

FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
BIOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA

ANA SOFIA LIMA ESTEVÃO DE OLIVEIRA

**IDENTIFICAÇÃO DE MOLÉCULAS REATIVAS COM ANTICORPOS ASSOCIADOS A
DENGUE**

Porto Alegre
2017

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

ANA SOFIA LIMA ESTEVÃO DE OLIVEIRA

**IDENTIFICAÇÃO DE MOLÉCULAS REATIVAS COM ANTICORPOS
ASSOCIADOS A DENGUE**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Farmacêutica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Professor Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira

Co-orientador: Dr. Ernesto Torres de Azevedo Marques Junior

Porto Alegre

2017

RESUMO

A dengue é uma arbovirose de alta incidência no Brasil, e corresponde a um grande problema de saúde pública. Ela possui uma incidência anual de mais de 50.000.000 e resulta num elevado número de casos de óbito, cerca de 25.000. Devido a isso, é de grande urgência que possamos identificar esta doença enquanto ela ainda se encontra em um estado inicial, para que, deste modo, possamos evitar a progressão da doença para casos mais severos. Um grande problema relacionado a dengue é que o vírus é representado por quatro subtipos, os quais são filogeneticamente distintos (DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4). Isso quer dizer que, por mais que as manifestações e formas de disseminação sejam iguais, a contaminação por um dos sorotipos não irá proteger contra os demais. Ao contrário do que muitos acreditam, a infecção por um sorotipo pode até assentuar uma infecção secundária pelos demais. Uma hipótese para explicar casos mais severos da doença devido a infecções heterotípicas é a hipótese de ADE (*antibody-dependent enhancement*), a qual sugere que a reação cruzada resulta na falta da inativação viral, aumentando assim a produção de mediadores inflamatórios e permeabilidade vascular devido a uma estimulação da replicação do vírus. Devido a isso, é de grande necessidade a identificação da doença antes das manifestações severas, e, porque essa identificação clínica, principalmente no estágio inicial da doença, é difícil, um marcador sorológico seria muito valioso. Marcadores sorológicos para diagnóstico de doenças vêm se tornando um tópico de recente interesse. Esses biomarcadores têm a vantagem de não serem invasivos para o paciente e baratos de produzir e analisar. Sendo assim, aqui, apresentamos uma nova tecnologia para a busca desses marcadores, os peptídeos. Peptídeos são oligômeros sintéticos, compostos por unidades de glicina N-substituída e possuem uma variada utilidade biológica que proporcionam uma tecnologia alternativa para a investigação e elucidação da resposta imune. O mesmo, vêm se destacando para busca de biomarcadores sorológicos devido a sua estabilidade química em fluídos onde enzimas degradativas podem estar presentes e devido a resultados promissores sem a necessidade de um conhecimento prévio sobre o antígeno natural e o seu anticorpo correspondente. Neste projeto, foi realizado a triagem de uma biblioteca combinatorial com cerca de um milhão de peptídeos, os quais passaram por etapas de triagens em soros de pacientes positivos para dengue, bem como para pacientes negativos. Aqui provamos o potencial dessas moléculas sintéticas na identificação de anticorpos com relevância clínica presente no soro dos pacientes. Os resultados obtidos foram gerados através de 3 etapas de triagem consecutivas, onde 33 peptídeos reativos foram identificados. Devido a imparcialidade desta técnica, acreditamos que pelo menos um desses 33 peptídeos seja extremamente específico para a doença estudada. Os mesmos foram enviados para sequenciamento e re-síntese para que novos experimentos sejam feitos e para que os estudos continuem. Espera-se resultados muito promissores na área de diagnóstico para dengue.

Palavras Chaves: Dengue; Peptídeo; Biomarcadores; Diagnóstico.

ABSTRACT

Dengue fever is an arboviral infection highly common in Brazil, and it corresponds to a major public health problem. Annually, its incidence overcomes 50,000,000, from which about 25,000 are associated to death cases. Due to this high incidence and number of death, it is of great urgency to identify this disease while in an early state. That way, would be possible to avoid any progression of the disease to more severe cases. A major problem related to dengue is that the virus is represented by four subtypes, which are phylogenetically distinct (DENV1, DENV2, DENV3 and DENV4). This means that, although the manifestations and the forms of dissemination are the same, an infection caused by one of the serotypes will not protect against the others. In fact, an infection caused by one of the four serotypes may intensify even more the disease caused by a secondary infection by the three others. One hypothesis that could explain this relationship between heterotypic infections and severe cases of the disease is the ADE hypothesis (antibody-dependent enhancement), which suggests that a secondary infection would cause a cross-reaction between antigen and antibody, preventing the virus of being inactivated. As a consequence, it would result in an increase of the production of inflammatory mediators and vascular permeability that would intensify the disease. Therefore, it's very important to identify the disease while it is still in an initial stage. However, this early identification is hard and its diagnosis is still limited. Thus, a serological marker would be highly valuable. Recently, serological biomarkers for early diagnosis have become a topic of great interest. These biomarkers have advantages of not being invasive to the patient and inexpensive to produce and analyze. Thus, in this project, we introduce a new technology for the search of such markers, the peptoids. Peptoids are synthetic oligomers, composed of N-substituted glycine units, and can be used for several biological utilities that provide an alternative technology for the investigation and the elucidation of the immune response. Moreover, they have been used and reported as a potential candidate for the search of serological biomarkers due to their chemical stability in fluids where degradative enzymes can be found. In addition to that, the fact that there is no need for a prior knowledge about the target only make them even more attractive for such "job". In this project, a combinatorial library of about one million of peptoids was screened in sera from dengue positive patients, as well as negative patients. Hereby we report the potential of this synthetic molecules for the identification of antibodies with clinical relevance present in the patients' serum. The results here reported were generated by 3 consecutive screening steps, where 33 reactive peptoids were identified as potential biomarkers. Because of the impartiality of this technique, we believe that at least one of these 33 peptoids are extremely specific for the studied disease. Currently, they have been sent for the sequencing and re-synthesis step, so that new experiments can be done and the study can continue. We are very excited and we don't expect nothing less than promising results in the field of diagnosis and dengue.

Key words: Dengue fever; Peptoid; Biomarker; Diagnosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação da estrutura do vírus da dengue.....	9
Figura 2. Ilustração do mecanismo de <i>antibody-dependent enhancement</i>	12
Figura 3. Estrutura química da cadeia principal do peptóid.....	16
Figura 4. Estrutura química dos monômeros utilizados para a produção da biblioteca combinatorial de peptóids e suas correspondentes nomenclaturas....	20
Figura 5. Exemplo de síntese utilizando 3 monômeros para ilustrar a metodologia de <i>split and pool</i>	20
Figura 6. Ilustração da metodologia de triagem – <i>screening</i>	22
Figura 7. Peptóid reativo para anticorpos presentes em alto nível em soros de pacientes positivos para dengue. Foto obtida através da observação por microscopia de fluorêscencia.....	25
Figura 8. Foto da biblioteca de peptóids onde é possível visualizar o “ <i>hit</i> ”.....	26
Figura 9. Foto dos peptóids reativos após passarem pelo processo de pelagem e serem reavaliados através de novas triagens.....	27

LISTA DE SIGLAS

ADE – Antibody-dependent enhancement
DENV – Vírus da dengue
DENV1 – Vírus da dengue de sorotipo 1
DENV2 – Vírus da dengue de sorotipo 2
DENV3 – Vírus da dengue de sorotipo 3
DENV4 – Vírus da dengue de sorotipo 4
ssRNA – Ácido Ribonucléico de cadeia simples e de sentido positivo
C - Proteína do nucleocapsídeo icosaédrico
prM – Proteína de pré-membrana
E - Glicoproteína de envelope
OMS – Organização Mundial da Saúde
RNA – Ácido ribonucléico
PCR – Reação em cadeia de polimerase
NAT – Tecnologia de amplificação de ácido nucléico
HI – Inibição de hemaglutinação
IgM – Imunoglobulina M
IgG – Imunoglobulina G
PRNT - Teste de neutralização por redução de placas
DF - Dengue febril clássica
SDD – Doença da dengue severa
FHD – Febre de dengue hemorrágica
DSS - Síndrome do choque da dengue
HIV – Vírus da imunodeficiência humana
Nlys – 1,4-Diaminobutane
Nleu – Isobutylamine
Ntyr –Methoxybenzylamine
Nmba – R-(+)-alphaMethylbenzylamine
Nchma – Cyclohexanemethylamine

LISTA DE SIGLAS

Naea – N-(2-Aminoethyl)acetamide

Napp – N-(3-Aminopropyl)-2-pyrrolidinone

Nala – Beta alanine

Npip – Piperonylamine

Neth – 2-Ethoxyethamine

PBMC – Células mononucleares de sangue periférico

PBS – *Phosphate-buffered saline* / Tampão fosfato salino

TBS-T – *Tris-buffered saline + Tween* / Solução salina tris tamponade + Tween

TG – Tanta Gel

PEGA – poli(etileno glicol)-poli(N-Ndimetilacrilamida)

SUMÁRIO

1. Introdução	9
1.1 Vírus	9
1.2 Epidemiologia	10
1.3 Doença	11
1.3.1 Mecanismos imunopatogênicos.....	11
1.3.2 Métodos diagnósticos.....	12
1.3.3 Manifestações clínicas.....	13
1.4 Vacina	14
1.5 Peptóid	15
2. Justificativa	17
3. Objetivos	18
3.1 Objetivo geral.....	18
3.2 Objetivos específicos.....	18
4. Materiais e métodos	19
4.1 Construção da biblioteca de peptóids.....	19
4.2 Banco de soros.....	21
4.3 Identificação de peptóids reativos para dengue – Triagem.....	21
4.4 Confirmação de peptóids reativos para dengue.....	22
5. Resultados	24
5.1 Construção da biblioteca de peptóids.....	24
5.2 Identificação de peptóids reativos.....	24
5.3 Confirmação da reatividade dos peptóids previamente selecionados.....	26
6. Discussão	28
7. Conclusão	32
8. Referências	33

1. Introdução Geral

1.1 Vírus

O vírus da dengue (DENV) é um arbovírus esférico e envelopado pertencente à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*, cujo tamanho varia de 40 a 60nm (Cordeiro *et al.*, 2009; Pozzetto *et al.*, 2015). Seu genoma é composto por ácido ribonucléico de cadeia simples e sentido positivo (ssRNA) de aproximadamente 11kb de comprimento, que codifica 10 proteínas virais, 3 estruturais e 7 não estruturais, como pode ser visto na figura 1 (Zhang *et al.*, 2014). Dentre as proteínas estruturais encontram-se a proteína do núcleo capsídeo icosaédrico (C), a proteína de pré-membrana (prM) e a glicoproteína de envelope (E) (Zhang *et al.*, 2014; Pozzetto, 2015). Já as não estruturais, as quais vêm sendo associadas às patologias de forma grave, são representadas pelas proteínas NS1, NS2A, NS2b, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Weaver & Vasilakis, 2009).

