



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
Mestrado em Saúde Pública



Andréa Nazaré Monteiro Rangel da Silva

**IDENTIFICAÇÃO DE EPÍTOPOS DE CÉLULA B NA
GLICOPROTEÍNA-E DO ENVELOPE DO VÍRUS
DENGUE SOROTIPO 3.**

RECIFE
2007

ANDRÉA NAZARÉ MONTEIRO RANGEL DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO DE EPÍTOPOS DE CÉLULA B NA GLICOPROTEÍNA-E DO
ENVELOPE DO VÍRUS DENGUE SOROTIPO 3.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública, do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Sílvia Maria Lucena Montenegro
Co-orientadora: Dra. Patrícia Broto Furtado

Recife, 2007

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

- S586a Silva, Andréa Nazaré Monteiro Rangel da.
Projeto: Identificação de epítomos de célula B na glicoproteína-E do envelope do vírus dengue sorotipo 3./ Andréa Nazaré Monteiro Rangel da Silva. _Recife: A. N. M. R. da Silva, 2006.
111 p.
- Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, dez. 2006.
Orientadora: Sílvia Maria Lucena Montenegro.
- 1.Dengue. 2.Epítomos de linfócito B. 3. Peptídeos. I. Montenegro, Sílvia Maria Lucena. II. Título.
CDU 616.98
-

ANDRÉA NAZARÉ MONTEIRO RANGEL DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO DE EPÍTOPOS DE CÉLULA B NA GLICOPROTEÍNA-E DO
ENVELOPE DO VÍRUS DENGUE SOROTIPO 3.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública, do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em ____/____/____

Banca Examinadora

Dra. Sílvia Maria Lucena Montenegro (Orientadora)
Departamento de Imunologia do CPqAM/FIOCRUZ

Dra. Valéria Pereira (Revisor/Titular Interna)
Departamento de Imunologia do CPqAM/FIOCRUZ

Dra. Maria Rosângela Duarte Coêlho (Titular Externa)
Laboratório de Virologia do LIKA

Dra. Laura Vega Gil (Suplente Interna)
Laboratório de Virologia e Terapia Experimental do CPqAM/FIOCRUZ

Dra. Patrícia Moura (Suplente Externa)
Departamento de Patologia do Instituto de Ciências Biológicas da UPE

**“PEDRAS NO CAMINHO? GUARDO TODAS!
UM DIA VOU CONSTRUIR UM CASTELO.”**

(FERNANDO PESSOA)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, meu alicerce, por todas as oportunidades que me foram dadas, pelo apoio de sempre, por todo carinho, força e amor incondicional.

Ao Dr. Ernesto Marques, chefe do Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LAVITE), pela confiança em me passar este projeto, por todo incentivo, colaboração e conhecimento compartilhado.

À minha orientadora, Dra. Sílvia Montenegro, por ter aceito entrar neste desafio comigo, pela confiança, pelo otimismo, dedicação, eterno incentivo e amizade.

À minha co-orientadora, Dra. Patrícia Furtado, da University College London, que nem mesmo a distância fez perder o interesse pelo nosso trabalho, pela paciência nos ensinamentos (mesmo por telefone) e pela amizade.

Ao colaborador Dr. Frederico Abath, por ter sido muito mais que um colaborador, um segundo co-orientador, pelas injeções de ânimo, por todas as observações e sugestões inteligentes, indispensáveis para a realização deste projeto.

À Marli Tenório, colaboradora e doutoranda do LAVITE, pela valiosa contribuição durante a realização deste e de muitos trabalhos, por toda a ajuda no fornecimento de informações e de materiais, pela troca de experiências em Virologia e pela amizade.

Ao pós-doc Eduardo Nascimento, do LAVITE, pelas conversas, amizade, disponibilidade e paciência.

À coordenação do curso de pós-graduação, em especial a Nalva e Nilda, da Secretária Acadêmica, por toda a boa vontade e ajuda prestada nestes dois anos.

Aos novos amigos feitos durante o mestrado, em especial a Luíza (Lui), Filipe (Leish), Karina (Kari) e Bruna (Bubú) por terem tornado estes dois anos mais alegres, por toda ajuda, pelo eterno incentivo e pela amizade!

A todos da família LAVITE, pela convivência e amizade que tornaram o trabalho menos árduo!

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho, MUITO OBRIGADA!!!!!!!!

RESUMO

As infecções pelo vírus dengue têm se tornado um problema crescente de Saúde Pública em regiões tropicais e subtropicais do mundo. O vírus pertence à família *Flaviviridae* com quatro sorotipos antigenicamente distintos (DENV-1 a DENV-4). Não existe, até o momento, terapia antiviral efetiva e o desenvolvimento de uma vacina continua sendo um desafio, já que a mesma deve ser capaz de desencadear proteção contra os quatro sorotipos simultaneamente. Uma possível estratégia para evitar a patogenia associada com uma vacina para o dengue, seria a construção de uma vacina quimérica composta de epítomos críticos selecionados dos quatro sorotipos. A maioria dos epítomos envolvidos na neutralização do vírus está presente na glicoproteína E do envelope, que é a maior proteína de superfície da partícula viral. O objetivo deste trabalho foi identificar epítomos de célula B na glicoproteína E do vírus dengue sorotipo 3. Para o mapeamento de epítomos imunodominantes, noventa e cinco peptídeos (15-mers cada, sobreposição de 10) foram sintetizados (Synpep, California-USA), a partir da sequência de 490 aminoácidos da glicoproteína E do envelope do DENV-3, de cepa circulante no Brasil. Estes peptídeos foram testados por ELISA contra um pool de soros de pacientes positivos e negativos para dengue, coletados durante a fase de convalescença da infecção por DENV-3. Os resultados mostraram que os soros de humanos reagiram com onze, dos noventa e cinco peptídeos testados, distribuídos em 5 regiões com aminoácidos na posições 51-65 (peptídeo 11), 71-90 (peptídeos 15 e 16), 131-170 (peptídeos 27, 28, 29, 30, 31 e 32), 196-210 (peptídeo 40) e 246-260 (peptídeo 50). A análise da curva ROC mostrou que, dentre os peptídeos identificados, nove seriam capazes de diferenciar entre pacientes com DENV-3 de pacientes não-dengue e três capazes de diferenciar a infecção por DENV-3 daquelas por outros sorotipos virais (DENV-1 e DENV-2). Assim, nosso estudo identificou epítomos imunodominantes IgG específicos na glicoproteína E do DENV-3. Os peptídeos aqui descritos, junto com outros epítomos bem documentados são potencialmente relevantes para o desenho de uma vacina para o vírus dengue e para o desenvolvimento de kits de diagnóstico específicos.

Palavras-chave: dengue, epítomos de linfócito B, peptídeos.

ABSTRACT

Dengue virus infection is a growing global public health concern in tropical and subtropical regions of the world. The virus belongs to the Flaviviridae family with 4 antigenically distinct serotypes (DENV-1 to DENV-4). There is no antiviral therapy available and development of a dengue vaccine has proved to be elusive due to the requirement of the vaccine to elicit protection against all four serotypes simultaneously. One possible strategy to avoid pathogeny associated with a dengue vaccine would be to construct a chimeric vaccine composed of selected critical epitopes of the four serotypes. The majority of the epitopes involved in dengue neutralization are on the envelope (E) glycoprotein, which is the major surface protein of the viral particles. The aim of the present investigation is to identify B cell epitopes in the E glycoprotein elicited by natural dengue virus type 3 infections. For mapping immunodominant epitopes, ninety five peptides (each with 15-mers, overlap of 10) were synthesized (Synpep, California-USA), covering the 490 amino acids (aa) of the E-protein sequence deduced from the genome of a Dengue 3 isolate from Brazil. These peptides were tested by ELISA against a pool of positive and negative dengue patient sera collected during the convalescent phase of dengue 3 infection as determined by PCR. The results showed that the human sera reacted with eleven of the 15-mer peptides, distributed in 5 regions at amino acid positions 51-65 (peptide 11), 71-90 (peptide 15 and 16), 131-170 (peptide 27, 28, 29, 30, 31 and 32), 196-210 (peptide 40) and 246-260 (peptide 50). The ROC curve analysis showed that, from all identified peptides, nine would be able to discriminate between DENV-3 infection and non dengue and that three of them, would be able to differentiate DENV-3 infections from those with other viral serotypes (DENV-1 and DENV-2). In conclusion, our study identified several immunodominant IgG-specific epitopes on the envelope of DENV-3. The peptides described here in conjunction with other well documented epitopes are potentially relevant for the development of diagnostic reagents and vaccine for the dengue virus.

Keywords: dengue, B lymphocyte epitopes, peptides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mosquito <i>Aedes aegypti</i> .	23
Figura 2	Estrutura da glicoproteína-E do vírus dengue. A proteína é apresentada em azul, verde e amarelo para mostrar seus três domínios específicos (1772 x 1772 pixels).	25
Figura 3	Vírus DENV-2 replicando em cultura de tecido. Imagens de microscopia eletrônica (aumento de 123.000x).	26
Figura 4	Vírus DENV-2 replicando em cultura de tecido. Imagens de microscopia eletrônica (aumento de 123.000x).	26
Figura 5	<i>Rash</i> cutâneo.	33
Figura 6	Hemorragia subcutânea.	33
Figura 7	Hemorragia ocular.	33
Figuras 8A e B	Mapeamento dos 95 peptídeos da Synpep. A) Peptídeos de números 1 a 50. B) peptídeos de números 51 a 95 e antígeno total (AgT). As DOs foram lidas em filtro de 450nm. B=branco, C+= pool de soros positivos e C- = pool de soros negativos. Em laranja a linha que representa o “cut-off” (CO).	58
Figura 9	Fórmula geral de um aminoácido. R é comumente uma das 20 diferentes cadeias laterais. Em pH 7,0 o grupo amino e o grupo carboxil são ionizados.	63

Figura 10	Perfil de hidrofiliçidade da glicoproteína-E do DENV-3, de acordo com Kyte & Doolittle, gerado usando o software Lasergene Protean. O eixo horizontal indica o número do aminoácido na proteína e o eixo vertical o valor da hidropaticidade. Valores positivos indicam hidrofiliçidade e valores negativos hidrofobicidade.	64
Figura 11	Predição de acessibilidade dos aminoácidos da glicoproteína-E do DENV-3, segundo Emini. O eixo horizontal indica o número do aminoácido e o eixo vertical o valor da probabilidade dos mesmos estarem expostos na superfície da proteína. Valores positivos acima do eixo horizontal indicam a acessibilidade.	65
Figura 12	Predição de acessibilidade segundo Kabsch & Sander, 1983. Em cinza estão as folhas- β e em vermelho os 11 peptídeos mapeados. As letras que seguem o código do programa...	67
Figura 13	Predição de antigenicidade dos aminoácidos da glicoproteína-E do DENV-3, segundo Kolaskar & Tongaonkar. O eixo horizontal indica o número do aminoácido e o eixo vertical o valor da propensão destes em serem antigênicos. Valores positivos acima do eixo horizontal indicam a antigenicidade.	69
Figura 14	Estrutura do dímero da Glicoproteína-E para DENV-3seq e a posição na molécula dos onze peptídeos mapeados. A) visão superior, B) visão lateral, C) visão frontal posterior. Peptídeo 11 em verde, 15 e 16 em laranja, 27, 28, 29, 30, 31 e 32 em azul, 40 em vermelho e 50 em violeta/lilás.	72
Figura 15A	Curvas ROC para os peptídeos 11, 15, 16 e 27, geradas pelo Software Medcalc, versão 8.2. Discriminação entre pacientes normais e positivos para DENV-3. Quanto maior a área abaixo da curva, maior é o poder discriminatório do teste.	76
Figura 15B	Curvas ROC para os peptídeos 28, 29, 30 e 31, geradas pelo Software Medcalc, versão 8.2. Discriminação entre pacientes normais e positivos para DENV-3. Quanto maior a área abaixo da curva, maior é o poder discriminatório do teste.	77
Figura 15C	Curvas ROC para os peptídeos 32, 40 e 50, geradas pelo Software Medcalc, versão 8.2. Discriminação entre pacientes normais e positivos para DENV-3. Quanto maior a área abaixo da curva, maior é o poder discriminatório do teste.	78

Figura 16A	Curvas ROC para os peptídeos 11, 15, 16 e 27, geradas pelo Software Medcalc, versão 8.2. Discriminação entre DENV-3 e dengue por outros sorotipos. Quanto maior a área abaixo da curva, maior é o poder discriminatório do teste.	79
Figura 16B	Curvas ROC para os peptídeos 28, 29, 30 e 31, geradas pelo Software Medcalc, versão 8.2. Discriminação entre DENV-3 e dengue por outros sorotipos. Quanto maior a área abaixo da curva, maior é o poder discriminatório do teste.	80
Figura 16C	Curvas ROC para os peptídeos 32, 40 e 50, geradas pelo Software Medcalc, versão 8.2. Discriminação entre DENV-3 e dengue por outros sorotipos. Quanto maior a área abaixo da curva, maior é o poder discriminatório do teste.	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 A	Perfil do diagnóstico laboratorial e clínico das amostras positivas para DENV-3. Pacientes com forma clínica de dengue clássica (DC) e dengue clássica complicada (DCC).	44
Tabela 1 B	Perfil do diagnóstico laboratorial e clínico das amostras positivas para DENV-3. Pacientes com forma clínica de febre hemorrágica do dengue (FHD).	45
Tabela 2	Seqüência dos aminoácidos, posição na proteína e DOs encontradas para os 11 peptídeos mapeados.	59
Tabela 3	Peptídeos preditos segundo a escala de acessibilidade de Emini. Em vermelho os resíduos presentes nos peptídeos 27 e 30 mapeados.	66
Tabela 4	Peptídeos preditos segundo a escala de antigenicidade de Kolaskar & Tongaonkar. Em vermelho, os resíduos presentes nos peptídeos 11, 15, 27 e 50 mapeados.	70
Tabelas 5 A e B	Discriminação entre DENV-3 e Normais. Valores da sensibilidade (Sens.), especificidade (Espec.), cut-off (CO) e razão de verossimilhança positiva e negativa (RV^+ e RV^-) gerados para cada um dos 11 peptídeos na curva ROC. O intervalo de confiança (95% IC) e o valor de p (<i>p value</i>) também são mostrados.	74
Tabelas 6 A e B	Discriminação entre DENV-3 e dengue por outros sorotipos. Valores da sensibilidade (Sens.), especificidade (Espec.), cut-off (CO) e razão de verossimilhança positiva e negativa (RV^+ e RV^-) gerados para cada um dos 11 peptídeos na curva ROC. O intervalo de confiança (95% IC) e o valor de p (<i>p value</i>) também são mostrados.	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3-D	tridimensional
aa	aminoácido
A	aminoácido alanina
AAC	áreas abaixo da curva
Ag	antígeno
AgT	antígeno total
AP-61	linhagem celular de mosquito <i>Aedes pseudocutellaris</i>
BHK-21	<i>baby hamster kidney cell</i> (célula de rim de <i>hamster</i>)
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (soro albumina bovina)
C	aminoácido cisteína
C6/36	linhagem celular de mosquito <i>Aedes albopictus</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CO	<i>cut-off</i> (em português, ponto de corte)
CONEP	Comitê Nacional de Ética em Pesquisa
D	aminoácido ácido aspártico
DC	dengue clássica
DCC	dengue clássica complicada
DENV-1	vírus dengue sorotipo 1
DENV-2	vírus dengue sorotipo 2
DENV-3	vírus dengue sorotipo 3
DENV-3seq	seqüência de DENV-3 utilizada neste trabalho
DENV-4	vírus dengue sorotipo 4

DI	domínio I
DII	domínio II
DIII	domínio III
DMSO	<i>dimethyl sulfoxide</i> (dimetil-sulfóxido)
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucléico)
DO	densidade ótica
DP	desvio padrão
E	aminoácido ácido glutâmico
DSSP	<i>define secondary structure of proteins</i> (definir estrutura secundária de proteínas)
ECP	efeito citopático
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i> (ensaio de imunoadsorção enzimática)
F	aminoácido fenilalanina
FASTA	Tipo de formato de arquivo
FBS	<i>fetal bovine serum</i> (soro bovino fetal)
FHD	febre hemorrágica do dengue
G	aminoácido glicina
H	aminoácido histidina
HCMV	<i>human cytomegalovirus</i> (citomegalovírus humano)
HCV	<i>hepatitis C virus</i> (vírus da hepatite C)
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i> (vírus da imunodeficiência humana)
I	aminoácido isoleucina
IgG	imunoglobulina G

IgM	imunoglobulina M
JAM	cepa da Jamaica do vírus dengue sorotipo 2
JEV	<i>japanese encephalitis virus</i> (vírus da encefalite japonesa)
K	aminoácido lisina
KDa	kilodalton
L	aminoácido leucina
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
LAMP	<i>lysosome associated membrane protein</i> (proteína de membrana associada ao lisossomo)
LAVITE	Laboratório de Virologia e Terapia Experimental
LLC-MK2	<i>monkey rhesus kidney pool of cells</i> (pool de células de rins de macacos rhesus)
M	aminoácido metionina
MAC-ELISA	IgM antibody capture- ELISA (ELISA de captura de IgM)
mers	refere-se ao número de aminoácidos
µg	micrograma (10^{-6} gramas)
µl	microlitro (10^{-6} litros)
mg	miligrama (10^{-3} gramas)
MHC II	<i>major histocompatibility complex class II</i> (complexo de histocompatibilidade principal classe II)
ml	mililitro (10^{-3} litros)
MVEV	<i>murray valley encephalitis virus</i> (vírus da encefalite do vale Murray)
N	aminoácido asparagina
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional para Informação em Biotecnologia)
NGC	cepa <i>New Guinea C</i> (Nova Guiné C) do vírus dengue sorotipo 2

nm	nanômetro (10^{-9} metros)
O/N	<i>overnight</i>
P	aminoácido prolina
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (tampão fosfato salina)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
pH	potencial de hidrogênio iônico
PO	peroxidase
PRNT	<i>plaque reduction neutralizing test</i> (teste de neutralização por redução de placas)
Proteína C	proteína do capsídeo
Proteína E	proteína do envelope
Proteína M	proteína de membrana
Proteína prM	proteína pré-membrana
Q	aminoácido glutamina
R	aminoácido arginina
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (ácido ribonucléico)
ROC	<i>receiver operating characteristics</i>
RT-PCR	<i>reverse transcription-polymerase chain reaction</i> (transcrição reversa-reação em cadeia da polimerase)
RV^+	razão de verossimilhança positiva
RV^-	razão de verossimilhança negativa
S	aminoácido serina
SARS	severe acute respiratory syndrome (vírus da síndrome respiratória aguda grave)
SCD	síndrome do choque do dengue
T	aminoácido treonina

TA	temperatura ambiente
TBEV	<i>tick-borne encephalitis virus</i> (vírus da encefalite do carrapato)
TC	tampão carbonato
TMB	<i>tetramethylbenzidine</i> (tetrametilbenzidina)
TRA-284	linhagem celular de mosquito <i>Toxorhynchites amboinenses</i>
UAE	Unidade Arbitrária de ELISA
V	aminoácido valina
VERO	<i>african green monkey kidney cell</i> (célula de rim de macaco verde africano)
W	aminoácido triptofano
X	média aritmética, medida de tendência central
Y	aminoácido tirosina
λ	lambda, representa comprimento de onda

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Aspectos epidemiológicos do dengue	21
1.2 Modo de transmissão	22
1.3 Agente Etiológico	24
1.4 Diagnóstico	28
<i>1.4.1 Diagnóstico laboratorial</i>	28
<u>1.4.1.1 Isolamento e identificação viral</u>	28
<u>1.4.1.2 Pesquisa de anticorpos</u>	29
<u>1.4.1.2.1 Teste de neutralização</u>	29
<u>1.4.1.2.2 Teste de inibição da hemaglutinação</u>	29
<u>1.4.1.2.3 ELISA</u>	30
<u>1.4.1.3 Detecção do ácido nucléico</u>	30
<i>1.4.2 Diagnóstico clínico</i>	31
<u>1.4.2.1 Dengue clássica (DC)</u>	31
<u>1.4.2.2 Febre hemorrágica do dengue (FHD)</u>	32
<u>1.4.2.3 Síndrome do choque do dengue (SCD)</u>	32
1.5 Patologia	32
1.6 Prevenção, controle e tratamento	34
1.7 Mapeamento de epítomos de célula B	36
2 JUSTIFICATIVA	39
3 PERGUNTA CONDUTORA	40

4 HIPÓTESE	41
5 OBJETIVOS	42
5.1 Objetivo geral	42
5.2 Objetivos específicos	42
6 METODOLOGIA	43
6.1 Seleção de pacientes positivos para DENV-3	43
6.2 Seleção de pacientes negativos para DENV-3	43
6.3 Seleção de pacientes positivos para DENV-1 ou DENV-2	46
6.4 Pool de pacientes positivos e negativos para DENV-3	46
6.5 Peptídeos	47
6.5.1 Peptídeos Sintéticos	47
6.5.2 Mapeamento de epítomos de célula B	47
6.6 Predições de epítomos de célula B	48
6.7 Modelagem da estrutura da glicoproteína-E	49
6.8 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	49
6.8.1 Padronização da técnica	49
6.8.2 Controle positivo	50
6.8.3 Controles negativos	50
6.9 Análise estatística	51
6.10 Aspectos éticos	51
7 RESULTADOS	52
7.1 Padronização do ELISA para uso de peptídeos sintéticos	52
7.1.1 Peptídeos sintéticos Synpep	52

<u>7.1.1.1 Seleção da placa</u>	52
<u>7.1.1.2 Concentração dos peptídeos</u>	52
<u>7.1.1.3 Seleção do bloqueio</u>	53
<u>7.1.1.4 Titulação dos soros</u>	54
<u>7.1.1.5 Titulação dos conjugados</u>	54
<u>7.1.1.6 Controles do ELISA</u>	55
<u>7.1.1.7 Protocolo final para peptídeos Synpep</u>	56
7.1.2 Peptídeos sintéticos da Schafer	57
<u>7.1.2.1 Concentração dos peptídeos</u>	57
<u>7.1.2.2 Seleção do bloqueio</u>	59
<u>7.1.2.3 Titulação de soros</u>	60
<u>7.1.2.4 Tempo de reação do revelador</u>	60
<u>7.1.2.5 Controles do ELISA</u>	60
<u>7.1.2.6 Protocolo final para peptídeos Schafer</u>	61
7.2 Predições de epítomos de célula B	62
7.2.1 Perfil de hidropaticidade	62
7.2.2 Perfis de acessibilidade de superfície	64
7.2.3 Perfil da antigenicidade	62
7.3 Modelagem da estrutura da glicoproteína-E	71
7.4 Análise do perfil de reatividade dos 11 peptídeos mapeados frente aos soros de pacientes não dengue, positivos para DENV-3 e positivos para DENV-1 ou 2	73
8 DISCUSSÃO	82
9 CONCLUSÕES	88

10 PERSPECTIVAS	89
REFERÊNCIAS	90
APÊNDICE A – ARTIGO EM PREPARAÇÃO.....	101

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos epidemiológicos do dengue

Os primeiros relatos de uma doença semelhante a Dengue, ocorreram em 1779 em epidemias simultâneas em Batavia (Jakarta) e Cairo (SILER *apud* HENCHAL; PUTNAK, 1990). Posteriormente epidemias pelo dengue foram descritas na Philadelphia (1780), Zanzibar (1823 e 1870), Calcutá (1824, 1853, 1871 e 1905), Oeste Indiano (1827) e Honk Kong (1901). Outras grandes epidemias ocorreram, em intervalos irregulares, em locais onde o mosquito vetor pode ser achado, como nos Estados Unidos (1922), Austrália (1925-1926, 1942), Grécia (1927-1928) e Japão (1942-1945). Epidemias pelo dengue são responsáveis por centenas de milhares de casos por ano no Sudeste Asiático, onde todos os quatro sorotipos do vírus podem ser encontrados (HENCHAL; PUTNAK, 1990). Após a segunda Guerra Mundial o dengue passou a alastrar-se mundialmente, em áreas tropicas e subtropicais, sendo considerada uma das mais importantes doenças reemergentes (YAMADA *et al.*, 2002).

No Brasil, após a introdução de vetor do vírus, *Aedes aegypti*, vindo da África no século XVI durante o comércio de escravos (FIGUEIREDO, 1996), o vírus atuou de maneira expressiva em epidemias no Rio de Janeiro (1846, 1922 e 1923), São Paulo (1851, 1853 e 1916) e Curitiba (1896) (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1996).

Com o início da campanha de erradicação do vetor, em 1904, por Oswaldo Cruz para o combate da Febre Amarela, houve uma queda no número de casos, até ocorrer uma reinfestação do mosquito no início dos anos 70. Após cerca de 60 anos sem estar presente na literatura médica, o dengue ressurgiu em Boa Vista/Roraima entre 1981 e 1982, com os sorotipos DENV-1 e DENV-4 (FIGUEIREDO, 1996). Até então só havia em circulação no Brasil o sorotipo DENV-1 quando em 1990 foi detectada a entrada do DENV-2 e em 2001 do DENV-3 (MIAGOSTOVICH *et al.*, 2002).

Atualmente, a dengue é um problema de Saúde Pública, em termos de morbidade e mortalidade, reconhecida em mais de 100 países (nas Américas, Sudeste Asiático, Oeste do Pacífico, África e Leste do Mediterrâneo) e com 2,5 bilhões de pessoas afetadas em áreas onde a

doença é endêmica. São estimados anualmente, dependendo da atividade epidêmica, cerca de 50 a 100 milhões de casos de dengue clássica e centenas de milhares de casos de febre hemorrágica do dengue pelo mundo (GUZMÁN; KOURI, 2002).

1.2 Modo de transmissão

Os arbovírus formam um grupo de agentes infecciosos transmitidos por artrópodes hematófagos de um hospedeiro vertebrado para outro. Este grande grupo inclui as famílias *Togaviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae*, *Arenaviridae*, *Filoviridae*, *Rabdoviridae* e *Flaviviridae* (BROOKS; BUTEL; ORNSTON, 1998).

A epidemiologia de arboviroses é função de parâmetros ecológicos e fisiológicos, no qual a competência do vetor é muito importante (SONENSHINE; MATHER, 1994). Essa competência e a habilidade do vetor para adquirir, manter e transmitir agentes infecciosos aos seus hospedeiros, é determinada por fatores intrínsecos e extrínsecos, incluindo a habilidade fisiológica do tecido do vetor de se tornar infectado e manter um agente infeccioso particular (LANE, 1994).

O principal vetor de transmissão do vírus dengue ao homem é o mosquito do gênero *Aedes* e nas Américas a espécie mais importante é a *aegypti*. As suspeitas de que o vírus dengue era transmitido por um mosquito começaram no século XX e em 1906, Bancroft apresentou o *Aedes aegypti* como o principal vetor para o vírus dengue (HENCHAL; PUTNAK, 1990), sendo também o responsável pela transmissão da doença em áreas urbanas (GUBLER, 1998), em estações chuvosas e quentes (TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1997). Estima-se que cerca de dois terços da população mundial vive em áreas infestadas pelo mosquito *A. aegypti* (Figura 1) e que anualmente 80 milhões de pessoas são infectadas pelo vírus (FIGUEIREDO, 1991).

O *A. aegypti* é um mosquito diurno que apresenta picos de atividade ente 2 e 3 horas após o nascer do dia e algumas horas antes do anoitecer. As fêmeas desse mosquito são as responsáveis pela transmissão e dispersão de vários sorotipos e um único mosquito, se infectado, pode infectar várias pessoas (GUBLER, 1998).

A transmissão ocorre em dois ciclos: o intrínseco no homem, que começa um dia antes do aparecimento da febre e vai até o sexto dia da doença, correspondendo ao período de viremia, e o ciclo extrínseco nos mosquitos (fêmeas) que após picar pessoas virêmicas inicia a replicação do vírus no tubo digestivo, e após um período de incubação de 8 a 12 dias, estes são alojados nas glândulas salivares iniciando-se a transmissão (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1996).

A vida média do mosquito é de seis a oito semanas, e durante este período, ele permanece infectado com o vírus podendo transmitir o dengue para centenas de pessoas. No homem, o período de incubação da dengue é de três a quinze dias, tendo como média de cinco a seis dias (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1996).

