

**Ministério da Saúde Fundação Oswaldo Cruz Instituto Renè Rachou Programa de  
Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

**Identificação de Peptídeos para o Desenvolvimento de um Teste Diagnóstico Sorológico  
para Zika**

por  
Stella Garcia Colombarolli

Belo Horizonte  
2022

TESE

DCS – IRR

S. G. COLOMBAROLLI

2022

**STELLA GARCIA COLOMBAROLLI**

**Identificação de Peptídeos para o Desenvolvimento de um Teste Diagnóstico Sorológico  
para Zika**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto Renè Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde – Área de Concentração Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática.

Orientação: Dr. Carlos Eduardo Calzavara  
Silva

Coorientação: Dra. Jaqueline Germano de  
Oliveira

Belo Horizonte

2022

Catálogo na fonte  
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ  
Biblioteca do IRR  
CRB 6 3740/00

C718i  
2022

Colombarolli, Stella Garcia

Identificação de Peptídeos para o Desenvolvimento de um Teste Diagnóstico Sorológico para Zika/ Stella Garcia Colombarolli. – Belo Horizonte, 2022.

XII, 75 f., il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 68-75

Tese para obtenção do Título de Doutora pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática.

1. Zika vírus/imunologia 2. Diagnóstico diferencial 3. Microarranjos de proteínas I. Título II. Calzavara Silva, Carlos Eduardo (Orientação) III. Germano de Oliveira, Jaqueline (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.91

**STELLA GARCIA COLOMBAROLLI**

**Identificação de Peptídeos para o Desenvolvimento de um Teste Diagnóstico Sorológico  
para Zika**

**Banca Examinadora**

Dr. Carlos Eduardo Calzavara Silva (Orientador/Presidente)	IRR/FIOCRUZ MINAS
Dr. Gabriel da Rocha Fernandes	IRR/FIOCRUZ MINAS (Titular)
Dra. Anna Carolina Pinheiro Lage	IRR/FIOCRUZ MINAS (Titular)
Dr. Rafael Dhalia	IAM/FIOCRUZ PERNAMBUCO (Titular)
Dra. Mariana Sequetin Cunha	Instituto Adolfo Lutz (Titular)
Dra. Sandra Grossi Gava	IRR/FIOCRUZ MINAS (Suplente)

**Tese defendida e aprovada em Belo Horizonte aos 24 de fevereiro de 2022**

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Este trabalho também contou com o financiamento FAPEMIG, CNPq, FIOCRUZ e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Ao meu orientador, Dr. Carlos Eduardo Calzavara Silva, que há 11 anos desenvolve brilhantemente o seu papel de professor, me indicando sempre o melhor caminho. Também agradeço a Dra. Jaqueline Germano de Oliveira, que tanto me ensinou e me inspira com o seu exemplo de sucesso como mulher cientista. À Dra. Marina Cretich, que me supervisionou durante o doutorado sanduíche, tornando a experiência científica estimulante e enriquecedora, que me trouxe novamente à Itália, para trilhar mais uma etapa da vida profissional. Aos pesquisadores Dr. Alessandro Gori, Dra. Francesca Sciandra e Dr. Alberto Vitali pelo suporte científico diário.

Aos colaboradores Dr. Maurício Nogueira, Dr. Flávio Fonseca e Dr. Pedro Augusto Alves pelas valiosas amostras de soros humanos utilizadas neste projeto.

Aos colegas do grupo Imunologia Celular e Molecular, onde crescemos, aprendemos e nos divertimos juntos. Aos colegas de equipe do Conselho Nacional de Pesquisas da Itália, que me incentivam a enfrentar os obstáculos e seguir pelo caminho distinto na pesquisa.

À minha família, onde encontro o meu alicerce, proteção e amor. Aos meus pais, Anna Elisa e Marcos, que me fortalecem no dia a dia. Aos meus queridos irmãos, Bruno e Tulio, que juntos a Marcela e Raquel, presentearam a minha vida com os pequenos preciosos Davi e Bernardo. Ao Nicola, que enche o meu coração de alegria. Aos meus avós, que desejo honrá-los com carinho.

À Deus, que me mostra o significado desta vida.

Obrigada.

## RESUMO

O *Zika virus* (ZIKV), assim como o *Dengue virus* (DENV) e o *Yellow Fever virus* (YFV), membros da família *Flaviviridae*, compartilham alta homologia entre as suas sequências genômicas, aumentando a possibilidade de reações imunológicas cruzadas entre eles, tornando complexa a identificação de epítomos e anticorpos específicos para os *flavivírus*. A infecção por ZIKV está relacionada com complicações neurológicas graves em recém-nascidos, como a microcefalia e a Síndrome de Guillan-Barret, em adultos, o que causou sérios problemas de saúde pública no Brasil em 2015 e 2016. Neste mesmo momento, circulavam no Brasil, outros arbovírus, transmitidos pelos mesmos vetores, como o DENV, YFV e o *Chikungunya virus* (CHIKV). Inicialmente as doenças causadas pelos arbovírus apresentam sintomas muito similares, mas quando agravadas, caminham para desfechos diferentes, que necessitam de um manejo clínico e assistência hospitalar distintos. Desta forma, é importante o desenvolvimento de um teste diagnóstico diferencial precoce que seja sensível e específico o bastante para identificar estas doenças em sua fase inicial. Este trabalho tem como objetivo a identificação de regiões específicas da poliproteína do ZIKV que possam ser utilizadas como antígenos diferenciais em um teste diagnóstico para Zika. Para isso, foi traçada a seguinte metodologia: (i) utilizando a bioinformática como ferramenta, foi criado um banco de dados próprio para o estudo de epítomos antigênicos específicos e potencialmente diferenciais entre o ZIKV, DENV e YFV; (ii) foram selecionados, desenhados e sintetizados peptídeos antigênicos e específicos destes *flavivírus*; 3) foi realizada uma varredura dos peptídeos obtidos a partir de microarranjo proteico, avaliando a capacidade de reconhecimento específico por anticorpos presentes em 260 amostras de soros humanos, caracterizados em quatro grupos distintos: I – positivos para Zika, II – positivos para dengue, III – positivos para febre amarela, IV – negativos para as arboviroses testadas. Dentre os peptídeos testados, um peptídeo identificado na proteína do capsídeo de ZIKV apresentou resultados relevantes de reconhecimento específico e diferencial entre as amostras positivas para Zika e os outros grupos. Especialmente quando comparados os grupos positivos para Zika e dengue, este peptídeo foi eficiente em distinguir os grupos com sensibilidade de 100% e especificidade de 88,37%. Portanto, espera-se que este peptídeo possa ser utilizado no desenvolvimento de um teste diagnóstico sorológico diferencial e específico para Zika.

**Palavras chave:** *Zika virus*, Diagnóstico diferencial, Microarranjos proteicos

## ABSTRACT

The *Zika virus* (ZIKV), as well as *Dengue virus* (DENV) and *Yellow Fever virus* (YFV) are members of the *Flaviviridae* family, genus *Flavivirus*, and share high homology between their genomic sequences, increasing the possibility of immunological crossreactions between them and making it complex for the identification of epitopes and antibodies specific to Flaviviruses. ZIKV infection is related to serious neurological complications in newborns, such as microcephaly, and Guillan-Barret Syndrome in adults, which caused major public health problems in Brazil in 2015 and 2016. At the same time, were circulating in the country, transmitted by the same vectors, other arboviruses such as DENV, YFV and *Chikungunya virus* (CHIKV). Initially, the diseases caused by arboviruses have very similar symptoms, but when they worsen, they lead to different outcomes, which require different clinical management and hospital care. Therefore, it is important to develop an early differential diagnostic test that is sensitive and specific enough to identify these diseases early on. This work aims to identify specific regions of the ZIKV polyprotein that can be used as differential antigens in a diagnostic test for Zika. For this, the following methodology was designed: 1) using bioinformatics as a tool, a database was created for the study of specific and potentially differential antigenic epitopes between ZIKV, DENV and YFV; 2) antigenic and specific peptides of these flaviviruses were selected, designed and synthesized; 3) a scan of the peptides obtained from a protein microarray was performed, evaluating the ability of specific recognition by antibodies present in 260 samples of human sera, characterized in four distinct groups: I - positive for Zika, II - positive for dengue, III – positive for yellow fever, IV – negative for the arboviruses tested. Among the peptides tested, a peptide identified in the ZIKV capsid protein showed relevant results of specific and differential recognition between the Zika positive samples and the other groups. Especially when comparing the positive groups for Zika and dengue, this peptide was efficient in distinguishing the groups with sensitivity of 100% and specificity of 88.37%. Therefore, it is expected that this peptide can be used in the development of a differential and specific serological diagnostic test for Zika.