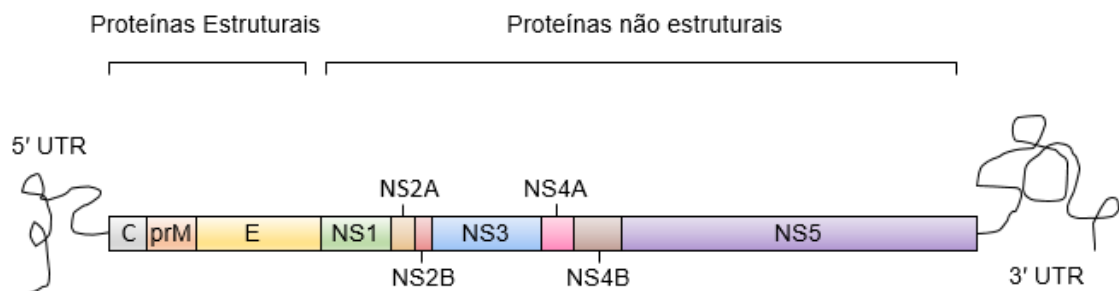


Figura 1: Estrutura do vírus da dengue.

Atualmente, o vírus da dengue refere-se a um grupo viral formado por quatro sorotipos (DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4) (Cordeiro *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2012). Os diferentes sorotipos são filogeneticamente distintos, no entanto causam manifestações clínicas e padrões de disseminação sistêmica similares (Gomes *et al.*, 2010; Rothman, 2011). Devido a diferença filogenética, a infecção por um determinado sorotipo confere imunidade de longa duração para aquele mesmo sorotipo, mas não para os demais (Wilder-Smith *et al.*, 2010; Añez *et al.*, 2012).

1.2 Epidemiologia

A dengue, atualmente, é a arbovirose com maior incidência e constitui um sério problema de saúde pública e socioeconômico no mundo, principalmente nos países tropicais (Ministério da saúde, 2002; Halstead *et al.*, 2004). Nas regiões tropicais, as condições ambientais favorecem o desenvolvimento e a proliferação do mosquito *Aedes aegypti*, principal vetor da doença (Pozzetto *et al.*, 2015). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), há uma estimativa de 50-100.000.000 de infecções por dengue anualmente, resultando em 500.000 casos de dengue grave, e cerca de 25.000 mortes (Laughlin *et al.*, 2012; Pozzetto *et al.*, 2015; Horstick *et al.*, 2015). No entanto, devido a insuficiente vigilância epidemiológica e notificação de casos e nas dificuldades no diagnóstico, acredita-se que a verdadeira incidência da dengue é maior do que atualmente relatada (Brasier, *et al.*, 2015).

A América Latina é responsável por 60% dos casos notificados por infecção do tipo dengue, e tem uma ampla distribuição e circulação simultânea dos quatro sorotipos do vírus. Entre 2001 e 2009, seis países foram responsáveis por mais de 75% de todos os casos na região: Venezuela, Brasil, Costa Rica, Colômbia, Honduras e México (Tapia-Conyer *et al.*, 2012). A ampla circulação dos sorotipos é um sinal de alerta para a propagação de formas graves da doença associadas com infecções secundárias (Laughlin *et al.*, 2012). Em 2015, no Brasil, por exemplo, foram analisadas 5.141 amostras e as proporções da imunização contra sorotipos virais identificados foram: DENV1 (92,7%), seguido de DENV4 (6,4%), DENV2 (0,6%) e DENV3 (0,2%), demonstrando a presença dos quatro sorotipos no país, mesmo que com diferentes intensidades (Ministério da saúde).

Embora a doença não só afete as populações pobres, a dengue é, no entanto, mais comum nas áreas urbanas mais empobrecidas e densamente povoadas, onde o acesso à prevenção através de controle do vetor e assistência médica de alta qualidade é limitado (Horstick, 2015). Mesmo assim, as tentativas de erradicar o *A. aegypti* alcançaram um sucesso considerável entre 1947 e 1970 (Laughlin *et al.*, 2012). Entretanto, um crescimento urbano acelerado e desorganizado, associado com a falta de manutenção do programa de combate ao mosquito, permitiu o ressurgimento dos mosquitos vetores (Cordeiro *et al.*,

2009).

1.3 Doença

1.3.1 Mecanismos imunopatogênicos

Do ponto de vista fisiopatológico, após a picada do mosquito, o DENV vírus pode utilizar diversos tipos de células para replicar-se. No entanto, aparentemente, existe uma preferência por células dérmicas e dendríticas (Pozzetto *et al.*, 2015). O vírus liga-se a receptores de superfície e é internalizado por endocitose (Laughlin *et al.*, 2012). Dentro das células, o RNA genômico viral é traduzido em proteínas virais, e posteriormente na produção de novos vírions, que serão reconhecidos pelos anticorpos responsáveis pela resposta imune do hospedeiro (Rothman, 2011).

Durante a infecção, a resposta imune inata desempenha um papel importante na primeira linha de defesa e na modulação da resposta adaptativa (Gomes *et al.*, 2010). Um dos primeiros passos da resposta inata é o reconhecimento molecular associado a agentes patogênicos (Castanha *et al.*, 2012). Já na resposta adaptativa, as proteínas estruturais (prM e E) e algumas não estruturais (NS1, NS3 e NS5) se tornam os principais alvos da resposta de anticorpos contra a infecção do vírus da dengue em seres humanos (Rothman, 2011).

Os anticorpos produzidos em resposta a um sorotipo do DENV conferem proteção ao longo da vida contra a reinfecção do mesmo, no entanto, geram proteção transitória contra os outros três sorotipos (Tang *et al.*, 2015). Nas infecções secundárias, as células T e os anticorpos exibem graus variáveis de reações cruzadas entre os quatro sorotipos (Laughlin *et al.*, 2012). Isso ocorre através da ligação das células da resposta imune a vários epítomos das proteínas estruturais e não estruturais (Rothman, 2011; Nascimento *et al.*, 2014). Essas reações cruzadas podem aumentar o risco de desenvolvimento de dengue hemorrágica, devido a falta da inativação do vírus, a qual é mais frequente em pacientes que possuem infecções por vírus heterólogos (Halstead *et al.*, 2004; Rothman, 2011; Tang *et al.*, 2015).

Uma hipótese bastante utilizada para explicar essa relação entre a dengue hemorrágica e a infecção heterotípica é a hipótese de ADE, figura 2 (*antibody-dependent enhancement*) (Tang *et al.*, 2015). Complexos contendo anticorpos e a partícula viral são formados com a porção Fc do anticorpo ligando-se em receptores celulares, facilitando a penetração do vírus nas células suscetíveis. (Gomes *et al.*, 2010). O aumento da carga viral dentro da célula infectada, ocasiona maior produção de mediadores inflamatórios aumentando a permeabilidade vascular (Halstead *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2015). De acordo com esta hipótese, uma infecção secundária com outro sorotipo DENV pode estimular a expansão e replicação do vírus devido a reação cruzada (Ubol & Halstead, 2010; Halstead *et al.*, 2004).

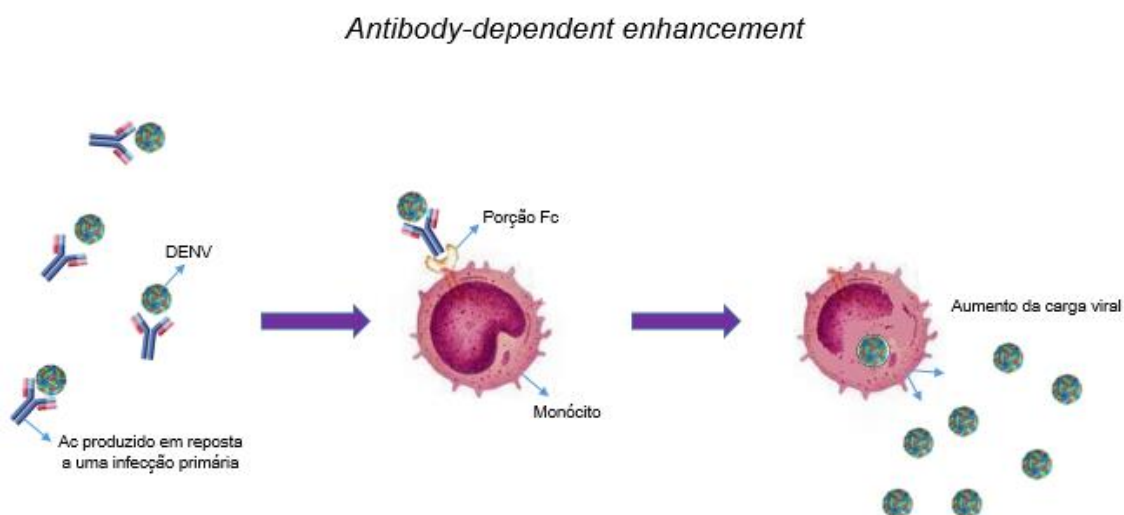


Figura 2: Ilustração do mecanismo ADE.

