 164, **2009**.

BINNING, J. K.; LEUNG, D. W. & AMARASINGHE, G. K. "Aptamers in virology: recent advances and challenges". *Front. Microbiol.*, 3: 29, **2012**.

BLACKSELL, S. D., P. N. NEWTON, D. BELL, J. KELLEY, M. P. MAMMEN, JR., D. W. VAUGHN, V. WUTHIEKANUN, A. SUNGKAKUM, A. NISALAK, & N. P. DAY. "The comparative accuracy of commercial rapid immunochromatographic assays for the diagnosis of acute dengue virus infection". *Clin. Infect. Dis.*, 42: 1134, **2006**

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. “Balanço Dengue Janeiro a Setembro de 2007”.

<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/balanco_dengue_setembro.pdf>.

Acesso em: 10 agosto 2013.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. “Informe epidemiológico da Dengue, Janeiro Março de 2011”.

<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_dengue_2011_janeiro_e_marco_13_04.pdf>. Acesso em: 10 agosto 2013.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. “Combate à Dengue - Brasil registra queda de 62% nos casos da doença”, 2012.

<http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalleNoticia&id_area=1498&CO_NOTICIA=13720>. Acesso em: 10 agosto 2013.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. “Boletim 1/2012 - Dengue: situação epidemiológica”.

[http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/index.cfm?portal=pagina.visualizarTexto&codConteudo=6407&codModuloArea=783&chamada=boletim-](http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/index.cfm?portal=pagina.visualizarTexto&codConteudo=6407&codModuloArea=783&chamada=boletim-10/10/2012)

10/10/2012. Acesso em: 10 agosto 2013.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. “Casos graves de dengue caem 44% e mortes têm retração de 20%”.

<<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/9531/785/casos-graves-de-dengue-caem-44-e-mortes-tem-retracao-de-20.html>>. Acesso em: 10 agosto 2013.

BRINSON, R.G.; SZAKAL, A.L. & MARINO, J.P. “Structural Characterization of the Viral and cRNA Panhandle Motifs from the Infectious Salmon Anemia Virus”. *J Virol.*, 24: 13408, **2011**.

CHELLISERRYKATILL, J. & ELLINGTON, A. D. “Evolution of a T7 RNA polymerase variant that transcribes 2'-O-methyl RNA”. *Nature Biotechnol.*, 22: 1160, **2004**.

CHEMISTRY WORD. “ Discoveries of the last six decades - 60 years of innovation”. <<http://www.rsc.org/chemistryworld/>> Acesso em: 10 setembro 2013.

CHUSHAK, Y. & STONE, M.O. “In silico selection of RNA aptâmeros”. *Nucleic Acids Res.*, 37: 9, **2009**.