**Key words:** *Zika virus*, Differential diagnosis, Protein Microarray, flaviviruses

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Distribuição das principais arboviroses no mundo.....	15
<b>Figura 2</b> - Difusão espacial do ZIKV no Brasil de 2014 a 2016 de acordo com relatos de casos e dados epidemiológicos produzidos pelo Ministério Federal da Saúde e secretarias estaduais de saúde.....	17
<b>Figura 3</b> - Representação do genoma e da partícula do ZIKV.....	21
<b>Figura 4</b> - Esquema do curso da infecção humana por ZIKV.....	25
<b>Figura 5</b> - A sorologia complexa da infecção pelo ZIKV e DENV.....	30
<b>Figura 6</b> - Estratégia de Trabalho.....	38
<b>Figura 7</b> - Representação do processo de seleção dos epítomos.....	43
<b>Figura 8</b> - Representação da organização de um <i>pad</i> do microarranjo proteico.....	46
<b>Figura 9</b> - Desenho esquemático dos epítomos selecionados distribuídos nas poliproteínas de DENV, ZIKV e YFV .....	54
<b>Figura 10</b> - Identificação dos peptídeos nas proteínas C e NS1 de ZIKV.....	57

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> - Processo de purificação por HPLC dos peptídeos sintetizados.....	55
<b>Gráfico 2</b> - Reconhecimento do Peptídeo 3 em ensaio de microarranjo.....	58
<b>Gráfico 3</b> - Reconhecimento dos peptídeos 1 e 2 pelos grupos de soros humanos.....	59
<b>Gráfico 4</b> - Reconhecimento dos peptídeos 18, 18a e 18b pelos grupos de soros humanos.....	60
<b>Gráfico 5</b> - Curva ROC gerada para o peptídeo 3 em análises de IgM.....	61
<b>Gráfico 6</b> - Reconhecimento do peptídeo 3 S-02 e Z-01 durante segunda análise por microarranjo.....	62
<b>Gráfico 7</b> - Avaliação do peptídeo 3 S-02 em ensaios de ELISA.....	63

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Probabilidade de reações cruzadas em testes sorológicos entre o ZIKV e vários flavivírus devido à vacinação ou circulação endêmica em uma população, por continente.....	26
<b>Tabela 2</b> - Identidade em % entre as sequências das poliproteínas dos <i>flavivírus</i> .....	28
<b>Tabela 3</b> - Banco de amostras de soros humanos caracterizadas e utilizadas no trabalho.....	39
<b>Tabela 4</b> - Grupos de amostras de soros humanos utilizados nos ensaios <i>in vitro</i> .....	50
<b>Tabela 5</b> - Epítomos de ZIKV, DENV e YFV selecionados <i>in silico</i> como potencialmente específicos.....	52

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Aa: Aminoácidos

BA: Bahia

C: Capsídeo

CDC: *Centers for Disease Control and Prevention* - Centro de Controle e Prevenção de Doenças

CTB: *Chemistry and Technology for Bioscience Group* – Grupo de Química e Tecnologia para Biociência

CHIKV: *Chikungunya virus*

CN: Controle negativo

CNR: *Consiglio Nazionale delle Ricerche* - Conselho Nacional de Pesquisas da Itália

DENV: *Dengue virus*

E: Envelope

ELISA: *Antibody Capture Enzyme-Linked Immuno Sorbet Assay* – Ensaio de Imunoabsorção enzimática

FAMERP: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

FLE: *Fusion Loop Epitope* - Epitopo da Alça de Fusão

FUNED: Fundação Ezequiel Dias

ICM: Imunologia Celular e Molecular

IMCR: Imunocromatográfico

IFI: Imunofluorescência Indireta

IgG: Imunoglobulina G

IgM: Imunoglobulina M

JEV: vírus da Encefalite Japonesa

LACEN: Laboratório Central de Saúde Pública

M: Membrana

MAYV: *Mayaro virus*

MVEV: *Encefalite de Murray Valley virus*

NCBI: *National Center for Biotechnology Information* – Centro Nacional para Informação em Biotecnologia

NS1: *Nonstructural Protein 1* - Proteína Não Estrutural 1

NS2A: *Nonstructural Protein 2A* - Proteína Não Estrutural 2A

NS2B: *Nonstructural Protein 2B* - Proteína Não Estrutural 2B

NS3: *Nonstructural Protein 3* - Proteína Não Estrutural 3

NS4A: *Nonstructural Protein 4A* - Proteína Não Estrutural 4A

NS4B: *Nonstructural Protein 4B* - Proteína Não Estrutural 4B

NS5: *Nonstructural Protein 5* - Proteína Não Estrutural 5

OMS: *World Health Organization* - Organização Mundial de Saúde

PAHO: Organização Pan-Americana de Saúde

PE: Pernambuco

PRNT: *Plaque Reduction Neutralization Test* - Teste de Neutralização por Redução de Placas

qRT-PCR: *Real-Time Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* -

Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo em Tempo Real

RN: Rio Grande do Norte

RNA: *Ribonucleic acid* - Ácido Ribonucleico

RT-PCR: *Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* -Transcrição

Reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase

SCITEC: *Istituto di Scienze e Tecnologie Chimiche "Giulio Natta"* - Instituto de Ciência e Tecnologia Química "Giulio Natta"

SNC: Sistema Nervoso Central

SUS: Sistema Único de Saúde

TA: Temperatura Ambiente

UCI: *University of California* - Universidade da Califórnia – Irvine

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

USP: Universidade de São Paulo

WB: *Western Blotting*

WNV: *West Nilo virus*

YFV: *Yellow Fever virus*

ZIKV: *Zika virus*

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
1.1.	Aspectos gerais das arboviroses.....	13
1.2.	Epidemiologia do <i>Zika virus</i> .....	16
1.3.	Manifestações Clínicas e Complicações por <i>Zika virus</i> .....	18
1.4.	O <i>Zika virus</i> .....	20
1.5.	Tratamento, Prevenção e Controle.....	22
1.6.	Diagnóstico.....	24
1.6.1.	Os testes diagnósticos para Zika.....	24
1.6.2.	Os arbovírus circulantes no Brasil se assemelham geneticamente.....	27
1.6.3.	A busca por antígenos específicos para o uso em diagnósticos sorológicos para a Zika.....	29
1.6.4.	Uso da bioinformática para elucidar as diferenças entre epítomos de ZIKV e outros <i>flavivírus</i> .....	32
2.	JUSTIFICATIVA.....	34
3.	HIPÓTESE.....	36
4.	OBJETIVOS.....	36
4.1.	Objetivo Geral.....	36
4.2.	Objetivos específicos.....	36
5.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
5.1.	Estratégia de Trabalho.....	37
5.2.	Etapa 1: Coleta e caracterização de amostras de soros humanos.....	39
5.2.1.	Apresentação das amostras utilizadas.....	39
5.2.2.	Protocolos de caracterização dos soros humanos.....	41
5.2.2.1.	Ensaio de PRNT.....	41
5.3.	Etapa 2: Desenho de peptídeos com potencial antigênico diferencial para ZIKV.....	42
5.4.	Etapa 3: Síntese dos peptídeos com potencial antigênico diferencial.....	44
5.5.	Etapa 4: Avaliação dos peptídeos capazes de realizar o diagnóstico diferencial para Zika por ensaios de microarranjo proteico.....	45
5.5.1.	Microarranjos proteicos desenvolvidos na UCI, em 2018.....	45
5.5.2.	Microarranjos proteicos desenvolvidos no SCITEC – CNR, em 2019-2020.....	47
5.5.2.1.	Preparação das lâminas de silicone.....	47
5.5.2.2.	Impressão dos peptídeos.....	47
5.5.2.3.	Incubação com os soros humanos e anticorpos secundários.....	48

5.5.3. Confirmação do reconhecimento diferencial dos peptídeos por ELISA.....	48
5.5.4. Análise dos dados.....	49
6. RESULTADOS.....	50
6.1. Grupos amostrais caracterizados.....	50
6.2. Identificação <i>in silico</i> de epítomos de ZIKV potencialmente específicos, síntese e purificação de peptídios.....	50
6.3. Microarranjo Proteico.....	56
6.4. Avaliação do peptídeo 3 (S-02) pelo ELISA.....	62
7. DISCUSSÃO.....	63
8. CONCLUSÃO.....	67
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Aspectos gerais das arboviroses

Os arbovírus constituem um grupo de vírus bastante diverso, incluindo membros das famílias *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* e *Orthomyxoviridae*. Os arbovírus são mantidos na natureza em ciclos complexos envolvendo uma gama de artrópodes como vetores, que incluem carrapatos, flebotomíneos e, dentre os mais comuns, mosquitos dos gêneros *Culex* e *Aedes*, que transmitem os vírus pela picada de suas fêmeas durante a hematofagia em mamíferos e aves. Com exceção de um único arbovírus com genoma de DNA conhecido, o *African swine fever virus*, todos os outros são vírus com genoma de RNA. Acredita-se que devido a maior plasticidade genética e a maior taxa de mutação, o RNA como material genético permite a adaptação em diferentes ciclos de replicações alternadas em hospedeiros vertebrados e invertebrados (YOUNG, 2018; FIGUEIREDO, 2007).