1.3.2 Métodos diagnósticos

A observação clínica é o critério mais importante para o diagnóstico da dengue, no entanto, por ser uma doença de amplo espectro clínico, é necessário fazer um diagnóstico laboratorial diferencial (Peeling *et al.*, 2010; Hynes, 2012; Ministério da saúde, 2002). Além disso, uma posterior confirmação é necessária (Cordeiro *et al.*, 2009, Wilder-Smith, 2012; Hadinegoro, 2012), podendo ser através de cultura de células, tecnologias de ácidos nucleicos e testes sorológicos (Zellweger & Shresta, 2014).

Atualmente, o método mais específico para determinação do sorotipo responsável pela infecção é o isolamento do vírus do soro ou de tecidos e inoculação em mosquitos ou em cultura de células, contudo, essa técnica é limitada a laboratórios especializados (Samanta & Sharma, 2015; Ministério da Saúde, 2002). Alternativamente, testes que quantificam RNA viral no sangue ou em tecidos podem ser feitos através de técnicas de PCR (Reação em cadeia de polimerase) e NAT (Tecnologia de Amplificação de Ácido Nucléico) (Peeling *et al.*, 2010; Laughlin *et al.*, 2012). O NAT, por ser sensível e específico, é bastante utilizado para o diagnóstico de infecções recente (Emmerich *et al.*, 2013).

Além destes, os testes sorológicos são úteis e simples de implementar (Laughlin *et al.*, 2012), sendo ELISA e a inibição de hemaglutinação (HI) os mais frequentes (Cordeiro *et al.*, 2009). O ELISA detecta anticorpos específicos IgM e IgG para os quatro sorotipos de dengue 4-6 dias após a infecção (Blacksell *et al.*, 2012). O HI é baseado na titulação de anticorpos de amostras de soro pareadas, e é o método mais utilizado na classificação sorológica da dengue e o mais recomendado pela OMS (Cordeiro *et al.*, 2009). Outro teste baseado na detecção de anticorpos que vem sendo frequentemente utilizado em estudos para a avaliação da imunogenicidade de vacinas em desenvolvimento (Wilder-Smith *et al.*, 2010) é o teste de neutralização por redução de placas (PRNT) (Castanha *et al.*, 2012). No entanto, este teste exige profissionais qualificados, é demorado e, assim como o HI, possui um alto índice de reações cruzadas entre diferentes flavivírus e sorotipos DENV (Blacksell, 2012).

1.3.3 Manifestações clínicas

A definição e classificação da dengue têm evoluído ao longo das últimas três décadas (Lora *et al.*, 2014). A infecção viral por qualquer sorotipo DENV pode gerar uma doença que varia em quatro formas clínicas principais: dengue febril indiferenciada ou síndrome viral, dengue febril clássica (DF) e dengue severa (SDD), que pode ser dividida em dengue hemorrágica (FHD) e síndrome do choque da dengue (DSS) (Teixeira *et al.*, 2013; Roopashri *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015). No entanto, a sobreposição de sinais clínicos entre as diferentes

manifestações têm afetado a gestão clínica e triagem dos pacientes (Hadinegoro, 2012). Além disso, os sintomas clínicos variam de acordo com a gravidade da doença e idade do paciente infectado (Zellweger & Shresta, 2014).

A dengue febril indiferenciada é a manifestação mais amena, normalmente ocorre durante a infecção primária, mas também pode ocorrer durante a fase inicial de uma infecção secundária (Roopashri *et al.*, 2014). Já a DF é a manifestação mais comuns da infecção clínica (Hynes, 2012). É observada mais frequentemente em adultos e adolescentes, e pode apresentar-se como uma única e ligeira febre ou uma doença mais incapacitante (Vervaeke *et al.*, 2015). Os sintomas geralmente começam com um início súbito de febre alta com duração de 4-8 dias (Roopashri *et al.*, 2014; Lora *et al.*, 2014). E manifestações como dor de cabeça intensa, dor retro-orbital, fadiga, dores musculares e articulares, perda de apetite, gosto metálico desagradável na boca, vômitos, diarreia e dor abdominal podem estar presentes (Ministério da Saúde, 2002).

A FHD geralmente afeta crianças menores de 15 anos, embora ultimamente venha ocorrendo em adultos também (Lora *et al.*, 2014; Pozzetto, 2015). Os sintomas iniciais são semelhantes aos da DF, porém evoluem rapidamente para manifestações hemorrágicas (Ministério da Saúde, 2002). Já a DSS é definida como uma dengue hemorrágica associada a uma pressão de pulso baixa, dor abdominal, agitação, hipotermia e sudorese (Hynes, 2012). Essas manifestações mais graves podem resultar em óbito, devido a uma falha de múltiplos órgãos que pioram progressivamente e a uma coagulação intravascular disseminada (Roopashri *et al.*, 2014).

1.4 Vacina

Sem uma campanha de vacinação ou um tratamento específico, o controle da doença baseia-se em medidas gerais de saúde pública, incluindo a vigilância, a educação, o reconhecimento precoce dos casos e o controle de vetores (Horstick, 2015; Pozzetto, 2015). No entanto, muitos países em risco de dengue não dispõem de recursos de saúde pública adequados (Laughlin *et al.*,

2012). Deste modo, a utilização de uma vacina com capacidade para estimular uma forte resposta protetora contra todos os quatro sorotipos é uma ferramenta vital na luta contra a dengue (Tapia-Conyer *et al.*, 2012; Castanha *et al.*, 2012); atuando não só através de uma imunização direta, como também através de uma redução da transmissão global mediante a um efeito rebanho (Teoh *et al.*, 2012).

Atualmente, quatro estratégias vacinais estão em desenvolvimento: vacinas vivas atenuadas quiméricas, vacinas vivas e atenuadas, vacinas inativas ou de subunidade e vacinas à base de ácido nucléico (Wilder-Smith *et al.*, 2010; Rothman, 2011). Uma delas, a vacina viva atenuada quimérica, desenvolvida pela Sanofi Pasteur, chegou ao mercado recentemente (Pitisuttithum & Bouckenoghe, 2016). Esta já está sendo comercializada no México, Brasil, Filipinas, El Salvador e Paraguai, e é licenciada para o uso em pessoas na faixa de 9 a 45 anos (Ferguson *et al.* 2016). Outra vacina que se encontra em estado avançado é a desenvolvida pelo NIH licenciada ao Butatan que iniciou os estudos de fase 3 no início de 2016 (Schwartz *et al.*, 2015).

1.5 Peptóids

Peptóids são oligômeros distintos com um esqueleto peptídico compostos por glicina N-substituída (Yoo *et al.*, 2010). Suas cadeias laterais são anexadas ao nitrogênio de amida da cadeia principal, ao invés do alfa-carbono como ocorre com os peptídeos, figura 3 (Dohm *et al.*, 2011; Yoo *et al.*, 2010). Essa diferença na posição das cadeias laterais gera numa menor susceptibilidade a proteases, que sem dúvida aumenta sua aplicabilidade como ferramentas de diagnóstico, bem como para outras aplicações como transportadores intracelulares, reconhecimento molecular e scaffolds (Sun & Zuckermann, 2013; Zuckermann, 2011; Dohm *et al.*, 2011). Além disso, os peptóids apresentam maior estabilidade metabólica, baixa toxicidade para células, excelente biocompatibilidade e uma potente atividade biológica quando comparados aos peptídeos (Yoo *et al.*, 2010; Godballe *et al.*, 2011).

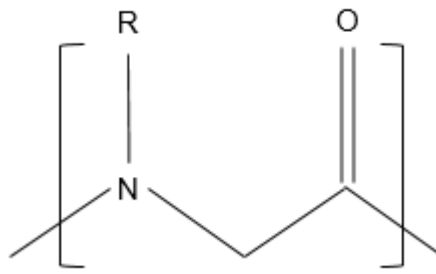


Figura 3: Estrutura química da cadeia principal do peptóid.

Grandes bibliotecas de peptóids já vêm sendo utilizadas como agentes de diagnóstico para identificação de biomarcadores (Zuckermann, 2011; Yeste & Quintana, 2013). Essas bibliotecas podem efetivamente auxiliar na identificação de tais alvos, ligando-se a células e a anticorpos com grande relevância clínica que encontram-se em maiores concentrações em soros de pacientes positivos para determinada doença (Dohm *et al.*, 2011). Em geral, essa técnica não necessita de um conhecimento prévio sobre o antígeno natural, se ligando ao sítio ativo do anticorpo presente em maiores concentrações, e podendo ser utilizada para diversas doenças (Raveendra *et al.*, 2013). Atualmente, vários artigos demonstram a habilidade de peptóids para a identificação de tais imunoglobulinas (Vanderstichele & Kodadek, 2014; Quan *et al.*, 2014; Doran *et al.*, 2015). Por exemplo, resultados promissores relacionados a lupus, alzheimer, parkinson, dentre outros, podem ser encontrados na literatura (Quan *et al.*, 2015; Scarano *et al.*, 2016; Yazdani *et al.*, 2016). No entanto, a utilização dessa tecnologia alternativa ainda está recente, e algumas desvantagens, como alto nível de falso positivos, ainda precisa ser superada (Doran *et al.*, 2015). Mesmo assim, o uso dessas moléculas sintéticas para a busca de biomarcadores é muito promissora, podendo substituir alguns testes diagnósticos padrões no futuro (Scarano *et al.*, 2016).