- CLYDE, K.; BARRERA, J. & HARRIS, E. "The capsid-coding region hairpin element (cHP) is a critical determinant of dengue virus and West Nile virus RNA synthesis". *J. Virol.*, 379: 323, **2008**.
- DEY, A.K.; GRIFFITHS, C.; LEA, S. M. & JAMES, W. "Structural characterization of an anti-gp120 RNA aptamer that neutralizes R5 strains of HIV-1". *RNA.*, 11: 884, **2005a**.
- DEY, A.K.; KHATI, M.; TANG, M.; WYATT, R.; LEA, S. M. & JAMES, W. "An aptamer that neutralizes R5 strain of human immunodeficiency virus type 1 blocks gp120-CCR5 interaction". *J. Virol.*, 79: 13810, **2005b**.
- DONG, H.; B. ZHANG. & SHI, P.Y. "Terminal structures of West Nile virus genomic RNA and their interactions with viral NS5 protein". *J. Virol.*, 381: 135, **2008**.
- DUCONGÉ, F. & TOULMÉ, J.J. "In vitro selection identifies key determinants for loop-loop interactions: RNA aptamers selective for the TAR RNA element of HIV-1". *RNA.*, 5: 1614, **1999**.
- ELLENBECKER, M.; SEARS, L.; LI, P.; LANCHY, J.M. & LODMELL, J.S. "Characterization of RNA aptamers directing against the nucleocapsid protein of Rift Valley fever virus". *Antiviral Res.*, 93: 339, **2012**.
- ELLINGTON, A.D. & SZOSTAK, J.W. "In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands". In: *Nature.*, 346: 822, **1990**.
- FERREIRA, C.S.M. & MISSAILIDIS, S. "Aptamer-based Therapeutics and their Potential in Radiopharmaceutical Design". *Brazilian archives of Biology and technology.*, 50: 76, **2007**.
- FIGUEIREDO, M.L.G.; ALFONSO, H.L.; AMARILLA, A.A.; FIGUEIREDO, L.T.M.; AQUINO, V.H.; COSTA, C.A. & LUZ S.L.B. "Detection of DENV-4 genotype I from mosquitoes collected in the city of Manaus, Brazil". *J. Virol.*, 10: 60, **2013**.
- FIGUEIREDO, R.M.P.; NAVECA, F.G.; BASTOS, M.S.; MELO, M.N.; VIANA, S.S.; MOURÃO, M.P.G.; COSTA, C.A. & FARIAS, I.P. "Dengue virus type 4, Manaus". *Emerg Infect Dis.*, 14: 669, **2008**.
- FILOMATORI, C.V.; LODEIRO, M.F.; ALVAREZ, D.E.; SAMSA, M.M.; PIETRASANTA, L. & GAMARNIK, A.V. A. "5' RNA element promotes dengue virus RNA synthesis on a circular genome". *Genes Dev.*, 20: 2249, **2006**.

- FLETCHER, S. J.; PHILLIPS, L. W.; MILLIGAN, A. S. & RODDA, S. J. "Toward specific detection of Dengue virus serotypes using a novel modular biosensor". *Biosens Bioelectron.*, 26: 1700, **2010**.
- FRIEBE, P. & HARRIS, E. "Interplay of RNA Elements in the Dengue Virus 5' and 3' Ends Required for Viral RNA Replication". *J. Virol.*, 84: 6118, **2010**.
- GEBHARD, L. G.; FILOMATORI, C. V. & GAMARNIK, A. V. "Functional RNA Elements in the Dengue Virus Genome". *Viruses.*, 3: 1756, **2011**.
- GIEGERICH, R.; VOSS, B. & REHMSMEIER, M. "Abstract Shapes of RNA". *Nucleic Acids Res.*, 32: 4851, **2004**.
- GOLD, L. "Globular oligonucleotide screening via the SELEX process: aptamers as high-affinity, high-specificity compounds for drug development and proteomic diagnostics". In: *Combinatorial chemistry and technology: principles, methods, and applications*. Editora CRC Press, 2ª Edição. 1999 p. 389-403.
- GOMES, K.N. "Seleção in vitro de aptâmeros de RNA como ligantes do receptor purinérgico P2Y2". São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica) – USP, 2010. Tese de doutorado, 100p.
- GREEN, L. S.; BELL, C. & JANJIC, N. "Aptamers as reagents for high-throughput screening". *BioTechniques.*, 30: 1100, **2001**.
- GREEN, N. M. "Avidin". *Adv. Protein Chem.*, 29: 133, **1975**.
- GUBLER, D.J. "Dengue and dengue hemorrhagic fever". *Clin. Microbiol.*, 11: 496, **1998**.
- GUZMÁN, M.G. & KOURI, G. "Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges". *J. Clin. Virol.*, 27: 13, **2003**.
- GUZMÁN, M.G. & KOURI, G. "Dengue diagnosis, advances and challenges". *Int J of Infect Dis.*, 8: 80, **2004**.
- GUZMAN, M.G. & VAZQUEZ, S. "The Complexity of Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Infection". *Viruses.*, 12: 2662, **2010**.
- HAHN, C.S.; HAHN, Y.S.; RICE, C.M.; LEE, E.; DALGARNO, L.; STRAUSS, E.G. & STRAUSS, J.H. "Conserved elements in the 3' untranslated region of flavivirus RNAs and potential cyclization sequences". *J. Mol. Biol.*, 198: 41, **1987**.
- HALSTEAD, S. B. "Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology". *Science.*, 239: 481, **1988**.