Os arbovírus normalmente exibem uma alta especificidade em relação ao hospedeiro para a manutenção do ciclo silvestre. Cada vírus dispõe de uma ou mais espécies de vertebrados e invertebrados para a sua multiplicação. Apesar dos vírus serem considerados especializados, os surtos de doenças causadas por eles em humanos, além de doenças veterinárias, são por vezes associadas às mudanças de comportamento, em que os arbovírus se adaptam a novos vetores ou hospedeiros, podendo estabelecer a sua transmissão em um ciclo urbano (COFFEY *et al*, 2013; WEAVER, 2012).

Alterações ecológicas produzidas pelo homem podem aumentar a prevalência de vetores, criar novos reservatórios ou induzir a adaptação de arbovírus em novos ciclos de manutenção. Além disso, os arbovírus podem percorrer longas distâncias através de hospedeiros que viajam cruzando fronteiras, e são introduzidos em novos países ou até mesmo em novos continentes apresentando grande potencial para provocar pandemias. Exemplos recentes de grandes surtos causados por arbovírus em humanos resultantes de uma rápida expansão geográfica em novas áreas, mas com a presença de vetores adequados, são o surgimento do *Chikungunya virus* (CHIKV) e do *Zika virus* (ZIKV) nas Américas em 2013 e 2015, respectivamente. O CHIKV gerou a maior e mais rápida pandemia viral de arbovírus da história, começando com um surto acentuado na Ilha de Reunião, na costa leste da África, cruzou o Oceano Índico para a Ásia e, em 2013, chegou ao hemisfério ocidental, percorrendo ilhas localizadas no Oceano Pacífico. O ZIKV viajou pela mesma rota, inicialmente em silêncio, percorrendo toda a Ásia e causando doença ao alcançar o Pacífico, completando o seu circuito. Nas duas pandemias, o CHIKV e o ZIKV foram transmitidos por viajantes infectados nas Américas para a Austrália, Europa e Estados Unidos. A expansão do ZIKV levou à declaração de uma Emergência de Saúde Pública

de Preocupação Internacional pela Organização Mundial de Saúde (OMS) no período entre 1º de fevereiro a 18 de novembro de 2016 (REUSKEN *et al.*, 2018).

Entre 2016 e 2017, o Brasil, além de enfrentar uma emergência de saúde pública causada pelo ZIKV, sofreu o maior surto de febre amarela silvática da história. O Ministério da Saúde do Brasil registrou surtos de febre amarela em diversos estados no leste do país, incluindo áreas onde a febre amarela não era tradicionalmente considerada um risco. Desde o fim de 2017, repetiram-se casos de febre amarela em diversos estados, especialmente nos estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais e a grande São Paulo. Já no início de 2018, foi registrado um caso de febre amarela em um viajante holandês não vacinado, hospedado próximo à região metropolitana de São Paulo. Desde então, houve registros de outros viajantes não vacinados, que visitaram áreas no Brasil com surto de febre amarela e que contraíram a doença, muitos dos quais infectados em Ilha Grande (Rio de Janeiro) e vários desses viajantes faleceram. Em resposta ao surto de febre amarela, a OMS ampliou a lista de áreas nas quais se recomenda a vacinação para viajantes internacionais, assim como as áreas de vacinação também foram ampliadas para moradores brasileiros (CDC, 2020; Ministério da Saúde, 2018). O surto de febre amarela no Brasil em 2017, em um território em que se considerava que a doença estava sob controle através da vacinação disponibilizada desde 1930, mostrou o potencial de reemergência das arboviroses (MARINHO *et al.*, 2017). Enquanto isso, constantemente, uma pandemia ininterrupta de dengue é vivenciada no Brasil.

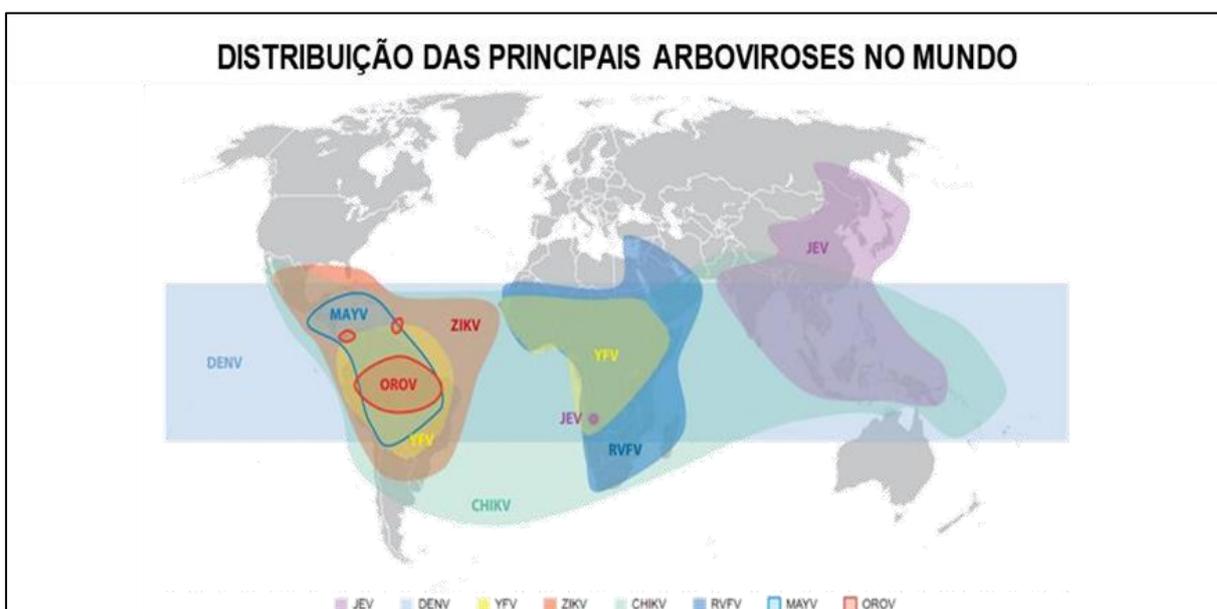
A dengue, causada pelos quatro sorotipos do DENV, é considerada pela OMS a arbovirose mais prevalente nos dias de hoje, estimando-se que 400 milhões de infecções por DENV ocorram anualmente, causando mais de 40 mil mortes. Segundo dados do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), aproximadamente 4 bilhões de pessoas, ou seja, aproximadamente 50% da população mundial, vivem em áreas de risco de transmissão para a dengue, que é endêmica em pelo menos 100 países na Ásia, no Pacífico, nas Américas, África e no Caribe (CDC, 2022).

Esses são eventos que causam milhões de infecções, que não apenas mudaram a epidemiologia de vírus antes obscuros, mas também colocaram à prova a capacidade da saúde pública mundial. Os mecanismos patogênicos e os modos de transmissão recentemente reconhecidos exigem o desenvolvimento de novas estratégias para controle e tratamento destas doenças. Desde o desenvolvimento de testes diagnósticos para a detecção assertiva da doença em questão, antivirais para o tratamento das arboviroses e manejo clínico e assistencial dos casos complicados, até o avanço das vacinas candidatas, são pilares essenciais para o progresso

das estratégias de controle e soluções para as doenças endêmicas e emergentes (HUANG *et al*, 2019).

No mapa representado na Figura 1 estão ilustradas as distribuições de arboviroses no mundo. Nos países da América do Sul, principalmente no Brasil, onde acontece a circulação simultânea dos vírus causadores da dengue, Zika, febre amarela e chikungunya, também circulam vírus menos comentados na literatura como o *Mayaro virus* (MAYV) e o *Oropouche virus* (OROV). Portanto, estudos que possam contribuir com o conhecimento e a preparação do sistema de saúde para o enfrentamento de vírus emergentes e reemergentes são necessários e urgentes.

**Figura 1: Distribuição das principais arboviroses no mundo.**



O Brasil é o país com o maior número de circulação de arbovírus diferentes registrados, com a presença do DENV, YFV, ZIKV, CHIKV, MAYV e OROV. Fonte: *Lecuit et al*, 2017. *Annual Review of Medicine*.

As epidemias causadas por diferentes agentes em uma população não imune para novos patógenos, podem levar a um colapso no sistema de serviços de saúde. Além do impacto direto no sistema de saúde pública, tais arboviroses apresentam um efeito econômico alarmante, uma vez que a dengue e a febre amarela podem levar a internações de milhares de pacientes em leitos de hospitais, assim como a Zika, embora caracterizada por baixa taxa de hospitalização, está relacionada a severas complicações neurológicas em neonatos, que necessitam de assistências pelo resto da vida, o que impacta diretamente a saúde financeira das famílias e

exerce pressão sobre o sistema de saúde e previdenciário de países em desenvolvimento como o Brasil (BRASIL *et al*, 2016).