2. Justificativa

A dengue, atualmente, é a arbovirose com maior incidência global e constitui um sério problema de saúde pública e socioeconômico no mundo, principalmente nos países tropicais. Segundo a OMS, há uma estimativa de 50-100.000.000 infecções por dengue anualmente, com cerca de 25.000 mortes. Além disso, o Brasil responde por mais de 50% dos casos de dengue notificados no continente americano. Por ser uma doença de amplo espectro clínico, é crucial a identificação de um marcador que possa prever a dengue no início dos sintomas, podendo assim, evitar casos mais graves que resultem em óbito. Deste modo, esse trabalho visa a busca de um marcador sorológico preditivo de dengue através do uso de uma biblioteca combinatória de peptídeos, a qual porta um imenso potencial como biomarcador devido a sua enorme variedade de química e estrutural. Assim, utilizaremos uma biblioteca de peptídeos para buscar a identificação de tais biomarcadores.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral:

Identificação de um biomarcador para dengue através do uso de uma biblioteca combinatória de peptóids que se associam a anticorpos com relevância clínica presentes no soro.

3.2 Objetivos específicos:

3.2.1 Síntese de uma biblioteca combinatorial com uma diversidade de pelo menos 1 milhão de peptóids;

3.2.2 Primeira subtração da biblioteca – *Triagem/ Screening*. Nesta etapa, serão removidos aqueles peptóids que forem reativos aos anticorpos presentes em soros de pessoas sadias e pessoas negativas para dengue e positivas para outras doenças;

3.2.3 Segunda subtração da biblioteca de peptóids. Nesta etapa serão selecionados dos peptóids restantes, aqueles reativos a pacientes de dengue clássica dos tipos DENV1, DENV2 e DENV3. Para isto, será feito um pool de soros de pacientes selecionados de uma coorte de dengue descrita anteriormente;

3.2.4 Confirmação dos peptóids reativos da etapa anterior para que possam ser mandados para sequenciamento e síntese.

4. Materiais e métodos

4.1 Construção da Biblioteca de Peptóids

Para construção da biblioteca composta por aproximadamente um bilhão de peptóids foi utilizado um ligante invariável, NlysNlys-Nleu. A biblioteca consiste em dez monômeros que são agrupados aleatoriamente em cada uma das oito posições disponíveis (8^{10}). Tais monômeros são Nlys (*1,4-Diaminobutane*), Nleu (*Isobutylamine*), Ntyr (*4-Methoxybenzylamine*), Nmba (*R-(+)-alphaMethylbenzylamine*), Nchma (*Cyclohexanemethylamine*), Naea (*N-(2-Aminoethyl)acetamide*), Napp (*N-(3-Aminopropyl)-2-pyrrolidinone*), Nala (*Beta Alanine*), Npip (*Piperonylamine*), and Neth (*2-Ethoxyethanamine*). Suas fórmulas moleculares podem ser vistas na figura 4. Neste trabalho, realizamos a técnica de “split and pool” para a síntese da biblioteca, figura 5. Porque a biblioteca foi produzida através da utilização de 10 monômeros, as esferas de resina utilizada na síntese, TantaGel (TG), foram divididas em 10 grupos igualmente. Esta etapa foi sucedida por uma segunda etapa onde os diferentes monômeros foram anexados a cada esfera para que, então, fossem misturados juntos na terceira etapa. Este ciclo de três etapas é repetido quantas vezes for necessário para que uma biblioteca combinatória, de extensão desejada, seja criada.

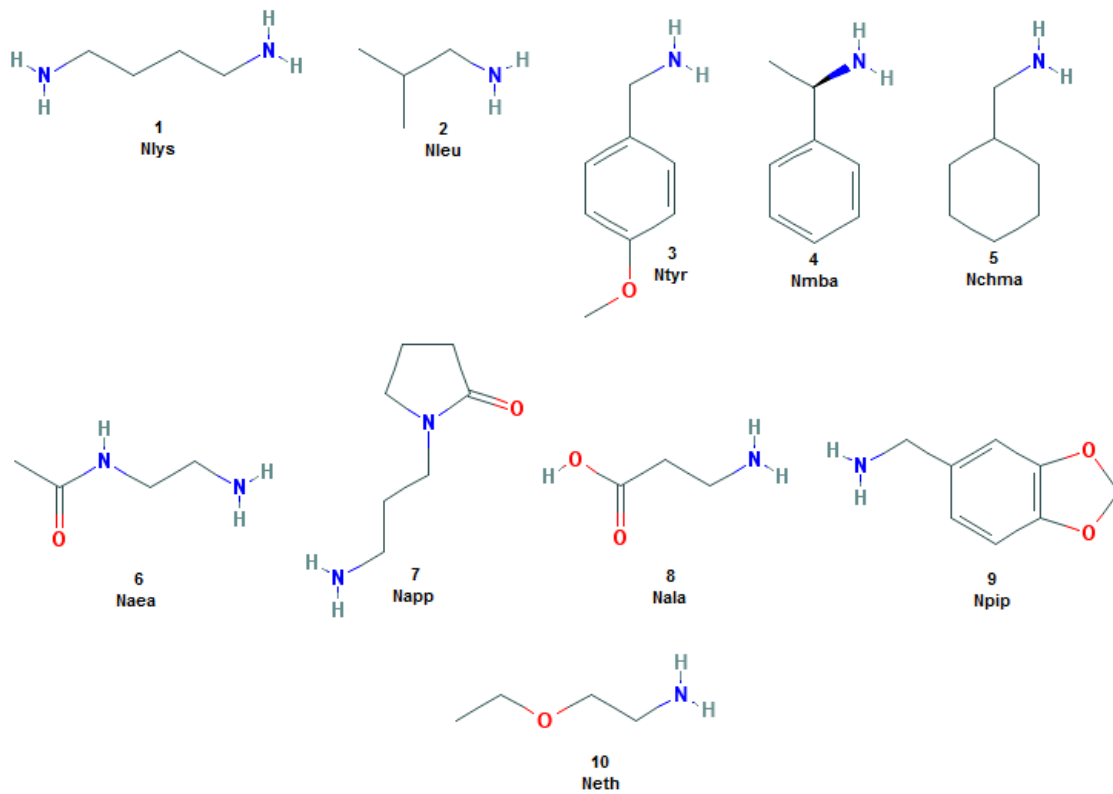


Figura 4. Lista dos monômeros utilizados na produção da biblioteca de peptíds e sua nomenclatura de unidade correspondente. Pubchem.

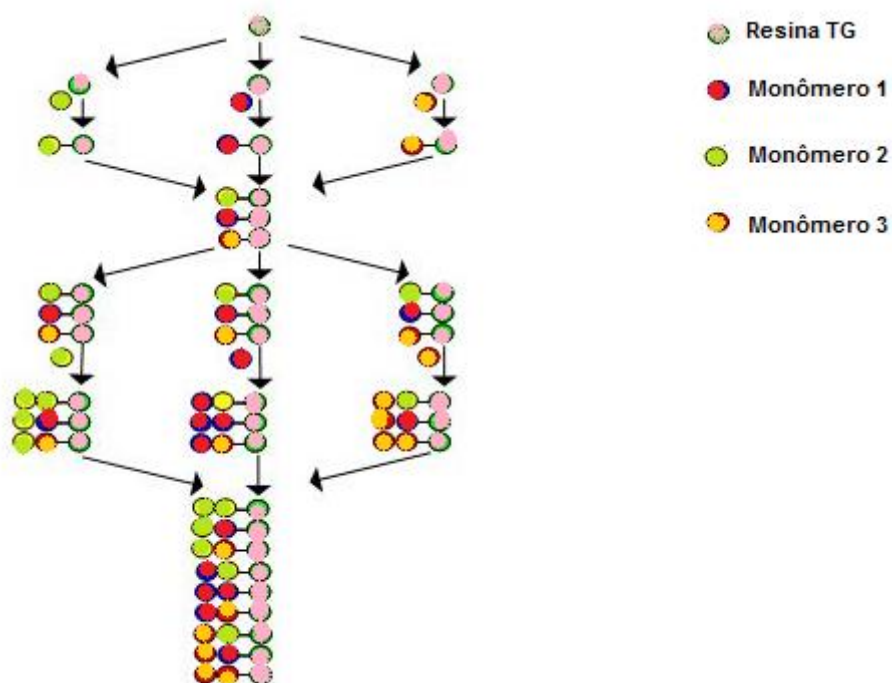


Figura 5. Exemplo da utilização de 3 monômeros para a ilustração da tecnologia de split and pool.