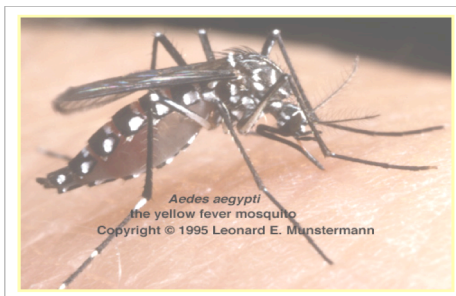


Figura 1-Mosquito *Aedes aegypti*.

Fonte: MUNSTERMANN, 1995.

A doença também pode ser transmitida pelos mosquitos *Aedes albopictus* que são mosquitos alóctones de região neotropical, cujo primeiro registro em território brasileiro foi feito em 1986, no Rio de Janeiro (LOWENBERG-NETO; NAVARRO-SILVA, 2002). A espécie ainda não foi incriminada como vetor do dengue no Brasil, mas é capaz de infectar-se com o vírus e transmiti-lo. Nas Américas foi encontrado infectado naturalmente com o vírus da encefalite eqüina do leste e em laboratório demonstrou competência à infecção e à transmissão para vinte e dois distintos arbovírus. No Brasil, sua presença foi detectada em quatorze estados e mostrou capacidade de transmitir dengue, febre amarela e vírus da encefalite eqüina venezuelana em laboratório (SEGURA *et al.*, 2003).

A reprodução destes vetores ocorre em água estagnada contida em recipientes plásticos, pneus, vasos de plantas, latas, vidros, tonéis, cisternas, bromélias, buracos em árvores, escavações em rocha e bambu (CONSOLI, 1998).

1.3 Agente etiológico

As principais doenças causadas por arbovírus no mundo, incluem a febre amarela, a febre do Nilo Ocidental e a dengue (BROOKS *et al.*, 1998). Doenças semelhantes à dengue são reportadas desde o século II (GUBLER, 1998), mas as primeiras observações sobre sua etiologia foram abordadas em 1907 por Ashburn e Craig, do Departamento Médico do Exército Americano (SABIN, 1952). Em meados dos anos 40, após técnicas apropriadas de laboratório, foi feito o isolamento e caracterização do vírus, sendo classificado inicialmente dentro do grupo B dos Arbovírus, pela classificação antigênica segundo Casals (TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1997).

Após estudos físico-químicos estes vírus foram classificados como pertencentes à família *Flaviviridae* gênero *Flavivirus* com quatro sorotipos antigênicos distintos (DENV-1 a DENV-4). Assim como outros flavivírus, a partícula viral é coberta por um envelope lipídico contendo proteínas do envelope e da membrana. Medem cerca de 60 nm de diâmetro (Figuras 3 e 4) e possuem 10 genes. Esses genes codificam três proteínas estruturais (capsídeo-C, membrana-M e envelope-E) e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5). Seu genoma é uma fita RNA de polaridade positiva, com aproximadamente 10.200 nucleotídios (FIGUEIREDO, 1991). Os genes que codificam as proteínas estruturais do dengue estão localizados na região 5' do genoma, sendo estas proteínas derivadas inicialmente de uma única e longa poliproteína precursora (RANDOLPH; WINKLER; STOLLAR, 1990).

A proteína C é o primeiro polipeptídeo viral sintetizado durante a tradução, tem um peso molecular em torno de 13.5 KDa e é rica em resíduos de lisina e arginina. Uma área hidrofóbica de aminoácidos no terminal carboxílico da proteína C, provavelmente age como um sinal transmembrana para a proteína M precursora, a prM (pré-membrana). Uma clivagem proteolítica específica de uma precursora glicosilada de prM durante a maturação viral, resulta na formação da proteína M de 8KDa (HENCHAL; PUTNAK, 1990). Esta clivagem que parece ocorrer nas

vesículas ácidas do complexo de Golgi, precede a liberação viral da célula, visto que a quantidade de prM associada com a partícula viral extracelular é baixa. A formação de M a partir de prM deve ser o evento crucial e final da morfogênese viral (RANDOLPH; WINKLER; STOLLAR, 1990).

A glicoproteína E, a maior glicoproteína do envelope do vírus (51-60KDa) , aparece como um homotrímero na superfície das partículas maduras e pode ser achada intracelularmente em heterodímeros E-prM (HENCHAL; PUTNAK, 1990). Representa o antígeno viral dominante, desempenhando importantes funções como ligação ao receptor, hemaglutinação de células sangüíneas, indução de resposta imune protetora pela produção de anticorpos, fusão específica de membrana e montagem viral (GUZMÁN; KOURI, 2004; LEITMEYER *et al.*, 1999). A Figura 2 mostra uma ilustração computadorizada de como a glicoproteína E do envelope, se organiza para formar uma concha protetora ao redor do vírus.

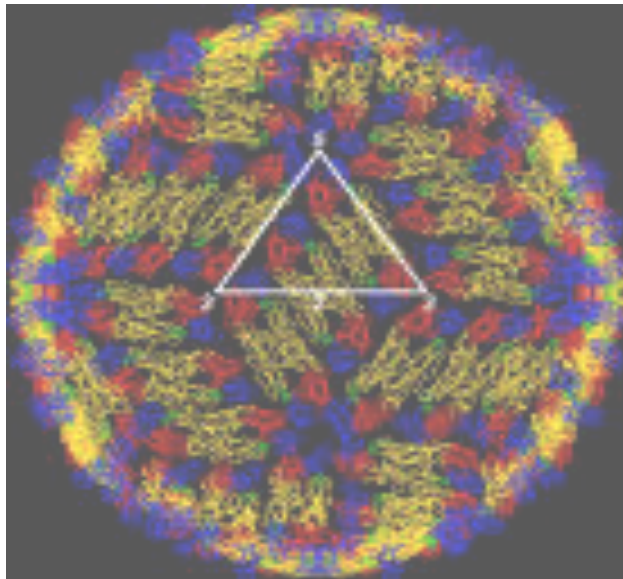
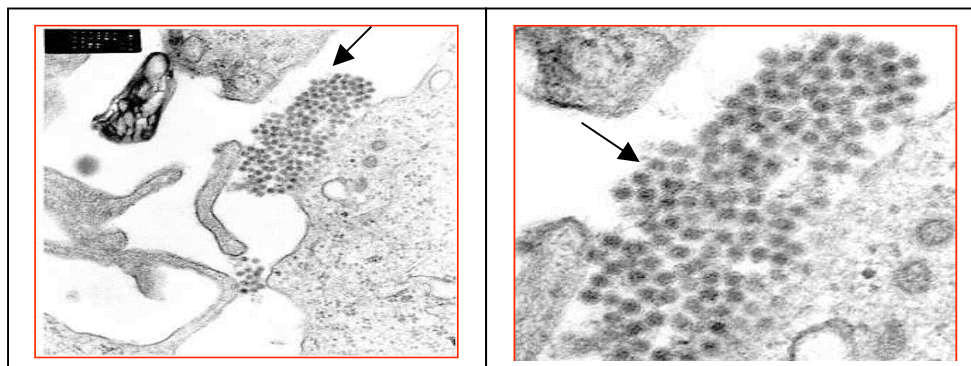


Figura 2-Estrutura da glicoproteína-E do vírus dengue. A proteína é apresentada em azul, verde e amarelo para mostrar seus três domínios específicos (1772 x 1772 pixels).

Fonte: PURDUE NEWS, 2003.

A glicoproteína E contém a maioria dos determinantes envolvidos na adsorção e penetração nas células do hospedeiro, bem como os epítomos envolvidos em sua neutralização (BIELEFELDT-OHMANN *et al.*, 1997; REY *et al.*, 1995) , desempenhando um papel importante na geração de anticorpos neutralizantes e na indução de uma resposta imune protetora.



Figuras 3 e 4-Vírus DEN-2 (seta) replicando em cultura de tecido. Imagens de microscopia eletrônica (aumento de 123.000x).

Fonte: CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2006.

A estrutura cristalizada dos ectodomínios da glicoproteína E do vírus da encefalite do carrapato (*Tick-Borne Encephalitis Virus-TBEV*) e do DENV-2 foi determinada e observou-se que ambas estruturas são similares, consistindo de um dímero no qual cada monômero possui três domínios tipo folha β -pregueada (MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005). Os domínios I, II e III foram previamente identificados na estrutura molecular da glicoproteína do TBEV. Devido as localizações dos resíduos de cisteína serem conservadas entre as glicoproteínas-E dos flavivírus, assume-se que toda a estrutura da proteína é igual entre os flavivírus, incluindo o dengue (ROEHRIG, 1997). Os domínios I e III contêm predominantemente epítomos do subcomplexo e tipo específico e o domínio II apresenta epítomos de reação cruzada do subgrupo e reativos do grupo, presentes na maioria dos flavivírus (CRILL; CHANG, 2004). A maioria dos anticorpos neutralizantes já caracterizados, reconhecem epítomos no domínio III, os quais têm sido implicados na ligação com o receptor celular, acreditando-se então que o mecanismo de neutralização para anticorpos contra estes epítomos seja a inibição da ligação ao receptor celular e à adsorção viral. Enquanto anticorpos contra epítomos no domínio I não são neutralizantes, existem anticorpos neutralizantes que reconhecem epítomos conservados entre os sorotipos no domínio II (MODIS *et al.*, 2005). Na partícula madura estes homodímeros repousam sobre a superfície viral formando um denso entrelaçado. Estudos com vacina de DNA para o DEN-2 contendo genes da região pré-membrana e 92% da proteína do E induziram resposta de anticorpos neutralizantes em camundongos e os animais vacinados tinham alta taxa de sobrevivência quando infectados posteriormente (KOCHEL *et al.*, 1997; PORTER *et al.*, 1998; RAVIPRAKASH *et al.*, 2001).

O papel da proteína não estrutural NS1 (46 kDa) na replicação viral não é conhecido, mas sugere-se que ela auxilie na morfogênese do vírus. Deve ter também importância imunológica, uma vez que, células infectadas expressando a proteína na superfície ou em sua forma secretada no meio extracelular se tornam alvo de citólise imune. A forma solúvel da NS1 foi caracterizada como um antígeno de fixação do complemento presente no soro e tecidos de animais infectados (BRANDT *et al.*, 1970) e induz uma forte resposta imune humoral (FALGOUT *et al.*, 1990). A NS2a (22 kDa) é requerida para o processamento proteolítico próprio do C-terminal de NS1 e NS2b, porém, sua função na replicação viral não é conhecida. Ela tem sido implicada no reconhecimento de epítomos de reatividade cruzada e sorotipo-específico por células T citotóxicas coletivamente com a NS1 (MATHEW *et al.*, 1996; MATHEW *et al.*, 1998). A proteína NS3 (70 kDa) é uma grande proteína citoplasmática que se associa a membrana via interação com a NS2b (CLUM; EBNER; PADMANABHAN, 1997) e contém várias atividades enzimáticas, como protease e helicase/trifosfatase, o que resulta no processamento da poliproteína e na replicação do RNA, sendo uma das mais conservadas proteínas entre os *Flavivirus* (MATHEW *et al.*, 1996). Estudos identificaram vários epítomos de reatividade cruzada reconhecidos por células T citotóxicas, contidos na NS3 (MATHEW *et al.*, 1996; ZIVNY *et al.*, 1999; SIMMONS *et al.*, 2005). As proteínas NS4a (16 kDa) e NS4b (27 kDa) são proteínas hidrofóbicas pequenas associadas à membrana e parecem ter função na replicação do RNA (LINDENBACH; RICE, 1999). Anticorpos anti-NS4a têm sido identificados em pacientes infectados com dengue, sobretudo em infecções secundárias (SE-THOE; NG; LING, 1999). A proteína NS5 (105 kDa) é a maior e mais conservada proteína dos *Flavivirus*, contendo homologia entre a RNA-polimerase RNA dependente de outros vírus RNA (RICE *et al.*, 1985).

1.4 Diagnóstico

1.4.1 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial das infecções pelo vírus dengue é feito através do isolamento e identificação do vírus, pesquisa de anticorpos e detecção do ácido nucléico.

Dados do paciente, tanto clínico como epidemiológicos, são importantes para se fazer uma interpretação correta dos resultados dos testes laboratoriais e se obter um diagnóstico final.

1.4.1.1 Isolamento e identificação viral

Para o isolamento viral são utilizados sangue e derivados coletados na fase aguda (três a cinco dias da doença) ou tecidos do paciente que poderão ser inoculados em animais de laboratório (camundongos recém-nascidos por via intra-cerebral), em mosquitos por injeção torácica, pela inoculação em cultura de células de mosquito (*Toxorhynchites amboinenses*, TRA-284; *Aedes albopictus*, C6/36 e *Aedes pseudoscutellaris*, AP-61) ou de células de vertebrados como VERO, BHK-21, LLC-MK2 (IGARASHI, 1978; ROMANOS, 2002).

O efeito citopatogênico (ECP) pode ser usado como meio de detecção do vírus e pode aparecer precocemente (três dias após inoculação) ou tardiamente (quatorze dias ou mais). Convém lembrar que alguns sorotipos, como o DENV-4, por exemplo, produz um efeito muito discreto capaz de passar despercebido por uma pessoa com pouca experiência. Por este motivo, todo o material do isolamento viral deve também ser submetido à reação de imunofluorescência direta, onde um conjugado de especificidade conhecida marcado com corante fluorescente é adicionado a células infectadas com o vírus e a formação do complexo antígeno-anticorpo é então visualizado pela fluorescência (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1996; ROMANOS, 2002).

1.4.1.2 Pesquisa de anticorpos

Pode ser realizada através de: teste de neutralização, inibição da hemaglutinação (IH) e diversas modalidades de *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA).

1.4.1.2.1 Teste de neutralização

Embora tenham sido descritas diversas provas de neutralização para o vírus dengue, o método mais sensível e específico é a prova de redução em placa (PRNT), com vírus em concentração constante e variações de diluição do soro. Nas infecções primárias de dengue durante o início da convalescença, são detectados anticorpos neutralizantes relativamente monotípicos. Após infecções secundárias, são produzidos altos títulos de anticorpos neutralizantes para dois dos quatro tipos de dengue. Em algumas combinações de infecções sequenciais, o título mais alto de anticorpos neutralizantes no soro do paciente convalescente é dirigido contra o vírus que infectou o paciente anteriormente (não o vírus da atual infecção), o chamado fenômeno do “pecado original antigênico” (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1996).

1.4.1.2.2 Teste de inibição da hemaglutinação (IH)

O vírus do dengue aglutina hemácias de ganso e de outras espécies assim como as células de sangue humano do grupo “O” tripsinizado. O IH é baseado na habilidade do anticorpo do dengue de inibir essa hemaglutinação. É recomendado para estudos soro-epidemiológicos, uma vez que os anticorpos IH persistem por um longo período de tempo e são usualmente detectados em casos de resposta primária, a partir do quinto ao sexto dia após o início da febre. Em casos de

resposta secundária, altos títulos de anticorpos IH podem ser precocemente detectados, entre dois e três dias após o início da febre (CLARK; CASALS, 1958).

1.4.1.2.3 ELISA

Diversos tipos de ELISA têm sido adaptados para detectar anticorpos contra dengue. Entre os mais utilizados estão o ELISA indireto onde a sensibilização da placa é feita com antígeno viral e o ELISA de captura de anticorpos (IgM ou IgG) onde a placa é sensibilizada com a anti-imunoglobulina específica (KAO *et al.*, 2005). Estudos mostram que estes últimos testes apresentam uma sensibilidade de 96-100% para IgM e de 52-97% para IgG, enquanto a especificidade varia de 86-92% e 95-100% para IgM e IgG respectivamente (KAO *et al.*, 2005).

Dentre os ELISA de captura, o MAC-ELISA (“IgM Antibody Capture-ELISA”) é o teste mais útil para a vigilância da doença. O teste baseia-se na detecção de anticorpos IgM específicos do dengue, não diferenciando os sorotipos. Esse anticorpo desenvolve-se rapidamente, a partir do quinto dia da doença em 80% dos casos e, entre o sexto e décimo dia, 93% a 96% dos pacientes apresentam IgM detectáveis. Geralmente pode persistir por até sessenta dias após o início da doença e, em alguns casos, pode ser detectado até os noventa dias. Portanto, uma reação positiva MAC-ELISA indica uma infecção em curso ou recente por dengue, ocorrida nos últimos dois a três meses. Considerando a dificuldade de obtenção da segunda amostra de sangue e o retardo do diagnóstico pelas outras técnicas, os resultados do MAC-ELISA são considerados aceitáveis para apoio à vigilância epidemiológica (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1996).

1.4.1.3 Detecção do ácido nucléico

A RT-PCR (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*) têm sido freqüentemente utilizada para identificar o ácido nucléico viral no sangue ou tecido do paciente com dengue. A técnica usa *primers* de diferentes regiões do genoma viral, capazes de anelar a qualquer um dos

quatro sorotipos do vírus (LANCIOTTI *et al.*, 1997). Este teste apresenta uma sensibilidade de 94% com DENV-1, 93% com DENV-2 e 100% com DENV-3 e DENV-4, quando comparada com o tradicional método de isolamento viral (KAO *et al.*, 2005).

1.4.2 Diagnóstico clínico

De acordo com o guia da Organização Mundial da Saúde (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1987) as infecções do dengue podem ser assintomáticas ou produzir febre não diferenciada, dengue clássica ou febre hemorrágica do dengue. Devido à variabilidade de sintomas diversos com a infecção por dengue, alguns critérios são adotados para a definição das fases da doença:

1.4.2.1 Dengue clássica (DC):

Nos casos típicos, a doença se inicia abruptamente após dois a sete dias de infecção com febre, dor de cabeça, dor retro-orbital, mialgia, artralgia, *rash* e manifestações hemorrágicas. A confirmação da doença deve ser realizada em conjunto com os dados laboratoriais e epidemiológicos. Os critérios laboratoriais para a confirmação de dengue clássica são o isolamento do vírus dengue de amostras de soro ou de autópsia, a demonstração de títulos de anticorpos IgM ou IgG e a demonstração do antígeno viral em tecidos de autópsia, soro ou amostras de fluido cefalorraquidiano; por imunohistoquímica, imunofluorescência, ELISA ou PCR (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1987).

1.4.2.2 Febre hemorrágica do dengue (FHD):

Nesta fase a febre dura de dois a sete dias e os fenômenos hemorrágicos são evidenciados pelo menos por um dos seguintes pontos: teste do torniquete positivo; petéquias, equimoses ou púrpura; sangramento de mucosa, do trato gastrointestinal ou outros locais; hematêmese e/ou melena. Os testes de laboratório de pacientes com FHD apresentam um número de plaquetas menores ou iguais a 100 000 células/mm³ no sangue, ocorrendo a evidência de efusão de plasma devido ao aumento da permeabilidade vascular, com elevação do hematócrito em 20% ou mais do valor encontrado inicialmente, podendo ocorrer também derrame pleural, ascite e hipoproteinemia (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1987).

1.4.2.3 Síndrome do choque do dengue (SCD):

Todos os sintomas e critérios laboratoriais citados para a febre hemorrágica do dengue devem estar presentes, mais a evidência de falência circulatória manifestada por pulso rápido ou fraco; ou por hipotensão, frio, pele pegajosa e inquietação (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1987).

1.5 Patologia

A doença é um processo infeccioso que pode cursar de formas assintomáticas, oligossintomáticas a formas graves e fatais. As manifestações clínicas são: a dengue clássica (DC) e a febre hemorrágica do dengue (FHD), que poderá evoluir para a síndrome do choque do dengue (SCD).

A dengue clássica apresenta-se em geral de forma benigna e autolimitada. No entanto, o período de recuperação associa-se a uma grande debilidade física que pode se estender por várias

semanas. Manifestações hemorrágicas do tipo epistaxe, petéquias, gengivorragias, metrorragias e *rash* (Figura 5) também podem ser observadas. Em casos mais raros, podem aparecer sangramentos maiores como hematêmese, melena ou hematúria (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1996).

Na febre hemorrágica do dengue os sintomas clínicos são, inicialmente, indistintos da dengue clássica, porém evoluem rapidamente para as manifestações hemorrágicas de gravidade variável. Os casos típicos são caracterizados por febre alta, fenômenos hemorrágicos (Figuras 6 e 7) hepatomegalia e freqüentemente, insuficiência circulatória (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1996).

Nos casos benignos ou moderados, após o desaparecimento da febre, todos os sinais e sintomas diminuem. Em casos graves, após o desaparecimento da febre entre o 3^o e 7^o dia, o estado do paciente complica-se repentinamente, com o surgimento dos sinais de insuficiência circulatória, levando a SCD. O quadro é caracterizado por queda da temperatura corporal, pulso rápido, cianose perioral, hipotensão, pele pegajosa e inquietação (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1987). Os casos de febre hemorrágica com choque quando erroneamente ou não tratados, podem levar a uma taxa de letalidade de até 50% (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1996).



Figura 5 - Rash cutâneo.

Fonte: WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006.



Figura 6 - Hemorragia subcutânea.



Figura 7 - Hemorragia ocular.

Fonte: WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006.

Desde a década de 70, duas teorias tentam explicar a ocorrência de FHD. A primeira chamada de “Teoria da modificação da virulência”, sugere que mutações ocorrem nas diferentes linhagens dos quatro sorotipos de dengue, podendo levar a quadros clínicos graves da doença (ROSEN, 1977). O vírus dengue deve sofrer mudanças devido a pressões de seleção e de evolução visto que eles passam pela replicação em espécies cruzadas, alternando entre humanos e mosquitos (KAO *et al.*, 2005). A segunda conhecida como “Teoria da infecção seqüencial heterotípica”, é a mais aceita atualmente e propõe que quando uma pessoa é acometida por duas ou mais infecções sucessivas por sorotipos virais diferentes, ocorre uma maior sensibilização do organismo, formando imunocomplexos que lhe complicam o quadro clínico (HALSTEAD, 1989). Neste aspecto, vários mecanismos imunológicos poderiam estar envolvidos: a) a infectividade viral aumentada por anticorpos (*antibody-dependent enhancement/ADE*) (WANG *et al.*, 1995); b) aumento da permeabilidade vascular devido à produção de citocinas como INF- γ , TNF- α , IL-6 e IL-2 pelos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ (GAGNON *et al.*, 1999) e c) formação excessiva de complexos imunes, produção de auto-anticorpos contra proteínas da coagulação e células endoteliais, os quais poderiam favorecer aos fenômenos hemorrágicos das formas severas da infecção (ANDERSON *et al.*, 1997). Em 1987, autores cubanos propuseram uma terceira teoria, a “Teoria da multicausalidade”, que une as teorias de Halstead e de Rosen a vários fatores de risco como fatores individuais, virais e epidemiológicos (BRAVO; GUZMAN; KOURI, 1987). Os mecanismos que ocasionam estas formas severas da doença ainda não foram completamente elucidados. Contudo, a infecção seqüencial com sorotipos diferentes, o intervalo entre as infecções e as diferenças em virulência de cada cepa podem ser importantes como determinantes dos padrões clínico-epidemiológicos da FHD/SCD (BURKE *et al.*, 1988; DEPARIS *et al.*, 1998; HALSTEAD, 1989).

1.6 Prevenção, controle e tratamento

As medidas de prevenção visam o controle do vetor como a única maneira de diminuir a transmissão do dengue. Duas formas de controle do vetor são empregadas: o ataque às larvas (que é mais eficaz) ou ao inseto adulto. Programas efetivos de prevenção da doença devem ter

vários componentes integrados, incluindo uma ativa vigilância laboratorial, educação da comunidade médica para garantir a administração efetiva dos casos, controle do vetor com a participação da comunidade e o uso efetivo de vacinas quando estas se tornarem disponíveis (GUBLER, 1998).

Até o momento não existe tratamento específico para o dengue. Por isso, o tratamento recebido pelos pacientes, trata-se de uma terapia de suporte, onde estes devem manter-se em repouso, recebendo analgésicos e antipiréticos, em caso de dores e febre respectivamente. Em casos de FHD e SCD a reposição de fluidos com soluções eletrolíticas pode evitar coagulação intravascular disseminada (HENCHAL; PUTNAK, 1990). Por causa das dificuldades de controle do vetor, e sem drogas antivirais efetivas, as pesquisas envolvendo a produção de uma vacina, têm crescido no mundo inteiro. A vacina para o vírus dengue apresenta uma dificuldade adicional pelo fato de ter que ser tetravalente, ou seja, de ser capaz de proteger contra os quatro sorotipos do vírus simultaneamente, sem aumentar o risco de ocorrência da FHD. Além disso, como para outras vacinas, não deve produzir efeitos colaterais e deve ter um baixo custo (MARQUES JR., 2002).

Em 1944-1945, Sabin e Schlesinger prepararam e testaram a primeira vacina viva atenuada para o DENV-1. Os indivíduos vacinados não apresentaram sintomas ou apenas uma febre baixa, com ou sem dor de cabeça (SABIN; SCHLESINGER, 1945). Também Schlesinger, em 1950, testou uma vacina para o DENV-1 desenvolvida em ovos embrionados, usando como modelo a bem sucedida vacina 17 D para febre amarela, derivada de embrião de galinha. Após 38 passagens em embriões de galinha, o vírus se manteve atenuado e as duas pacientes que participaram do teste apresentaram sintomas moderados de febre e *rash* e produziram anticorpos neutralizantes (SCHLESINGER, 1950). Sabin, 1952, tentou induzir proteção contra voluntários humanos infectados por vírus não modificados, através de rotas anormais de infecção (nasal, escarificação da derme e ocular), sem sucesso (SABIN, 1952). Wisseman, 1996, testaram uma vacina viva atenuada do DENV-1, durante uma epidemia pelo DENV-3 em Porto Rico. A vacina mostrou-se bem tolerada, não causou reações sistêmicas (*rash* moderado apareceu em alguns indivíduos), induziu anticorpos neutralizantes tipo-específicos e reduziu a incidência de dengue para a metade em relação ao grupo placebo (WISSEMAN, 1996). Apesar de algumas vacinas terem produzido altos títulos de anticorpos neutralizantes após infecções seriais ou simultâneas pelos flavivírus relatados, nenhuma foi protetora contra desafios por vírus heterólogos.

Recentemente há um interesse considerável no desenvolvimento de preparações de subunidades de vacinas. Camundongos foram protegidos pela imunização com NS1 purificada do DENV-2 (SCHLESINGER; BRANDRISS; WALSH, 1987). Antígenos das proteínas estruturais e não-estruturais do DENV-4, expressos com o vírus da vaccinia ou com baculovírus, protegeram camundongos contra desafios letais por vírus dengue (BRAY *et al.*, 1989).

Várias estratégias têm sido utilizadas nas pesquisas para a produção de uma vacina: 1) Vacinas com vírus vivos atenuados ou inativados; 2) Vacinas não recombinantes com proteínas estruturais, não-estruturais ou peptídios sintéticos; 3) Vacinas com subunidades recombinantes usando baculovirus, leveduras e *Escherichia coli*; 4) Vacinas com vetores recombinantes; 5) Vacinas com clones de cDNA infecciosos e 6) Vacinas de DNA (GUZMÁN; KOURI, 2002).

Para se produzir uma vacina segura e eficaz contra o vírus dengue, é necessário que se identifiquem os determinantes antigênicos (epítomos) na superfície do vírus, dos sorotipos DENV-1 a DENV-4, que possa ser incorporado dentro de uma vacina quimérica responsável e induzir a produção de anticorpos neutralizantes (SERAFIN; AASKOV, 2001). Para isso, é necessário conhecer a resposta imunológica de indivíduos infectados a proteínas estruturais e não-estruturais do vírus e distinguir entre resposta protetora e patogênica (HUANG *et al.*, 1999).

1.7 Mapeamento de epítomos de célula B

A resposta imune adaptativa possui duas armas principais: a resposta imune celular por linfócitos T e a resposta imune humoral por linfócitos B (células B) secretores de anticorpos. Em ambos os casos a resposta imune é estimulada através do reconhecimento pelo receptor de uma pequena parte do antígeno conhecida como epítopo ou determinante antigênico (KORBER; LABUTE; YUSIM, 2006). Os epítomos podem ser lineares, consistindo de uma seqüência contínua de aminoácidos (aa) ou podem ser conformacionais, quando apresentam uma seqüência descontínua com a proteína em sua forma conformacional (SAHA; BHASIN; RAGHAVA, 2005).