## **1.2. Epidemiologia do Zika virus**

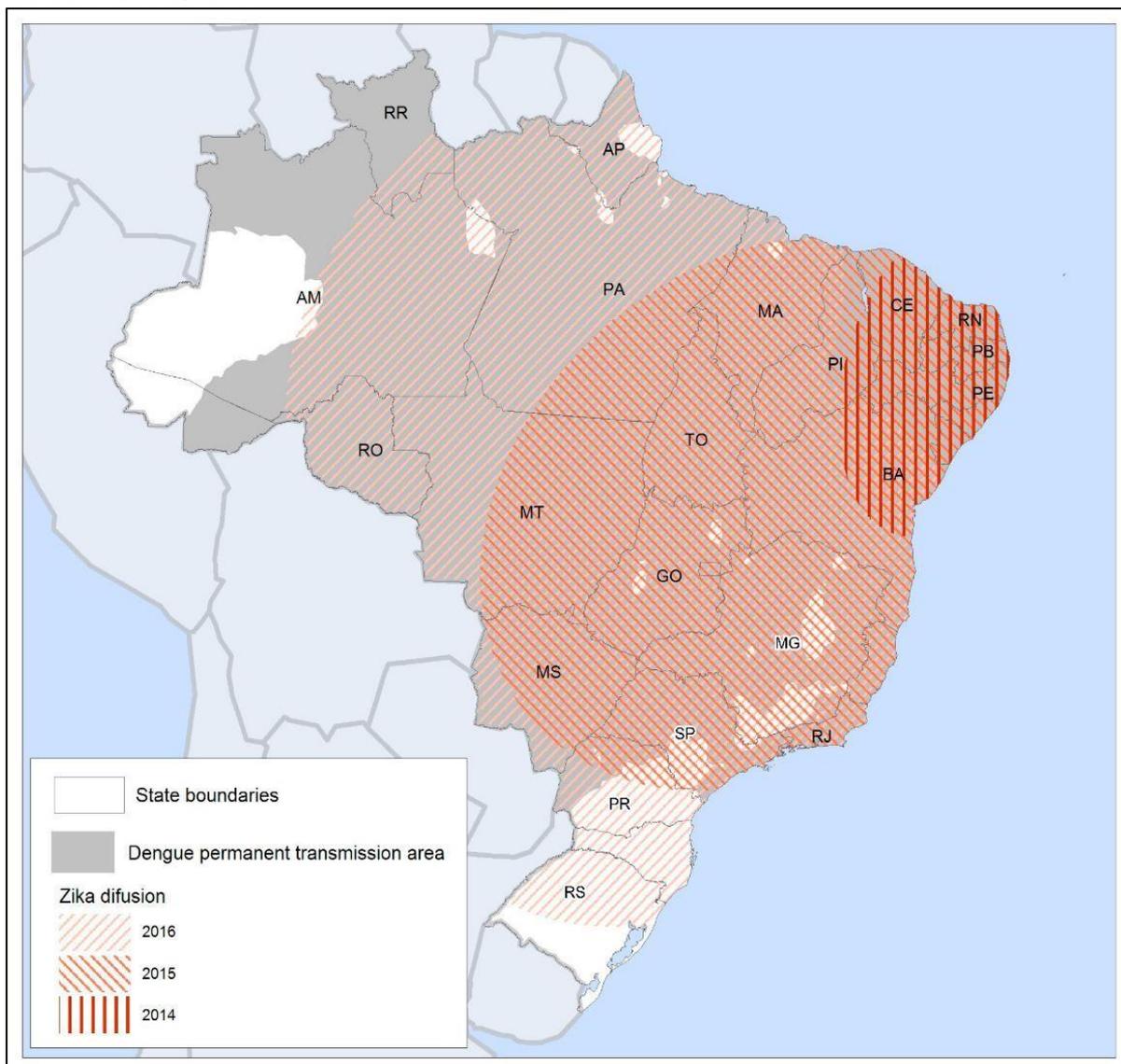
O ZIKV foi isolado pela primeira vez em 1947 a partir de primatas da floresta Zika em Uganda, durante um estudo em áreas de alta incidência de febre amarela (DICK *et al*, 1952). O primeiro caso humano de infecção pelo ZIKV foi detectado em 1952. Entre os anos 1960 e 1980, ocorreram casos isolados na Ásia e África, em indivíduos que apresentavam os sintomas típicos da infecção por ZIKV. Porém, o primeiro surto de Zika aconteceu em 2007 na Micronésia, e nos anos 2013 e 2014, foi feita pela primeira vez a correlação entre desordens neurológicas e a infecção pelo ZIKV na Polinésia Francesa (KELLEY & RICHARDS, 2016).

Já no Brasil, o primeiro relato de caso ocorreu no Nordeste em maio de 2015, infecção confirmada laboratorialmente, primeiro nos estados de Pernambuco (PE), Rio Grande do Norte (RN) e Bahia (BA), em seguida, nos demais estados das regiões Centro-Oeste e Sudeste. Os indivíduos apresentavam uma doença caracterizada por erupção maculopapular, febre, mialgias, artralgias e conjuntivite. Sintomas clínicos genéricos e semelhantes aos sintomas apresentados em pacientes com dengue, porém, durante a investigação para o diagnóstico, foi detectado o RNA de ZIKV no sangue de pacientes pela técnica de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) (CAMPOS *et al*, 2015).

Estudos filogenéticos descreveram apenas um sorotipo de ZIKV contendo duas linhagens – a africana e a asiática. Tais linhagens incluem três genótipos virais denominadas de oeste genótipo africano, leste africano e asiático. Acredita-se que o genótipo asiático do ZIKV tenha chegado ao Brasil já em 2014, compartilhando um ancestral comum com a cepa de ZIKV que circulou durante a epidemia da Polinésia Francesa (LOWE *et al*, 2018). Estes estudos sugerem também que o ZIKV tenha sido introduzido no Brasil durante o Campeonato Mundial de Canoagem, no Rio de Janeiro, em que 4 países – Polinésia Francesa, Nova Caledônia, Ilhas Cook e Ilhas de Páscoa, onde o ZIKV já circulava, trouxeram equipes que competiram em diversas categorias (AL-QAHTANI *et al*, 2016).

A Figura 2 resume a disseminação da epidemia de ZIKV no Brasil de acordo com relatórios epidemiológicos estaduais e nacionais:

**Figura 2: Difusão espacial do ZIKV no Brasil de 2014 a 2016 de acordo com relatos de casos e dados epidemiológicos fornecidos pelo Ministério Federal da Saúde e Secretarias Estaduais de Saúde.**



A atual área de transmissão permanente da dengue é mostrada em cinza. Fonte: Lowe *et al*, 2018. *Int. J. Environ. Res. Public Health*.

Seguindo a introdução do ZIKV no Brasil, em outubro de 2015, foi reportado o nascimento de 2700 bebês com microcefalia comprovadamente relacionada com a infecção por ZIKV através da transmissão vertical da gestante infectada (ARAÚJO *et al*, 2018). Um aumento expressivo do número de recém-nascidos com o perímetro cefálico inferior ao considerado normal, comparado ao ano de 2014 no qual foram notificados 150 casos de microcefalia. Ao todo, mais de 8000 crianças nasceram com malformações causadas pela infecção por ZIKV. Em 2016 foi declarado estado de emergência pela Organização PanAmericana de Saúde

(PAHO), tornando o Brasil o epicentro de surtos de Zika (SILVA & SOUZA, 2016; AL-QAHTANI *et al*, 2016).

Atualmente, a Zika é uma doença de notificação compulsória no Brasil. Considera-se que o pico do surto tenha ocorrido em 2016 uma vez que o número de casos caiu consideravelmente desde então. É reconhecido que o surto chegou ao fim. Apesar disso, a infecção pelo ZIKV é e continuará sendo um risco em muitos países das Américas e ao redor do mundo, devido à gravidade das complicações relacionadas à doença. Vale ressaltar que a febre amarela, que foi considerada controlada, já provocou surtos graves e inesperados, causando milhares de mortes em um sistema de saúde despreparado.

### **1.3 Manifestações Clínicas e Complicações por *Zika virus***

A Zika é caracterizada por exantema, conjuntivite, febre baixa, artralgia moderada, cefaléia, dor muscular, vômito e hipertrofia ganglionar. O diagnóstico clínico é difícil de ser realizado, já que tais sintomas se assemelham com os sintomas de outras arboviroses, principalmente a dengue. Apesar de surgirem com os mesmos sinais clínicos, são doenças diferentes que podem evoluir para complicações distintas. (BRASIL *et al*, 2016).