4.2 Banco de Soros

As amostras de soros utilizadas para a identificação dos peptóids reativos para dengue foram obtidas a partir de 658 pacientes em Recife, Pernambuco, Brasil, inscritos no grupo de dengue, totalizando 2.364 amostras. De cada paciente, até quatro amostras foram coletadas no prazo de 30 dias a partir do início dos sintomas. Amostras de soro foram coletadas em tubos *Vacutainer* de 10 mL e foram separadas e armazenados em dois criotubos (1 mL por tubo) a -80 ° C e -20 ° C para o isolamento do vírus e soro, respectivamente. O plasma e as células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram separadas e também criopreservadas para estudos posteriores. As amostras criopreservadas servem como uma ferramenta útil para investigações imunológicas. Os dados do estudo foram integrados em um banco personalizado de dados digital que inclui dados clínicos completos e os respectivos inventários de criopreservação das amostras, plasma e soro.

4.3 Identificação de peptóids reativos para Dengue – Triagem/ Screening

O primeiro passo para que obtivéssemos a identificação de peptóids reativos para dengue foi através de uma primeira remoção de possíveis falsos positivos. Deste modo, os peptóids foram incubados com soros de indivíduos saudáveis e que nunca tiveram nenhum contato com algum tipo de flavivírus. Incubações com soros positivos pra HIV, influenza e hepatite B e C, foi, também, realizadas. Assim, foi possível retirar da biblioteca aqueles peptóids que reagiriam com IgG em outros tipos de doenças e soros, minimizando qualquer reação cruzada ou falsa interpretação.

Após a primeira subtração de peptóids reativos pra outras doenças, a biblioteca foi incubada com pools de soros positivos para infecções recentes de dengue dos tipos DENV1, DENV2 e DENV3. No primeiro dia, as beads foram incubadas em 1mL de PBS-*Starting block* (Tampão fosfato salino) diluídos em 3mL de TBS-T (Solução salina trans-tamponada) e 1,53uL do *pool* de soro

(100ng/1000uL) por 12 horas à 4 ° C. Após às 12 horas de incubação com soro, as beads foram lavadas três vezes consecutivas, 5 minutos cada, em constante agitação, em 4mL de TBS-T à 4 ° C. Em seguida, foi aplicado o anticorpo de detecção (Qdot 655 IgG anti-humano, lote #1644854, Thermofisher), o qual foi preparado na diluição de 5uL para cada 1 mL de TBS-T e onde os peptóids foram incubados por 2 horas à 4 ° C em constante agitação e protegido da luz. Após às 2 horas de incubação, os peptóids foram lavados novamente três vezes, nas mesmas condições previamente descritas, e analisados através de microscopia de florêscencia. Um resumo da técnica de triagem está ilustrado abaixo a figura 6.

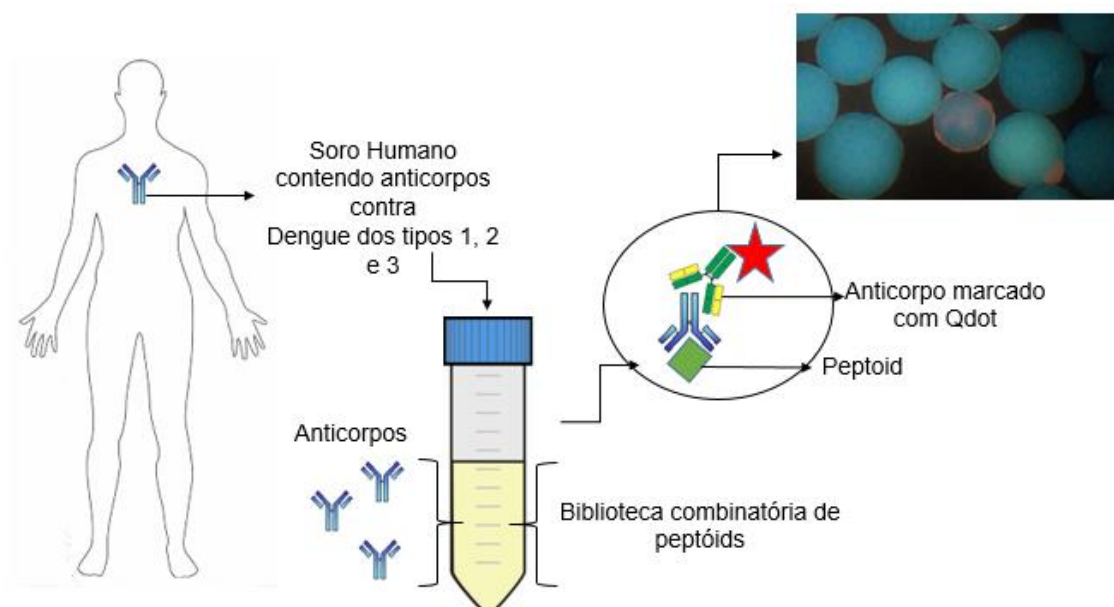


Figura 6: Ilustração da metodologia de triagem.

4.4 Confirmação de peptóids reativos para dengue

Após a identificação dos peptóids reativos, foi necessário realizar a pelagem (*stripping*) para a confirmação da sua reatividade. Este processo tem como fim separar o anticorpo ligado ao peptóid para que a afinidade seja testada novamente. A identificação e a pelagem foram realizadas três vezes para evitar falsos positivos.

Os peptóids foram incubados duas vezes, por 20 minutos cada, em 1mL de tampão de *Stripping* (2x) para que ocorresse o desligamento dos anticorpos ligados. Após esta etapa, eles foram incubados, duas vezes consecutivas, em 1mL de PBS (1x) à 4 ° C por 10 minutos, e então lavados três vezes em mesmas condições previamente descritas. Após cada pelagem, uma nova triagem foi realizada para a confirmação da reatividade do peptóid com os anticorpos.

5. Resultados

5.1 Construção da biblioteca de peptóids

Antes de iniciar a síntese da biblioteca pela técnica de “*split and pool*”, foi necessário escolher que tipo de resina seria utilizado para o suporte sólido. Dois tipos de resinas vêm sendo utilizadas como uso padrão para tais procedimentos: Tanta Gel e poli(etileno glicol)-poli(N-Ndimetilacrilamida) PEGA. Ambas as resinas possuem grande capacidade de estabilidade em água e em solventes orgânicos, boa capacidade para ligação com proteínas, boa capacidade para a posterior visualização dos “hit”, e boa qualidade para uso de marcadores fluorescentes (Alluri *et al.*, 2003). No entanto, devido a fragilidade do polímero PEGA, foi escolhido a TG como suporte para os peptóids. Hit é o termo utilizado para os peptóids que se mostram reativos no procedimento de triagem. Os 10 monômeros foram anexados ao polímero, de maneira que uma diversidade de 1.073.741.824 foi obtida. Esta variada biblioteca foi utilizada na busca de peptóids que fossem reativos para anticorpos com relevância clínica presente em soro de pacientes previamente confirmados como DENV positivos.

5.2 Identificação de peptóids Reativos

A biblioteca combinatória de 1.073.741.824 peptóids foi primeiramente incubada com soros de pessoas negativas para qualquer doença e pessoas negativas para dengue e positivas para influenza, HBV e HCV e HIV, num total de 5 triagens. Todos os peptóids que se ligaram às IgGs presentes nos soros, e que foram marcados pelo anticorpo secundário Qdot, foram retirados da biblioteca manualmente com a ajuda de uma micropipeta 2uL. Os peptóids restantes foram, então, incubados com soros de pacientes positivos para dengue. Os “*Hit*” dessa triagem foram coletados como possíveis biomarcadores para dengue e separados para posterior análise. Como dito previamente, ocorre o “*Hit*” quando o oligômero sintético, peptóid, se liga de modo específico ao anticorpo com relevância clínica relacionado a doença em questão.

A biblioteca de peptóids passou primeiramente pela triagem com soros positivos para dengue do tipo 3. Os compostos que se ligaram aos anticorpos

foram identificados visualmente através da técnica de microscopia de fluorescência. Os “hit” podem ser identificados através da visualização de um aro vermelho ao redor do peptóid, correspondente ao anticorpo secundário acoplado a molécula fluorescente, como mostrado na figura 7. Como resultado, um total de 21 “hit” para DENV3 foi obtido, os quais foram separados para posterior confirmação. Após a incubação com DENV3, a biblioteca foi incubada com soros de pacientes imunizados para DENV1. Um total de 15 peptóids reativos para DENV1 foram identificados e separados para posterior confirmação. O mesmo processo foi realizado com soros positivos para DENV2 onde foram encontrados 10 peptóids reativos, que assim como os outros, foram retirados da biblioteca e guardados para serem testados novamente. Um total de 46 *hit* foram obtidos.

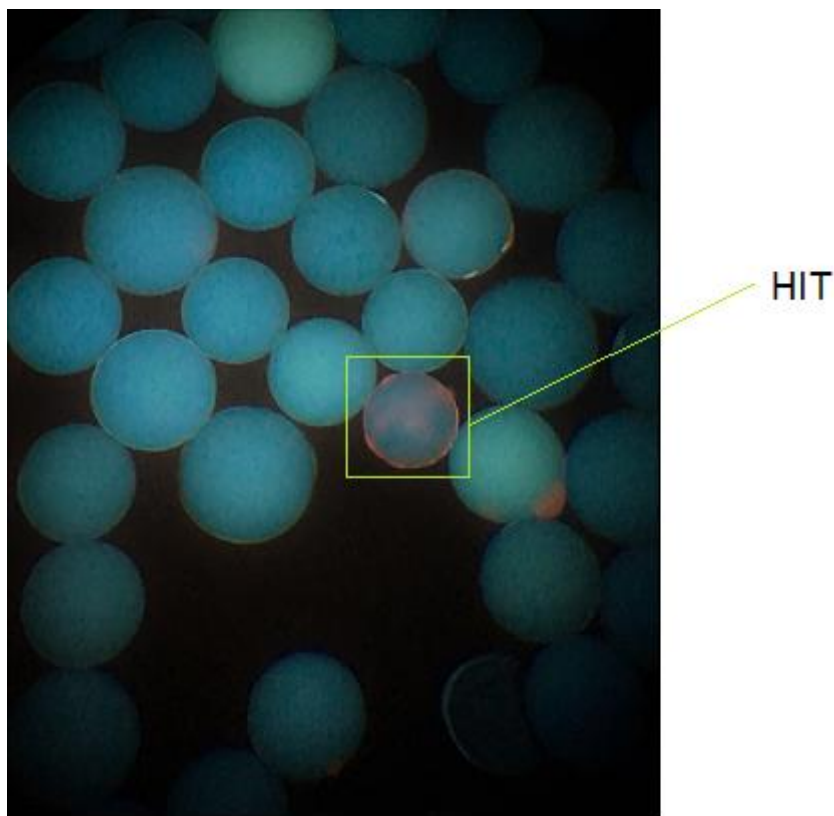


Figura 7. Peptóid reativo para anticorpos presentes em alto nível em soros de pacientes positivos para dengue. Foto obtida através da observação por microscopia de fluorescência na resolução de 40X.