É possível mimetizar estes determinantes antigênicos, produzindo curtas cadeias de aminoácidos (peptídeos lineares) e usá-los como base para o desenvolvimento de vacinas

(FRANCIS, 1996). Por isso, epítomos definidos através do mapeamento de peptídeos sintéticos têm sido empregados com sucesso como componentes de tratamentos preventivos e terapêuticos e para diagnosticar e tipificar espécies virais, incluindo o vírus da imunodeficiência humana (*Human Immunodeficiency Virus-HIV*) e vírus da hepatite C (*Hepatitis C Virus-HCV*) (HEWER; MEYER, 2003; HUANG, *et al.*, 1996).

O conhecimento de epítomos de célula B em proteínas virais é essencial para o conhecimento da patogênese e resposta imunológica da infecção e para o desenvolvimento de vacinas efetivas (LIU *et al.*, 2004; WU *et al.*, 2001). Dentro desta perspectiva, diversas proteínas têm sido estudadas e possíveis epítomos de célula B identificados, não apenas para o dengue, mas para diversos vírus como: vírus da encefalite do vale Murray (*Murray Valley Encephalitis Virus-MVEV*), vírus da encefalite japonesa (*Japanese Encephalitis Virus-JEV*), Citomegalovírus Humano (*Human Cytomegalovirus-HCMV*), HIV e vírus da síndrome respiratória aguda grave (*Severe Acute Respiratory Syndrome Virus-SARS*) (HEWER; MEYER, 2003; HUANG *et al.*, 1996; LIU *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2006; MATHEWS *et al.*, 1992; TAKAHASHI *et al.*, 2002).

Assim, a motivação de mapear epítomos lineares para a produção de uma vacina contra a dengue, reside na importância do reconhecimento dessas seqüências lineares pelos anticorpos de membrana das células B que estimulam a expansão clonal e produção de anticorpos neutralizantes específicos (WU *et al.*, 2003).

Por isso, determinantes antigênicos nas proteínas estruturais e não estruturais do dengue têm sido extensivamente mapeados. Usando um painel de peptídeos sintéticos derivados da seqüência de aminoácidos da glicoproteína E do DENV-2, cepa da Jamaica (JAM), Roehrig *et al.*, 1990, determinaram previamente que 11 peptídeos definiam regiões antigênicas nas posições 1-55, 79-172, 225-249 e 333-388 (ROEHRIG *et al.*, 1990). Sete epítomos também já foram mapeados na glicoproteína E do DENV-2, cepa New Guinea C-NGC (HENCHAL *apud* ROEHRIG; BOLIN; KELLY, 1998). Em 1999, Huang *et al.*, identificaram o peptídeo derivado da proteína NS1 de DENV-2 (aa 1-15) como o epítopo imunodominante, tendo a imunoglobulina IgM como o anticorpo isotipo-específico (HUANG *et al.*, 1999). Neste mesmo ano foram mapeados epítomos na glicoproteína-E (aa 274-283 aa e 349-359) e na proteína de membrana-M (aa 40-49) do DENV-2, utilizando anticorpos monoclonais e peptídeos sintéticos (FALCONAR, 1999). Já em 2001, através do método de *phage-display* foi proposto um possível epítopo de célula B sorotipo-específico contendo os aminoácidos de 111-116 da proteína NS1 de DENV-1

(WU *et al.*, 2001). Com a mesma metodologia, Thullier publica o achado de um possível epítomo neutralizante na glicoproteína E, utilizando o anticorpo monoclonal 4E11 capaz de neutralizar os quatro sorotipos do vírus dengue pela ligação aos resíduos 296-400 (THULLIER *et al.*, 2001). Também foi divulgada a presença de epítomos não especificados na proteína E do DENV-1 e do DENV-3, reconhecidos por anticorpos monoclonais IgM específicos para este sorotipo (BEASLEY; AASKOV, 2001; SERAFIN; AASKOV, 2001). Cinco peptídeos foram mapeados em três regiões distintas da proteína prM do DENV-2 (VÁZQUEZ *et al.*, 2002). O mapeamento da proteína não-estrutural NS1 para o DENV-2, a partir do uso de peptídios sintéticos justapostos, sugeriu que a sequência SHRLHNTMPSES seria um provável epítomo de célula B (WU *et al.*, 2003). Em 2004, Crill e Chang identificaram na glicoproteína-E do DENV-2 três epítomos distintos de reação cruzada, dois destes epítomos contendo resíduos contínuos localizados dentro do peptídeo de fusão que é altamente conservado entre os flavivírus e um terceiro contendo resíduos descontínuos (CRILL; CHANG, 2004). Epítomos lineares imunodominantes foram mapeados no capsídeo (na região C-terminal) e na proteína NS4a (na região amino-terminal) do DENV-2, utilizando peptídeos sintéticos tipo *multi-pin* (ANANDARAO; SWAMINATHAN; KHANNA, 2005).

A identificação dos mesmos é importante para a seleção de subunidades de vacina, desenvolvimento de testes sorológicos de diagnósticos específicos e compreensão das interações vírus-anticorpo em nível molecular (WU *et al.*, 2003).

2 JUSTIFICATIVA

Os epítomos de célula B do vírus dengue ainda não foram bem documentados e até então, nenhuma proteína ou um peptídeo podem ser usados para diferenciar a infecção pelos quatro sorotipos. Portanto, não são conhecidos epítomos sorotipo-específicos de célula B, na glicoproteína E do envelope do DENV-3. Além disso, os trabalhos que tratam do mapeamento desses epítomos utilizam soros de animais imunizados, não permitindo a visualização da resposta de humanos à peptídeos sintéticos.

Assim, a identificação de epítomos reativos à célula B é muito importante para o conhecimento das respostas imunes protetora e patogênica no que diz respeito a construção de uma vacina.

3 PERGUNTA CONDUTORA

Utilizando peptídeos sintéticos, quais os epítomos lineares de célula B presentes na glicoproteína E do envelope do vírus dengue 3?

4 HIPÓTESE

Epítomos de célula B estão presentes na glicoproteína E do envelope do DENV-3, por ser esta proteína o antígeno viral dominante e alvo de diversos estudos sobre mapeamento de epítomos em flavivírus.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

- Identificar epítomos de célula B na glicoproteína E do envelope do DENV-3, que não apresentam reação cruzada com o DENV-1 e DENV-2, utilizando peptídeos sintéticos justapostos.

5.2 Objetivos específicos

1. Otimizar o ELISA para mapeamento de epítomos de célula B.
2. Identificar epítomos lineares com soros de pacientes positivos para DENV-3.
3. Testar os peptídeos mais reativos contra soros de pacientes infectados com DENV-1 ou DENV-2, a fim de determinar epítomos que não apresentem reação cruzada.

6. METODOLOGIA

6.1 Seleção de pacientes positivos para DENV-3

Os soros dos pacientes positivos para dengue foram fornecidos pela soroteca do Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LAVITE)-Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife-Brasil. Esses soros foram identificados como positivos para DENV-3, através dos seguintes testes: isolamento viral e/ou ELISA para IgM (EIE-IgM-Biomanguinhos) e/ou ELISA para IgG (*Dengue IgG Indirect ELISA*, PanBio) e/ou PCR (*Polymerase Chain Reaction*). O tamanho da amostra (de conveniência), foi de 32 pacientes positivos para dengue (Tabelas 1A e B), escolhidos de acordo com seu diagnóstico laboratorial e clínico de dengue clássica-DC (n=13) e febre hemorrágica do dengue-FHD (n=08), baseados nos critérios de avaliação da Organização Mundial da Saúde (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1996). No entanto, um grupo de pacientes foi categorizado em dengue clássica complicada-DCC (n=11), baseado em outros critérios clínicos e laboratoriais, por apresentarem plaquetopenia ≤ 140.000 e manifestações hemorrágicas.

6.2 Seleção de pacientes negativos para DENV-3

Os soros de pacientes negativos para o DENV-3 foram fornecidos pela soroteca do Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LAVITE), do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. Foram escolhidos dezessete soros que apresentaram sorologia negativa para IgM (EIE-IgM-Biomanguinhos) e IgG (*Dengue IgG Indirect ELISA*, PanBio).

Tabela 1A - Perfil do diagnóstico laboratorial e clínico das amostras positivas para DENV-3. Pacientes com forma clínica de dengue clássica (DC) e dengue clássica complicada (DCC).

Amostras		Diagnóstico Laboratorial					Diagnóstico Clínico
Pacientes	N ^o da coleta	Isolamento Viral	PCR	IgM	IgG	Tipo de Infecção	Forma Clínica
1	4 ^o amostra	neg	pos	neg	pos	sec	DC
2	2 ^o amostra	pos	pos	neg	pos	sec	DC
3	3 ^o amostra	pos	pos	neg	pos	prim	DC
4	5 ^o amostra	pos	pos	pos	pos	prim	DC
5	2 ^o amostra	pos	pos	pos	pos	sec	DCC
6	5 ^o amostra	neg	pos	neg	pos	inc	DC
7	5 ^o amostra	neg	pos	neg	pos	sec	DCC
8	5 ^o amostra	neg	neg	pos	pos	inc	DC
9	5 ^o amostra	pos	pos	neg	pos	sec	DC
10	5 ^o amostra	neg	pos	pos	pos	sec	DCC
11	5 ^o amostra	neg	neg	neg	pos	imune	DC
12	5 ^o amostra	neg	neg	neg	pos	imune	DC
13	5 ^o amostra	pos	pos	pos	pos	sec	DC
14	5 ^o amostra	neg	neg	neg	pos	sec	DC
15	5 ^o amostra	pos	pos	pos	pos	sec	DCC
16	5 ^o amostra	pos	pos	pos	pos	sec	DCC
17	1 ^o amostra	pos	pos	neg	pos	sec	DCC
18	5 ^o amostra	neg	pos	pos	pos	sec	DCC
19	5 ^o amostra	neg	pos	pos	pos	sec	DCC
20	2 ^o amostra	neg	pos	pos	pos	sec	DC
21	1 ^o amostra	neg	pos	neg	pos	sec	DC
22	1 ^o amostra	neg	pos	neg	pos	sec	DCC
23	5 ^o amostra	neg	neg	pos	pos	sec	DCC
24	5 ^o amostra	neg	pos	pos	pos	sec	DCC

neg = negativo, pos = positivo, prim = infecção primária, sec = infecção secundária, PCR= *Polymerase Chain Reaction* e inc=inconclusivo.

Tabela 1B-Perfil do diagnóstico laboratorial e clínico das amostras positivas para DENV-3. Pacientes com forma clínica de febre hemorrágica do dengue (FHD).

Amostras		Diagnóstico Laboratorial					Diagnóstico Clínico
Pacientes	N ^o coleta	Isolamento Viral	PCR	IgM	IgG	Tipo de Infecção	Forma Clínica
1	4 ^o amostra	neg	pos	pos	pos	prim	FHD
2	4 ^o amostra	pos	pos	pos	pos	sec	FHD
3	6 ^o amostra	pos	pos	pos	pos	prim	FHD
4	5 ^o amostra	neg	neg	neg	pos	imune	FHD
5	5 ^o amostra	neg	neg	neg	pos	sec	FHD
6	5 ^o amostra	pos	pos	pos	pos	sec	FHD
7	6 ^o amostra	neg	pos	pos	pos	prim	FHD
8	6 ^o amostra	pos	pos	pos	pos	prim	FHD

neg = diagnóstico negativo, pos = diagnóstico positivo, prim = infecção primária,

sec = infecção secundária e PCR= *Polymerase Chain Reaction*.

6.3 Seleção de pacientes positivos para DENV-1 ou DENV-2

A fim de testar a possibilidade dos peptídeos mapeados serem de reação cruzada com os outros sorotipos do vírus dengue, foram utilizados vinte soros de pacientes diagnosticados como positivos para DENV-1 ou 2. Estes soros foram provenientes da epidemia de 1999 e fornecidos pelo banco de soros do Setor de Virologia, do Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN-PE) da Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco. Os pacientes apresentaram diagnóstico clínico de dengue clássica e diagnóstico laboratorial com sorologia positiva para IgM (MAC-ELISA) e isolamento viral e/ou PCR positivos em DENV-1 ou DENV-2.

6.4 Pool de pacientes positivos e negativos para DENV-3

Para o mapeamento inicial dos epítomos de célula B, um pool de soros positivos e negativos também foi montado com amostras cedidas pelo Setor de Virologia do LACEN-PE. O pool positivo incluiu amostras de 8 pacientes positivos para DENV-3, com sorologia positiva para IgM (MAC-ELISA) e com altos títulos de IgG (*Dengue IgG Indirect ELISA*, PanBio). O pool negativo incluiu amostras de 21 pacientes não reativos para qualquer sorotipo do dengue, demonstrado através dos exames laboratoriais de isolamento viral, sorologia para IgM (MAC-ELISA) e IgG (*Dengue IgG Indirect ELISA*, PanBio).

6.5 Peptídios

6.5.1 *Peptídeos sintéticos*

Foi utilizado um total de noventa e cinco peptídeos, cada um com 15-mers e sobreposição de 10 aminoácidos, sintetizados por dois laboratórios: SynPep, California-USA e Schafer, Conpenhagen-DK. Ambos foram produzidos a partir da seqüência de 490 aminoácidos da glicoproteína E do envelope do DENV-3 (NCBI AAK74176), de cepa circulante no Estado do Rio de Janeiro (MIAGOSTOVICH *et al.*, 2002), sendo esta a mesma cepa que circulou durante as epidemias em Recife (dados não publicados) e que passaremos no decorrer deste trabalho, a denominar de DENV-3seq.

6.5.2 *Mapeamento de epítomos de célula B*

Os noventa e cinco peptídeos sintéticos fornecidos pela Synpep foram testados através de ELISA frente ao pool de soros de pacientes positivos e negativos para DENV-3, como descrito no item 6.4. Para o cálculo do cut-off (CO) deste ensaio foi feita a média das DOs dos 95 peptídeos frente ao pool negativo, mais 3 vezes o desvio padrão da média ($CO=X+3DP$).

Os peptídeos mais reativos foram então testados frente aos soros individuais dos pacientes, como descrito nos itens 6.1, 6.2 e 6.3., através do ELISA. Os resultados encontrados foram expressos sob a forma de unidade arbitrária de ELISA (UAE), que consiste na razão entre a densidade ótica (D.O.) encontrada para cada amostra teste e a D.O. encontrada para o plasma de referência na mesma placa, a fim de minimizar a variabilidade de valores dos controles positivo e negativo, bem como das amostras encontradas em cada experimento (VERWEIJ *et al.*, 1995). No nosso caso, a UAE foi calculada multiplicando para cada peptídeo, as DOs dos soros testados por um quinto da DO do controle positivo (Ag extracelular total de DENV-3 + pool positivo) e gerada pelo Software StatView versão 5,0.

O Software Estatístico MedCalc versão 8.2 foi usado para análise da curva ROC (*Receiver Operating Characteristics*), geração de gráficos e determinação do CO. Os gráficos da curva ROC exibem a sensibilidade versus 1 menos sensibilidade. As áreas abaixo da curva (AAC) podem apresentar valores que variam de 0,5 a 1,0, com altos valores indicando uma capacidade discriminatória maior. Quando a variável estudada não pode distinguir entre os dois grupos, a área será igual a 0,5 (a curva ROC coincidirá com a diagonal). As áreas abaixo da curva significativamente diferentes de 0,5 ($p < 0,05$) indicam que esses testes têm uma capacidade de distinguir entre os grupos estudados. O CO foi selecionado para permitir uma alta acurácia e minimização dos resultados falso negativos e falso positivos.

A razão de verossimilhança positiva (RV^+) para um determinado teste diagnóstico expressa a probabilidade do resultado de um teste ser positivo em pessoas com a doença, dividida pela probabilidade do teste ser positivo em pessoas sem a doença. O teste é considerado útil se a RV^+ for maior do que 1, reforçando a especificidade do teste. Nos casos em que a RV^+ for igual ou menor do que 1, o teste em estudo provavelmente apresenta resultados falsos-negativos. A razão de verossimilhança negativa para um teste (RV^-) expressa a probabilidade do resultado de um teste diagnóstico ser negativo em pessoas com a doença, dividido pela probabilidade do teste ser negativo em pessoas sem a doença. O teste é considerado útil se a RV^- for menor do que 1.

Os resultados obtidos foram apresentados utilizando um intervalo de confiança de 95%.

6.6 Predições de epítomos de célula B

A fim de conhecer melhor os peptídeos mais reativos mapeados, foram utilizadas ferramentas de predição de epítomos de célula B disponíveis na página do Immune epitope *database and analysis resource* (www.immunepitope.com) para realizar as predições de acessibilidade (EMINI *et al.*, 1985) e antigenicidade (KOLASKAR; TONGAONKAR, 1990). Para análise do perfil de hidropaticidade (KYTE; DOOLITTLE, 1982), foi utilizado o software *Lasergene Protean*, da DNASTAR (www.dnastar.com). Uma outra análise de acessibilidade da proteína também foi feita utilizando o programa DSSP (KABSCH; SANDER, 1983).

6.7 Modelagem da estrutura da glicoproteína-E

A seqüência de aminoácidos da glicoproteína-E DENV-3seq foi passada para o formato FASTA e enviada para o programa de modelagem de proteínas *Swiss Model* (www.swissmodel.expasy.org). O FASTA é um software para o alinhamento de proteínas e DNA, descrito pela primeira vez por Lipman e Pearson em 1985. Porém, o formato do arquivo usado como entrada para este software passou a ser largamente usado hoje por ferramentas de busca de seqüências protéicas e programas de alinhamento de seqüências (LIPMAN; PEARSON, 1985). Como resultado da modelagem para o DENV-3seq, o *Swiss Model* enviou a estrutura da proteína modelada como um monômero e os cinco modelos mais homólogos estruturalmente de proteínas já publicadas. A visualização da estrutura foi feita pelo programa *Swiss PDB Viewer* (www.expasy.org), onde os aminoácidos dos peptídeos mapeados foram localizados e atribuídos a cada um deles uma cor diferente.

6.8 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

6.8.1 Padronização da técnica

Para a otimização da técnica de ELISA usando os peptídeos sintéticos da Synpep, foram analisadas as seguintes variáveis:

- a) seleção da placa
- b) concentração do peptídeo sintético da Synpep
- c) seleção do bloqueio (inativação dos sítios inespecíficos)
- d) titulação do anticorpo primário
- e) titulação dos conjugados

Para a otimização da técnica de ELISA usando os peptídeos sintéticos da Schafer, já tendo como base o conhecimento adquirido pela padronização com os peptídeos da Synpep, foram analisadas as seguintes variáveis:

- a) Concentração do peptídeo sintético da Schafer
- b) Seleção do bloqueio (inativação dos sítios inespecíficos)
- c) Titulação do anticorpo primário
- d) Tempo de reação do revelador (substrato-TMB)
- e) Seleção dos filtros para leitura no espectrofotômetro (leitor de ELISA)

6.8.2 Controle positivo

Como controle positivo para os nossos ensaios, foi utilizado o antígeno celular total de DENV-3, produzido no LAVITE através da técnica de produção de antígeno celular de dengue (HECHAVARRIA, 2002), que foi testado com o pool de soros positivos e negativos.

6.8.3 Controles negativos

É importante salientar que em todos os ensaios foram utilizados os seguintes controles:

- a) Branco: a sensibilização da placa foi realizada com antígeno celular ou peptídeos e PBS no lugar do anticorpo primário, a fim de testar se havia ligação inespecífica do conjugado com o peptídeo ou antígeno celular.
- b) PBS+PBS: a sensibilização da placa foi realizada com PBS e em seguida foi colocado o PBS no lugar do anticorpo primário, a fim de testar se havia ligação inespecífica do conjugado com a placa.

6.9 Análise Estatística

As comparações das áreas abaixo da curva (AAC) foram realizadas usando métodos não paramétricos do programa estatístico Medcalc versão 8.2 e as diferenças foram consideradas significantes, quando $p < 0,05$.

6.10 Aspectos Éticos

O projeto faz parte de um projeto maior denominado “Vacina de dengue baseada em epítomos, tetravalente e direcionada ao compartimento MHC II”, registrado no CEP/CPqAM 68/02 e aprovado pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) com o número 4909. O projeto de dissertação proposto atende às condições de subprojeto o que o habilita a utilizar o parecer do projeto principal.

7 RESULTADOS

7.1 Padronização do ELISA para uso de peptídeos sintéticos

7.1.1 *Peptídeos sintéticos da Synpep*

Para a padronização da técnica algumas variáveis foram analisadas como descrito na metodologia:

7.1.1.1 Seleção da placa

Utilizamos placas de máxima absorção (placas NUNC Maxisorp e Immulon II) para proteínas e verificamos que as densidades ópticas foram semelhantes. Optamos pela placa Immulon II para realizar as etapas de padronização, por ser esta a mais apropriada para a captação de peptídeos (Dynatech Laboratories Inc. VA-USA).

7.1.1.2 Concentração dos peptídeos

Os noventa e cinco peptídeos sintéticos da Synpep na quantidade de 3 mg cada foram reconstituídos em 20% de DMSO (*dimethyl sulfoxide*) em água destilada, para uma concentração final de 3 mg/ml (solução estoque). Nos primeiros procedimentos os peptídeos foram testados em pools de cinco peptídeos, diluídos em tampão carbonato (TC), 0,2M, pH 9,6, na concentração de 10 µg/ml. Devido a forte reação inespecífica apresentada, optamos por trabalhar com os peptídeos individualmente.

Para isso, os peptídeos foram diluídos em tampão carbonato pH 9,6, 0,2M, a partir da solução estoque e utilizados na concentração final de 10 µg/ml. A sensibilização da placa foi feita com 100 µl da diluição do peptídeo e incubada por 18h (*overnight-O/N*) a 4⁰C. Durante os ensaios, testando os 95 peptídeos individuais, escolhemos um dos que apresentaram maiores densidades óticas em todos os experimentos (peptídeo 14), como padrão para a otimização das outras variáveis. Este único peptídeo foi testado então em diferentes concentrações: 5, 10, 20, 30 e 40 µg/ml. A concentração de 20 µg/ml foi considerada a ideal para ser utilizada na técnica.

7.1.1.3 Seleção do bloqueio (inativação dos sítios inespecíficos)

Para a escolha da substância mais eficiente no bloqueio de sítios inespecíficos de ligação, utilizamos:

- a) Leite desnatado instantâneo.
- b) Soro albumina bovina (BSA).
- c) Soro bovino fetal (FBS).

Todas essas substâncias foram testadas na concentração de 5% (p/v) e 10% (p/v) com e sem Tween 20 (Reagen, RJ, Brasil), em *Phosphate Buffered Saline* (PBS) pH 7,2, por 2h a temperatura ambiente (T.A.).

Além disso, também testamos como soluções de bloqueio no mesmo tempo de incubação e na mesma condição de temperatura, os seguintes soros:

- a) 3% soro camundongo
- b) 3% soro de cabra

Os melhores resultados foram obtidos com leite desnatado instantâneo a 5% sem Tween 20 e BSA a 5% com Tween 20. Pelo seu baixo custo, o leite desnatado instantâneo foi o escolhido para solução bloqueadora.

Como alternativa para tentar baixar ainda mais a ligação inespecífica da reação, testamos o leite desnatado a 5% em tampão carbonato, 0,2M, pH 9,6. Os resultados mostraram então, uma melhor relação entre os controles positivos e negativos quando comparados com os resultados dos ensaios com PBS, tendo o tampão carbonato tornado a solução bloqueadora mais eficiente.

Assim, a substância de bloqueio selecionada foi o leite desnatado instantâneo a 5% em tampão carbonato pH 9,6.

7.1.1.4 Titulação de soros

Os soros utilizados na titulação foram os pools de soros de pacientes positivos e negativos (como referido no item 6.1), os quais foram testados em duas soluções diluentes: leite desnatado instantâneo a 5% e a 10%, ambas em PBS, pH 7,2. Os pools também foram testados em diferentes diluições: 1:50, 1:100, 1:200 e 1:400, sendo utilizados para todos os ensaios o tempo de incubação de 1h e temperatura de 37⁰C.

Os melhores resultados foram observados na diluição de 1:50 em 10% de leite desnatado instantâneo em PBS pH 7,2, onde obtivemos uma diferença maior entre os pools positivo e negativo.

7.1.1.5 Titulação dos conjugados

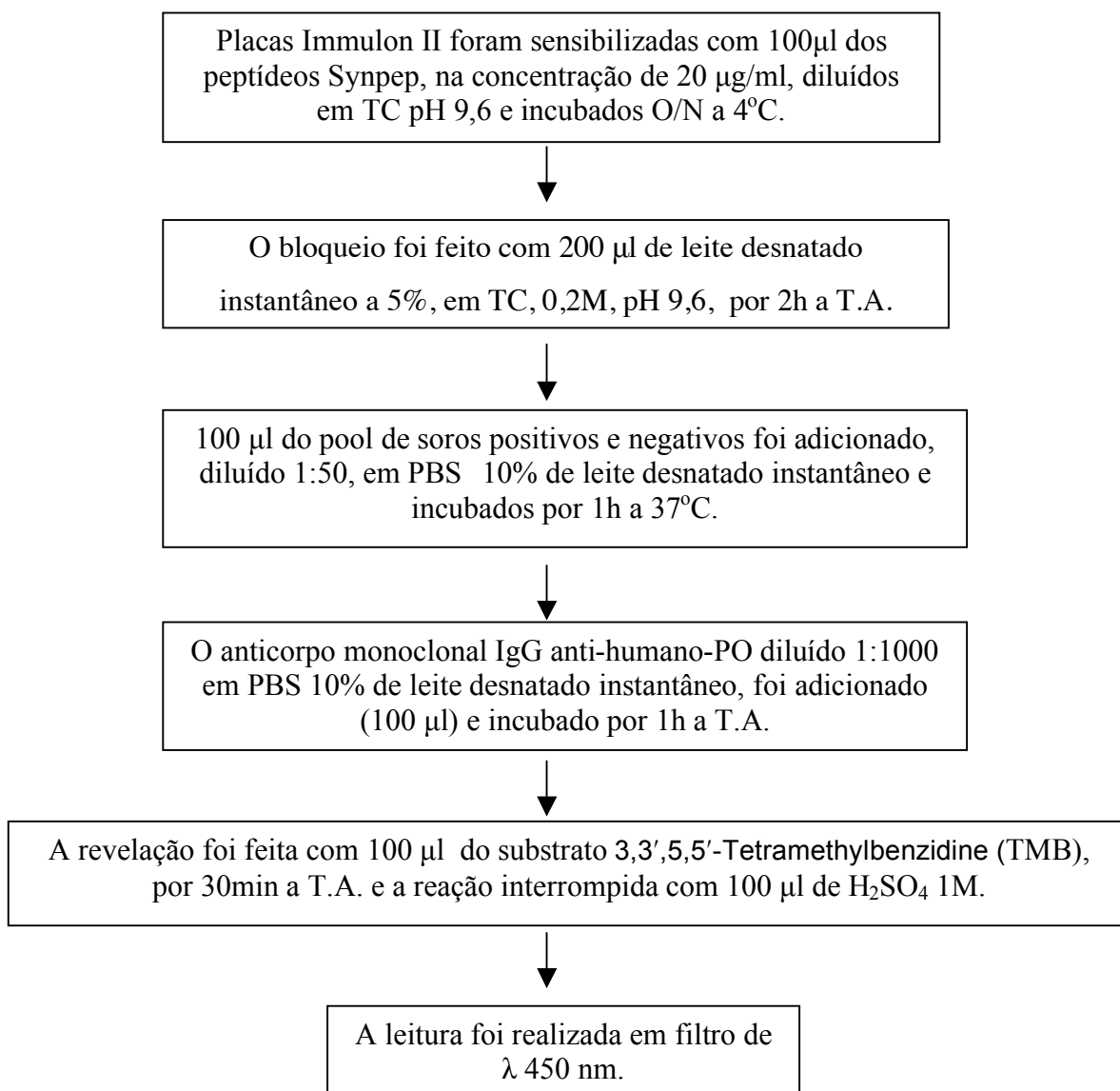
Após a seleção do soro na diluição de 1:50, a titulação do conjugado foi realizada com anticorpo monoclonal IgG anti-humano conjugado a peroxidase (PO) fabricado em camundongo (nas diluições 1:500, 1:1.000 e 1:2.000) em PBS com 5%, 10%, 20% ou 30% de leite desnatado instantâneo, e incubado por 1h, T.A..