Até outubro de 2015, infecção por ZIKV era considerada uma doença benigna por não ter registros de morte e causar baixa taxa de hospitalização. Entretanto, a partir dessa data foi observado um aumento acentuado no número de neonatos nascidos com microcefalia, condição rara associada ao desenvolvimento cerebral incompleto, em maternidades no nordeste do Brasil. Especialistas de Recife, PE, levantaram a hipótese de uma associação entre a infecção pelo ZIKV na gravidez e a microcefalia (ARAÚJO *et al*, 2016). Na época, não havia nenhuma evidência científica direta de uma relação causal entre a infecção pelo ZIKV durante a gravidez e defeitos cerebrais congênitos em fetos ou recém-nascidos, embora a difusão espacial da epidemia de microcefalia tenha seguido os caminhos de disseminação do ZIKV de um epicentro na região Nordeste para o sul e oeste em rápida sucessão. A partir de novembro de 2015, as notificações de casos suspeitos de microcefalia aumentaram 10 vezes em apenas algumas semanas (AL-QAHTANI *et al*, 2016; LOWE *et al*, 2018) A associação entre a microcefalia e a infecção por ZIKV foi confirmada por meio da reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa quantitativa (qRT-PCR) e *Antibody Capture Enzyme-Linked Immuno Sorbet Assay* (ELISA) para detecção de IgM. O estudo realizado excluiu fatores de confusão em análises multivariáveis, como uso de medicamentos durante a gestação como o piriproxifeno e a administração de vacinas, demonstrando uma forte correlação entre a infecção congênita pelo ZIKV e a microcefalia grave e não grave (ARAÚJO *et al*, 2018).

Em meio a esta situação de caos, a confirmação de infecção pelo ZIKV incluiu diagnóstico laboratorial utilizando a RT-PCR. No entanto, esse teste nunca esteve disponível para atender a demanda total de casos durante o surto de ZIKV. Além disso, o diagnóstico pode ser problemático devido à janela de tempo limitada em que as partículas virais persistem na corrente sanguínea, à grande proporção de infecções assintomáticas e à reatividade cruzada de anticorpos entre o ZIKV e outros flavivírus, especialmente os quatro sorotipos do DENV (ALIOTA *et al*, 2017).

Diversos estudos de investigação para confirmação da infecção pelo ZIKV e dos distúrbios neurológicos no sistema nervoso central (SNC) dos fetos foram realizados pela academia científica e foi demonstrado que o é crucial para o desenvolvimento neurológico. Quando a infecção da mãe pelo ZIKV acontece durante primeiro trimestre da gestação há maior probabilidade de afetar o sistema nervoso central do bebê. O ZIKV foi isolado do sangue, no líquido amniótico, no leite materno, na saliva, na urina, no cérebro do feto e no tecido placentário. Foi comprovado que o ZIKV infecta as células dendríticas dérmicas, o que facilita a disseminação do vírus para diferentes órgãos através do sistema circulatório. A transmissão transplacentária do ZIKV da mãe para o feto pode ocorrer pela infecção de macrófagos placentários e citotrofoblastos, já que os macrófagos são as principais células-alvo da infecção pelo ZIKV na placenta. Estudos demonstraram que o ZIKV, sendo capaz de infectar células mononucleares do sangue humano, poderia não só facilitar a disseminação do vírus, mas também permitir a entrada do vírus em locais imunoprivilegiados, uma vez que essas células são capazes de cruzar, por exemplo, a barreira hematoencefálica, desempenhando papel importante na fisiopatologia da doença (MESSIAS *et al*, 2019; FAIZAN *et al*, 2016).

Outra grave complicação relacionada com a infecção por ZIKV é a Síndrome de GuillainBarré (SGB), uma doença autoimune caracterizada por fraqueza muscular consequente de danos no sistema nervoso (COX *et al*, 2015). O aumento da SGB no Brasil também coincidiu com o surto de Zika quando comparados aos registros históricos visto que admissões durante o período do surto em 2016, aumentaram de uma média de 1,0/mês para 5,6/mês, levando às investigações sobre a correlação entre as duas doenças (MUSSO *et al*, 2015).

A relação entre a infecção por ZIKV e a SGB é mais comum em jovens adultos, com idades médias que variam entre 40 e 50 anos sendo ligeiramente mais prevalente em indivíduos do sexo masculino. Os sintomas neurológicos se apresentam entre o 6º e o 10º dia, em média, após os sintomas iniciais da infecção pelo ZIKV. Os relatos de caso descrevem fraqueza da extremidade inferior, que predomina como o sintoma inicial da síndrome, seguido de dor, disfunção e paralisia facial. Também foram relatadas arritmias cardíacas e retenções urinárias

nos pacientes que desenvolveram a SGB relacionada à infecção por ZIKV. A severidade do quadro desenvolvido tornou urgente a capacitação médica e demais profissionais de saúde para maior conhecimento dos sintomas e lesões neuronais causados pela Zika (MARTYN *et al*, 2016).

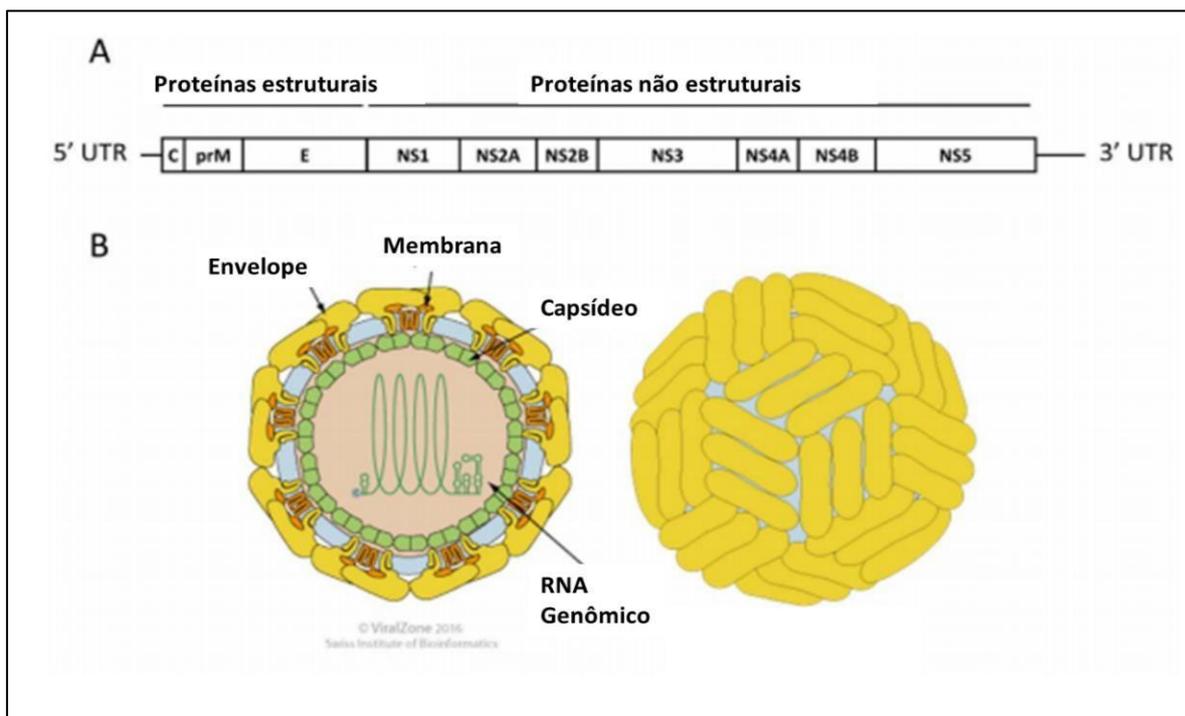
#### **1.4 O Zika virus**

O *Zika virus* é um membro da família *Flaviviridae* e do gênero *Flavivirus*, que também inclui os vírus DENV, YFV, WNV, o vírus da Encefalite Japonesa (JEV), o vírus da Encefalite de Saint Louis (SLV) e o vírus da Encefalite de Murray Valley (MVEV) (COX *et al*, 2015).

O ZIKV é transmitido para os humanos pela picada de mosquitos da espécie *Aedes aegypti*, porém outras formas de transmissão já foram relatadas como a transmissão do vírus através da saliva, da urina, além do potencial de transmissão sexual. A persistência do ZIKV no trato genitourinário masculino e feminino por longos períodos de tempo foi relatada. Notavelmente, o RNA de ZIKV pode persistir em níveis elevados no esperma meses após a resolução dos sintomas. Já em pacientes do gênero feminino, o RNA viral foi detectado em secreções vaginais por até 2 semanas após o início dos sintomas. A transmissibilidade sexual do ZIKV e a sua persistência nos tecidos e secreções do trato reprodutivo são características não comumente observadas em pacientes infectados com outros outros *flavivírus*, transmitidos unicamente via vetor (SILVA & SOUZA, 2016; ALIOTA, *et al* 2017).