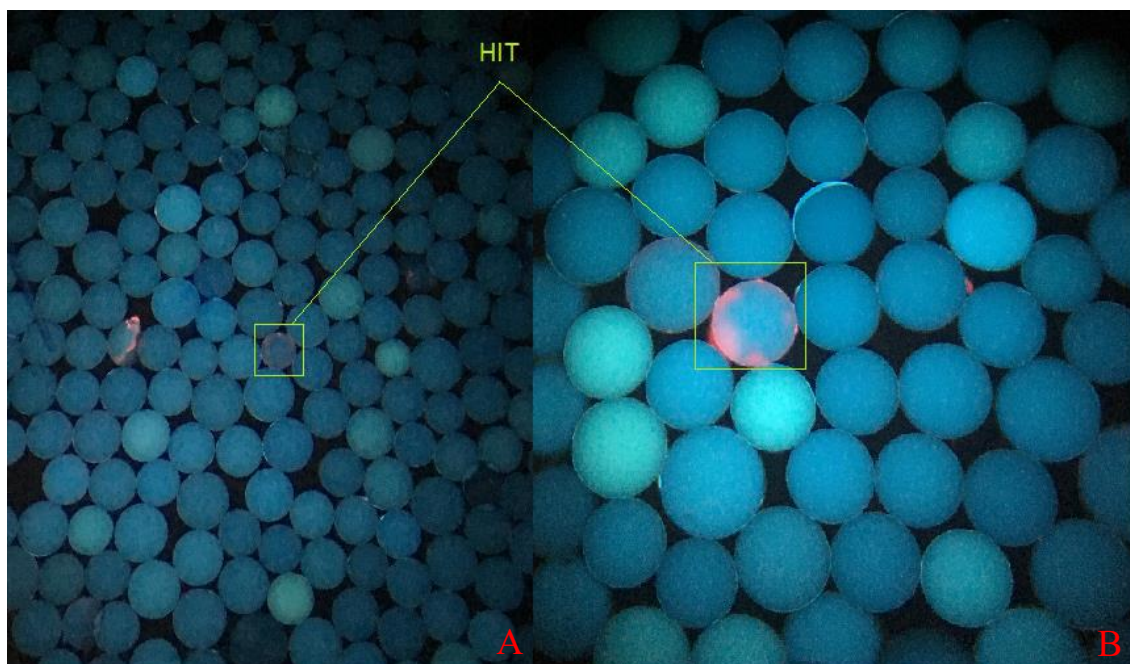


Figura 8. Peptóids reativos para dengue na resolução de 4X, A, e 10X, B.

5.3 Confirmação da reatividade dos peptóids previamente selecionados

Após serem previamente selecionados, os peptóids passaram pelo processo de pelagem para que fossem testados novamente. Os peptóids reativos para DENV1, 2 e 3 passaram por um primeiro *stripping* para que uma nova triagem fosse realizado, evitando, assim, falsos positivos. Como resultado da segunda triagem, foram encontrados 8 peptóids positivos para DENV1, 13 para DENV2 e 17 para DENV3. Os peptóids que permaneceram positivos foram selecionados para que o processo pudesse ser repetido mais uma vez. Deste modo, a pelagem foi novamente realizada, assim como a incubação com pool de soro para cada tipo de dengue. Como resultado final, foram encontrados 6 peptóids positivos para DENV1, 12 para DENV2 e 15 para DENV3, totalizando 33 “hit”.

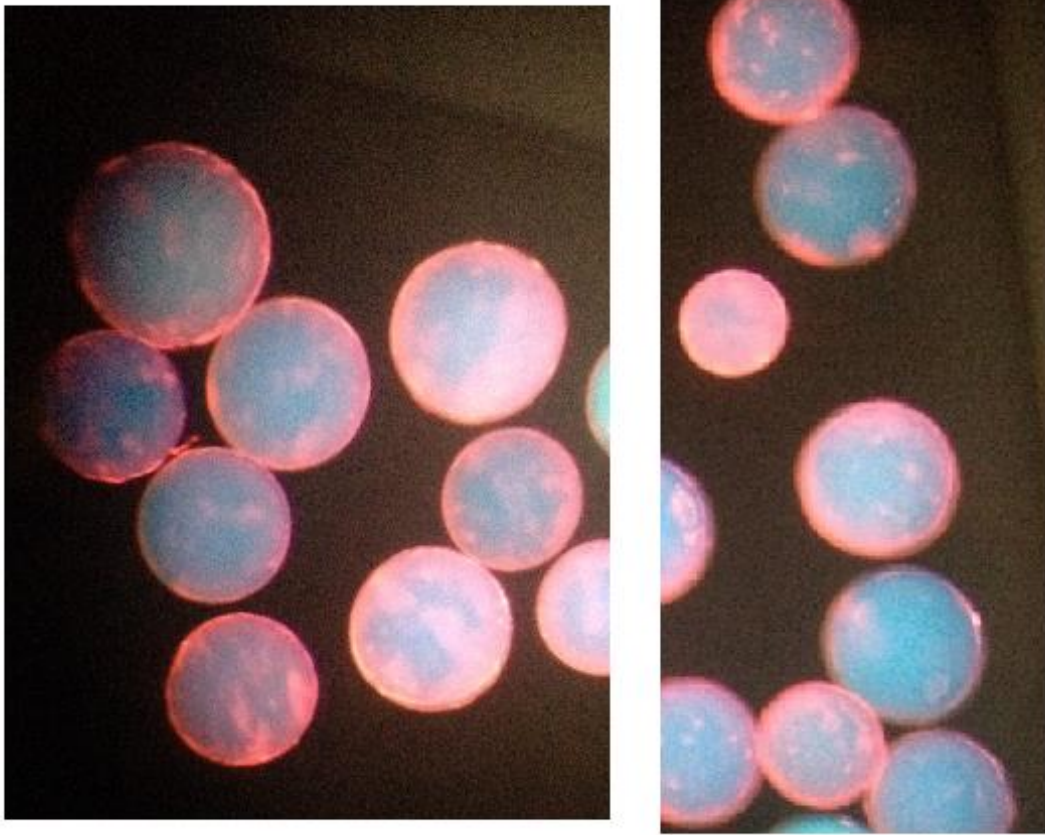


Figura 9. Revalidação dos “hit” obtidos na resolução de 100X.

6. Discussão

Atualmente existe uma grande necessidade para a descoberta de um biomarcador que possa ajudar na identificação da doença enquanto a mesma se encontra em um estado inicial (Scarano *et al.*, 2016). Devido a habilidade do sistema imune adaptativo em produzir um grande número de anticorpos contra cada antígeno, um modo ideal para o diagnóstico precoce seria através de um marcador que identificasse esses anticorpos (Vanderstichele & Kodadek, 2014). Para que isso ocorra, é necessário a utilização de um ensaio capaz de identificar o sítio de ligação do antígeno no anticorpo produzido contra uma específica doença (Doran *et al.*, 2015). Deste modo, um potencial candidato, com habilidade de analisar e reconhecer a interação entre o anticorpo e um específico epítipo seria o peptóid (Regenmortel, 2001). Atualmente, peptóid vem sendo a escolha entre muitos projetos de pesquisa, e vêm se mostrando uma versátil ferramenta, gerando resultados muito promissores para atividade antimicrobiana, transporte intracelular, biomarcadores, modulador de interação proteica e biosensores (Chongsiriwatana *et al.*, 2007; Kown *et al.*, 2008; Doran *et al.*, 2015).

Devido a sua arquitetura sintética e não natural, o peptóid não se assemelha a nenhum possível antígeno nativo, e deste modo, tem a capacidade de se ligar ao anticorpo de modo imparcial, onde o conhecimento prévio sobre o alvo é desnecessário (Doran *et al.*, 2015). Esta habilidade é conhecida como “*antigen surrogate*” (Quan *et al.*, 2014). *Antigen surrogate* pode ser definido pela habilidade de uma molécula sintética de identificar epítipos e sítios específicos, lineares ou não lineares, em anticorpos (Doran *et al.*, 2015). Através dela, é possível não só a identificação do antígeno natural, como também a sua caracterização (Yeste & Quintana., 2013).