- HARAGUCHI, Y.; KUWASAKO, K.; MUTO, Y.; BESSHO, Y.; NISHIMOTO, M.; YOKOYAMA, S.; KANAI, A.; KAWAI, G. & SAKAMOTO, T. "Characterization of RNA aptamers against SRP19 protein having sequences different from SRP RNA". *Nucleic Acids Symposium Series*, 2009, p. 265-266.
- HESELBERG, J.R.; ROBERTSON, M.P.; KNUDSEN, S.M. & ELLINGTON, A.D. "Simultaneous detection of diverse analytes with an aptazyme ligase array". In: *Anal Biochem.*, 312: 112, **2003**.
- IGLESIAS, N.G. & GAMARNIK, A.V. "Dynamic RNA structures in the dengue virus genome". *RNA Biol.*, 8: 257, **2011**.
- KANWAR, J.R.; MOHAN, R.R.; KANWAR, R.K.; ROY, K. & BAWA, R. "Applications of aptamers in nanodelivery systems in cancer, eye and inflammatory diseases". *Nanomedicine.*, 5: 1445, **2010**.
- KAO, C. C.; CHAO, D. Y.; WU, H. L.; CHANG, G. L. "Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health". *J Microbiol Immunol Infect.*, 38: 16, **2005**.
- KAPOOR, M.; ZHANG, L.; RAMACHANDRA, M.; KUSUKAWA, J.; EBNER, K.E. & PADMANABHAN, R. "Association between NS3 and NS5 proteins of dengue virus type 2 in the putative RNA replicase is linked to differential phosphorylation of NS5". *J Biol Chem.*, 32: 19106, **1995**.
- KATO, Y.; MINAKAWA, N.; KOMATSU, Y.; KAMIYA, H.; OGAWA, H.; HARASHIMA, H. & MATSUDA, A. "New NTP analogs: the synthesis of 4'-thioUTP and 4'-thioCTP and their utility for SELEX". *Nucleic Acids Res.*, 33: 2951, **2005**.
- KLUSSMANN, S.; NOLTE, A.; BALD, R.; ERDMANN, V.A, & FÜRSTE, J.P. "Mirror-image RNA that binds D-adenosine". In: *Nat Biotechnol.*, 14: 1115, **1996**.
- 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.*, 108: 725, **2002**.
- KYLE, J.L. & HARRIS, E. "Global spread and persistence of dengue". *Annu. Rev. Microbiol.*, 62: 92, **2008**.

- LATHAN, J.A. J. R. & TOOLE, J. J. "The application of a modified nucleotide in aptamer selection: novel trombin aptamers containing 5-(1-pentynyl)-2' deoxyuridine. *Nucleic. Acids. Res.*, 22: 2822, **1994**.
- LEE, J. F.; STOVALL, G. M.; ELLINGTON, A. D: "Aptamer therapeutics advance". *Curr Opin Chem Biol.*, 10: 289, **2006**.
- LI, D.; LOTT, W.B.; LOWRY, K.; JONES, A.; THU, H.M. & AASKOV, J. "Defective Interfering Viral Particles in Acute Dengue Infections" . *PLoS ONE.*, 4: 12, **2011**.
- LILLEY, D.M. " The origins of RNA catalysis in ribozymes". *Trends. Biochem. Sci.*, 28: 501, **2003**.
- LO, M.K.; TILGNER, M.; BERNARD, K.A. & SHI, P.Y." Functional analysis of mosquito-borne flavivirus conserved sequence elements within 3' untranslated region of west nile virus by use of a reporting replicon that differentiates between viral translation and RNA replication". *J. Virol.* 77: 10014, **2003**.
- MACIEL, I. J.; SIQUEIRA, J. B.; MARTELLI, C. M. "Epidemiologia e Desafios no Controle da Dengue". *Rev Patol Tropic.*, 37: 130, **2008**.
- MIYAZAKI, Y & FUJITA, M. "Commentary on aptamers for virus research". *Front. Microbio .*,3: 52, **2012**.
- NAGARKATTI, R.; BIST, V.; SUN, S.; FORTES DE ARAUJO, F.; NAKHASI, H.L. & DEBRABANT, A. "Development of an Aptamer-Based Concentration Method for the Detection of *Trypanosoma cruzi* in Blood". *PLoS ONE.*, 8: 12, **2012**.
- NATHAN, M. B. & DAYAL-DRAGER, R. "Epidemiological Trends, the Global Strategy and Public Health Advances in Dengue" *Negl Trop Dis.*, 30-34, 2007.
- NG, E.W.; SHIMA, D.T.; CALIAS, P.; CUNNINGHAM, E.T.JR.; GUYER, D.R. & ADAMIS, A.P. "Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease". In: *Nat Rev Drug Discov.*, 5: 132, **2006**.
- NUNES, M.R.; FARIA, N.R.; VASCONCELOS, H.B.; MEDEIROS, D.B.; DE LIMA, C.P. S.; CARVALHO, V.L.; DA SILVA, E.V. P.; CARDOSO, J.F.; SOUSA, E.C. & NUNES, K.N. " Phylogeography of dengue vírus serotype 4, Brazil, 2010-2011". *Emerg Infect Dis.*, 18: 1864, **2012**.