Foi selecionado anticorpo monoclonal IgG anti-humano-PO fabricado em camundongo, na diluição de 1:1.000 em PBS com 10% de leite desnatado instantâneo.

7.1.1.6 Controles do ELISA

Foram utilizados os controles citados na metodologia, ítem 6.8.2.2 , e observamos que não havia ligação inespecífica do conjugado com o peptídeo, com o antígeno celular ou com a placa.

7.1.1.7 Protocolo final para peptídeos Synpep



- Seis lavagens com 0,05% Tween 20 em PBS pH 7,2 foram efetuadas entre todas as incubações.

Através desse protocolo, utilizando o pool de soros positivos e negativos como descrito no item 6, foram selecionados 11 peptídeos. Para o cálculo do “cut-off” (CO) deste ensaio foi feita a média das densidades óticas (DOs) dos 95 peptídeos frente ao pool negativo mais três vezes o desvio padrão da média (CO= 0,5). Os resultados deste ensaio são mostrados na Figura 8. Um maior detalhamento dos onze peptídeos mapeados pode ser observado na Tabela 2.

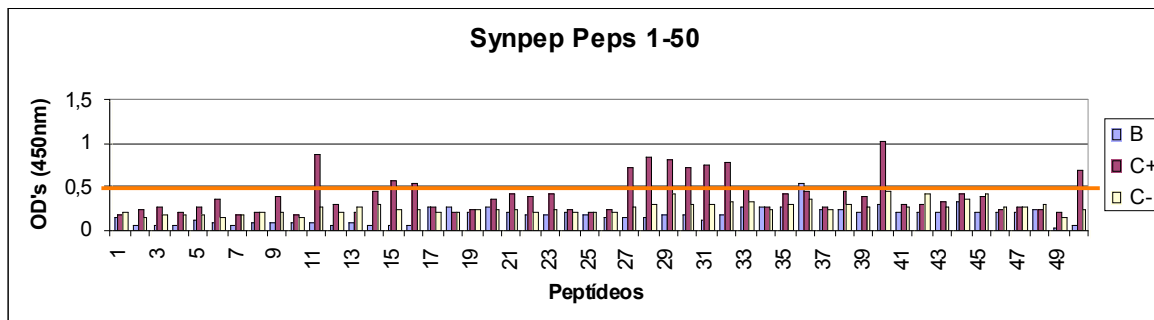
Em virtude de problemas operacionais, demos continuidade as etapas posteriores do trabalho utilizando os peptídeos sintéticos da Schafer, cujas características eram iguais as do anterior. Em razão disso, apenas algumas variáveis tiveram que ser novamente otimizadas, permanecendo a mesma padronização para a placa (Immulon II-Dynatech Laboratories Inc. VA-USA) e diluição do conjugado (anticorpo monoclonal IgG anti-humano-PO fabricado em camundongo, diluição de 1:1.000).

7.1.2 *Peptídeos sintéticos da Schafer*

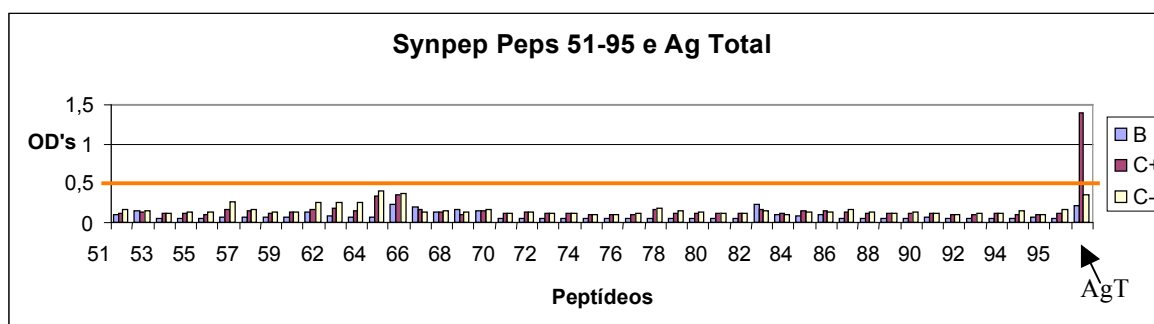
7.1.2.1 Concentração dos peptídeos

Para a padronização, foram utilizados todos os onze peptídeos mais reativos identificados no item 7.1.1.7. Os mesmos foram diluídos a partir da sua concentração original (10 mg/ml), em 10, 20 e 40 µg/ml, em tampão carbonato, 0,2M, pH 9,6. A sensibilização da placa foi feita com 100 µL de cada peptídeo diluído e incubada por 18h a 4⁰C. A concentração de 20 µg/ml foi considerada a ideal para ser utilizada na técnica.

A



B



Figuras 8A e B-Mapeamento dos 95 peptídeos da Synpep. A) Peptídeos de números 1 a 50. B) Peptídeos de números 51 a 95 e antígeno total (AgT). As DOs foram lidas em filtro de 450nm. B=branco, C+ = pool de soros positivos e C- = pool de soros negativos. Em laranja a linha que representa o *cut-off* (CO).

Tabela 2-Seqüência dos aminoácidos, posição na proteína e DOs encontradas para os 11 peptídeos mapeados.

Peptídeo #	Seqüência dos aminoácidos (posição na proteína)	ELISA(DO ₄₅₀) Pool de soros
11	TQLATLRKLCIEGKI (51-65)	0,90
15	DSRCPTQGEAVLPEE (71-85)	0,59
16	TQGEAVLPEEQDPNY (76-90)	0,55
27	QYENLKYTVIITVHT (131-145)	0,72
28	KYTVIITVHTGDQHQ (136-150)	0,87
29	ITVHTGDQHQVGNET (141-155)	0,82
30	GDQHQVGNETQGVTA (146-160)	0,75
31	VGNETQGVTAETPQ (151-165)	0,76
32	QGVTAETPQASTTE (156-170)	0,78
40	LLTMKNKAWMVHRQW (196-210)	1,03
50	PEVVVLGSQEGAMHT (246-260)	0,72

7.1.2.2 Seleção do bloqueio (inativação dos sítios inespecíficos)

A solução de bloqueio selecionada no item 7.1.1.3 não se mostrou adequada quando utilizamos esses novos peptídeos. Por isso, para selecionarmos a substância mais eficiente para o bloqueio de sítios inespecíficos, testamos:

- a) BSA
- b) FBS

Ambas foram testadas na concentração de 5% com 0,05% de Tween 20 em PBS pH 7,2, por 2 h a T.A.

O melhor resultado foi obtido com o FBS e para adequarmos ainda mais a solução de bloqueio, testamos a substância selecionada diluída em tampão carbonato, 0,2M, pH 9,6, a qual foi escolhida.

7.1.2.3 Titulação de soros

Os pools positivo e negativo (referido no item 6.1) foram testados nas diluições de 1:50 e 1:100, em 5% de FBS em 0,05% Tween 20 em PBS pH 7,2, tendo sido utilizado para todos os ensaios o tempo de incubação de 1 hora e temperatura de 37⁰C, baseado no protocolo padronizado para os peptídeos da Synpep. Os melhores resultados foram observados na diluição de 1:50.

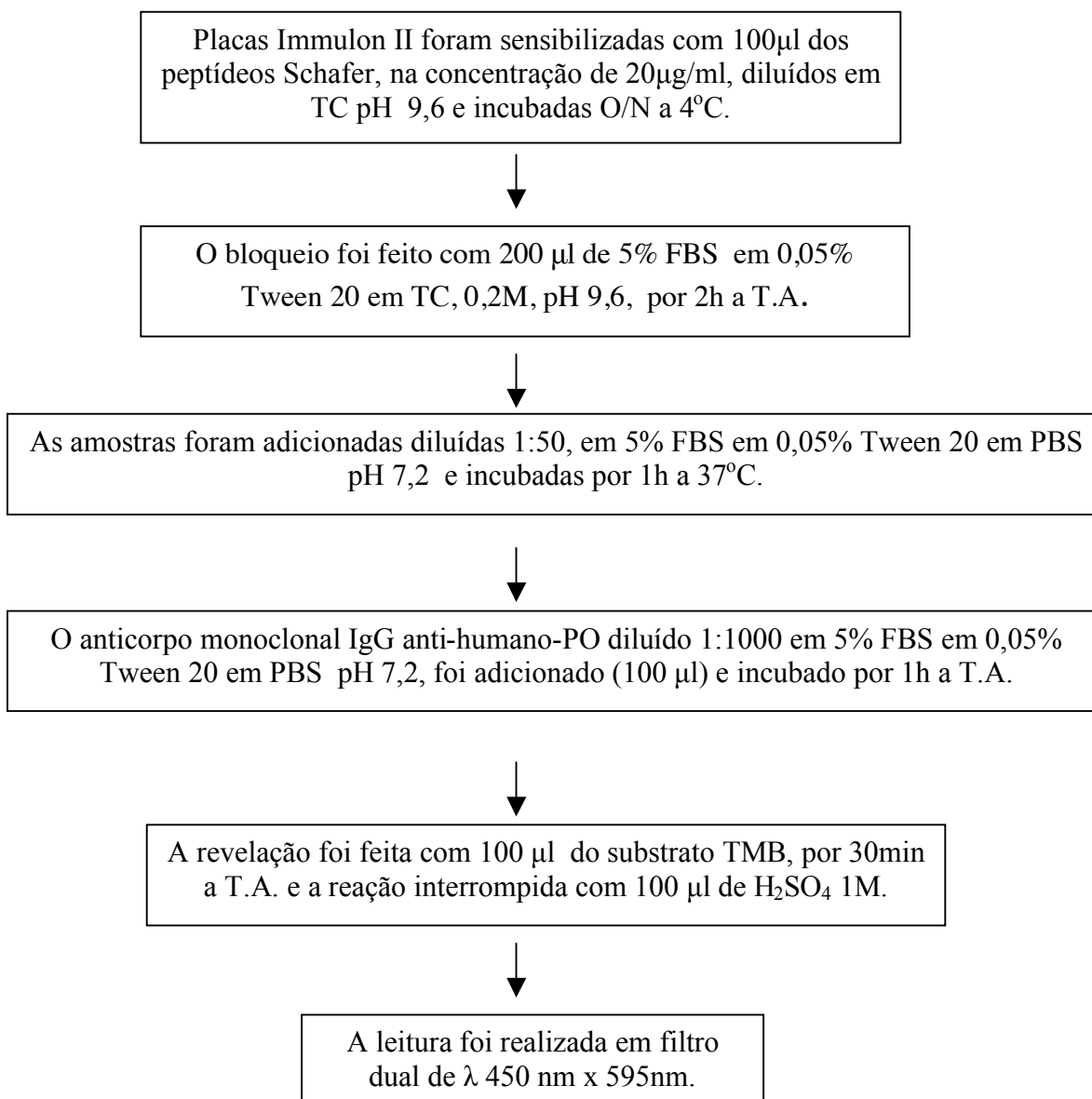
7.1.2.4 Tempo de reação do revelador (substrato-TMB) e seleção dos filtros para leitura no espectrofotômetro (leitor de ELISA)

Os 11 peptídeos também foram testados quanto ao melhor tempo de reação do revelador e melhor filtro para leitura no espectrofotômetro. Para isso, foram realizadas leituras durante 5, 10, 15, 20, 30 e 40 minutos de reação, utilizando diferentes filtros: 450nm, 450nm x 595nm e 450nm x 655nm. Os melhores resultados foram aqueles em que encontramos a maior diferença entre os positivos e negativos. Os parâmetros escolhidos foram leitura com 30 minutos de reação e filtro de 450nm x 595nm.

7.1.2.5 Controles do ELISA

Foram utilizados os mesmos controles citados na metodologia, item 6.8.2.2 e não foi observada ligação inespecífica do conjugado com o peptídeo, com o antígeno celular ou com a placa.

7.1.2.6 Protocolo final para peptídeos Schafer



- Seis lavagens com 0,05% Tween 20 em PBS pH 7,2 foram efetuadas entre todas as incubações.

7.2 Predições de epítomos de célula B

Parâmetros como hidrofiliçidade, flexibilidade, acessibilidade, polaridade e antigenicidade das cadeais polipeptídicas têm sido correlacionadas com a localização de epítomos contínuos (HASTE ANDERSEN *et al.*, 2005). Isto leva ao uso de regras empíricas que possam permitir a predição da posição destes epítomos a partir de características da seqüência protéica. Essas predições têm como objetivo identificar regiões de interação entre antígeno e anticorpo. Esta identificação correta, não só permite mapear regiões importantes de localização na estrutura tri-dimensional, mas também auxiliar no diagnóstico e prognóstico de doenças, na imunointervenção e no desenho de drogas e vacinas, onde peptídeos específicos são usados para induzir a resposta de anticorpos (SUMAR, 2001).

Por isso, utilizamos ferramentas de predição disponíveis para um melhor estudo dos onze peptídeos mapeados e com isso analisá-los através da hidrofiliçidade (KYTE; DOOLITTLE, 1982), acessibilidade (EMINI *et al.*, 1985) e antigenicidade (KOLASKAR; TONGAONKAR, 1990), como descrito abaixo:

7.2.1 Perfil de hidropaticidade (hidrofiliçidade e hidrofobicidade)

As proteínas consistem de aminoácidos que se juntam através de pontes peptídicas e cada aminoácido tem um grupo de cadeia lateral (R) diferente que determina quando a proteína é hidrofóbica ou hidrofílica (Figura 9). Grupos hidrofílicos são tipicamente polares interagindo com a água através de pontes de hidrogênio. Grupos hidrofóbicos por sua vez são apolares e incapazes de interagir com a água. A hidrofiliçidade e hidrofobicidade do aminoácido determinam onde ele estará localizado na estrutura final da proteína (KYTE; DOOLITTLE, 1982).

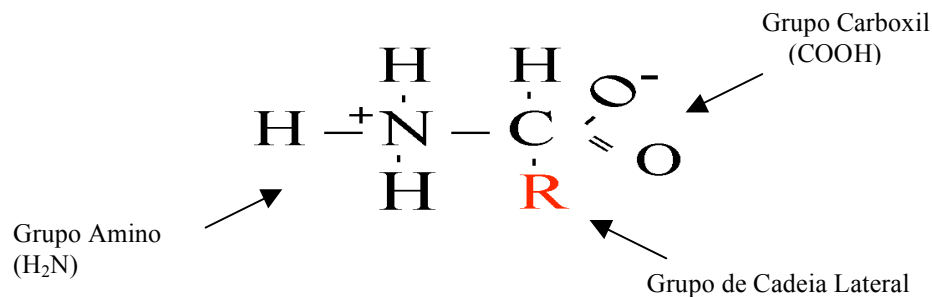


Figura 9-Fórmula geral de um aminoácido. R é comumente uma das 20 diferentes cadeias laterais. Em pH 7,0 o grupo amino e o grupo carboxil são ionizados.

Os plots de hidropaticidade de Kyte-Doolittle fornecem informações sobre a possível estrutura da proteína e podem indicar se as proteínas são do tipo transmembrana ou se estariam expostas na superfície (KYTE; DOOLITTLE, 1982). A Figura 10 mostra o perfil de hidropaticidade observado na glicoproteína E do DENV-3. A proteína é quase totalmente hidrofílica com exceção de alguns picos hidrofóbicos ao longo da mesma e da região C-terminal que apresenta uma área de hidrofobicidade maior. O peptídeo 11 que abrange os aminoácidos 51-65, apresenta uma maior hidrofobicidade entre os resíduos 53-55 e 60-63. Os peptídeos 15 e 16 (resíduos 71-90) são 95% hidrofílicos, com apenas um aminoácido, a glicina na posição 78, dentro do perfil de hidrofobicidade. Dentre os peptídeos 27, 28, 29, 30, 31 e 32 (resíduos 131-170), são achados aminoácidos hidrofóbicos entre os resíduos 137-144, 159-162, 169-170, mostrando ser este peptídeo em sua maioria hidrofílico abrangendo os resíduos 131-136, 145-158, 169-170. O peptídeo 40 (resíduos 196-210) e 50 (resíduos 246-260) apresentam 74% e 34% de hidrofobicidade respectivamente. Picos de hidrofobicidade foram encontrados nos aminoácidos glutamina (86), treonina (228), triptofano (229), alanina (243 e 344) e glicina (342). As áreas mais hidrofóbicas estão entre os aminoácidos 104-121, 137-144, 191-199, 247-254, 274-281, 373-383, 420-431 e 433-493.

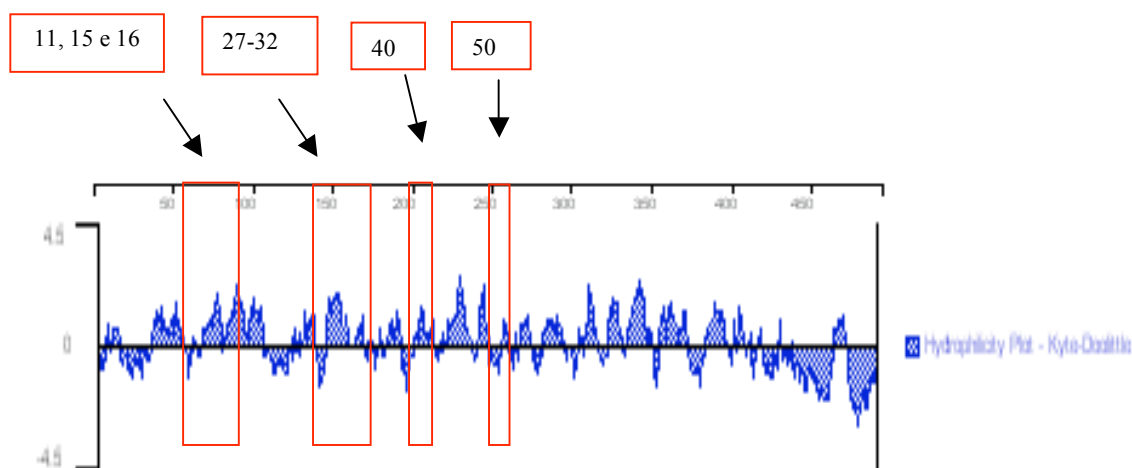


Figura 10-Perfil de hidrofobicidade da glicoproteína-E do DENV-3, de acordo com Kyte & Doolittle, gerado usando o software Lasergene Protean. O eixo horizontal indica o número do aminoácido na proteína e o eixo vertical o valor da hidropaticidade. Valores positivos indicam hidrofobicidade e valores negativos hidrofobicidade (DNASTAR, 2006).

7.2.2 Perfis de acessibilidade de superfície

Os perfis de acessibilidade mostram quais aminoácidos ou seqüência peptídica estariam mais expostos na superfície da proteína, revelando assim quais resíduos poderiam ser relacionados a funções da proteína viral como ligação ao receptor na célula hospedeira ou até mesmo se possibilitariam a ligação de anticorpos. Um peptídeo hidrofóbico pode não estar necessariamente exposto à superfície visto que a glicoproteína-E se apresenta como um dímero com uma interface entre os monômeros, o que possibilitaria a entrada de água permitindo que alguns resíduos apresentem hidrofobicidade, mas estejam escondidos dentro do dímero.

O perfil de acessibilidade de superfície usando a escala de Emini (Figura 11) mostrou que várias seqüências peptídicas poderiam estar expostas na superfície, como mostra a Tabela 3. Dentre estas predições, dois peptídeos mostram seqüências de aminoácidos presentes nos peptídeos 27 e 30 por nós mapeados. São os peptídeos que apresentam aminoácidos nas posições 130-136 abrangendo os resíduos VQYENLK, onde QYENLK aparecem no peptídeo 27 (aa 131-145) e o peptídeo 145-156 com a seqüência TGDQHQVGNETQ onde GDQHQVGNETQ aparece no peptídeo 30 (aa 146-160).

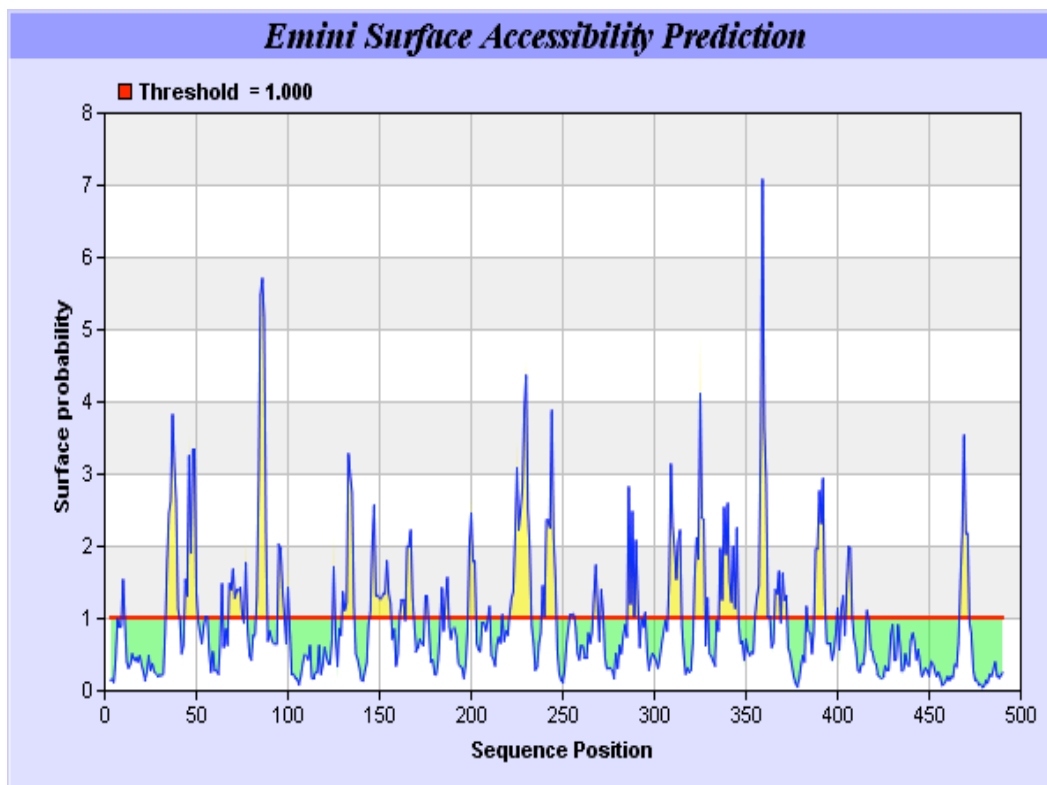


Figura 11-Predição de acessibilidade dos aminoácidos da glicoproteína-E do DENV-3, segundo Emini. O eixo horizontal indica o número do aminoácido e o eixo vertical o valor da probabilidade dos mesmos estarem expostos na superfície da proteína. Valores positivos acima do eixo horizontal indicam a acessibilidade .

Fonte: IMMUNE EPITOPE DATABASE AND ANALYSIS RESOURCE, 2006.

Tabela 3-Peptídeos preditos segundo a escala de acessibilidade de Emini.

Em vermelho os resíduos presentes nos peptídeos 27 e 30 mapeados.

Posição Inicial	Posição Final	Peptídeo
34	40	MAKNKPT
44	50	ELQKTEA
68	75	ITTDSRCP
83	88	PEEQDP
130	136	VQYENLK
145	156	TGDQHQVGNETQ
221	232	GATTETPTWNRK
239	246	KNAHAKKP
286	291	KMDKLE
308	314	KEVSETQ
322	327	VEYKGE
336	345	STEDGQGKAH
355	363	VVTKKEEPV
388	393	NWYKKG

Fonte: IMMUNE EPITOPE DATABASE AND ANALYSIS RESOURCE, 2006

A acessibilidade também foi testada com o programa DSSP (*Define Secondary Structure of Proteins*) (KABSCH; SANDER, 1983) como mostra a Figura 12. Na primeira linha está representada a seqüência de aminoácidos de DENV-3, na segunda as letras codificam a estrutura predita para a proteína (ver legenda abaixo da figura) e na terceira linha representa a predição de acessibilidade, onde os valores de 0-1 são dados para os resíduos escondidos e valores de 2-9 para os resíduos acessíveis, significando que para o valor nove, temos o aminoácido mais exposto. Para a análise levamos em consideração como aminoácidos de maior exposição, aqueles que apresentavam valores maiores ou iguais a quatro (≥ 4).

MRCVGVGNRDFVEGLSGATWVDVVLHGGCVTTMAKNKPTLDIELQKTEATQLATLRKLCIEGKITNITTD SRCPTQG
 EAVLPEEQDP
 CTTTTCSSEEEECCTTCSEEEEEECTTCEEEEEEETTEEEEEEEEEEEEEEEEECCCEEEEEEEEEEEEEEEEEECTTSC
 CCCC GGCTCT
 010063470753919974390605054600000119930000020850605945444300061834994755930995
 9081936956

NYVCKHTYVDRGWGNGCGLFGKGS LVTCAKFQCLEPIEGKV VQYENLKYTVIITVHTGDQH QVGNETQGVTAETPQA
 STTEAILPEY
 TEEEEEEEEEECTTTTCSSEEEEEEETTEEEEEEEEEEEEEEEEECCGGGEEEEEEEEEECCCTTCTTCSSEEEEEECCGG
 CEEEEEEETT
 540395290840979606793900100006082774060630949607120000004065905259962481903295
 5749090892

GTLGLECS PRTGLDFNEMI LLTMKNKAWMVHRQWFFDLPLPWTSGATTETPTWNRKELLVTFKNAHAKKPEVVV LGSQ
 EGAMHTAL
 EEEEEEECCSSCTTSEEEEEEETTEEEEEHHHHHHCCSCEEEESCSSSCCCBCGGGTEEEECSSSSSCEEEEECCC
 HHHHHHT
 330108043936872991000219990110979905919004182799994717919700659599199292759355
 83514950

TGATEIQNSGGT SIFAGHLKCR LKMDKLELKGMSYAMCTNTFVLKKEVSETQHGTILVKVEYKGEDAPCKIPFSTEDG
 QGKAHNRLI
 SSSEEECCBTBCCCCCEEEEEECTTBCCSCTTSCBCCSCEEEEEEECTTSCEEEEEEECSSCCSEECCEEEESS
 SSSCCCEES
 972790927742071809080907099093319987808530759991782971002040409095460300251483
 9495970940

TANPVVTKKEEPVNIEAEPFPGESNIVIGIGDNALKINWYKK
 SCSCEECSTTSCEEEEEECSSEEEEEECSSTTCEEEEEECC
 033010699970000005029290202007699129293929

Figura 12-Predição de acessibilidade segundo Kabsch & Sander, 1983. Em cinza estão as folhas- β e em vermelho os 11 peptídeos mapeados. As letras que seguem o código do programa DSSP estão indicadas abaixo:

- * H = α hélice (ligações de hidrogênio com 4 'loops/turns' repetitivos)
- * B = resíduo isolado em folha- β (*beta-sheet*)
- * E = Longo filamento de aminoácidos participantes de uma folha- β
- * G = 3-hélice (3_{10} helice)
- * I = 5- hélice (π helice)
- * T = ligação de hidrogênio em *loop/turn*
- * S = áreas da proteína que são geometricamente curvadas

Os resultados mostram que todos os peptídeos, em especial 11, 27 e 40, possuem resíduos dentro de áreas de folhas β , as quais constituem a estrutura secundária da proteína. As folhas β produzem estruturas bastante rígidas, mantidas por ligações de hidrogênio que interligam as ligações peptídicas de cadeias vizinhas (ALBERTS *et al.*, 2002). O peptídeo 11 mostra nove aminoácidos bem expostos em especial a glutamina na posição 52. A região que abrange os peptídeos 15 e 16 colabora com quinze aminoácidos expostos na superfície da molécula, em especial os aminoácidos arginina (73), treonina (76), ácido glutâmico (79), prolina (83) e glutamina (77 e 86). Entre os peptídeos 27, 28, 29, 30, 31 e 32, vinte e dois aminoácidos parecem ser expostos, entre eles glutamina (131 e 165), ácido glutâmico (133, 154, 161 e 170), histidina (149) e treonina (155). Para os peptídeos 40 e 50 foram observados sete e dez aminoácidos respectivamente, como os mais expostos na superfície da molécula. Dentre estes, lisina (200 e 202), asparagina (201), histidina (207), glutamina (209) e triptofano (210) para o peptídeo 40 e ácido glutâmico (247), leucina (251) e treonina (260) para o peptídeo 50.

Os peptídeos 11 e 27, também aparecem como aqueles onde podem ser vistas áreas com maior número de resíduos escondidos (valor igual a zero).