Peptóids são oligômeros sintéticos, compostos de glicina N-substituída, e com capacidade de se modelar em arquiteturas semelhantes a proteínas (Olivier *et al.*, 2013). Suas cadeias laterais o tornam mais flexíveis, fáceis de sintetizar e com custo de produção baixo (Sun & Kodadek, 2013). Essa tecnologia tem a vantagem de ser quimicamente estável em fluídos biológicos, como por exemplo em soro, e tem uma vasta diversidade relacionada a aplicabilidade biológica e molecular, tornando-se assim uma promissora ferramenta para o uso em diagnóstico (Gearhart *et al.*, 2016). Essa sua estabilidade o torna candidatos

perfeitos para a busca de biomarcadores onde existe uma grande concentração de enzimas degradativas (Sun & Zuckermann, 2013).

Diversos experimentos publicados apoiam a utilização do peptóid através da demonstração de seu potencial em se ligar seletivamente a anticorpos presentes em soros de pessoas doentes, e não, em soros de pessoas saudas e/ou controles. Por exemplo, Reddy *et al.*, identificou, através do uso dessas moléculas, biomarcadores de IgG para a doença de Alzheimer, com alta especificidade (Reddy *et al.*, 2011). Assim como Reddy, Quan *et al.* também conseguiu isolar marcadores que se ligavam especificamente em anticorpos presentes em indivíduos positivos para doença sistêmica de Lupus (Quan *et al.*, 2014). O mesmo foi relatado para doenças como HIV (vírus da imunodeficiência humana), autismo, Parkinson, neuromielite ótica (NMO) e muitas outras (Gearhart *et al.*, 2016; 19; Yazdani *et al.*, 2016; Raveendra *et al.*, 2013). Raveendra e seu grupo obtiveram resultados muito promissores para NMO, onde peptóids utilizados para diagnósticos demonstraram uma sensibilidade de 93% e uma especificidade de 100% (Raveendra *et al.*, 2013). Apesar desses resultados não providenciarem resultados suficientes para a substituição dos testes atuais de diagnóstico de rotina, eles demonstram o potencial do uso dessas moléculas como biomarcadores (Yeste & Quintana, 2013). No entanto, atualmente, algumas desvantagens ainda são impecilhos para o seu uso em procedimentos clínicos (Pepe & Feng, 2011). Desvantagens como falso positivos, falta de uma padronização no procedimento de triagem e uma baixa reprodutibilidade necessitam ser superadas (Doran *et al.*, 2015; Quan *et al.*, 2016, 16). No entanto, estudos para a superação dessas limitações vêm constatemente sendo realizados, gerando grande entusiasmo no meio científico, e fazendo deles grandes candidatos para futuro testes de rotina (Doran *et al.*, 2015).

Neste projeto, foi possível provar, em concordância com projetos previamente publicados, a viabilidade da utilização de uma biblioteca combinatória de oligômeros, glicina N-substituídos, para a busca de marcadores sorológicos. Nos experimentos realizados, foi possível considerar a possibilidade dessas moléculas sintéticas se ligarem de modo específico a anticorpos presentes em soros de pacientes com dengue, sem se ligar em anticorpos

presentes em pessoas DENV negativas e controles. Esses resultados demonstram que anticorpos não se ligam exclusivamente a antígenos, demonstrando que é possível variadas abordagens para o estudo da resposta imune, a qual ainda está muito limitada. Além disso, não existem motivos para acreditar que a biblioteca utilizada na triagem tivesse algum composto específico para dengue, demonstrando a capacidade desse ensaio de identificar de modo imparcial anticorpos através da imitação de um antígeno nativo. E, como citado anteriormente, uma grande vantagem observada, por mim e por outros cientistas, é que na utilização dessa técnica não é necessário nenhum conhecimento prévio sobre o alvo (Gocke *et al.*, 2009).

O número de peptídeos reativos, no entanto, é maior para o primeiro tipo de dengue testado e menor para o último. Isso pode ser justificado pela grande semelhança entre os sorotipos, fazendo com que o peptídeo que poderia ser específico para DENV2, se ligasse ao DENV3. Devido a sua capacidade de se moldar aos anticorpos, peptídeos para DENV2 ou DENV1 se moldaram para DENV3, mas devido a sua baixa especificidade, foram eliminados nos processos de confirmação da reatividade após os testes. Devido a sua estrutura sintética, acreditamos que através de uma abordagem imparcial, essas moléculas puderam identificar com grande precisão anticorpos presentes em alta concentração. Na verdade, devido a essa imparcialidade, acreditamos que esses peptídeos que foram reativos possuam um alto nível de especificidade e sensibilidade para a doença em questão, podendo resultar em bons marcadores. Esses resultados demonstram a grande capacidade de seleção do peptídeo em soro humano, tornando eles em grandes candidatos como ferramentas de diagnósticos.

Experimentos paralelos estão sendo conduzidos para testar a especificidade desses peptídeos reativos para dengue em ensaios ELISA, onde se espera buscar resultados ainda mais promissores. Ao mesmo tempo, peptídeos encontrados como reativos serão testados em um maior número de soros. Deste modo, acredita-se na real possibilidade da identificação de peptídeos caracterizados para utilização de diagnóstico para dengue. Embora nosso estudo ainda esteja na fase inicial, nossos resultados demonstram uma primeira evidência do

potencial dessas moléculas sintéticas no uso diagnóstico, não só para dengue, como para qualquer doença infecciosa (Gearhart *et al.*, 2016).

7. CONCLUSÃO

A descoberta de um biomarcador sorológico é de grande interesse para a elucidação de respostas sobre a resposta imune. Em muitas doenças, a resposta imune adaptativa produz muitos anticorpos que poderiam ser excelentes candidatos para tais biomarcadores. No entanto, por muito tempo se acreditou que anticorpos produzidos em presença de antígenos específicos, só se ligariam com afinidade e especificidade a esses antígenos. Neste projeto, introduzimos uma técnica alternativa para a identificação desses anticorpos, o “*antigen surrogate*”, através da utilização de uma biblioteca de oligômeros sintéticos. Como previamente descrito, nós testamos e confirmamos a utilidade de uma biblioteca combinatorial de peptóids na identificação de anticorpos específicos para dengue através da técnica de triagem, também conhecida como *screening*. Através da triagem de, mais ou menos, 1 milhão de peptóids foi possível observar a capacidade da identificação de alvos com relevância clínica presentes em soros de pessoas positivas para a dengue, e que não estão presentes em pessoas negativas para a doença. Vários peptóids foram identificados e isolados para próximos experimentos, e acreditamos que pelo menos um deles será específico para dengue. Esses resultados, mesmo estando em estágios iniciais da pesquisa, demonstram uma grande habilidade dessas compostos sintéticos como ferramenta para diferenciação de pacientes com e sem a doença estudada. Novos estudos estão sendo conduzidos na busca de uma melhor caracterização dos “hit”, anteriormente, isolados.

8. REFERÊNCIAS

Alluri PG, Reddy MM, Bachhawat-Sikder K, Olivos HJ, Kodadek T (2003). Isolation of protein ligands from large peptoid library. **Journal of American Chemical Society**, 125, 13995-14004.

Añez G, Heisey ARD, Espina LM, Rios M (2010). Phylogenetic analysis of dengue virus types 1 and 4 circulating in Puerto Rico and Key West, Florida, during 2010 epidemics. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 87(3):548-53.

Blacksell SD, Lee SJ, Chanthongthip A, Taojaikong T, Thongpaseuth S, Hubscher T, Newton PN (2012). Short comparison of performance of serum and plasma in Panbio Dengue and Japanese encephalitis virus enzyme-linked immunosorbent assays. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 87(3): 573–575.

Brasier AR, Zhao Y, Wiktorowicz JE, Spratt HM, Nascimento EJ, Cordeiro MT, Soman KV, Ju H, Recinos A 3rd, Stafford S, Wu Z, Marques ET Jr, Vasilakis N (2015). Molecular classification of outcomes from dengue virus -3 infections. **Journal of Clinical Virology**, 64, 97–106.

Castanha PMS, Cordeiro MT, Martelli CMT, Souza WV, Marques ETA Jr, Braga C (2012). Force of infection of dengue serotypes in a population-based study in the northeast of Brazil. **Epidemiology Infection**, 141(5):1080-8.

Chongsiriwatana NP, Patch JA, Czyzewski AM, Dohm MT, Ivankin A, Gidalevitz D, Zuckermann RN, Barron AE (2007). Peptoids that mimic the structure, function, and mechanism of helical antimicrobial peptides. **Proceeding of the national academics of science**, 105(8): 2794-9.

Cordeiro MT, Braga-Neto U, Nogueira RMR, Marques ET Jr (2009). Reliable Classifier to Differentiate Primary and Secondary Acute Dengue Infection Based on IgG ELISA. **PLoS ONE**, 4(4): e4945.

Dohm MT, Kapoor R, Barron AE (2011). Peptoids: Bio-Inspired Polymers as Potential Pharmaceuticals. **Current Pharmaceutical Design**, 17, 2732-2747.

Doran TM, Simanski, Kodadek T (2015). Discovery of Native Autoantigens via Antigen Surrogate Technology: Application to Type 1 Diabetes. **ACS Chemical Biology**, 10, 401-412.

Doran TM, Gao Y, Simanski S, McEnaney P, Kodadek T (2015). High Affinity Binding of Conformationally Constrained Synthetic Oligomers To An Antigen-Specific Antibody: Discovery of a Diagnostically Useful Synthetic Ligand For Murine Type 1 Diabetes Autoantibodies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 25(21): 4910–491.

Emmerich P, Mika A, Schmitz H (2013). Detection of serotype-specific antibodies to the four dengue viruses using an immune complex binding (ICB) ELISA. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 7(12): e2580.