- OSANAI, C.H.; TRAVASSOS DA ROSA, A.P.; TANG, A.T.; AMARAL, R.S.; PASSOS, A.D & TAUIL, P.L. "Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report". *Rev Inst Med Trop.*, 25: 54, **1983**.
- OSTRONOFF, M.; OSTRONOFF, F.; FLORENCIO, R.; FLORÊNCIO, M.; DOMINGUES, M.C.; CALIXTO, R.; SUCUPIRA, A.; SOUTO MAIOR, A.P.; MATIAS, C.; MATIAS, K.; TAGLIARI, C. & SOUSSAIN, C. "Serious thrombocytopenia due to dengue hemorrhagic fever treated with high dosages of immunoglobulin". *Clin Infect Dis.*, 36: 1624, **2003**
- PAGRATIS, N.C.; BELL, C.; CHANG, Y.F.; JENNINGS, S.; FITZWATER, T.; JELLJNEK, D. & DANG, C. "Potent 2'- amino-, and 2'-fluoro-2'-deoxyribonucleotide RNA inhibitors of keratinocyte growth factor". In: *Nat Biotechnol.* 15: 73, **1997**.
- PATEL, D.J. & SURI, A. K. "Structure, recognition and discrimination in RNA aptamer complexes with cofactors, amino acids, drugs and aminoglycoside antibiotics". *Rev. Mol. Biotechnol.*, 74: 60, **2000**.
- POLACEK, C.; FOLEY, J.E. & HARRIS, E. "Conformational Changes in the Solution Structure of the Dengue Virus 5' End in the Presence and Absence of the 3' Untranslated Region". *J. Virol.*, 83: 1166, **2009**.
- POLONI, T.; OLIVEIRA, A.; ALFONSO, H.; GALVÃO, L.; AMARILLA, A.; POLONI, D.; FIGUEIREDO, L. & AQUINO, V. "Detection of dengue virus in saliva and urine by real time RT-PCR" *J.Virol.*, 7: 22, **2010**.
- RAY, P & WHITE, R.R. "Aptamers for targeted drug delivery". *Pharmaceuticals.*, 3: 1778, **2010**.
- REYES-REYES, E. M.; TENG, Y. & BATES, J. "A new paradigm for aptamer therapeutic AS1411 action: uptake by macropinocytosis and its stimulation by a nucleolin-dependent mechanism," *Cancer Res.*, 70: 8629, **2010**.
- RODENHUIS-ZYBERT, I.A.; WILSCHUT, J. & SMIT, J.M. "Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity". *Cell Mol. Life Sci.*, 67: 2786, **2010**.
- SAN MARTÍN, J. L; BRATHWAITE, O.; ZAMBRANO, B.; SOLÓRZANO, J. O.; BOUCKENOOGHE, A.; DAYAN, G. H. & GUZMÁN, M. G. "The Epidemiology of Dengue in the Americas Over the Last Three Decades: A Worrisome Reality" *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 82: 135, **2010**.