7.2.3 Perfil de antigenicidade

A escala de antigenicidade é um método semi-empírico desenvolvido para prever determinantes antigênicos nas proteínas, utilizando as propriedades físico-químicas dos aminoácidos e suas frequências de ocorrência em epítomos conhecidos experimentalmente. A aplicação deste método em um grande número de proteínas mostra que ele é capaz de prever determinantes antigênicos com até 75% de acurácia (KOLASKAR; TONGAONKAR, 1990).

O perfil de antigenicidade usando a escala de Kolaskar & Tongaonkar (Figura 13) mostrou que várias seqüências peptídicas na glicoproteína E poderiam ser antigênicas, como mostra a tabela 4. Dentre estas predições, quatro peptídeos mostram seqüências de aminoácidos presentes nos peptídeos 11, 15, 27 e 50 por nós mapeados. São os peptídeos que apresentam aminoácidos nas posições 51-63 abrangendo os resíduos TQLATLRKLCIEG, onde todos os resíduos aparecem no peptídeo 11 (aa 51-65), o peptídeo 77-84 com a seqüência QGEAVLPE com todos estes resíduos presentes no peptídeo 15, aminoácidos nas posições 126-146

(EGKVVQYENLKYTVIITVHTG) corroborando com o peptídeo 27 mapeado (aa 131-145), mostrando os resíduos QYENLKYTVIITVHTG em comum e finalmente o peptídeo predito KKPEVVVLGS (aa 244-253), com a seqüência de resíduos PEVVVLGS em comum com o peptídeo 50 (aa 246-260).

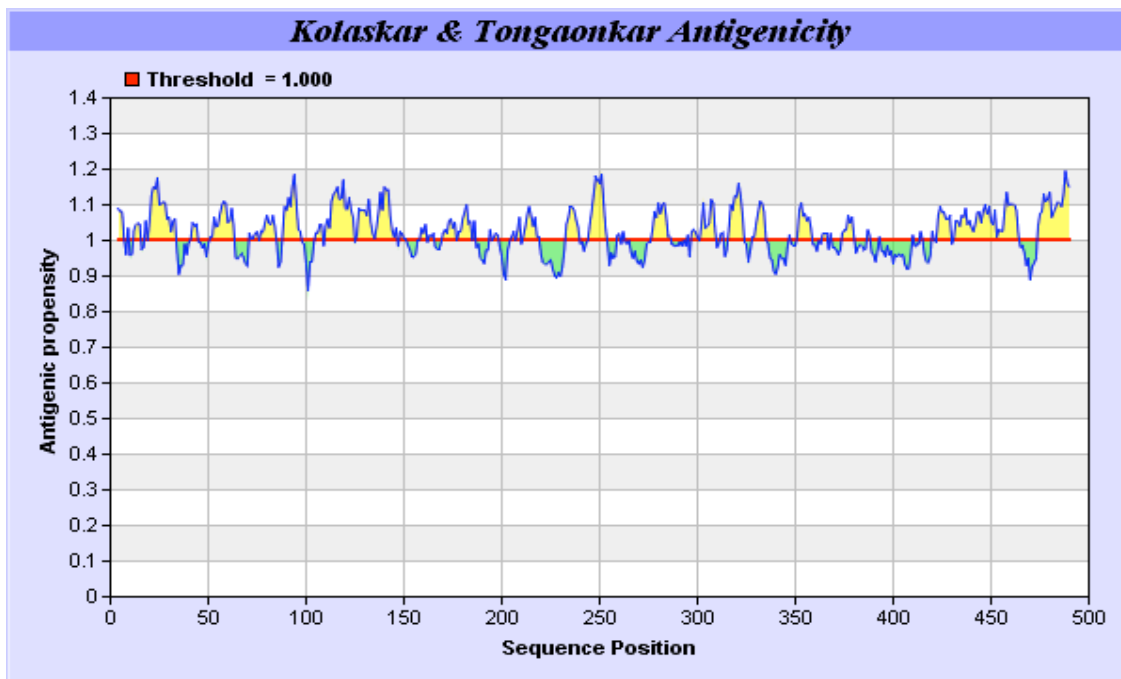


Figura 13-Predição de antigenicidade dos aminoácidos da glicoproteína-E do DENV-3, segundo Kolaskar & Tongaonkar. O eixo horizontal indica o número do aminoácido e o eixo vertical o valor da propensão destes em serem antigênicos. Valores positivos acima do eixo horizontal indicam a antigenicidade.

Fonte: IMMUNE EPITOPE DATABASE AND ANALYSIS RESOURCE, 2006.

Tabela 4-Peptídeos preditos segundo a escala de antigenicidade de Kolaskar & Tongaonkar. Em vermelho, os resíduos presentes nos peptídeos 11, 15, 27 e 50 mapeados.

Posição Inicial	Posição Final	Peptídeo
18	33	ATWVDVVLEHGGCVTT
51	63	TQLATLRKLCIEG
77	84	QGEAVLPE
88	97	PNYVCKHTYV
110	124	KGSLVTCAKFQCLEP
126	146	EGKVVQYENLKYTVIITVHTG
170	176	EAILPEY
178	184	TLGLECS
211	219	FFDLPLPWT
233	239	ELLVTFK
244	253	KKPEVVVLGS
277	286	FAGHLKCRK
302	309	NTFVLKKE
316	323	GTILVKVE
328	335	DAPCKIPF
351	358	TANPVVTK
374	380	SNIVIGI
423	429	VGGVLNS
431	464	GKMVHQIFGSAYTALFSGVSWVMKIGIGVLLTWI

Fonte: IMMUNE EPITOPE DATABASE AND ANALYSIS RESOURCE, 2006.

7.3 Modelagem da estrutura da glicoproteína E

A estrutura do DENV-3seq foi feita através do envio da sequência de aminoácidos ao programa de modelagem Swiss-Model localizado no website do ExPASy-*Expert Protein Analysis System* (www.expasy.ch). O programa retornou então, a estrutura na forma de um monômero e não do dímero correspondente a glicoproteína-E. A estrutura do DENV3-seq foi baseada numa estrutura cristalizada publicada no *Protein Data Bank-PDB* (BERMAN *et al.*, 2000) para o DENV-3 (1UZG.pdb) (MODIS *et al.*, 2005) e apresentou 95.9 % de homologia com a nossa seqüência. Como a estrutura 1UZG.pdb é um dímero, a construção do dímero do DENV3-seq foi feita através da sobreposição dos dois monômeros do DENV-3seq nos dois monômeros que compõem o dímero da proteína 1UZG.pdb, utilizando o programa *DeepView/Swiss-PdbViewer* versão 3.7/SP5 (GUEx; PEITSCH, 1997). Relatamos também a falta de 101 aminoácidos referentes à DENV-3seq (aminoácidos 558 a 659) que também estão faltosos na estrutura 1UZG.pdb e não foram cristalizados. Desta forma, não foi possível a inclusão destes resíduos na modelagem, visto que isto afetaria a conformação da glicoproteína-E como um todo. Para que isso fosse feito corretamente, seria necessária a cristalização destes resíduos associada ao fragmento solúvel da DENV-3seq, o que não é propósito desta dissertação. Também foram omitidos os quatro carboidratos presentes na estrutura 1UZG.pdb porque o programa Swiss-Model somente retorna a estrutura baseada na sequência de aminoácidos sem considerar a presença de carboidratos, já que a orientação dos mesmos varia de proteína para proteína e seria difícil predizer uma orientação correta para os carboidratos presentes na estrutura de DENV-3. O dímero está representado nas Figuras 14 A, B e C, mostrando a posição dos onze peptídeos mapeados na molécula da glicoproteína E. Por questões ilustrativas, um monômero está representado por círculos preenchidos em branco e o outro por faixas brancas.

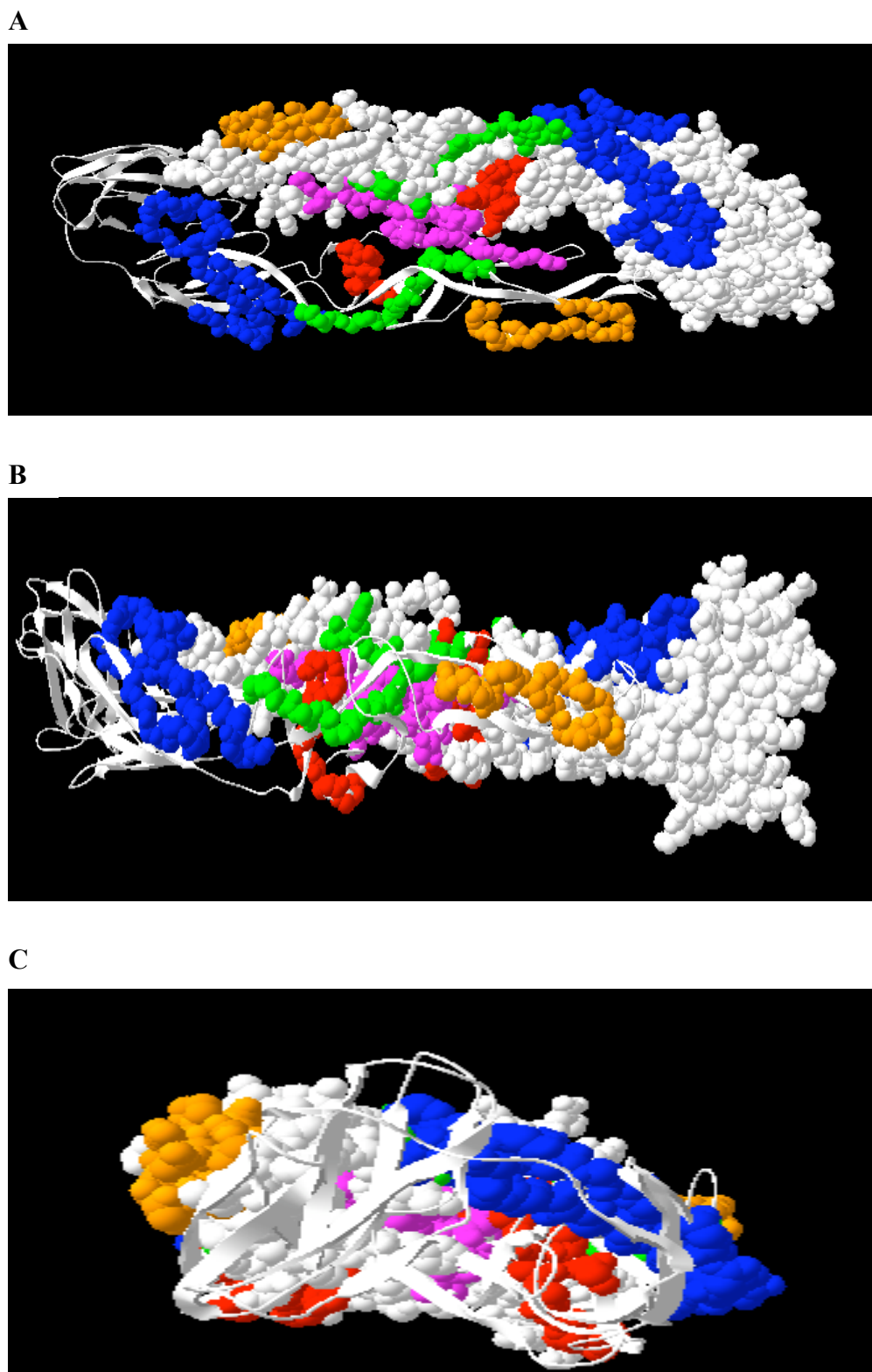


Figura 14-Estrutura do dímero da Glicoproteína-E para DENV-3seq e a posição na molécula dos onze peptídeos mapeados. A) visão superior, B) visão lateral, C) visão frontal posterior. Peptídeo 11 em verde, 15 e 16 em laranja, 27, 28, 29, 30, 31 e 32 em azul, 40 em vermelho e 50 em violeta/lilás.

Fonte: SWISS MODEL. 2006.

7.4 Análise do perfil de reatividade dos 11 peptídeos mapeados frente a soros de pacientes não dengue, positivos para DENV-3 e positivos para DENV-1 ou 2

Os onze peptídeos Schafer testados através de ELISA, foram analisados quanto ao seu poder discriminatório em diferenciar pacientes de DENV-3 de pacientes normais e pacientes com DENV-1 ou 2, através da curva *Receiver Operating Characteristic* (ROC) construída para cada peptídeo. A análise ROC é uma ferramenta utilizada para medir e especificar problemas no desempenho do diagnóstico em medicina. A área abaixo da curva ROC está associada ao poder discriminante de um teste de diagnóstico, visto que, geometricamente a curva ROC é um gráfico de pares "x" e "y", que correspondem respectivamente à especificidade e à sensibilidade do teste. Assim, quanto maior a área abaixo da curva significa que maior é o poder discriminatório do teste em diferenciar, neste caso, entre pacientes normais e positivos para DENV-3. Ao contrário disto, quanto mais perto da linha pontilhada estiver a curva, menor o poder do teste.

Os ensaios mostraram que os peptídeos 15, 16, 28, 29, 30, 31, 32, 40 e 50 têm algum poder discriminatório entre dengue por sorotipo 3 e indivíduos normais (não dengue), com um provável potencial para uso no diagnóstico para infecção por DENV-3, ao contrário dos peptídeos 11 e 27 que parecem não despertar resposta imune significativa. Os valores da sensibilidade, especificidade, CO e razão de verossimilhança positiva e negativa (RV^+ e RV^-), gerados para cada um dos 11 peptídeos na curva ROC, podem ser vistos nas tabelas 5A e 5B. Nas figuras 15A, 15B e 15C, estão as curvas ROC construídas para cada peptídeo.

Com relação a capacidade de diferenciar entre infecção por DENV-3 de infecção por DENV-1 ou 2, os resultados mostraram que os peptídeos 11, 27 e 28 apresentam um alto poder discriminatório, podendo estes peptídeos, serem potenciais para uso no diagnóstico diferencial entre sorotipos. Os resultados destes ensaios podem ser vistos nas curvas ROC construídas para cada peptídeo, nas figuras 16A, 16B e 16C. Nas tabelas 6A e 6B estão os valores da sensibilidade, especificidade, CO e razão de verossimilhança positiva e negativa (RV^+ e RV^-), gerados para cada um dos 11 peptídeos na curva ROC.

Tabelas 5A e B-Discriminação entre DENV-3 e Normais. Valores da sensibilidade (Sens.), especificidade (Espec.), cut-off (CO) e razão de verossimilhança positiva e negativa (RV^+ e RV^-) gerados para cada um dos 11 peptídeos na curva ROC. O intervalo de confiança (95% IC) e o valor de p (p value) também são mostrados.

A

D3 x ND	PEPTÍDEOS					
	11	15	16	27	28	29
CO	0,139	0,379	0,372	0,272	0,231	0,461
Sens.	59,4	46,9	65,6	28,1	56,2	68,7
	(40,7-76,3)	(29,1-65,2)	(46,8-81,4)	(13,8-46,7)	(37,7-73,6)	(50,0-83,9)
Espec	58,8	94,1	94,1	94,1	88,2	88,2
	(33,0-81,5)	(71,2-99,0)	(71,2-99,0)	(71,2-99,0)	(63,5-98,2)	(63,5-98,2)
RV^+	1,44	7,97	11,16	4,78	4,78	5,84
RV^-	0,69	0,56	0,37	0,76	0,50	0,35
95% IC	0,417-0,707	0,571-0,837	0,701-0,925	0,381-0,673	0,593-0,853	0,625-0,876
p value	0,4385	0,0030	<0,0001	0,7428	0,0008	0,0001

B.

D3 x ND	PEPTÍDEOS				
	30	31	32	40	50
CO	0,461	0,445	0,419	0,189	0,232
Sens.	65,6	68,7	81,2	84,4	90,6
	(46,8-81,4)	(50,0-83,9)	(63,6-92,7)	(67,2-94,7)	(75,0-97,9)
Espec	94,1	94,1	94,1	94,1	94,1
	(71,2-99,0)	(71,2-99,0)	(71,2-99,0)	(71,2-99,0)	(71,2-99,0)
RV^+	11,16	11,69	13,81	14,34	15,41
RV^-	0,37	0,33	0,20	0,17	0,10
95% IC	0,676-0,910	0,836	0,742-0,948	0,697-0,923	0,789-0,971
p value	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Tabelas 6A e B-Discriminação entre DENV-3 e dengue por outros sorotipos. Valores da sensibilidade (Sens.), especificidade (Espec.), cut-off (CO) e razão de verossimilhança positiva e negativa (RV^+ e RV^-) gerados para cada um dos 11 peptídeos na curva ROC. O intervalo de confiança (95% IC) e o valor de p (p value) também são mostrados.

A

D3xRC	PEPTÍDEOS					
	11	15	16	27	28	29
CO	0,27	0,331	0,826	0,34	0,329	0,951
Sens.	90,6 (75,0-97,9)	43,7 (26,4-62,3)	93,7 (79,2-99,1)	87,5 (71,0-96,4)	71,9 (53,3-86,2)	90,6 (75,0-97,9)
Espec	65,0 (40,8-84,5)	85,0 (62,1-96,6)	20,0 (5,9-43,7)	80,0 (56,3-94,1)	85,0 (62,1-96,6)	25,0 (8,8-49,1)
RV^+	2,59	2,92	1,17	4,38	4,79	1,21
RV^-	0,14	0,66	0,31	0,16	0,33	0,37
95% IC	0,684-0,909	0,469-0,746	0,387-0,670	0,725-0,934	0,621-0,867	0,363-0,646
p value	<0,0001	0,1634	0,7144	<0,0001	0,0003	0,9550

B

D3xRC	PEPTÍDEOS				
	30	31	32	40	50
CO	0,326	1,197	0,801	0,235	0,318
Sens.	21,9 (9,3-40,0)	100,0 (89,0-100,0)	62,5 (43,7-78,9)	75,0 (56,6-88,5)	78,1 (60,0-90,7)
Espec	95,0 (75,1-99,2)	20,0 (5,9-43,7)	60,0 (36,1-80,8)	45,0 (23,1-68,4)	40,0 (19,2-63,9)
RV^+	4,37	1,25	1,56	1,36	1,30
RV^-	0,82	0,00	0,62	0,56	0,55
95% IC	0,403-0,685	0,392-0,675	0,363-0,646	0,358-0,642	0,325-0,635
p value	0,5732	0,6660	0,9550	1,00	0,9326

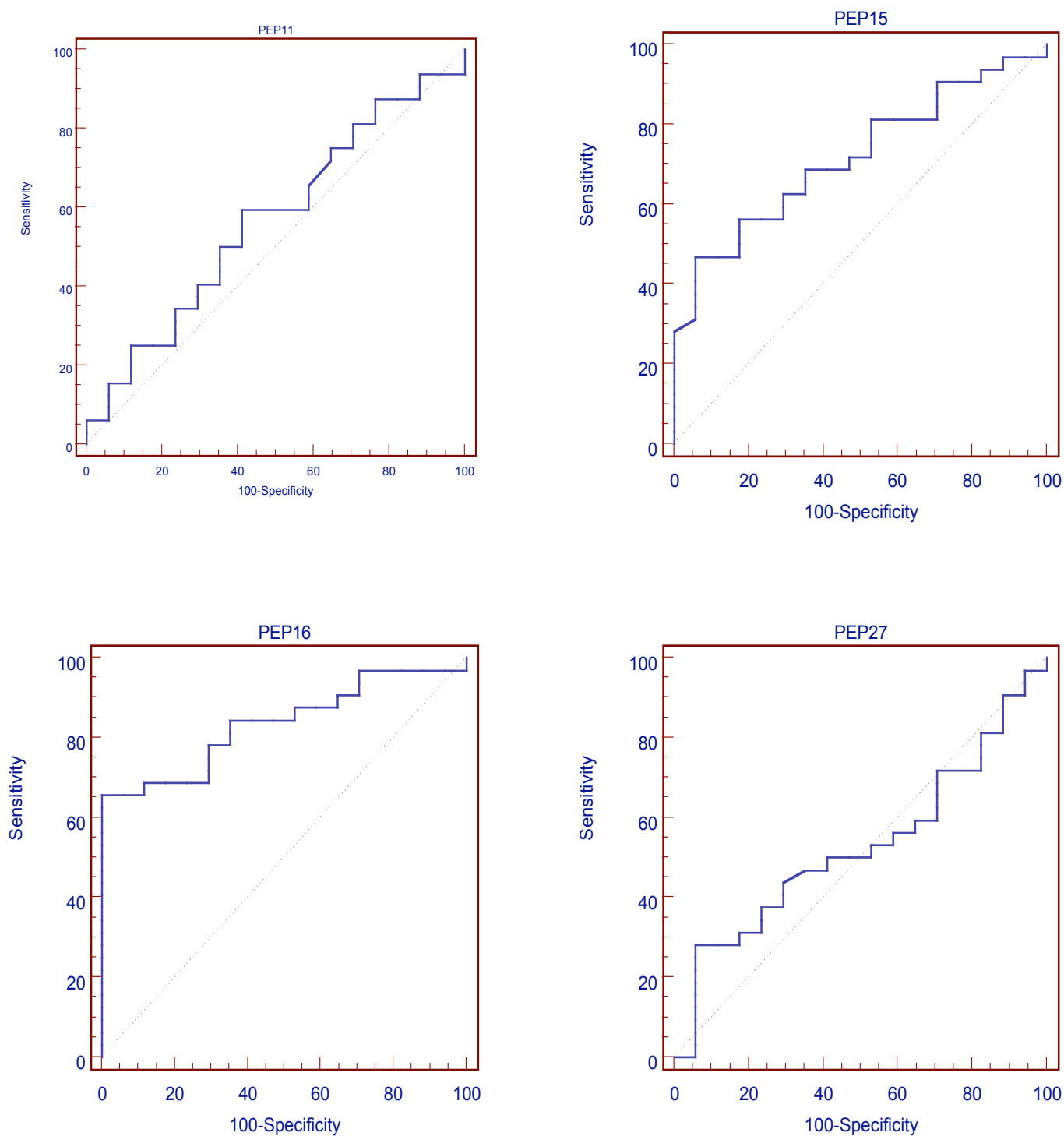


Figura 15A-Curvas ROC para os peptídeos 11, 15, 16 e 27, geradas pelo Software Medcalc, versão 8.2. Discriminação entre pacientes normais e positivos para DENV-3. Quanto maior a área abaixo da curva, maior é o poder discriminatório do teste.

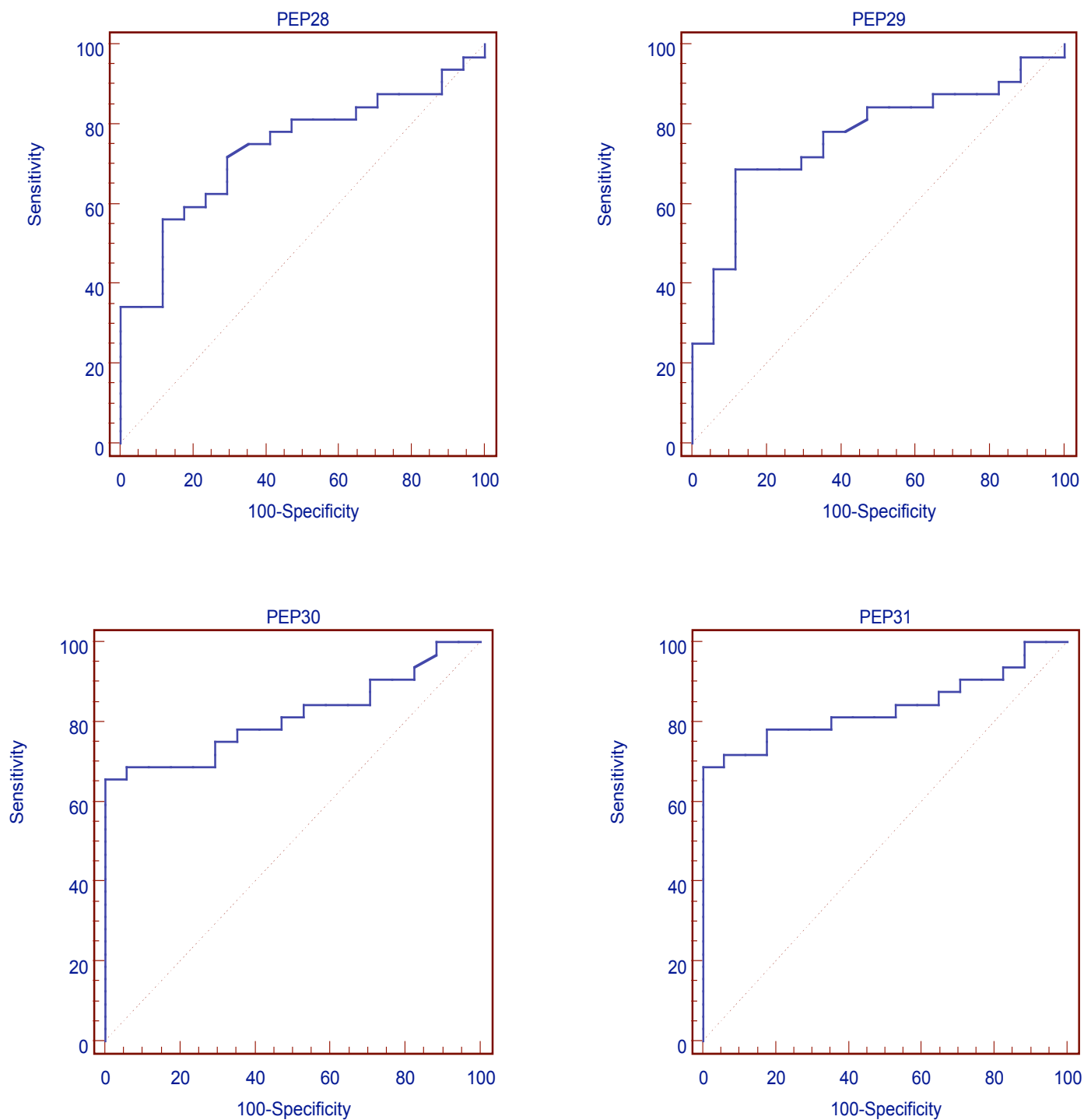


Figura 15B-Curvas ROC para os peptídeos 28, 29, 30 e 31, geradas pelo Software Medcalc, versão 8.2. Discriminação entre pacientes normais e positivos para DENV-3. Quanto maior a área abaixo da curva, maior é o poder discriminatório do teste.