Ferguson NM, Rodríguez-Barraquer I, Dorigatti I, Mier-y-Teran-Romero L, Laydon DJ, Cummings DAT (2016). Benefits and risks of the Sanofi-Pasteur dengue vaccine: Modeling optimal deployment. **Science**, 353(6303):1033-1036.

Gearhart TL, Montelaro RC, Schurdak ME, Pilcher CD, Rinaldo CR, Kodadek T, Park Y, Islam K, Yurko R, Marques ETA Jr, Burke DS (2016). Selection of a potential diagnostic biomarker for HIV infection from a random library of non-biological synthetic peptoid oligomers. **Journal of Immunological Methods**, 435: 85 –89.

Gocke AR, Udugamasooriya DG, Archer CT, Lee1 J, Kodadek T (2009). Isolation of antagonists of antigen-specific autoimmune T cell proliferation. **Chemistry and Biology**, 16(11): 1133-1139.

Godballe T, Nilsson LL, Petersen PD, Jenssen H (2011). Antimicrobial b-Peptides and a-Peptoids. **Chemical Biology and Drug Design**, 77: 107–116.

Gomes ALV, Wee LJK, Khan AM, Gil LHVG, Marques ET Jr, Calzavara-Silva CE, Tan WT (2010). Classification of Dengue Fever Patients Based on Gene Expression Data Using Support Vector Machines. **PLoS ONE**, 5(6): e11267.

Hadinegoro SRS (2012). The revised WHO dengue case classification: does the system need to be modified? **Pediatrics and International Child Health** 32(s1): 33–38.

Halstead SB, Heinz FX, Barrett ADT, Roehrig JT (2004). Dengue virus: molecular basis of cell entry and pathogenesis. **Vaccine**, 23, 849–856.

Horstick O, Tozan Y, Wilder-Smith A (2015). Reviewing Dengue: Still a Neglected Tropical Disease? **PLoS Neglected Tropical Diseases** 9(4): e0003632.

Hynes NA (2012). Dengue: A reemerging concern for travelers. **Cleveland Clinical journal of medicine**, 79: 474-482.

Kwon YU, Kodadek T (2008). Encoded combinatorial libraries for the construction of cyclic peptoid microarrays. **Chemical Communications**, 30; (44): 5704–5706.

Laughlin CA, Morens DM, Casetti MC, Denis ACS, Martin JLS, Whitehead SS, Fauci AS (2012). Dengue Research Opportunities in the Americas. **Journal of Infectious Diseases**, 206(7): 1121–1127.

Lora AJM, Fernandez J, Morales A, Soto Y, Feris-Iglesias J, Brito MO (2014). Disease severity and mortality caused by dengue in a Dominican Pediatric Population. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 90(1): 169–172.

Lu P, Bian G, Pan X, Xi Z (2012). Wolbachia Induces Density-Dependent Inhibition to Dengue Virus in Mosquito Cells. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 6(7): e1754.

Ministerio da Saude (2002). Fundação Nacional de Saúde. – Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 20p.: il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos, nº 176).

Olivier GK, Andrew Cho A, Sanii B, Connolly MD, Tran H, Zuckermann RN (2013). Antibody-mimetic peptoid nanosheet for molecular recognition. **American Chemical Society Nano**, 7(10): 9276-9286.

Peeling RW, Artsob H, Pelegrino JL, Buchy P, Cardoso MJ, Enria DA, Farrar J, Gubler DJ, Guzman MG, Halstead SB, Hunsperger E, Kliks S, Margolis HS, Nathanson CM, Nguyen VC, Rizzo N, Vásquez S, Yoksan S (2010). Evaluation of diagnostic tests: dengue. **Nature**, 8(12): 30-8.

Pepe MS, Feng Z (2011). Improving biomarkers identification with better designs and reporting. **Clinical Chemistry**, 57(8): 1093-1095.

Pitisuttithum P & Bouckennooghe A (2016) The first licensed dengue vaccine: an important tool for integrated preventive strategies against dengue virus infection. **Expert Review of vaccines**, 15:7, 795-798.

Pozzetto B, Memmi M, Garraud O (2015). Is transfusion-transmitted dengue fever a potential public health threat? **World Journal of Virology**, 4(2): 113-123.

Quan J, Lakhanpal A, Reddy MM, Zaman S, Li QZ, German DC, Olsen NJ, Kodadek T, Karp DR (2014). Discovery of Biomarkers for systematic lupus erythematosus using a library of synthetic autoantigen surrogates. **Journal of Immunological Methods**, 402(0): 23-34.

Raveendra B, Hao W, Baccala R, Reddy MM, Schilke J, Bennett JL, Theofilopoulos AN, Kodadek T (2013). Discovery for peptoids ligands for Anti-Aquaprin 4 antibodies. **Chemistry and Biology**, 20(3): 351-359.

Reddy MM, Wilson R, Wilson J, Connell S, Gocke A, Hynan L, German D, Kodadek T (2011). Identification of candidates IgG antibody biomarkers for Alzheimer's disease through screening of synthetic combinatorial libraries. **Cell**, 144(1): 132-142.

Regenmortel MHVV (2001). Antigenicity and immunogenicity of synthetic peptides. **Biologicals**, 29, 209-213.

Roopashri G, Vaishali MR, David MP, Baig M, Navneetham A, Venkataraghavan K (2015). Clinical and oral implications of dengue fever: a review. **Journal of International Oral Health**, 7(2): 69-73.

Rothman AL (2011). Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. **Nature**, 11: 532-543.

Samanta J, Sharma V (2015). Dengue and its effects on liver. **World Journal of Clinical Cases**, 3(2): 125-131.

Scarano S, Lisi S, Ravelet C, Peyrin E, Minunni M (2016). Detecting Alzheimer's disease biomarkers: from antibodies to new biomimetic receptors and their application to establish and emerging bioanalytical platforms – A critical Review. **Analytica Chimica Acta**, 940: 21-37.

Schwartz LM, Halloran ME, Durbin AP, Longini IM Jr (2015). The dengue vaccine pipeline: Implications for the future of dengue control. **Vaccine**, 33(29): 3293-8.

Sun J, Zuckermann RN (2013). Peptoid Polymers: A Highly Designable Bioinspired Material. **American Chemical Society**, 7(6): 4715-4732.

Tang WW, Grewal R, Shrestha S (2015). Influence of antibodies and T cells on dengue disease outcome: insights from interferon receptor-deficient mouse models. **Current Opinion in Virology**, 13: 61–66.

Tapia-Conyer R, Betancourt-Cravioto M, Méndez-Galván J (2012). Dengue: an escalating public health problem in Latin America. **Pediatrics and International Child Health**, 32: 14-17.

Teixeira MG, Siqueira JB Jr, Ferreira GLC, Bricks L, Joint G (2013). Epidemiological trends of dengue disease in Brazil (2000-2010):A systematic literature. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 7(12): e2520.

Teoh EP, Kukkaro P, Teo EW, Lim AP, Tan TT, Yip A, Schul W, Aung M, Kostyuchenko VA, Leo YS, Chan SH, Smith KG, Chan AH, Zou G, Ooi EE, Kemeny DM, Tan GK, Ng JK, Ng ML, Alonso S, Fisher D, Shi PY, Hanson BJ, Lok SM, MacAry PA (2012). The structural Basis for serotype-specific neutralization of dengue virus by a human antibody. **Science Translational Medicine**, 4: 139ra83.

Ubol S, Halstead SB (2010). How innate immune Mechanism Contribute to Antibody-Enhanced Viral Infections. **Clinical and Vaccine Immunology**, 1829-1835.

Vanderstichele H, Kodadek T (2014). Roadblocks for integration of novel biomarker concepts into clinical routine: the peptoid approach. **Research and Therapy**, 6: 23.

Vervaeke P, Vermeire K, Liekens S (2015). Endothelial dysfunction in dengue virus pathology. **Reviews in Medical Virology**, 25: 50-67.

Weaver SC, Vasilakis N (2009). Molecular evolution of dengue viruses: Contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of

the preeminent arboviral disease. **Infections, Genetics and Evolution**, 9(4): 523-540.

Wilder-Smith A, Ooi E.-E., Vasudevan SG, Gubler DJ (2010). **Infectious Diseases Program**, 12: 157–164.

Wilder-Smith A (2012). Dengue infections in travelers. **Pediatrics and International Child Health**, 32: 28-32.

Yazdani U, Zaman S, Hynan LS, Brown LS, Dewey RB Jr, Karp D, German DC (2016). Blood biomarker for Parkinson disease: peptoids. **NPJ Parkinson's Disease**, 2016;2.

Yeste A, Quintana FJ (2013). Antigen microarrays for the study of autoimmune diseases. **Clinical Chemistry**, 59(7): 1036-1044.

Yoo B, Shin SBY, Huang ML, Kirshenbaum K (2010). Peptoid Macrocycles: Making the Rounds with Peptidomimetic Oligomers. **Chemistry- A European Journal**, 16, 5528 – 5537.

Zellweger RM, Shresta S (2014). Mouse models to study dengue virus immunology and pathogenesis. **Frontiers in Immunology**, 10, 5:151.

Zhang XH, Zhou YP, Peng HJ, Zhou FY, Liu ZH, Chen XG (2014). Predictive Symptoms and Signs of Severe Dengue Disease for Patients with Dengue Fever: A Meta-Analysis. **BioMed Research International**, 2014: 359308.

Zhang X, Sun L, Rossmann MG (2015). Temperature dependent conformational change of dengue virus. **Current Opinion in Virology**, 12: 109-112.

Zuckermann RN (2011). Peptoid origins. **Biopolymers**, 96:545-555.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria Acadêmica
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: proacad@pucrs.br
Site: www.pucrs.br/proacad