- SANO, T.; VAJDA, S.; REZNIK, G.O.; SMITH, C.L. & CANTOR, C.R. "Molecular Engineering of Streptavidin". *Annals New York Academy of Sciences*, New York –USA, 1996, p.383-390.
- SHURTLEFF, A.C.; BEASLEY, D.W.; CHEN, J.J.; NI, H.; SUDERMAN, M.T.; WANG, H.; XU, R.; WANG, E.; WEAVER, S.C. & WATTS, D.M. "Genetic variation in the 3' non-coding region of dengue viruses". *J. Virol.*, 281: 87, **2001**.
- SIGMA ALDRICH. Sigma production or quality control. <<http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>>. Acesso em 20 de novembro 2013.
- SINGER, B.S.; SHTATLAND, T.; BROWN, D. & GOLD, L. "Libraries for genomic SELEX". *Nucleic Acids Res.*, 25: 786, **1997**.
- STOLTENBURG, R.; REINEMANN, C. & STREHLITZ, B. "SELEX – A revolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands". *Biomol Eng.*, 24: 403, **2007**.
- STORCK, S.; SHUKLA, M.; DIMITROV, S. & BOUVET, P. "Functions of the histone chaperone nucleolin in diseases". *Subcell Biochem.*, 41: 144, **2007**.
- SUZUKI, R.; BORBA, L.; SANTOS, C.N.D & MASON, P.W. "Construction of an infectious cDNA clone for a Brazilian prototype strain of dengue virus type 1: characterization of a temperature-sensitive mutation in NS1". *J. Virol.*, 2: 383, **2007**.
- TOULMÉ, J.J.; DI PRIMO, C. & BOUCARD, D." Regulating eukaryotic gene expression with aptâmeros". *FEBS Lett.*, 567: 62, **2004**.
- TUERK, C & GOLD, L. "Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase". In: *Science.*, 249: 510, **1990**.
- ULRICH, H. & TRUJILLO, C.A. "Aptâmeros: Uma nova ferramenta biotecnológica. Bases moleculares da Biotecnologia". Editora Roca Ltda, 1ª Edição. 2008. p. 37-54.
- ULRICH, H. & WRENGER, C. "Disease-specific biomarker discovery by aptamers". *CytometryA.*, 75: 733, **2009** .
- VAJDA, S.; WENG, Z.; ROSENFELD, R. & DELIS, C. "Effect of conformational flexibility and solvation on receptor-ligand binding free energies". *Biochem.*, 33: 13988, **1994**.

- WANG, J.; JIANG, H. & LIU, F. "In vitro selection of novel RNA ligands that bind human cytomegal virus and block viral infection". *RNA*, 6: 583, **2000**.
- WILLIS, M.C.; COLLINS, B.D.; ZHANG, T.; GREEN, L.S.; SEBESTA, D.P.; BELL, C.; KELLOGG, E.; GILL, S.C.; MAGALLANEZ, A.; KNAUER, S.; BENDELE, R.A.; GILL, P.S. & JANJIĆ, N. "Liposome- anchored vascular endothelial growth factor aptamers". In: *Bioconjug Chem.*, 9: 582, **1998**.
- WONGPHATCHARACHAI, M.; WANG, P.; ENOMOTO, S.; WEBBY, R.J.; GRAMER, M.R.; AMONSIN, A. & SREEVATSAN, S. "Neutralizing DNA Aptamers against Swine Influenza H3N2 Viruses". *J. Clin. Microbiol.*, 51: 54, **2013**.
- 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*, 374: 185, **2008**.
- ZANDI, K.; TEOH, B.T.; SAM, S.; WONG, P., MUSTAFA, M.R. & BAKAR, S.A. "In vitro antiviral activity of Fisetin, Rutin and Naringenin against Dengue virus type-2". *J Med Plant Res.*, 5: 5539, **2011**.
- ZHOU, J.; BATTIG, M.R. & WANG, Y. "Aptamer-based molecular recognition for biosensor development". *Anal. Bioanal. Chem.*, 398: 2480, **2010**.
- ZUKER, M. "Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization Prediction". *Nucleic Acids Res.*, 31: 3415, **2003**.