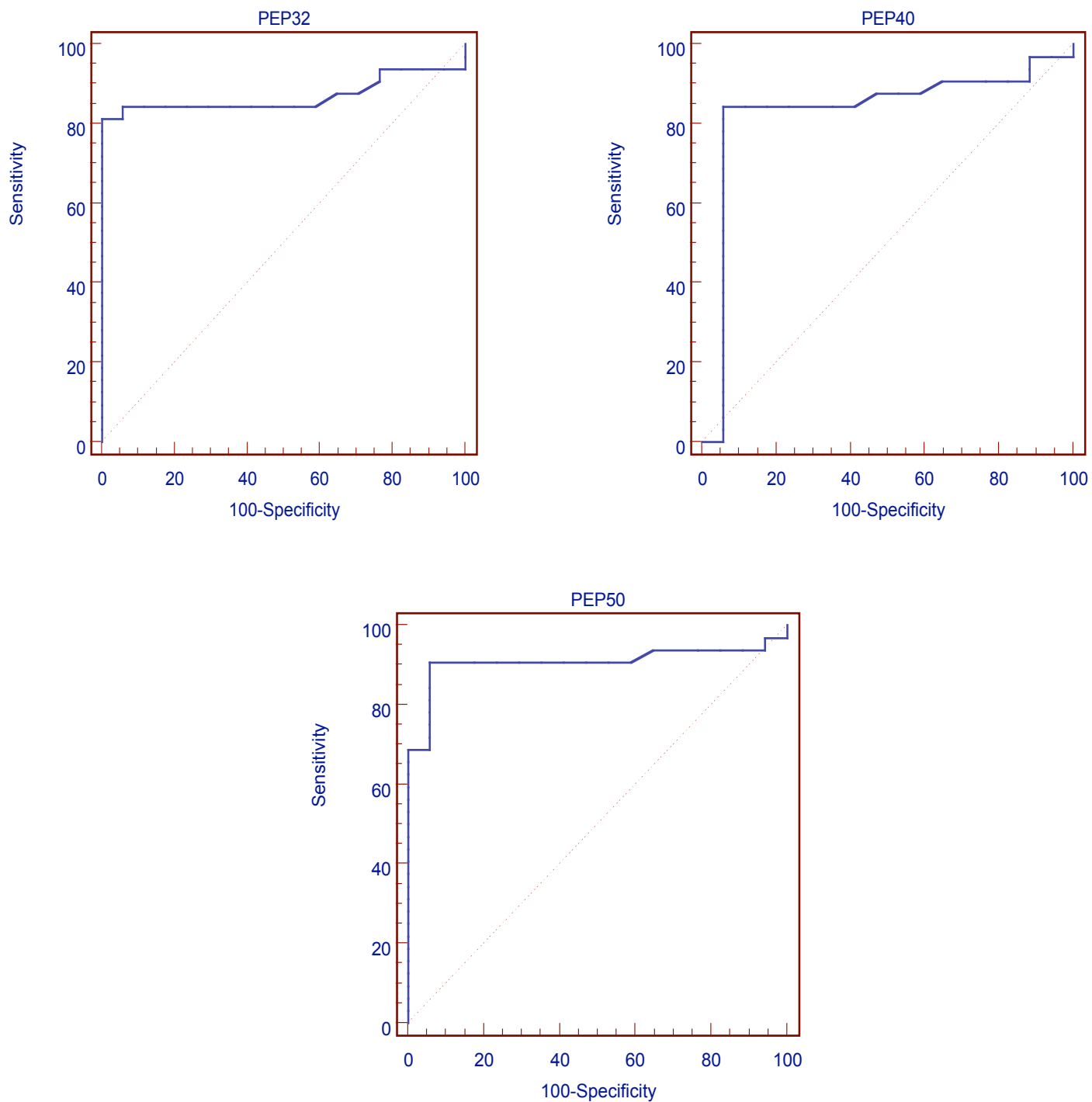


Figura 15C-Curvas ROC para os peptídeos 32, 40 e 50, geradas pelo Software Medcalc, versão 8.2. Discriminação entre pacientes normais e positivos para DENV-3. Quanto maior a área abaixo da curva, maior é o poder discriminatório do teste.

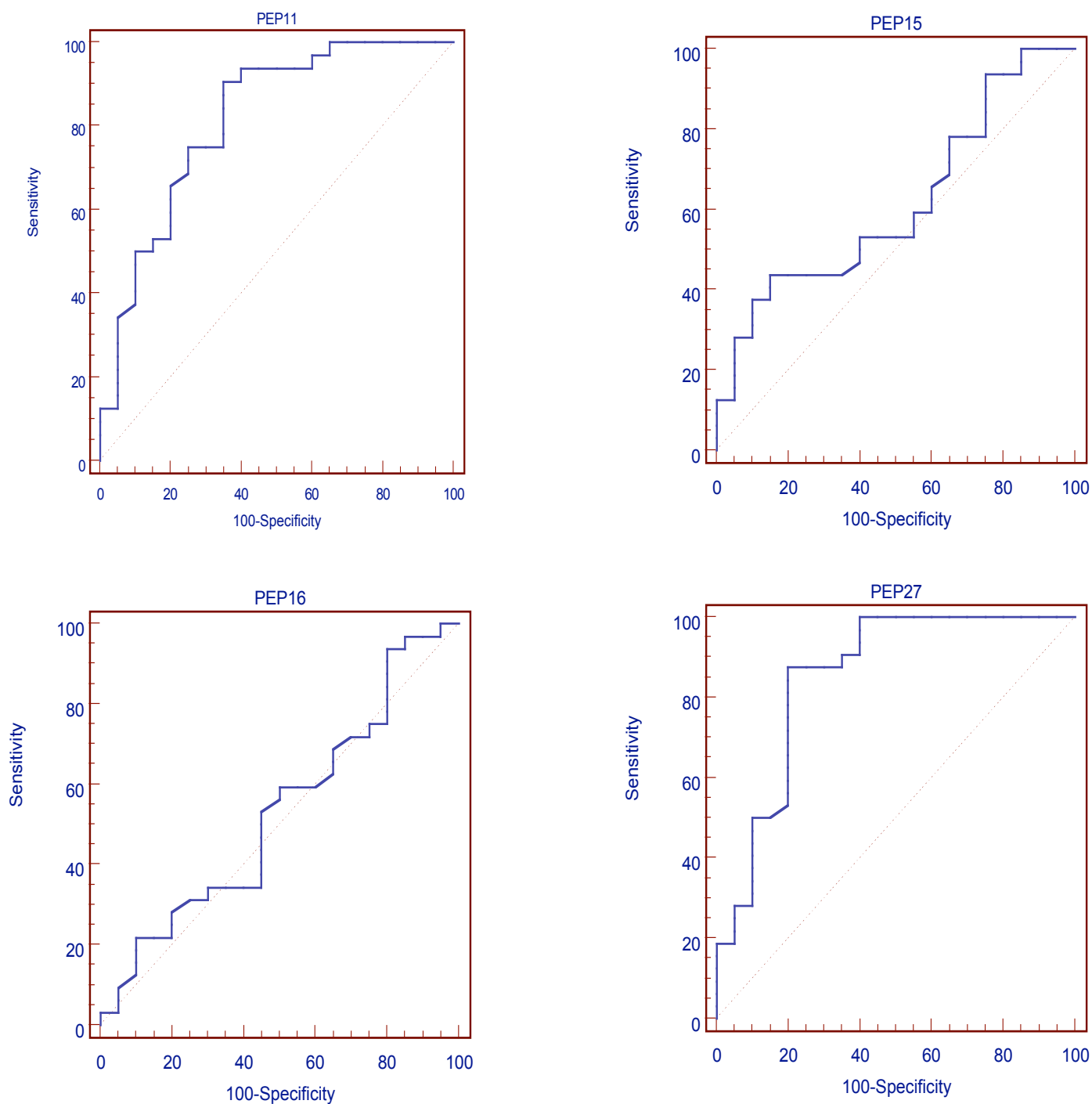


Figura 16A-Curvas ROC para os peptídeos 11, 15, 16 e 27, geradas pelo Software Medcalc, versão 8.2. Discriminação entre DENV-3 e dengue por outros sorotipos. Quanto maior a área abaixo da curva, maior é o poder discriminatório do teste.

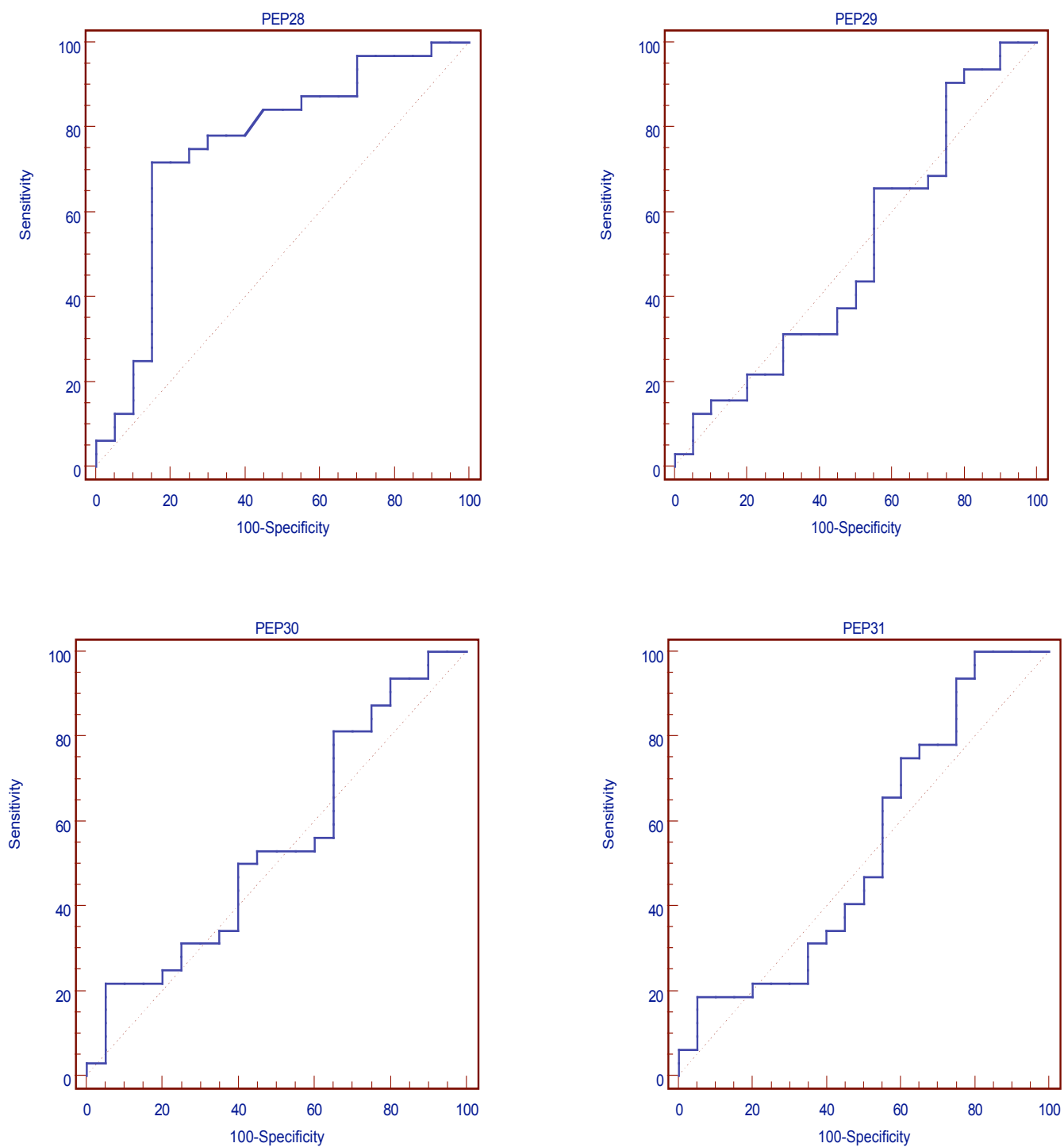


Figura 16B-Curvas ROC para os peptídeos 28, 29, 30 e 31, geradas pelo Software Medcalc, versão 8.2. Discriminação entre DENV-3 e dengue por outros sorotipos. Quanto maior a área abaixo da curva, maior é o poder discriminatório do teste.

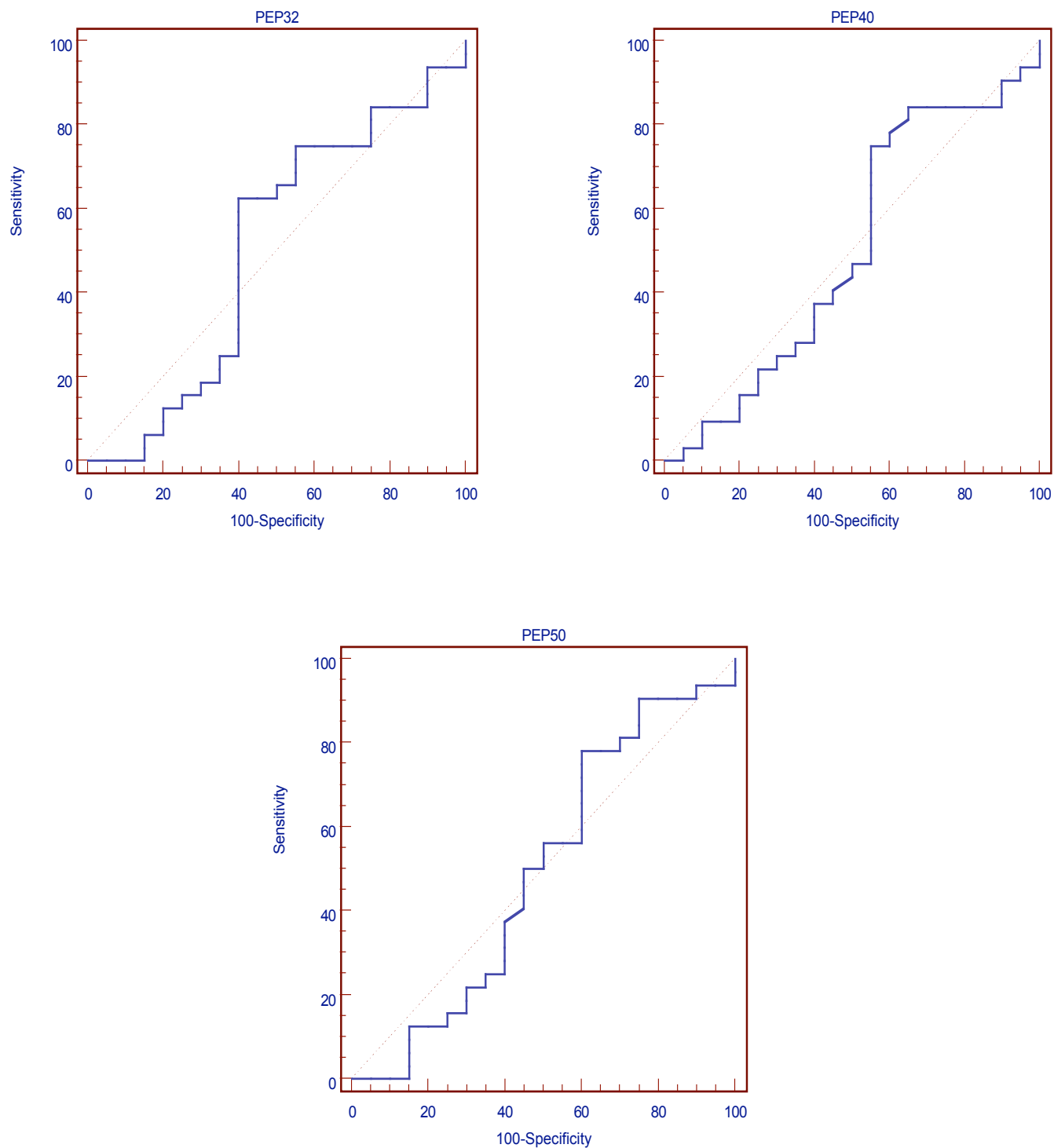


Figura 16C-Curvas ROC para os peptídeos 32, 40 e 50, geradas pelo Software Medcalc, versão 8.2. Discriminação entre DENV-3 e dengue por outros sorotipos. Quanto maior a área abaixo da curva, maior é o poder discriminatório do teste.

8 DISCUSSÃO

A dengue representa uma das mais importantes doenças virais em termos de morbidade e mortalidade e até o momento não existe nenhum produto eficaz e comercialmente disponível para o tratamento do vírus. Embora o desenvolvimento de uma vacina tenha se tornado uma prioridade incontestável para a Saúde Pública, ela continua sendo um desafio científico devido a doença ser causada por 4 sorotipos antigenicamente distintos, tendo a hipótese da infecção sequencial heterotípica como um fator de risco para os quadros de FHD e SCD (HOMBACH *et al.*, 2005). Uma das estratégias para se evitar a patogênica associada com a vacina para o dengue, seria a construção de uma vacina quimérica composta de epítomos selecionados dos 4 sorotipos. A maioria desses epítomos parece estar presente na glicoproteína E, por ser esta a maior proteína de superfície presente no vírus (SERAFIN; AASKOV, 2001). A esta proteína tem sido relacionadas as funções de ligação com receptores celulares e interação com a membrana da célula hospedeira para fusão e subsequente entrada na célula (ZHANG *et al.*, 2004).

A grande maioria das vacinas e métodos diagnósticos existentes utiliza todo ou parte do genoma da proteína E com o objetivo de se obter peptídios de alto poder imunogênico. Esses peptídeos devem ser capazes de induzir uma resposta imune celular e humoral para que sejam selecionados para estudo. Peptídeos sintéticos preparados da seqüência da glicoproteína E de vários vírus foram estudados através da atividade das células T-auxiliares (MATHEWS *et al.*, 1991). No entanto, a imunidade protetora das infecções de flavivírus depende também da produção de anticorpos neutralizantes para epítomos críticos presente no envelope, fornecendo a base para os estudos de vacinas (GUIRAKHOO *et al.*, 2004). A identificação de epítomos de célula B é importante para a seleção de peptídeos para candidatos a vacinas, desenvolvimento de reagentes para diagnóstico específico do dengue e para melhor entender as interações vírus-anticorpo a nível molecular (WU *et al.*, 2003).

Os recentes avanços na bioinformática, com relação às predições de epítomos de células B, associados à tecnologia de síntese de peptídeos específicos, fez com que pudéssemos trabalhar neste nosso projeto com peptídeos sintéticos preparados a partir da seqüência da glicoproteína E do DENV-3 e conhecê-los melhor através das predições.

Essa abordagem, associada ao fato de que a maioria dos trabalhos que visam o mapeamento de epítomos utiliza geralmente soros de animais imunizados, faz com que este trabalho realizado com soros de pacientes seja original e traga ferramentas importantes que possam auxiliar no estudo do desenvolvimento de vacinas racionais e testes diagnósticos. Além disso, a identificação desses epítomos também contribuirá para estudos de prognóstico, imunointervenção e produção de drogas.

O objetivo deste estudo foi localizar epítomos lineares de célula B na glicoproteína E do DENV-3. Para isso, utilizamos peptídeos sobrepostos (*overlapping*) que cobrem os 490 aminoácidos da glicoproteína-E e pools de soros positivos e negativos para o mapeamento. Como o DENV-3 foi responsável pelas últimas epidemias em Recife e no Brasil, utilizamos peptídeos sintetizados baseados na seqüência de uma cepa viral de DENV-3 que circulou em Recife e soros de pacientes infectados com este mesmo sorotipo.

Para que pudéssemos alcançar esse objetivo, esforços foram realizados para otimizar a técnica de ELISA, uma vez que o mapeamento de epítomos de células B com soro de pacientes pode ser complicado de ser analisado (WESTYWOOD; HAY, 2001). Além de desenvolvermos diversas etapas de otimização na padronização, um interessante ponto foi o desenvolvimento da solução de bloqueio diluída em tampão carbonato, pH 9,6, o que permitiu uma maior adsorção da proteína de bloqueio, diminuindo assim o *background* do teste.

Após essa padronização, foram identificados onze peptídeos lineares IgG específicos, cobrindo cinco regiões ao longo da proteína E, com os aminoácidos nas posições 51-65, 71-90, 131-170, 196-210 e 246-260. Embora epítomos imunogênicos tenham sido identificados na glicoproteína E do DENV-1 e DENV-2, não há informação no que diz respeito a epítomos presentes na glicoproteína E do DENV-3. Em 2001 e 2005, autores descrevem a presença de epítomos não especificados na glicoproteína E do DENV-3 (MODIS *et al.*, 2005; SERAFIN; AASKOV, 2001).

É interessante lembrar que as imunoglobulinas podem se ligar a epítomos lineares e conformacionais (ATABANI, 2001). Embora os anticorpos reconheçam mais a forma conformacional do que a seqüência linear da proteína (WESTYWOOD; HAY, 2001), não se pode descartar a possibilidade de que seqüências lineares presentes nestes epítomos conformacionais sejam reconhecidos. Assim, era importante conhecer a posição dos onze peptídeos mapeados na superfície da molécula e para isso utilizamos as ferramentas de predições

de hidrofiliçidade, de acessibilidade e de antigenicidade, assim como o modelo tridimensional (3-D) da glicoproteína DENV-3seq. A análise da carga dos aminoácidos dos peptídeos identificados não foi realizada, mesmo sabendo que resíduos carregados são importantes na interação com anticorpos (LEITMEYER *et al.*, 1999).

Os nossos resultados mostraram que todos os peptídeos identificados estão presentes nas regiões mais hidrofílicas, sugerindo que eles poderiam estar expostos na superfície da molécula da glicoproteína. Porém, a interface entre os monômeros dentro do dímero apresenta uma área que mistura interações hidrofóbicas (60%) e hidrofílicas (40%) (ZHANG *et al.*, 2004). Desta maneira, peptídeos que aparecem como hidrofílicos nas predições poderiam não estar acessíveis à ligação ao anticorpo e nem serem antigênicos. Por isso, realizamos as predições de acessibilidade e antigenicidade, que mostrou que os peptídeos 27 e 30 apresentam o maior número de resíduos expostos na superfície da molécula e os peptídeos 11, 15, 27 e 50 como sendo os mais antigênicos.

Estes resultados podem ser confirmados pela estrutura 3-D que mostra que os peptídeos 27 e 30 (Figura 14, em azul) aparecem expostos na molécula como alças que se projetam para a superfície. Entre os peptídeos preditos como os mais antigênicos, o 11 (Figura 14, em laranja) parece ser o mais exposto e o 50 (Figura 14, em violeta/lilás) aparece escondido na interface do dímero. Aliás, os monômeros da glicoproteína E fazem interações entre si no dímero e uma destas regiões de contato encontra-se no domínio II, entre os resíduos 256-265, os quais interagem com os mesmos resíduos no monômero adjacente (ZHANG *et al.*, 2004). O peptídeo 50 que abrange os aminoácidos nas posições 246-260 parece então fazer parte desta região de contato entre os monômeros.

Ainda em relação à modelagem da estrutura de DENV-3seq, a falta de alguns aminoácidos nos modelos estruturais já publicados, que fez com que nossa modelagem também ficasse com alguns aminoácidos faltosos, se deve ao fato de que esses resíduos se encontram em áreas hidrofóbicas da proteína, o que dificulta a cristalização desta área da molécula. Apesar de não ter sido possível localizar os carboidratos presentes na DENV-3seq, resíduos de asparagina (N) são encontrados nos peptídeos 29, 30 e 31 que abrangem os aminoácidos de 141-165. Sabe-se que existem dois resíduos de asparagina (N) glicosilados no dengue. Um na posição 153 e outro na posição 67, presentes no domínio II. A asparagina 153 é conservada na maioria dos envelopes

dos flavivírus, aparecendo como um tetrassacarídeo, onde o quarto açúcar (uma manose) parece ser importante para a entrada viral (MODIS *et al.*, 2003).

Um fato interessante foi observado para o peptídeo 27 que apareceu em todas as predições de célula B realizadas e que curiosamente também tem aparecido nas predições para epítomos de célula T feitas por outros grupos (ZHANG *et al.*, 2005). Tem sido demonstrado para inúmeros vírus que epítomos de célula T-auxiliares podem ser modelados pelo uso de peptídeos sintéticos e que epítomos de célula T-auxiliares ativos, podem regular a resposta humoral para epítomos de célula B. Estas observações são importantes no desenho de uma vacina e significa que para serem efetivas, elas terão de expressar epítomos de célula B e T (ROEHRIG *et al.*, 1992).

Existem muitas evidências de que a estrutura da glicoproteína E se apresenta fortemente conservada entre os membros da família *Flaviviridae* e por isso, toda a discussão gerada aqui neste trabalho no que diz respeito a estrutura do dengue, foi feita a partir das informações geradas para a estrutura cristalizada já publicada para o vírus dengue e para o vírus da encefalite do carrapato (MODIS *et al.*, 2003; MODIS *et al.*, 2004; MODIS *et al.*, 2005; REY *et al.*, 1995).

A glicoproteína E possui três domínios estruturais: DI (abrangendo os resíduos 130-185), DII (resíduos nas posições 50-130 e 185-300) e DIII (resíduos 300-400). Observamos então, que dos onze peptídeos mapeados, aqueles incluídos nas posições 51-65, 71-90, 196-210 e 246-260 estão localizados no domínio II e aqueles incluídos nas posições 131-170 localizados no domínio I da glicoproteína. O domínio I contém predominantemente epítomos não neutralizantes tipo-específicos. Muitos dos anticorpos neutralizantes tipo-específicos mapeiam o domínio III da glicoproteína, enquanto que anticorpos monoclonais neutralizantes de reação cruzada se ligam a peptídeos de fusão no domínio II (CRILL; ROEHRIG, 2001; OLIPHANT *et al.*, 2006). Torna-se necessária, para um melhor entendimento sobre o comportamento destes peptídeos em elicitarem respostas por anticorpos protetores (neutralizantes) ou patogênicos, a informação sobre testes de neutralização para cada um destes peptídeos, o que será realizado num projeto futuro.

A glicoproteína E faz parte das chamadas proteínas de fusão de classe II, encontrada nos flavivírus e alfavírus, onde uma clivagem proteolítica (de prM para M nos flavivírus) produz partículas virais maduras com peptídeos prontos para fusão, sendo estes essenciais para a interação entre a membrana do vírus e da célula hospedeira. Estes peptídeos de fusão, uma seqüência hidrofóbica conservada em todos os flavivírus, estão presentes no domínio II da glicoproteína E (abrangendo os resíduos nas posições 98-109 para o DENV-2), escondidos em

sua interface e se tornando expostos na mudança conformacional iniciada pela exposição à um baixo pH (MODIS *et al.*, 2003; MODIS *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2003). A análise da sequência dos 11 peptídeos mapeados mostrou que nenhum deles se enquadraria como um peptídeo de fusão, embora alguns deles estejam presentes no domínio II, como já foi dito anteriormente. De qualquer maneira, o mapeamento de peptídeos no *loop* de fusão não tem sido associado sempre com atividade terapêutica, tendo sido demonstrado que o uso dos mesmos para tratamento apresenta pouca proteção pós infecção ou diferentes níveis de proteção *in vivo* dependendo do modelo usado. Assim, é possível que anticorpos que se ligam a estes peptídeos de fusão sejam protetores contra a infecção em alguns tipos celulares e possivelmente patológicos em outros (OLIPHANT *et al.*, 2006).

Ainda dentro desta perspectiva, testamos soros de pacientes positivos e negativos para dengue frente aos onze peptídeos mapeados, a fim de testar o poder discriminatório dos mesmos em diferenciar entre pacientes com DENV-3 de pacientes normais e entre pacientes com DENV-3 daqueles com infecção por DENV-1 ou DENV-2. Como não há circulação do DENV-4 no Brasil, não temos soros de pacientes infectados por este sorotipo e por isso a reatividade cruzada com este sorotipo não pôde ser avaliada. Devido ao n amostral pequeno utilizado neste trabalho, principalmente em relação aos pacientes com FHD (n = 8), não foi possível estabelecer se os peptídeos são capazes de diferenciar entre os diferentes quadros clínicos de DC, DCC e FHD.

Os resultados quanto ao poder discriminatório dos onze peptídeos mapeados em diferenciar dengue por sorotipo 3 e indivíduos normais, sugere que os peptídeos 15, 16, 28 29, 30, 31, 32, 40 e 50 poderiam ser usados em kits de diagnóstico para este fim. Os peptídeos 11 e 27 parecem não despertar resposta humoral significativa nos pacientes com dengue 3, sugerindo que eles não podem ser utilizados para diagnóstico e que seriam pouco imunogênicos nas circunstâncias de uma infecção natural por DENV-3.

No que se refere ao diagnóstico do dengue, vale comentar que o uso de antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos têm a finalidade de aumentar a especificidade do diagnóstico humoral. Muitos kits de diagnóstico estão disponíveis comercialmente e usam preparações totais do vírus dengue como antígenos para a detecção de anticorpos anti-dengue. A produção do antígeno total seja por antígeno recombinante ou por produção em cultura de células, leva tempo e pode gerar reação cruzada devido à similaridade com outros *flavivirus*, além da reação cruzada entre os sorotipos do dengue. O ideal seria o uso de antígenos específicos para

cada sorotipo viral e, neste contexto, o conhecimento de epítomos imunogênicos é um pré-requisito para o desenvolvimento de kits de diagnóstico com alto grau de sensibilidade e especificidade e com a possibilidade de sorotipagem viral.

A avaliação do poder discriminatório dos peptídeos em diferenciar entre dengue por sorotipo 3 e dengue pelos demais sorotipos virais, apontou inicialmente os peptídeos 11, 27, 28 como aqueles capazes de diferenciar o tipo de infecção. Contudo, notou-se que, com o aumento do CO houve um aumento da sensibilidade, indicando que as densidades óticas dos pacientes com dengue por outros sorotipos é maior. As razões para que pacientes com dengue por sorotipo não 3 aparentemente reajam cruzadamente de forma mais intensa com peptídeos de DENV-3 não estão claras, porém sabemos que no caso dos peptídeos 11 e 27, os pacientes com dengue 3 não são responsivos em comparação com pacientes normais. Os demais peptídeos (15, 16, 29, 30, 31, 32, 40, 50) não permitem a discriminação, indicando que os pacientes com dengue 3 e dengue não 3 exibem produção de anticorpos semelhantes para estes peptídeos.