O genoma dos *flavivírus* é composto por uma molécula de RNA de fita simples e senso positivo com cerca de 11000 pares de bases que codificam em torno de 3500 aminoácidos (COX *et al*, 2015). A fita de RNA tem início na região 5' UTR, seguida por uma região que é traduzido em uma poliproteína, e termina na região 3' UTR. Esta poliproteína é então clivada e processada por proteases do hospedeiro e do próprio vírus originando três proteínas estruturais: a proteína do capsídeo (C), a proteína do precursor de membrana (prM/M) e a proteína do envelope (E); e sete proteínas não estruturais: NS1, NS2A e NS2B, NS3, NS4A e NS4B, e NS5 (RASTOGI *et al*, 2016; LINDENBACH *et al*, 2007). A Figura 3 representa o genoma e a partícula do ZIKV:

**Figura 3: Representação do genoma e da partícula do ZIKV.**



Em (A) o RNA do ZIKV contendo uma única ORF, que codifica três proteínas estruturais e sete proteínas não estruturais, flanqueadas por duas regiões não traduzidas (UTR). Em (B) o vírion de ZIKV é envelopado, esférico, com cerca de 50 nm de diâmetro. As proteínas prM/M e E de superfície são arranjadas em uma simetria  $T = 3$  do tipo icosaédrica. Fonte: adaptada de *Lin et al, 2018*.

Assim como os outros *flavivírus*, o ZIKV é esférico e envelopado, medindo de 42 a 52 nm de diâmetro. O processo de montagem de partículas dos flavivírus envolve (i) a interação de prM e proteínas E que levam à formação de um heterodímero no retículo endoplasmático, (ii) encapsulação do RNA genômico pela proteína C e inclusão por bicamadas lipídicas derivadas da membrana celular contendo proteínas prM e E para formar os vírions imaturos, e (iii) a clivagem de proteínas prM em proteínas M via furina ou uma protease semelhante a furina na rede trans-Golgi, desencadeando assim a liberação da partícula viral (LINDENBACH & RICE, 2003). A proteína E é a principal envolvida na ligação e fusão do receptor celular, é formada como um dímero cabeça-cauda nas superfícies das partículas virais. Ela consiste em três domínios distintos no ectodomínio: um domínio de barril beta central I (DI), um domínio de dimerização II (DII) e um domínio semelhante a imunoglobulina III (DIII) (MODIS *et al.*, 2004; REY *et al.*, 1995). Estruturas de ZIKV de alta resolução recentemente identificadas por

microscopia eletrônica (crio-EM) indicam que a estrutura geral do ZIKV é semelhante a de outros flavivírus, principalmente com os vírus da dengue (LIN *et al*, 2018).

É visto na literatura que a proteína mais imunogênica dos *flavivírus* é a proteína E, considerada o principal alvo dos anticorpos neutralizantes pela sua localização estrutural e por ser fundamental para a entrada do vírus na célula. Em estudos baseados no DENV como modelo, a proteína NS1 é notável por constituir 3 das regiões mais imunogênicas do vírion, além disso é secretada no meio extracelular, possibilitando o seu reconhecimento por anticorpos e a ativação do sistema complemento. Contudo, análises filogenéticas de ZIKV sugerem uma seleção positiva para as proteínas NS5 e NS4B como alvos também potenciais para o sistema imune (LINDENBACH *et al*, 2007; SIRONI *et al*, 2016).

A proteína E de ZIKV e DENV têm um alto grau de similaridade estrutural, o que sugere que compartilhem regiões antigênicas e, como consequência, na prática, sejam sorologicamente indistinguíveis. A reatividade cruzada de anticorpos entre *flavivírus* pode ser influenciada pela homologia das sequências e estruturas de suas proteínas, bem como devido a abundância de anticorpos reativos em soros policlonais. Por exemplo, a reatividade cruzada pode ser devido a uma pequena população de anticorpos que apresentam elevados níveis de especificidade para as proteínas E de vírus diferentes, ou pode ser devido a uma maior população de anticorpos que apresentam ampla reatividade cruzada (KEASEY *et al*, 2017).

Análises *in silico* identificaram as proteínas E e NS1 de ZIKV com uma alta reatividade para anticorpos, e alta similaridade de sequências com outros *flavivírus*. Foi apontada a reatividade de células T para todas as proteínas não-estruturais de ZIKV em relação à reatividade às proteínas dos outros *flavivírus*, principalmente as proteínas NS3 e NS5, indicando mais uma vez a dificuldade de diferenciação de resposta do sistema imune humano às infecções por ZIKV e DENV. (XU *et al*, 2016).

### **1.5 Tratamento, Prevenção e Controle da Zika**

Ainda não existe nenhum fármaco antiviral específico para tratamento de pacientes com Zika. O manejo dos casos inclui o cuidado dos sintomas, tais como repouso, ingestão de líquidos, analgésicos e antipiréticos. Os casos suspeitos de Zika não devem receber medicamentos anti-inflamatórios não esteroides, a menos que a probabilidade de dengue hemorrágica seja anulada (CHAN *et al*. 2016).

A concepção de diferentes tipos de vacinas contra o ZIKV, incluindo vacinas baseadas em DNA, atenuadas, inativadas e de subunidade está em vários estágios de desenvolvimento clínico (POLÔNIA *et al*, 2018).

Na ausência de tratamento específico, a prevenção é a melhor forma de proteção contra a Zika. Para todas as doenças transmitidas por mosquitos, as medidas preventivas são as mesmas e incluem proteção contra picadas de mosquitos e controle da população de vetores (CHEN & HAMER, 2016).

Medidas preventivas devem ser aplicadas para evitar as picadas dos mosquitos vetores responsáveis pela transmissão do vírus. Essas medidas simples incluem a utilização de repelentes contra insetos, a minimização da área cutânea exposta à picada dos mosquitos, a eliminação de água parada onde o mosquito pode fazer sua ovoposição e a instalação de telas em janelas e portas. Medidas rigorosas devem ser implementadas pelos governos, sob forma de vigilância e programas de conscientização entre a população e profissionais da saúde, para uma melhor administração da doença (ALBUQUERQUE *et al*, 2012; PARASHAR & CHERIAN, 2014).

Por este motivo, o Ministério da Saúde possui um conjunto de programas e políticas para a intensificação de atividades de vigilância, no preparo de resposta da rede de saúde pública, no treinamento de profissionais, divulgação de medidas às Secretarias Estaduais de Saúde e preparo de laboratórios de referência para o diagnóstico da doença. Houve um fortalecimento nas medidas de prevenção e identificação de casos desde 2015. Nas regiões com registro de Zika, foram constituídas equipes, orientando a busca ativa de casos suspeitos, para emitir alertas às unidades de saúde e às comunidades. Para o controle dos mosquitos transmissores da doença, vêm sendo realizadas ações de bloqueio de casos suspeitos e eliminação de criadouros. Além de investimentos em pesquisa para erradicação da doença e combate ao vetor (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

A transmissão sexual do ZIKV foi comprovada e, portanto, o sexo seguro deve ser praticado após visitar áreas de alto risco (MUSSO *et al*, 2015; HILLS *et al*. 2016). Mulheres grávidas devem atentar-se para o perigo da infecção por ZIKV durante a gestação, portanto, recomenda-se seguir as precauções de segurança durante sua permanência em áreas de alto risco ou durante os períodos de janeiro a abril por causa do crescimento no número de mosquitos vetores em período de chuvas no Brasil. Viajantes que retornam de áreas endêmicas para o ZIKV, devem seguir a prática de sexo seguro com suas parceiras grávidas. Nas áreas de alto risco, os casos de infecção por ZIKV devem ser monitorados para quaisquer complicações neurológicas e autoimunes. Os profissionais de saúde e a equipe laboratorial devem tomar medidas de precaução ao lidar com amostras ou pacientes infectados com ZIKV, seguindo práticas de biossegurança para reduzir o risco de transmissão do ZIKV (RATHER *et al*, 2017).

## 1.6 Diagnóstico

### 1.6.1. Os testes diagnósticos para Zika

O diagnóstico mais comumente utilizado para a identificação das principais arboviroses circulantes no Brasil é o clínico e epidemiológico, sendo realizado pelo médico, baseado nos sintomas relatados pelo paciente e na região do país em que a infecção pelo patógeno deve ter ocorrido. Porém, no Brasil esse é um método que pode apresentar limitações, já que arbovírus estão presentes em quase todo o território nacional e, apesar de as doenças seguirem cursos clínicos diversos, as arboviroses se manifestam com sintomas iniciais similares, que não seguem um padrão para todos os indivíduos doentes e podem ser facilmente confundidos durante o diagnóstico clínico (BRASIL *et al*, 2016).

