

REA.02 - Seleção e avaliação de aptâmeros para detecção sorológica da proteína NS1 do vírus Zika

Liliane Monteiro de Morais^{1*}; Laís Nascimento Alves¹; Ana Paula Corrêa Argondizzo¹; Henrique Francisco Rocha¹; Dilson Silva²; Sheila Maria Barbosa de Lima¹; Sotiris Missailidis¹.

¹Fiocruz/Bio-Manguinhos;

²UERJ - Universidade Estadual do Rio de Janeiro.

Introdução:

O vírus Zika (ZIKV) é um Arbovírus pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*. No Brasil, a circulação autóctone vem ocorrendo desde 2015. A maioria das infecções são assintomáticas ou apresentam manifestações clínicas leves, semelhantes às causadas por outros *Flavivirus*, dificultando o diagnóstico clínico. O diagnóstico laboratorial é realizado principalmente a partir de técnicas moleculares, uma vez que testes sorológicos podem apresentar reação cruzada com outros *Flavivirus*. O genoma viral é formado por uma molécula de RNA fita simples, polaridade positiva, apresentando uma única região de leitura aberta (ORF) que codifica uma poliproteína, posteriormente clivada em três proteínas estruturais (C, prM e E) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). A proteína NS1 é expressa na superfície de células infectadas e também é secretada para o meio extracelular, possuindo um papel importante na indução de anticorpos. Essa proteína pode ser encontrada na corrente sanguínea antes ou durante o início dos sintomas, permitindo o diagnóstico precoce da infecção. Os aptâmeros são ferramentas moleculares inovadoras e sofisticadas, selecionadas “*in vitro*” através do método de Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial (SELEX). Eles têm alta capacidade de reconhecimento, afinidade e especificidade aos alvos para os quais foram selecionados, possibilitando o desenvolvimento de testes diagnósticos altamente específicos e sensíveis.

Objetivo:

Obter aptâmeros específicos para a proteína NS1 do vírus Zika.

Metodologia:

As proteínas NS1 recombinantes foram obtidas por dois sistemas de expressão: em *Escherichia coli* (rNS1z), fornecida pelo LATER, e em baculovírus (rNS1zg),

comercialmente adquirida. A seleção de aptâmeros foi realizada através do processo de seleção SELEX, utilizando-se microplacas para imobilização da proteína. Uma biblioteca de DNA fita simples foi submetida à interação com a proteína rNS1, onde foram selecionados aptâmeros ligantes. Após lavagem para retirada dos não ligantes, as sequências foram eluídas utilizando concentrações crescentes de sal. Em seguida foi realizada a dessalinização em coluna de 5 kDa e amplificação por PCR unidirecional usando oligonucleotídeos específicos. Este ciclo de seleção foi repetido por sete vezes, com um ciclo de seleção negativa para proteína NS1 de febre amarela. Ao final do último ciclo, foi realizada PCR bidirecional, o produto foi clonado no vetor pCR2.1 TOPO e transformado em *Escherichia coli* TOP10. Os plasmídeos dos clones obtidos foram extraídos, quantificados e sequenciados. As sequências foram analisadas utilizando-se programa de alinhamento (*Muscle*) e as estruturas secundárias foram avaliadas pelo programa *mfold*. Os aptâmeros foram avaliados por espectroscopia de fluorescência e os dados obtidos estão sendo analisados utilizando-se o programa *Microcal Origin 6*. Os resultados serão expressos pela constante de *Stern Volmer*.

Resultado:

Foram obtidas 16 sequências de aptâmeros para a proteína rNS1z e 3 aptâmeros para rNS1zg.

Conclusão:

Todas as sequências apresentaram perfil promissor, foram sintetizadas e estão sendo avaliadas para verificar a interação aptâmero-alvo.

Palavras-chave: vírus Zika. ; NS1; aptâmeros