Embora os peptídeos 11, 27 e 28 sejam possíveis marcadores de reação cruzada para DENV-1 ou DENV-2, não se pode descartar o uso deles na produção de uma vacina, pois os mesmos podem gerar forte resposta na produção de anticorpos neutralizantes também para o DENV-3, o que seria importante para esta abordagem. Testes de imunogenicidade realizados pelo nosso grupo em camundongos Balb-C, apresentaram para nove peptídeos resposta humoral significativa 30 dias após o desafio com os onze peptídeos mapeados (resultados não mostrados). O fato de apenas dois peptídeos, terem sido reconhecidos por soros de humanos e não terem sido imunogênicos em camundongos após as duas imunizações, pode sugerir que estes peptídeos lineares (que se sobrepõem) fazem parte de um epítomo conformacional, visto que os soros foram de pacientes expostos a partícula viral inteira e não apenas ao peptídeo, como no camundongo.

Os peptídeos mapeados na glicoproteína E do DENV-3, descritos neste trabalho junto com outros epítomos bem documentados são potencialmente relevantes para o desenho de uma vacina para o vírus dengue e para o desenvolvimento de kits de diagnóstico específicos.

9 CONCLUSÕES

Após o mapeamento de epítomos de células B na glicoproteína E do envelope do vírus dengue sorotipo 3, podemos concluir que:

- 1- Onze peptídeos lineares de célula B, IgG específicos, foram identificados como sendo reativos com soros de pacientes com DENV-3 e o estudo destes contribuirá para o desenvolvimento de vacinas e testes diagnósticos.
- 2- Esses peptídeos estão presentes nos domínios I e II da glicoproteína. Para uma melhor avaliação do poder protetor ou patogênico destes peptídeos serão necessários estudos utilizando testes de neutralização.
- 3- Nenhum dos onze peptídeos faz parte de peptídeos de fusão e provavelmente não são candidatos para estudo dos peptídeos com atividade terapêutica.
- 4- Os peptídeos 15, 16, 28 29, 30, 31, 32, 40 e 50 são capazes de distinguir entre a doença dengue por sorotipo 3 e indivíduos normais.
- 5- Os estudos sugerem que os peptídeos 11 e 27 não elicitam resposta humoral significativa nos pacientes com dengue 3, sugerindo que esses não podem ser utilizado para testes diagnósticos.
- 6- Os resultados dos peptídeos 11, 27 e 28 sugerem que eles são possíveis marcadores da reação cruzada para DENV-1 ou DENV-2.
- 7- Os resultados sugerem que pacientes com dengue 3 e aqueles com dengue por outros sorotipos, apresentam resposta humoral semelhante para os peptídeos 15, 16, 29, 30, 31, 32, 40 e 50, indicando que esses peptídeos não discriminam esses pacientes.

10 PERSPECTIVAS

Diante desses resultados e cientes de que outros estudos necessitam ser realizados para que as conclusões tenham maior suporte científico, é que enumeramos abaixo alguns pontos que nos orientarão no futuro para a complementação desse trabalho:

- 1- Realização de testes de neutralização com os 11 peptídeos mapeados.
- 2- Investigar se estes peptídeos são conservados ou não frente a diferentes cepas de dengue e de outros flavivírus (alinhamento já realizado).
- 3- Construir cassetes de DNA com estes epítomos de célula B e com outros epítomos imunologicamente reativos.
- 4- Fusionar estes cassetes de DNA com a extremidade C-terminal da proteína LAMP, para direcionamento e apresentação da proteína quimérica obtida via MHC II.
- 5- Fusionar a quimera de LAMP com o replicon de febre amarela e determinar sua expressão protéica e tráfego celular em cultura de células.
- 6- Analisar a eficiência dos antígenos codificados pelos replicons quanto à obtenção de resposta imune protetora.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. *et al.* Proteínas. In: ALBERTS, B. *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre: Artmed, 2002. cap. 3, p. 129-188.

ANDERSON, R. S. *et al.* Activation of endothelial cells via antibody-enhanced dengue virus infection of peripheral blood monocytes. **Journal of Virology**, Washington DC, v. 71, n. 6, p. 4226-42326, June 1997.

ANANDARAO, R.; SWAMINATHAN, S.; KHANNA, N. The identification of immunodominant linear epitopes of dengue type 2 virus capsid and NS4a proteins using pin-bound peptides. **Virus Research**, Amsterdam, v. 112, n. 1/2, p. 60-68, Sept. 2005.

ATABANI, S. F. Combined B cell and T cell epitopes. In: WESTWOOD, O. M. R.; HAY, F. C. (Ed.). **Epitope Mapping**. 01. ed. New York: Oxford University, 2001. cap. 4, p. 91-102.

BEASLEY, D. W. C.; AASKOV, J. G. Epitopes on the dengue 1 virus envelope protein recognized by neutralizing IgM monoclonal antibodies. **Virology**, New York, v. 279, n. 2, p. 447-458, Jan. 2001.

BERMAN, H. M. *et al.* Nucleic Acids Research . **The Protein Data Bank**, Oxford, n. 28, p. 235-242, 2000.

BIELEFELDT-OHMANN, H. *et al.* Analysis of a recombinant dengue-2 virus-dengue-3 virus hybrid envelope protein expressed in a secretory baculovirus system. **Journal of General Virology**, London, v. 78, p. 11, p. 2723-2733, Nov. 1997.

BRANDT, W. E. *et al.* Partial purification and characterization of a dengue virus soluble complement-fixing antigen. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 105, n. 6, p. 1565-1568, Dec. 1970.

BRAVO, J.R.; GUZMAN, M.G.; KOURI, G.P. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 1. Individual risk factors for dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 81, n. 5, p. 816-20.1987.

BRAY, M. *et al.* Mice immunized with recombinant vaccinia virus expressing dengue 4 virus structural proteins with or without nonstructural protein NS 1 are protected against fatal dengue virus encephalites. **Journal of Virology**, Washington DC, v. 63, n. 6, p. 2853-2856, June 1989.

BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; ORNSTON, L. N. Doenças virais transmitidas por artrópodes e roedores. In: JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A (Ed.). **Microbiologia médica**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. cap. 10, p. 107-129.

BURKE, D. S. *et al.* A prospective study of dengue infections in Bangkok. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, Baltimore, v. 38, n. 1, p. 172-180, Jan. 1988.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Dengue 2 virus in tissue culture. Disponível em: www.cdc.gov. Acessado em: 12 de junho de 2006.

CLARK, D. H.; CASALS, J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 7, n. 5, p. 561-573, Sept. 1958.

CLUM, S.; EBNER, K. E.; PADMANABHAN, R. Cotranslational membrane insertion of the serine proteinase precursor NS2B-NS3(Pro) of dengue virus type 2 is required for efficient in vitro processing and is mediated through the hydrophobic regions of NS2B. **Journal Biological Chemistry**, Baltimore, v. 272, n. 49, p. 30715-30723, Dec. 1997.

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. 2.ed. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 1998. 223 p.

CRILL, D. W.; CHANG, G. J. J. Localization and characterization of flavivirus envelope glycoprotein cross-reactive epitopes. **Journal of Virology**, Washington DC, v. 78, n. 24, p. 13975-13986, Dec. 2004.

CRILL, D. W.; ROEHRIG, J. T. Monoclonal Antibodies That Bind to Domain III of Dengue Virus E Glycoprotein are the Most Efficient Blockers of Virus Adsorption to Vero Cells. **Journal of Virology**, Washington DC, v. 75, n. 16, p. 7769-7773, Aug. 2001.

DEPARIS, X. *et al.* Possible dengue sequential infection: dengue spread in a neighbourhood during the 1996/97 dengue-2 epidemic in French Polynesia. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 3, n. 11, p. 866-871, Nov. 1998.

DNASTAR. Disponível em: www.dnastar.com. Acesso em: 14 de julho de 2006.

EMINI, E. A. *et al.* Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. **Journal of Virology**, Washington DC, v. 55, n. 3, p. 836-839, Sept. 1985.

FALCONAR, A. K. I. Identification of an epitope on the dengue virus membrane (M) protein defined by cross-protective monoclonal antibodies: design of an improved epitope sequence based on common determinants present in both envelope (E and M) proteins. **Archives of Virology**, Wien, v. 144, n. 12, p. 2313-2230, Dec. 1999.

FALGOUT, B. *et al.* Immunization of mice with recombinant vaccinia virus expressing authentic dengue virus nonstructural protein NS1 protects against lethal dengue virus encephalitis. **Journal of Virology**, Washington DC, v. 63, n. 6, p. 2853-2856, June 1989.

FIGUEIREDO, L. T. M. Dengue in Brazil: history, epidemiology and research. **Virus Reviews and Research**, Belo Horizonte, v. 1, p. 9-16, 1996.

FIGUEIREDO, L. T. M. Dengue: aspectos virológicos, históricos, fisiopatológicos e do controle de epidemias. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 24, n. 2, p. 111-112, abr./jun. 1991.

FRANCIS, M. J. Synthetic Peptides. In: ROBISON, A., FARRAR, G., WIBLIN, C. **Methods in Molecular Medicine: Vaccine Protocols**. 1. ed. New Jersey : Human Press, 1996. cap. 6, p. 75-90.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de dengue: vigilância epidemiológica e atenção ao doente**. 2.ed. Brasília, DF: Departamento de Operações, 1996. 79.

GAGNON, S. J.; ENNIS, F. A.; ROTHMAN, A. L. Bystander target cells lysis and cytokine production by dengue virus-specific human CD4 (+) cytotoxic T-lymphocyte clones. **Journal of Virology**, Washington DC, v. 73, n. 5, p. 3623-3629, May 1999.

GUEX, N.; PEITSCH, M.C. Swiss-Model and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**, Weinheim, n. 18, p. 2714-2723. 1997.

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

GUIRAKHOO, F. *et al.* Safety and Efficacy of Chimeric Yellow Fever-Dengue Virus Tetravalent Vaccine Formulations in Nonhuman Primates. **Journal of Virology**, Washington DC, v. 78, n. 9, p. 4761-4775, May 2004.

GUZMAN, M. G.; KOURI, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. **International Journal of Infectious Disease**, Hamilton, v. 8, n. 2, p. 69-80, Mar. 2004.

GUZMAN, M. G.; KOURI, G. Dengue: an update. **Lancet Infectious Diseases**, London, v. 2, n. 1, p. 33-42, Jan. 2002.

HALSTEAD, S. B. Antibody, macrophages, dengue virus infection, shock, and hemorrhage: a pathogenetic cascade. **Reviews of Infectious Diseases**, Chicago, v. 11, suppl. 4, p. 830-839, May/Jun. 1989.

HASTE ANDERSEN, P.; NIELSEN, M.; LUND, O. Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein 3D structures. **Protein Science**, New York, v. 15, n. 11, p. 2558-2567, Nov. 2006.

HECHAVARRIA, A.B. **Manual de Procedimientos de Técnicas para el Diagnóstico del Dengue**. Organización Panamericana de la Salud. República de Nicaragua. 2002.

HENCHAL, E. A.; PUTNAK, J. R. The dengue viruses. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington DC, v. 3, n. 4, p. 376-396, Oct. 1990.

HEWER, R.; MEYER, D. Peptide immunogens based on the envelope region of HIV-1 are recognized by HIV/AIDS patient polyclonal antibodies and induce strong humoral immune responses in mice and rabbits. **Molecular Immunology**, Oxford, v. 40, n. 6, p. 327-335, Oct. 2003.

HOMBACH, J. *et al.* Review on flavivirus vaccine development. Proceedings of a meeting jointly organized by the World Health Organization and the Thai Ministry of Public Health, 26-27 April 2004, Bangkok, Thailand. **Vaccine**, Kidlington, v. 23, p. 2689-2695, Apr. 2005.

HUANG, J. H. *et al.* Antibody responses to an immunodominant nonstructural 1 synthetic peptide in patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 57, n. 1, p. 1-8, Jan. 1999.

HUANG, J. H. *et al.* Identification of immunodominant, group-specific and subcomplex-specific, continuous epitopes in the core regions of Japanese encephalitis virus using synthetic peptides. **Virus Research**, Amsterdam, v. 41, n. 1, p. 43-53, Mar. 1996.

IGARASHI, A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and chikungunya viruses. **Journal of General Virology**, London, v. 40, n. 3, p. 531-544, Sept. 1978.

IMMUNEPITOPE DATABASE AND ANALYSIS RESOURCE. Disponível em: www.immunoepitope.com. Acesso em: 16 de julho de 2006.

KABSCH, W.; SANDER, C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen bonded and geometrical features. **Biopolymers**, Hoboken, v. 22, p. 2577-2637, 1983.

KAO, C. L. *et al.* Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, Taiwan, v. 38, n. 1, p. 5-16, Feb. 2005.

KOCHEL, T. *et al.* Inoculation of plasmids expressing the dengue-2 envelope gene elicit neutralizing antibodies in mice. **Vaccine**, Kidlington, v. 15, n. 5, p. 547-552, Apr. 1997.

KOLASHAR, A. S.; TONGAONKAR, P. C. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 276, n. 1/2, p. 172-174, Dec. 1990.

KORBER, B.; LABUTE, M.; YUSIM, K. Immunoinformatics comes of age. **PLoS Computational Biology**, San Francisco, v. 2, n. 6, p. 71-78, June 2006.

KYTE, J.; DOOLITTLE, R. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. **Journal of Molecular Biology**, California, v. 157, p. 105-132, 1982.

LANCIOTTI, R. S. *et al.* Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 30, n. 3, p. 545-551, Mar 1992.

LANE, R. S. Competence of ticks as vectors of microbial agents with an emphasis on *Borrelia burgdorferi*. In: SONENSHINE, D. E.; MATHER, T. N. (Ed.) **Ecological dynamics of tick-borne zoonoses**. Oxford: Oxford University Press, 1994. p. 45-67.

LEITMEYER, K. C. *et al.* Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. **Journal of Virology**, Washington DC, v. 73, n. 6, p. 4738-4747, June 1999.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. **Journal of Virology**, Washington DC, v. 73, n. 6, p. 4611-4621, June 1999.

LIPMAN, D.J.; PEARSON, W.R. Rapid and sensitive protein similarity searches. **Science**, Washington DC, v. 227, n. 4693, p. 1435-1441, Mar 1985.

LIU, I. J. *et al.* Disease-specific B cell epitopes for serum antibodies from patients with severe acute respiratory syndrome (SARS) and serologic detection of SARS antibodies by epitope-based peptide antigens. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 190, n. 4, p. 797-809, Aug. 2004.

LIU, S. J. *et al.* Immunological characterizations of the nucleocapsid protein based SARS vaccine candidates. **Vaccine**, Kidlington, v. 24, n. 16, p. 3100-3108, Apr. 2006.

LOWENBERG-NETO, P.; NAVARRO-SILVA, M. First report of *Aedes albopictus* in the state of Santa Catarina, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 36, n. 2, p. 246-247, Apr. 2002.

MARQUES JR, E. Vacina para dengue. As perspectivas de uma vacina contra o vírus de dengue com a tecnologia do DNA recombinante. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, [S.l.], n. 25, p. 4-7, mar./abr. 2002. (Entrevista).

MATHEW, A. *et al.* Dominant recognition by human CD8+ cytotoxic T lymphocytes of dengue virus nonstructural proteins NS3 and NS1.2a. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 98, n. 7, p. 1684-1691, Oct. 1996.

MATHEW, A. *et al.* Predominance of HLA-restricted cytotoxic T-lymphocyte responses to serotype-cross-reactive epitopes on nonstructural proteins following natural secondary dengue virus infection. **Journal of Virology**, Washington DC, v. 72, n. 5, p. 3999-4004, May 1998.

MATHEWS, J. H. *et al.* T-Helper and Associated Antibody Response to Synthetic Peptides of the E Glycoprotein of Murray Valley Encephalitis Virus. **Journal of Virology**, Washington DC, v. 65, n. 10, p. 5141-5148, Oct. 1991.

MATHEWS, J. H. *et al.* A synthetic peptide to the E glycoprotein of Murray Valley encephalitis virus defines multiple virus-reactive T- and B-cell epitopes. **Journal of Virology**, Washington DC, v. 66, n. 11, p. 6555-6562, Nov. 1992.

MIAGOSTOVICH, M. P. *et al.* Genetic characterization of dengue virus type 3 isolates in the State of Rio de Janeiro, 2001. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirao Preto, v. 35, n. 8, p. 869-872, Aug. 2002.

MODIS, Y. *et al.* Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature**, London, v. 427, n. 22, p. 6986-6991, June. 2003.

MODIS, Y. *et al.* A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. **PNAS**, California, v. 100, n. 12, p. 313-319, Jan. 2004.

MODIS, Y. *et al.* Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein. **Journal of Virology**, Washington DC, v. 79, n. 2, p. 1223-1231, Jan. 2005.

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, n. 1, p. 13-22, Jan. 2005.

MUNSTERMANN, L.E. The Yellow Fever Mosquito. Disponível em: www.cober.com.ar/links/galeria/aedes_aegypti_1.jpg. Acesso em: 18 de setembro de 2006.

OLIPHANT, T. *et al.* Antibody Recognition and Neutralization Determinants on Domains I and II of West Nile Virus Envelope Protein. **Journal of Virology**, Washington DC, v. 80, n. 24, p. 12149-12159, Dec. 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Dengue hemorrágico: diagnóstico, tratamento e controle**. Genebra, 1987.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Dengue hemorrágico: diagnóstico, tratamento e controle.** Genebra, 1996.

PORTER, K. R. *et al.* Protective efficacy of a dengue 2 DNA vaccine in mice and the effect of CpG immuno-stimulatory motifs on antibody responses. **Archives of Virology**, Wien, v. 143, n. 5, p. 997-1003, Apr. 1998.

PURDUE NEWS. First-ever images of developing dengue virus obtained at Purdue. Disponível em: www.news.uns.purdue.edu/UNS/images/kuhn.dengue1.jpeg. Acesso em 14 de outubro de 2006.

RANDOLPH, V. B., WINKLER, G.; STOLLAR, V. Acidotropic amines inhibit proteolytic processing of flavivirus prM protein. **Virology**, New York, v. 174, n. 2, p. 450-458, Feb. 1990.

RAVIPRAKASH, K. *et al.* Synergistic neutralizing antibody response to a dengue virus type 2 DNA vaccine by incorporation of lysosome-associated membrane protein sequences and use of plasmid expressing GM-CSF. **Virology**, New York, v. 290, n. 1, p. 74-82, Nov. 2001.

REY, F. A. *et al.* The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. **Nature**, London, v. 375, n. 6529, p. 291-298, May 1995.

RICE, C. M. *et al.* Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. **Science**, Washington DC, v. 229, n. 4715, p. 726-733, Aug. 1985.

ROEHRIG J. T. Immunochimistry of dengue viruses. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. (Ed.) **Dengue and dengue hemorrhagic fever.** London: CABI Publishing, 1997. chap. 10, p. 199-219.

ROEHRIG, J. T. Immunichemistry of dengue viruses. In: GUBLER, D.J.; KUNO, G. (Ed). **Dengue and dengue hemorrhagic fever.** London: CABI Publishing, 1997. cap. 10, p. 199-219.

ROEHRIG, J. T. *et al.* Antibodies to dengue 2 virus E-glycoprotein synthetic peptides identify antigenic conformation. **Virology**, New York, v. 177, n. 2, p. 668-675, Aug. 1990.

ROEHRIG, J. T. *et al.* Enhacement of the Antibody Response to Flavivirus B-Cell Epitopes by Using Homologous or Heterologous T-Cell Epitopes. **Journal of Virology**, Washington DC, v. 66, n. 6, p. 3385-3390, June. 1992.

- ROEHRIG, J. T.; BOLIN, R. A.; KELLY, R. B. Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica. **Virology**, New York, v. 246, n. 2, p. 317-328, July 1998.
- ROMANOS, M. T. V. Febre amarela e dengue. In: SANTOS, N. S. O. (Org.). **Introdução à virologia humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 177-181.
- ROSEN, L. The Emperor's New Clothes revisited, or reflections on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 26, n. 3, p. 337-343, May 1997.
- SABIN, A. B. Research on dengue during World War II. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 1, n. 1, p. 30-50, Jan. 1952.
- SABIN, A. B.; SCHLESINGER, R. W. Production of immunity to dengue with virus modified by propagation in mice. **Science**, Washington DC, v. 101, n. 2634, p. 640-642, June 1945.
- SAHA, S.; BHASIN, M.; RAGHAVA, G. P. S. Bcipep: A database of B-cell epitopes. **BMC Genomics**, London, v. 6, n. 79, p. 1471-2164, May 2005.
- SCHLESINGER, J. J.; BRANDRISS, M. W.; WALSH, E. E. Protection of mice against dengue 2 virus encephalitis by immunization with the dengue 2 virus nonstructural glycoprotein NS1. **Journal of General Virology**, London, v. 68, n. 3, p. 248-254, Mar. 1987.
- SCHLESINGER, R. W. Propagation in chick embryos of the Hawaiian strain of dengue virus I. Sustained serial passage in eggs after one hundred and one intracerebral passages in mice. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 51, p. 248-254. 1950.
- SEGURA, M. N. O. et al. Encontro de *Aedes albopictus* no Estado do Pará, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 388-389, jun. 2003.
- SERAFIN, I. L.; AASKOV, J. G. Identification of epitopes on the envelope (E) protein of dengue 2 and dengue 3 viruses using monoclonal antibodies. **Archives of Virology**, Wien, v. 146, n. 12, p. 2469-2479, Dec. 2001.
- SE-THOE, S. Y.; NG, M. M.; LING, A. E. Retrospective study of Western blot profiles in immune sera of natural dengue virus infections. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 57, n. 3, p. 322-30, Mar. 1999.

SIMMONS, C. P. *et al.* Early T-cell responses to dengue virus epitopes in Vietnamese adults with secondary dengue virus infections. **Journal of Virology**, Washington DC, v. 79, n. 9, p. 5665-5675, May 2005.

SONESHINE, D. E.; MATHER, T. N. **Ecological dynamics of tick-borne zoonoses**. Oxford: Oxford University, 1994.

SUMAR, N. Multiple Pin Peptide Scanning (“Pepscan”). In: WESTWOOD, O. M. R.; HAY, F. C. (Ed.). **Epitope Mapping**. 1. ed. New York: Oxford University, 2001. cap. 2, p. 17-45.

SWISS MODEL. Disponível em: www.swissmodel.expasy.org. Acesso em: 16 de agosto de 2006.

TAKAHASHI, I. *et al.* Epitope analysis of antibodies in Japanese to human cytomegalovirus phosphoprotein 150 with synthetic peptides. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 66, n. 11, p. 2402-2405, Nov. 2002.

THULLIER, P. *et al.* Mapping of a dengue virus neutralizing epitope critical for the infectivity of all serotypes: insight into the neutralization mechanism. **Journal of General Virology**, London, v. 82, n. 8, p. 1885-1892, Aug. 2001.

TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. T. *et al.* Dengue. In: LEÃO, R. N. Q. (Ed.) **Doenças infecciosas e parasitárias: enfoque amazônico**. Belém: Cejup, 1997. p. 227-241.

VÁZQUEZ, S. *et al.* Immune response to synthetic peptides of dengue prM protein. **Vaccine**, Kidlington, v. 20, n. 13/14, p. 1823-1830, Mar. 2002.

WANG, S. *et al.* Antibody-enhanced binding of dengue-2 virus to human platelets. **Virology**, New York, v. 213, n. 1, p. 254-257, Oct 1995.

WESTWOOD, O. M. R.; HAY, F. C. An introduction to epitope mapping. In: WESTWOOD, O. M. R.; HAY, F. C. (Ed.). **Epitope Mapping**. 1. ed. New York: Oxford University, 2001. cap. 01, p. 01-15.

WISSEMAN, C. L. Prophylaxis of dengue, with special reference to live virus vaccine. **Proceedings of the Japanese Society for Tropical Medicine**, [S.l.], v. 7, p. 51-56, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. TDR IMAGES. Disponível em: www.who.int/tdr/diseases/dengue/default.htm. Acesso em: 18 de agosto de 2006.

WU, H. C. *et al.* Identification of a dengue virus type 2 (DEN-2) serotype-specific B-cell epitope and detection of DEN-2-immunized animal serum samples using an epitope-based peptide antigen. **Journal of General Virology**, London, v. 84, n. 10, p. 2771-2779, Oct. 2003.

WU, H. C. *et al.* Identification of B-cell epitope of dengue virus type 1 and its application in diagnosis of patients. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 39, n. 3, p. 977-982, Mar. 2001.

YAMADA, K. I. *et al.* Virus isolation as one of the diagnostic methods for dengue virus infection. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 24, n. 3, p. 203-209, Apr. 2002.

ZHANG, W. *et al.* Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. **Nature Structural Biology**. London, v. 10, n. 11, p. 907-912, Nov. 2003.

ZHANG, W. *et al.* Conformational Changes of the Flavivirus E Glycoprotein. **Structure**. Switch, v. 12, p. 1607-1618, Sept. 2004.

ZHANG, W. *et al.* MULTIPRED: a computational system for prediction of promiscuous HLA binding peptides. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 33, p. W172-W179, Jul. 2005.

ZIVNY, J. *et al.* Partial agonist effect influences the CTL response to a heterologous dengue virus serotype. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 163, n. 5, p. 2754-2760, Sept. 1999.

APÊNDICE A - ARTIGO EM PREPARAÇÃO

Identification of Continuous B-cell Epitopes in the Envelope Glycoprotein of Dengue Virus Type 3.

Andréa N.M. Rangel da Silva^a, Frederico G.C. Abath^b, Patrícia Brotto Furtado^c, Silvia M.L. Montenegro^b, Ernesto Marques Junior^{a,c}.

^aLaboratório de Virologia e Terapia Experimental, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ, Av.Morais Rego s/n., Cidade Universitária, 50670-420 Recife-PE, Brasil.

^bDepartamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ, Av.Morais Rego s/n., Cidade Universitária, 50670-420 Recife-PE, Brasil.

^cUniversity College London

^dThe Johns Hopkins School of Medicine, Department of Pharmacology and Molecular Sciences, 725 North Wolfe Street, Baltimore, MD 21205, USA.

Abstract. Dengue virus infection is a growing global public health concern in tropical and subtropical regions of the world. One possible strategy to avoid the risks correlated with a dengue vaccine would be to construct a chimeric vaccine composed of selected critical epitopes of four serotypes. We have used synthetic peptides to identify B-cell epitopes in the E glycoprotein of dengue virus type 3. The ELISA results showed that the human dengue serum reacted with several linear immunodominant peptides distributed in 7 regions at amino acid positions 26-40, 51-65, 71-90, 131-150, 146-170, 196-210 and 246-260. Almost of this epitopes mapped to regions predicted to be hydrophilic based on Kyte and Doolittle profiles, suggesting that these regions are exposed at the surface of the E protein. In conclusion, our study identified several immunodominant IgG-specific epitopes on the envelop of DENV-3. The peptides of E glycoprotein in conjunction with others well documented epitopes, could be developed into diagnostic reagents and vaccine for the dengue virus.

Keywords: dengue, B lymphocyte epitopes, peptides

INTRODUCTION

Dengue infections occur in the most of tropical and subtropical areas of the world, and are considered as one of the most important re-emerging infections diseases (YAMADA *et al.*, 2002). More than 2.5 billion people are at risk of infection and more than 100 countries have endemic dengue transmission (GUZMÁN; KOURI, 2004). Dengue virus is a member of the family *Flaviviridae*, genus *Flavivirus* with 4 antigenically distinct serotypes (DENV1 to DENV-4). The agent is a single-stranded, positive-sense, RNA virus with a genome of approximately 11 kb (FIGUEIREDO, 1991). The virus encode and express three structural (Capsid, C; premembrane, prM and envelope, E) and seven nonstructural (NS) proteins (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b and NS5) (ANADARAO *et al.*, 2005). The E glycoprotein is exposed on the surface of the dengue virion and represents the dominant virus antigen, conferring protective immune responses by eliciting neutralizing and hemmagglutination-inhibiting antibodies and is responsible for virus attachment, virus-specific membrane fusion and virus assembly (LEITMEYER *et al.*, 1999). The *flavivirus* E-glycoprotein contains three structural and functional domains: domains I and III contain predominately subcomplex and type-specific epitopes, whereas DII contains the major flavivirus group and subgroup cross-reactive epitopes (CRILL; CHANG, 2004). There is none available antiviral therapy to treat dengue infections and control of dengue virus by vaccination has proved elusive (MODIS *et al.*, 2005). In order to produce a safe, effective vaccine against dengue infection, the determinants on the surface of the virion of each dengue serotype need to be identified (SERAFIN; AASKOV, 2001). Peptides corresponding to the antigenic determinants of the proteins that elicit antibodies in dengue-infected patients would be useful for a vaccine production. Into this perspective, several epitopes in the E-glycoprotein (ROEHRIG *et al.*, 1998; BEASLEY; AASKOV, 2001; THULLIER *et al.*, 2001; APT *et al.*, 2006), NS1 (HUANG *et al.*, 1999; WU *et al.*, 2001; WU *et al.*, 2003), NS4a and capsid (ANANDARAO *et al.*, 2005) for DENV-1 e DENV-2 has been mapped extensively. However, not much information is available in the literature regarding the epitopes in the proteins of DENV-3. In the present study, we have mapped B cell epitopes in the E glycoprotein of DENV-3 and have identified several immunodominant IgG-specific epitopes.