Os aspectos laboratoriais observados durante o curso de arboviroses em fase aguda são inespecíficos. Nos exames realizados são encontradas leucopenia e trombocitopenia discretas a moderadas, leves elevações nos valores de desidrogenase láctica sérica, gama glutamiltransferase e marcadores de atividade inflamatória, como a proteína C reativa, fibrinogênio e ferritina. Contudo, estes parâmetros laboratoriais não constituem informações específicas de infecção por nenhuma das arboviroses presentes no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

É preconizado pelo Ministério da Saúde que o exame para a confirmação das arboviroses deve ser a RT-PCR, técnica que detecta o RNA viral, realizada em laboratórios de referência como o Lacen de MG, integrante da rede de Lacens do Sistema Único de Saúde (SUS) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). Porém, o uso dessa técnica apresenta limitações, porque só pode ser utilizada no período de viremia das doenças, para que se possa extrair o RNA dos vírus em fluidos corporais do paciente, ou seja, o tempo da coleta da amostra é um fator limitante. Visto que muitas vezes o indivíduo só procura os centros de saúde quando os sintomas já foram estabelecidos há dias e, conseqüentemente, a carga viral no sangue do paciente já é baixa e pode não ser detectada pela RT-PCR, constituindo assim um problema para o diagnóstico da doença.

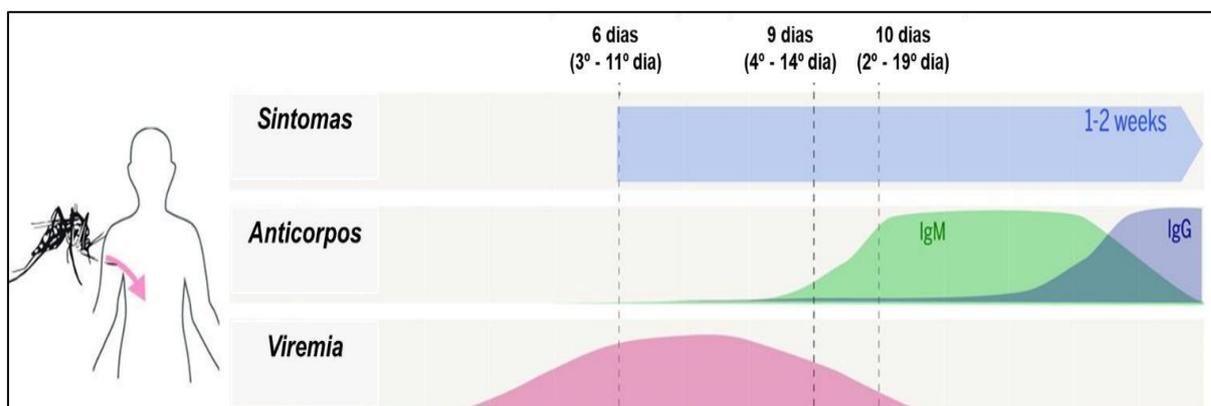
Os testes diagnósticos sorológicos comerciais para flavivírus disponíveis no mercado não conferem a confiabilidade de um resultado sensível, específico e diferencial. Um total de 12 testes diagnósticos sorológicos comerciais para Zika estão disponíveis, dentre eles, testes ELISA, imunocromatográficos e testes de imunofluorescência. Os testes ELISA e testes rápidos disponíveis atualmente utilizam as proteínas do envelope (E) e NS1 dos vírus. Nestes testes espera-se detectar anticorpos IgM e IgG específicos. O que acontece na prática é que devido à grande identidade entre proteínas de flavivírus, anticorpos que reagem contra proteínas de

diferentes vírus são detectados pelo teste, ou seja, ocorre a reação cruzada. Isto é um problema grave verificado nos centros de saúde, visto que a população brasileira está simultaneamente exposta ao DENV, ao ZIKV e grande parte é vacinada para YFV. Desta maneira, é um desafio para a ciência encontrar uma região antigênica específica destes vírus, que possa constituir um teste diagnóstico confiável, capaz de suprir as necessidades da rede pública de saúde (BOEUF *et al*, 2016; SPEER & PIERSON, 2016; STETTER *et al*, 2016).

O teste sorológico considerado “Padrão Ouro” pelo CDC é o Teste por Neutralização de Redução de Placas (PRNT), que detecta anticorpos neutralizantes específicos no soro do paciente (CDC, 2020). Esta técnica é de difícil execução pois necessita de alta habilidade técnica, de investimentos financeiros altos, de um longo tempo para a sua realização. Além disso, há muitas variáveis interdependentes durante os passos da técnica e somente anticorpos neutralizantes podem ser identificados.

Para ilustrar a cinética de produção de anticorpos durante a infecção por ZIKV e a oportunidade de realização dos diferentes tipos de testes para o diagnóstico da doença, veja a Figura 4 abaixo:

**Figura 4: Esquema do curso da infecção humana por ZIKV.**



A infecção pelo ZIKV pode causar doença sintomática que começa a se manifestar a partir do 3º dia pós infecção. A IgM é detectável a partir do 4º dia e o período de viremia detectável por exame molecular vai do 2º ao 6º dia. O momento da mudança IgM / IgG é mostrado apenas para fins ilustrativos e não indicar o tempo real de persistência de IgM. A figura foi adaptada de Lessler *et al*, 2016.

Os sintomas se desenvolvem, em média, 6 dias (intervalo de 95%, 3 a 11 dias) após a infecção pelo ZIKV. Aproximadamente no 9º dia (intervalo de 95%, 4 a 14 dias) os anticorpos IgM começam a ser produzidos e, mais tarde, diminuem à medida que os níveis de anticorpos

IgG aumentam e persistem por longos períodos. A viremia provavelmente começa a aumentar antes que os sintomas apareçam, e a magnitude e a duração da viremia definirão o tempo adequado para a execução do teste molecular, isolamento viral ou captura de antígenos (LESSLER *et al*, 2016). Já os testes diagnósticos sorológicos para os flavivírus são problemáticos devido à intensa reatividade cruzada entre os anticorpos produzidos contra diferentes vírus devido à circulação endêmica de vários flavivírus no Brasil ou pela vacinação para a febre amarela (CHARREL *et al*, 2016), ilustrado na Tabela 1 abaixo.

**Tabela 1: Probabilidade de reações cruzadas em testes sorológicos entre o ZIKV e vários flavivírus devido à vacinação ou circulação endêmica em uma população, por continente.**

<b>Vírus</b>	<b>África</b>	<b>Ásia</b>	<b>América Central e Caribe</b>	<b>Europa</b>	<b>América do Norte</b>	<b>Oceania</b>	<b>América do Sul</b>
<b>Relacionado à Vacinas</b>							
<i>Vírus da Febre Amarela</i>	+	-	-	-	-	-	+
<i>Vírus da Encefalite Japonesa</i>	-	+	-	-	-	+	-
<i>Vírus da Dengue</i>	-	-	+	-	-	-	-
<b>Circulação Endêmica</b>							
<i>Vírus da Febre Amarela</i>	+	-	-	-	-	-	+
<i>Vírus da Dengue</i>	+	+	+	-	-	+	+
<i>Vírus do Oeste do Nilo</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Vírus da Encefalite Japonesa</i>	-	+	-	-	-	+	-
<i>Vírus da Encefalite de Saint Louis</i>	-	-	+	-	+	-	+
<i>Vírus Rocio</i>	-	-	-	-	-	-	+

Legenda: o símbolo (+) é utilizado para identificar os continentes com circulação do vírus e possibilidade de apresentar reação cruzada em teste sorológico; o símbolo (-) é utilizado quando não há circulação do vírus no continente. Fonte: adaptado de Charrel *et al.*, 2016.

Como anteriormente mencionado e considerando a dificuldade de se realizar um teste diagnóstico sorológico para Zika, devido às constantes reações cruzadas apresentadas, é preconizado pelo Ministério da Saúde que o exame para a confirmação de Zika deve ser a RT-PCR (convencional ou quantitativa), técnica realizada em laboratórios de referência da rede do Sistema Único de Saúde (SUS) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022). Porém, para a realização dos testes moleculares, é necessária uma plataforma de instrumentação e alta habilidade técnica, fazendo-se pouco viável para atender regiões do país que não são preparadas e distantes de cidades com maior infra-estrutura. Outro fator complicador é a necessidade de viremia detectável, o que restringe a execução da PCR à fase aguda da doença, que compreende o 2º aos 7º dias após a infecção, limitando a técnica por este curto intervalo de tempo (LI *et al*, 2016). Portanto, o teste diagnóstico ideal seria a detecção de IgM, anticorpo presente a partir do 5º dia após a infecção pois permanece no soro do paciente até aproximadamente o 15º dia. Além disso, é necessário que tal teste seja diferencial e específico para Zika, capaz de ser realizado em tempo hábil para o curso de manejo clínico do indivíduo infectado.