MATERIALS AND METHODS

Peptide synthesis. A total of ninety five peptides (each with 15-mers, overlap of 10) were synthesized for two laboratories: Synpep, California-USA and Schafer, Conpenhagem-DK. All of them were produced covering the 490 amino acids (aa) of the E protein sequence deduced from the genome of a Dengue 3 isolated from Brazil (MIAGOSTOVICH *et al.*, 2002). For convenience, we will refer to these sequence as DENV-3seq. Synpep peptides were used to perform first screening with pool of patient sera and Schafer peptides used with different groups of patients with dengue fever, dengue hemorrhagic fever and patients with DENV-1 or DENV-2 infections.

Hidropathicity, surface accessibility and antigenicity analysis. The E-glycoprotein sequence of DENV-3seq were analyzed using Lasergene software (DNASTAR Inc.) and putative hydrofobic and hydrophilic regions along the length predicted using Kyte and Doolittle method (KYTE; DOOLITTLE, 1982). Surface accessibility and antigenicity analysis were done using Emini (EMINI *et al.*, 1985) and Kolaskar & Tongaonkar (KOLASKAR; TONGAONKAR, 1990) prediction methods respectively, both available at “Immune Epitope Database and Analysis Resource” home page (www.immunoepitope.com). Other surface accessibility prediction was done with DSSP program (KABSCH; SANDER, 1983).

Modeling DENV-3seq E-glycoprotein. The modeling of DENV-3seq structure was done using Swiss Model program (www.swissmodel.expasy.org) and the Swiss PBD Viewer program was required for visualization (www.expasy.org).

Dengue patient sera. Sera from eight patients that were positive for IgM and IgG anti-dengue antibodies by conventional clinical diagnostic assays were pooled together for the first screening using Synpep peptides. As negative control, peptides were screened with a serum pool from twenty one normal patients that were determined to be negative for dengue IgM and IgG antibodies. In order to investigate the power of the first mapped peptides in discriminate the infections between DENV-3 and non dengue patients and between DENV-3 and infections for other dengue serotypes, Schafer peptides were used. For it, thirty two positive and seventeen negative patients were obtained from Virology and Experimental Therapy Laboratory (LAVITE), Recife, Brazil, and chosen based in the World Health Organization evaluations criteria (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1996) for dengue fever (DF) and dengue hemorrhagic fever (DHF). The sera for DENV-3 were identified as positive through conventional laboratory assays as viral isolation, IgM and IgG. The negative patients were those who presented to be negative for IgM and IgG anti-dengue antibodies. Sera from patients with DENV-1 or DENV-2 (D1D2) infections were provided by Virology Branch of the Public Health Central Laboratory of Pernambuco (LACEN-PE). It was a total of twenty sera diagnosed as positive during 1999 Brazilian's dengue outbreak.

ELISA for epitope identification. ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) was optimized for using Synpep and Schafer linear synthetic peptides from E-glycoprotein. Briefly, for Synpep peptides, each microtiter well (Immulon II, Dynatech Laboratories Inc., VA-USA) was coated overnight at 4°C with 20µg/ml, 100µl per well of synthetic peptides in carbonate buffer (CB), 0.2M, pH 9.6. After, wells were blocked with 200µl of CB 5% dry skimmed milk for 2h in room temperature (RT). The wells were washed in phosphate buffered saline 1x (PBS), pH 7.2, 0.05% Tween 20 (Reagen, RJ, Brazil) and then human sera were added, diluted 1:50 in PBS 1x 10% dry skimmed milk for 1h at 37 °C. After this, another wash was done (1x PBS 0.05% Tween 20) and wells were incubated for 2h at RT with 100µl of 1:1000 peroxidase mouse anti-human IgG monoclonal (Zymed Laboratories Inc., CA-USA), diluted in PBS 1x 10% dry skimmed milk. Finally, the enzyme activity was developed with the addition of 100µl of tetramethylbenzidine (TMB) substrate solution at 30min in RT. Optical densities (ODS) were measured at 450nm in microtiter plate reader (Bio-Rad Benchmark Plus). For Schafer peptides, we adopted the same

protocol with differences in the block step that was done using 200 μ l of CB 5% fetal bovine serum 0,05% Tween 20 and in the solution for diluting dengue sera and second antibody, consisting of PBS 5% fetal bovine serum 0,05% Tween 20. As internal reference control, total cellular extract of DENV-3 infected cells (HECHAVARRIA, 2002) was used as the capture antigen.

Statistical Analysis. For the purpose of first screening assigning linear epitopes, the mean OD obtained using negative sera pool plus three times standard deviation was used as the cut-off value. So, the most reactive peptides were tested with the individual patients sera (DF, DHF and D1D2) and the results were expressed in ELISA arbitrary unity form (EAU), consisting in the ratio between the optical density (OD) found for each tested sample and the OD found for the reference control (total cellular extract of DENV-3 infected cells) in the same plate, in order to minimize the variability of positive and negative controls, as well as of the samples in each assay. The software StatView version 5.0 was used to generate the EAU and the results were analyzed through the ROC curves, using the software MedCalc version 8.2 for graphs generation.

RESULTS

Identification of E-glycoprotein epitopes. The ELISA results using Synpep peptides, showed that the human dengue serum reacted with eleven peptides along the entire length of the E-glycoprotein molecule. These results are presented in the main panel of Fig.1. These peptides are distributed in 5 regions at amino acid positions 51-65, 71-90, 131-170, 196-210 and 246-260. The sequences of these peptides and their relative epitope activity are summarized in Table 1.

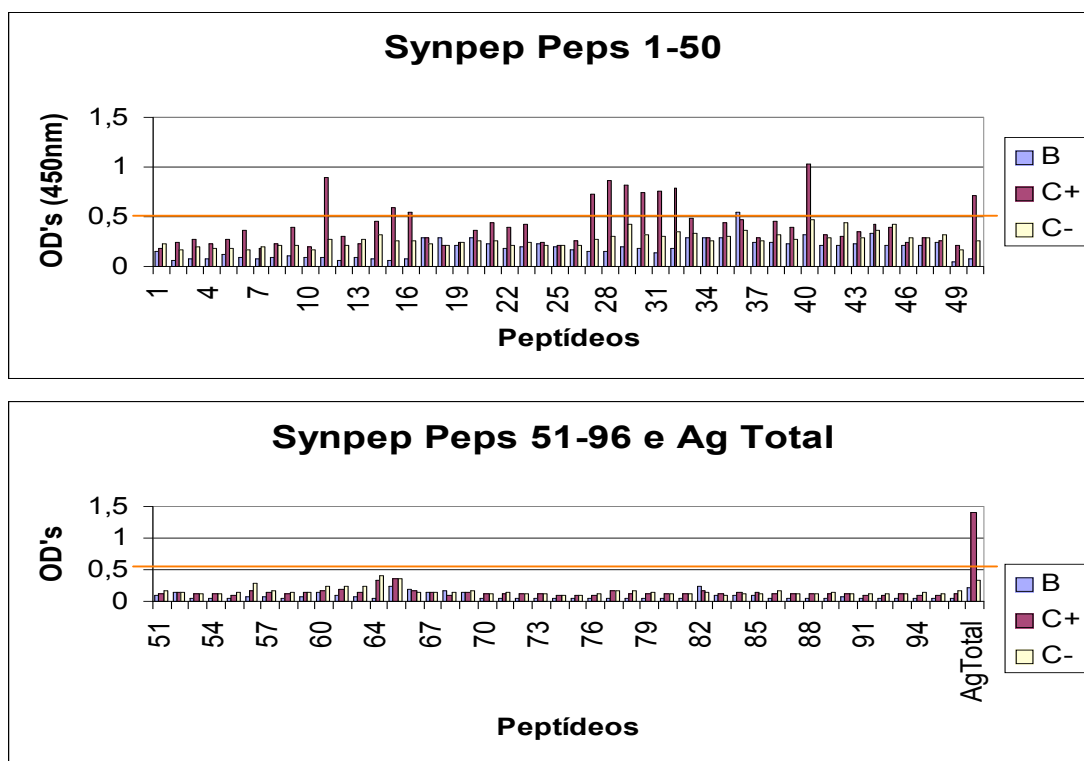


Fig.1. IgG-specific activities of synthetic peptides of DENV-3 E-glycoprotein, using human sera. The horizontal axis denotes the peptide number and the vertical axis denotes the absorbance measured at 450nm. The cut-off absorbance used to identify reactive epitopes is shown by the red line.

Analyzing hydrophathy, surface accessibility and antigenicity profiles. Parameters such as hydrophilicity, flexibility, accessibility, turns and antigenic propensity of polypeptides chain have been correlated with the location of continuous epitopes. This has led to a search for empirical rules that would allow the position of continuous epitopes to be predicted from certain features of the protein sequence. The evaluation of DENV-3seq E-glycoprotein sequence, showed in the hidropathy profile that all eleven peptides are in hydrophilic areas according to Kyte and Doolittle hydrophathy profiles (Fig.2), suggesting that these regions are exposed at the surface of the E protein. However, in the surface accessibility prediction just two peptides from eleven, those including residues VQYENLK (aa 130-136) and TGDQHQVGNETQ (aa 145-156), appearing to be really exposed in the protein surface. In the antigenicity prediction we found that

four peptides, those spanning the residues TQLATLRKLCIEG (aa 51-63), QGEAVLPE (aa 77-84), EGKVVQYENLKYTVIITVHTG (aa 126-146) and KKPEVVVLGS (aa 244-253) seems to be antigenic.

Table 1. Immunoreactive DENV- 3 E-glycoprotein peptides.

Peptide #	Peptide sequence (aa residue #s)	ELISA(OD ₄₅₀) Human sera
N11	TQLATLRKLCIEGKI (51-65)	0,90
N15	DSRCPTQGEAVLPEE (71-85)	0,59
N16	TQGEAVLPEEQDPNY (76-90)	0,55
N27	QYENLKYTVIITVHT (131-145)	0,72
N28	KYTVIITVHTGDQHQ (136-150)	0,87
N29	ITVHTGDQHQVGNET (141-155)	0,82
N30	GDQHQVGNETQGVTA (146-160)	0,75
N31	VGNETQGVTAETPQ (151-165)	0,76
N32	QGVTAETPQASTTE (156-170)	0,78
N40	LLTMKNKAWMVHRQW (196-210)	1,03
N50	PEVVVLGSQEGAMHT (246-260)	0,72

Modeling DENV-3seq E-glycoprotein. The structure of DENV-3seq done by Swiss Model was a monomer and not a dimer like the E-glycoprotein molecule. So, the construction of the DENV-3seq dimer was done by overlapping the two monomers of DENV-3seq in the monomers from the structure of DENV-3 published (1UZG.pdb), using Deep View/Swiss-PdbViewer program version 3.7/SP5 (GUEx; PEITSCH, 1997).

The dimer is presented in the Picture 2, showing the position of the eleven mapped peptides in the E-glycoprotein structure, in different colors.

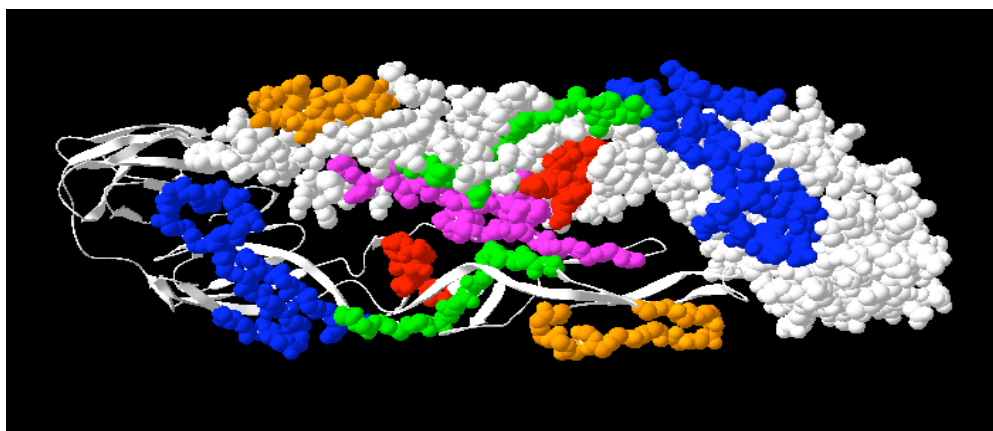


Figure 2. Structure of E-glycoprotein dimer and molecule position of the eleven mapped peptides. Top View, peptides are represented in colorful space-filling: peptide 11 in green, peptides 15 and 16 in orange, peptides 27, 28, 29, 30, 31 e 32 in blue, 40 in red and 50 in violet. For illustrative reasons one monomers are represented as space-filling and the other as ribbons.

Analyzing the reactivity profile of eleven mapped peptides in discriminate the infections between DENV-3 and non dengue patients and between DENV-3 and infections for other dengue serotypes (DENV-1 and DENV-2). The results were analyzed through the ROC curves generated for each peptide. The assays demonstrates that peptides 15, 16, 28, 29, 30, 31, 32, 40 and 50 have some power in discriminate between DENV-3 infections and non dengue, with likely potential for using in the diagnostic assays for DENV-3 infections, on the contrary of peptides 11 and 27, that seems do not generate significant immune response. About the ability in differentiate DENV-3 and dengue for other serotypes, it has shown that peptides 11, 27 and 28 presented high responses and that these peptides could be used for the differential diagnostic between serotypes.

DISCUSSION

Dengue represents the most important arthropode-borne viral disease in humans in terms of morbidity and mortality and at present there is no one antiviral therapy available for the disease treatment. Although vaccine development is an undisputed public health priority, it remains a considerable scientific challenge due to the disease being caused by four antigenically distinct serotypes, been the sequential infection hypothesis as a risk factor of dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome (HOMBACH *et al.*, 2005). One possible strategy to avoid pathogeny associated with a dengue vaccine would be to construct a chimeric vaccine composed of selected critical epitopes of the four serotypes and exclude unnecessary epitopes. The majority of the epitopes involved in dengue neutralization might be present in the E glycoprotein, which is the major surface protein in the viral particles (SERAFIN; AASKOV, 2001).

Almost vaccines and diagnostic methods available nowadays, make use of all or part of the E glycoprotein genome to gain peptides with high immunogenic power. These peptides might be able to induce cellular and humoral responses for being selected to studies. Synthetic peptides prepared from the sequences of the structural glycoproteins of several viruses have been evaluated for Th-cell activity (MATHEWS *et al.*, 1991). However, an effective vaccine should elicit durable neutralizing-antibody responses, as well as strong memory-B and T-cell responses (GUIRAKHOO *et al.*, 2004). The identification of B-cell epitopes is important to select peptides for vaccine approaches, development of diagnostic reagents and for better understanding the interactions between virus-antibody in a molecular level (WU *et al.*, 2003).

The purpose of this of this study was to locate linear B-cell epitopes on the dengue virus envelope glycoprotein, which might be potentially useful in diagnosis. A DENV-3 is currently the most prevalent of the four serotypes during the last outbreaks in Brazil, we performed our pepscan analysis with DENV-3 virus-infected patient sera.

The ELISA results showed that the human dengue serum reacted with eleven continuous peptides, IgG-specific, distributed in five regions at amino acids positions 51-65, 71-90, 131-170, 196-210 and 246-260. Some immunogenic peptides have been identified in the E-glycoprotein of DENV-1 and DENV-2, but not much information is available about B-cell epitopes present in the E-glycoprotein of DENV-3. In 2001 and 2005, some authors described the presence of non

specified epitopes in E-glycoprotein of DENV-3 (MODIS *et al.* 2005; SERAFIN; AASKOV, 2001).

All the eleven peptides mapped are present in the hydrophilic regions of the protein, suggesting that they could be exposed on the surface of the E-glycoprotein. However, the interface between monomers within a dimer is a mixture of hydrophobic (60%) and hydrophilic (40%) interactions. So, peptides that appear to be hydrophilic based on the predictions tools could not be accessible to the antibody binding. That is the reason we realized the accessibility and antigenicity predictions, showing that from eleven, just two peptides (11 and 27) seems to be exposed at the surface and four (11, 15, 27 and 50) are the most antigenic. It can be confirmed with the 3-D structure that shows peptides 27 and 30 (in blue) as been exposed in the molecule like loops projecting for the surface. As one of the most antigenic, peptide 11 (in orange) seems to be the most exposed and peptide 50 (violet) the most hidden in the dimer interface. The monomers in the E-glycoprotein make interactions each other and one of this region contact is on domain II (residues 256-265), which interacts with the same residues across the dyad axis (ZHANG *et al.*, 2004). Peptide 50, spanning residues 246-260, seems to make part of this contact region between monomers.

Despite it was not possible to localize where are the carbohydrate molecules in the E-glycoprotein of DENV-3seq, asparagine residues are found in the peptides 29, 30 and 31, spanning amino acids from 141-165. There are two glycosilated asparagines on each dengue E subunit: Asn-153 on domain I and Asn-67 on domain II. Asn-153 is conserved in most flavivirus envelope proteins and bears a tetrasaccharide, where the fourth sugar (a monose), appears to be important for viral entry (MODIS *et al.*, 2003).

An interesting point observed is that peptide 27 appear in all predictions accomplished in this work and curiously has appeared in the T-cell prediction done for other groups (ZHANG *et al.*, 2005). It has been demonstrated for a number of a viruses that Th-cell epitopes can be modeled using synthetic peptides and that active Th-cell epitopes can modulate the antibody response to B-cell epitopes. These observations are important in vaccine design and mean that effective vaccines will most likely require expression of B- and T-cell epitopes (ROEHRIG *et al.*, 1992).

The E-glycoprotein has three structural domains: DI (spanning residues 130-185), DII (spanning residues 50-130 and 185-300) and DIII (spanning residues 300-400). From the eleven

mapped peptides, those included at positions 51-65 (peptide 11), 71-90 (peptides 15 and 16), 196-210 (peptide 40) and 246-260 (peptide 50) are located on domain II and those included on positions 131-170 (peptides 27, 28, 29, 30, 31 and 32) are on domain I. Domain I contains predominately type-specific no neutralizing epitopes. Domain II contains many cross-reactive epitopes eliciting neutralizing and no neutralizing monoclonal antibodies that bind to fusion peptides, while domain III contains multiple type and subtype specific epitopes eliciting only virus-neutralizing antibodies (CRILL; ROEHRIG, 2001; OLIPHANT *et al.*, 2006). It is necessary, for a better understanding about the behavior of this peptides in eliciting responses for protective (neutralizing) or pathogenic antibodies, the information about neutralizing tests for each one of these peptide, what will be done in a future project.

The E-glycoprotein is a so called class II fusion protein, found so far in flaviviruses and alphaviruses, where a proteolytic cleavage yields mature virions with the fusion peptide primed for fusion, been essential for the attachment point for drawing host-cell and viral membranes together. These fusion peptides, a hydrophobic sequence conserved among all flaviviruses, are present on domain II (spanning residues at positions 98-109 for DENV-2), hidden on the dimer interface and becoming exposed during the conformational change initiated by exposure to low pH (MODIS *et al.*, 2003; MODIS *et al.*, 2005 and ZHANG *et al.*, 2003). The sequence analysis of the eleven peptides showed that they do not fit as a fusion peptides. Anyway, mapping to the fusion loop was not always associated with therapeutic activity, had been demonstrated that their use for treatment present little protection postinfection or various levels of protection in vivo depending on the model used. It could be possible that antibodies that localize to this region could be protective against infection in some cell types and possibly pathological in others (OLIPHANT *et al.*, 2006).

It was tested positive and negative patient sera with different types of clinical infections, against the eleven peptide mapped, in order to evaluate their power for discriminating the infections between DENV-3 and non dengue patients and between DENV-3 and infections for other dengue serotypes (DENV-1 and DENV-2). As there is no DENV-4 circulation in Brazil, we didn't have any sera from patient infected with this serotype and the cross reactive response for it could not be evaluated. Moreover, as the number of the samples used in this work was little, it was not possible to establish if the peptides could be used to differentiate the distinct clinical types of dengue (DC and DHF).

The results about the power of the eleven peptides in discriminate the infections between DENV-3 and non dengue patients, shown that peptides 15, 16, 28, 29, 30, 31, 32, 40 e 50 could be used to produce kits for dengue diagnosis. Peptides 11 and 27, seems do not elicit significant immune response for DENV-3, suggesting that they could not be used for this purpose. The evaluation of the peptides in discriminate between DENV-3 and infections for other dengue serotypes (DENV-1 and DENV-2), shown that peptides 11, 27 and 28 were able to differentiate the serotype of infection.

Our study identified several immunodominant IgG-specific epitopes on the envelop of DENV-3. The peptides of E glycoprotein described herein in conjunction with other well documented epitopes are potentially relevant for the development of diagnostic reagents and vaccine for the dengue virus.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge Marli Tenório for providing us the DENV-1 nad DENV-2 patient sera used in this study. We thank Carlos Brito for the clinical diagnosis from the DENV-3 patients. The work was supported by Brazil's Ministry of Health, FIOCRUZ-PDTIS RVR 09 programme, The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and The United and States National Institute of Health(NIH) grant U19 AI05641.

REFERENCES

ANANDARAO, R.; SWAMINATHAN, S.; KHANNA, N. The identification of immunodominant linear epitopes of dengue type 2 virus capsid and NS4a proteins using pin-bound peptides. **Virus Research**, Amsterdam, v. 112, n. 1/2, p. 60-68, Sept. 2005.

APT, D. *et al.* Tetravalent neutralizing antibody response against four dengue serotypes by a single chimeric dengue envelope antigen. **Vaccine**, Kidlington, v. 24, p. 335-344. 2006.

BEASLEY, D. W. C.; AASKOV, J. G. Epitopes on the dengue 1 virus envelope protein recognized by neutralizing IgM monoclonal antibodies. **Virology**, New York, v. 279, n. 2, p. 447-458, Jan. 2001.

CRILL, D. W.; CHANG, G. J. J. Localization and characterization of flavivirus envelope glycoprotein cross-reactive epitopes. **Journal of Virology**, Washington DC, v. 78, n. 24, p. 13975-13986, Dec. 2004.

CRILL, D. W.; ROEHRIG, J.T. Monoclonal Antibodies That Bind to Domain III of Dengue Virus E Glycoprotein are the Most Efficient Blockers of Virus Adsorption to Vero Cells. **Journal of Virology**, Washington DC, v. 75, n. 16, p. 7769-7773, Aug. 2001.

EMINI, E. A. *et al.* Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. **Journal of Virology**, Washington DC, v. 55, n. 3, p. 836-839, Sept. 1985.

FIGUEIREDO, L. T. M. Dengue: aspectos virológicos, históricos, fisiopatológicos e do controle de epidemias. *Medicina, Ribeirão Preto*, v. 24, n. 2, p. 111-112, abr./jun. 1991.

GUEx, N.; PEITSCH, M.C. Swiss-Model and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**, n. 18, p. 2714-2723. 1997.

GUIRAKHOO, F. *et al.* Safety and Efficacy of Chimeric Yellow Fever-Dengue Virus Tetravalent Vaccine Formulations in Nonhuman Primates. **Journal of Virology**, Washington DC, v. 78, n. 09, p. 4761-4775, May. 2004.

GUZMAN, M. G.; KOURI, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. **International Journal of Infectious Disease**, Hamilton, v. 8, n. 2, p. 69-80, Mar. 2004.

HECHAVARRIA, A.B. Manual de Procedimientos de Técnicas para el Diagnóstico del Dengue. **Organización Panamericana de la Salud**. República de Nicaragua. 2002.

HUANG, J. H. *et al.* Antibody responses to an immunodominant nonstructural 1 synthetic peptide in patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 57, n. 1, p. 1-8, Jan. 1999.

KABSCH, W.; SANDER, C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen bonded and geometrical features. **Biopolymers**, v. 22, p. 2577-2637. 1983.

KOLASHAR, A. S.; TONGAONKAR, P. C. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Letters*, Amsterdam, v. 276, n. 1/2, p. 172-174, Dec. 1990.

KYTE, J.; DOOLITTLE, R. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, v. 157, p. 105-132. 1982.

LEITMEYER, K. C. *et al.* Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *Journal of Virology*, Washington DC, v. 73, n. 6, p. 4738-4747, June 1999.

MATHEWS, J. H. *et al.* T-Helper and Associated Antibody Response to Synthetic Peptides of the E Glycoprotein of Murray Valley Encephalitis Virus. *Journal of Virology*, Washington DC, v. 65, n. 10, p. 5141-5148, Oct. 1991.

MIAGOSTOVICH, M. P. *et al.* Genetic characterization of dengue virus type 3 isolates in the State of Rio de Janeiro, 2001. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Ribeirao Preto, v. 35, n. 8, p. 869-872, Aug. 2002.

MODIS, Y. *et al.* Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*, London, v. 427, n. 22, p. 6986-6991, June. 2003.

MODIS, Y. *et al.* Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein. *Journal of Virology*, Washington DC, v. 79, n. 2, p. 1223-1231, Jan. 2005.

OLIPHANT *et al.* Antibody Recognition and Neutralization Determinants on Domains I and II of West Nile Virus Envelope Protein. **Journal of Virology**, Washington DC, v. 80, n. 24, p. 12149-12159, Dec. 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Dengue hemorrágico: diagnóstico, tratamento e controle. Genebra, 1996.

ROEHRIG, J. T. *et al.* Enhancement of the Antibody Response to Flavivirus B-Cell Epitopes by Using Homologous or Heterologous T-Cell Epitopes. **Journal of Virology**, Washington DC, v. 66, n. 6, p. 3385-3390, June. 1992.

ROEHRIG, J. T.; BOLIN, R. A.; KELLY, R. B. Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica. **Virology**, New York, v. 246, n. 2, p. 317-328, July 1998.

SERAFIN, I. L.; AASKOV, J. G. Identification of epitopes on the envelope (E) protein of dengue 2 and dengue 3 viruses using monoclonal antibodies. **Archives of Virology**, Wien, v. 146, n. 12, p. 2469-2479, Dec. 2001.

THULLIER, P. *et al.* Mapping of a dengue virus neutralizing epitope critical for the infectivity of all serotypes: insight into the neutralization mechanism. **Journal of General Virology**, London, v. 82, n. 8, p. 1885-1892, Aug. 2001.

WU, H. C. *et al.* Identification of a dengue virus type 2 (DEN-2) serotype-specific B-cell epitope and detection of DEN-2-immunized animal serum samples using an epitope-based peptide antigen. **Journal of General Virology**, London, v. 84, n. 10, p. 2771-2779, Oct. 2003.

WU, H. C. *et al.* Identification of B-cell epitope of dengue virus type 1 and its application in diagnosis of patients. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 39, n. 3, p. 977-982, Mar. 2001.

YAMADA, K. I. *et al.* Virus isolation as one of the diagnostic methods for dengue virus infection. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 24, n. 3, p. 203-209, Apr. 2002.

ZHANG *et al.* Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. **Nature Structural Biology**, London, v. 10, n. 11, p. 907-912, Nov. 2003.

ZHANG *et al.* Conformational Changes of the Flavivirus E Glycoprotein. **Structure**, v. 12, p. 1607-1618, Sept. 2004.

ZHANG *et al.* MULTIPRED: a computational system for prediction of promiscuous HLA binding peptides. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 33, p. W172-W179, Jul. 2005.