### **1.6.2 Os arbovírus circulantes no Brasil se assemelham geneticamente**

O ZIKV, o DENV sorotipos 1, 2, 3 e 4 e o YFV pertencem ao mesmo gênero *Flavivirus*, à família *Flaviviridae* e apesar de serem espécies diferentes, compartilham de genomas muito similares, que resultam em poliproteínas com valores de identidade relevantes entre si, como pode ser visto na Tabela 2 a seguir. A Tabela 2 foi gerada a partir dos dados resultantes de alinhamentos múltiplos realizados no programa online Clustal Omega, utilizando as sequências de aminoácidos de referência dos *flavivirus* estudados disponibilizados no Genbank - NCBI.

**Tabela 2: Identidade em % entre as sequências das poliproteínas dos *flavivírus***

	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	ZIKV
YFV	45.95	45.80	45.32	45.24	46.65
DENV-1		72,28	78,21	68,82	55,82
DENV-2			72,34	69,65	55,97
DENV-3				70,24	56,52
DENV-4					56,53

As sequências de aminoácidos dos vírus DENV 1, 2, 3 e 4, ZIKV e YFV foram submetidos a alinhamentos múltiplos no programa Clustal Omega.

A Tabela 2 mostra os altos valores de identidade entre as sequências de aminoácidos que codificam as poliproteínas dos *flavivírus*, dos quais o maior deles, como esperado, é entre os sorotipos de DENV que compartilham entre si acima de 68% de aminoácidos nas mesmas posições em suas sequências. Em seguida, os vírus DENV e ZIKV apresentam identidade acima de 55%, de 46% entre ZIKV e YFV e 45% entre DENV1-4 e YFV. Esses dados demonstram como flavivírus se assemelham geneticamente e, conseqüentemente, são considerados sorocomplexos, explicando o motivo pelo qual identificá-los especificamente é ainda um desafio.

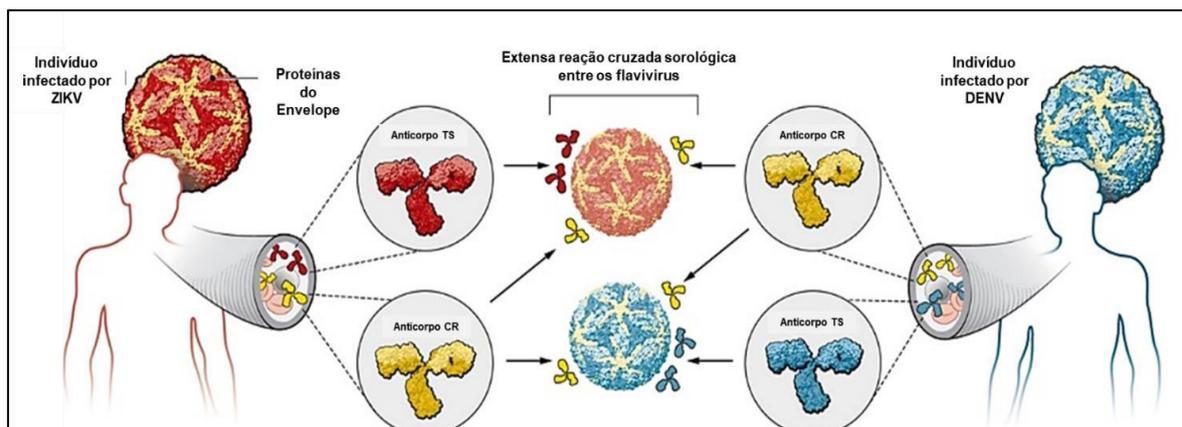
A proteína E é o principal alvo dos anticorpos neutralizantes, porque é a responsável pela fusão viral que acontece quando a clivagem de prM permite que a proteína do E responda ao pH endossômico por meio de uma mudança conformacional, que catalisa a fusão da membrana e libera o genoma viral no citosol. A perda do fragmento precursor de prM permite que a proteína E flutue durante o empacotamento do vírion, permitindo a exposição da alça de fusão, que pode ser caracterizada como um dos principais epítomos antigênicos (CALISHER *et al*, 1989).

A caracterização funcional e estrutural de um painel de anticorpos isolados de pacientes com dengue demonstrou que a maioria destes anticorpos tinha como alvo o epítopo da alça de fusão (FLE). Entretanto, outros anticorpos apresentaram como alvo uma região quaternária facilmente acessível na superfície exposta da proteína E, localizada na interface entre as duas subunidades E no dímero. Estes anticorpos amplamente neutralizantes, denominados EDE para epítopo de dímero do E, neutralizam de forma potente todos os quatro sorotipos de DENV. O local de ligação dos EDEs é conservado entre os sorotipos de DENV porque também é o local de interação de prM com dímeros E durante o transporte das partículas virais imaturas através do aparelho de Golgi da célula. Foi visto ainda que os anticorpos neutralizantes EDE são capazes de neutralizar o ZIKV com a mesma potência com a qual neutralizam o DENV (BARBA-SPAETH *et al*, 2016).

### **1.6.3. A busca por antígenos específicos para o desenvolvimento de diagnósticos sorológicos para a Zika**

Uma compreensão detalhada dos epítopos reconhecidos pelos anticorpos específicos gerados contra o ZIKV e dos anticorpos que apresentam reação cruzada com outros flavivírus é a estratégia ideal para melhorar a especificidade do diagnóstico diferencial. A seleção de antígenos pode ser realizada utilizando técnicas convencionais como ELISA, *Western blotting* (WB), imunofluorescência indireta (IFI) e também microarranjo de peptídeos. Seguindo pelo caminho oposto, mas com objetivo similar, também podem ser feitas buscas *ex vivo* por anticorpos monoclonais neutralizantes. O grande desafio está na homologia e semelhança entre as proteínas de ZIKV e DENV, principalmente a proteína E, que é frequentemente usada na fabricação de testes diagnósticos comerciais por ser a mais imunogênica. Tanto a infecção pelo ZIKV, quanto pelo DENV, induz a produção de anticorpos específicos para o vírus, anticorpos tipo-específicos, porém como a similaridade das proteínas dos *flavivírus* é muito grande, são também produzidos anticorpos à regiões comuns de ZIKV e DENV, sendo os responsáveis pela reatividade cruzada que são frequentemente observadas durante testes sorológicos, pois estes anticorpos comuns são capazes de se ligar a antígenos comuns dos *flavivírus* (SPEER & PIERSON, 2016) (Figura 5).

**Figura 5: A sorologia complexa da infecção pelo ZIKV e DENV.**



A infecção pelo ZIKV quanto pelo DENV resulta na produção de anticorpos específicos para apenas um desses dois vírus, anticorpo tipo específico (TS), bem como anticorpos de reatividade cruzada (CR) capazes de se ligar a ambos os vírus em vários graus. A figura foi adaptada de Speer & Pierson, 2016. *Science*.

Embora um progresso substancial tenha sido feito no desenvolvimento de testes para ZIKV, ainda há uma grande demanda por testes de imunodiagnóstico sensíveis e específicos que atendam às necessidades em áreas endêmicas. Até o momento, três testes sorológicos foram autorizados para uso emergencial pelo *Food and Drug Administration* (FDA). O teste MAC-ELISA para Zika do CDC é altamente sensível quando as amostras de soro são coletadas durante o tempo apropriado, geralmente após 5 dias do início dos sintomas. As razões da alta sensibilidade e baixa especificidade do MAC-ELISA do CDC são a longa incubação do soro com o vírus inteiro (antígeno de cultura de células Vero ou antígeno recombinante COS-1), que captura uma grande variedade de anticorpos no ensaio. O teste InBios Zika Detect IgM Capture ELISA, autorizado também pelo FDA, faz o uso do antígeno recombinante COS-1, que é composto por epítopos da proteína E de ZIKV, desenvolvido pelo CDC, e mostra sensibilidade semelhante. A melhora da especificidade desse teste vem da inclusão de outros antígenos de flavivírus, permitindo a avaliação da detecção diferencial de anticorpos para ZIKV. Comparativamente, os testes CDC-MAC ELISA e InBios Zika Detect Antibody Capture têm sensibilidade semelhante, sendo que o InBios pode detectar menos infecções falso-positivas por dengue do que o teste desenvolvido pelo CDC.

Os métodos de detecção de anticorpos anti-NS1, aparentemente, trazem um nível mais alto de especificidade para imunodiagnósticos para Zika, embora possivelmente a um custo de menor sensibilidade. O teste Liaison XL Zika Capture IgM também foi recentemente autorizado

para uso e detecta a ligação de anticorpos IgM a micropartículas revestidas com ZIKV-NS1, subtraindo o sinal gerado pela ligação de anticorpos IgG. O uso combinado do antígeno NS1 e a exclusão do sinal do anticorpo IgG, resultam na alta especificidade da detecção de IgM neste teste. Mais recentemente, a partir de estudos de competição de anticorpos, epítomos NS1 específicos foram identificados e usados para gerar antígenos que discriminam o ZIKV das infecções por DENV em método ELISA de “bloqueio de ligação” (BOB). Os desenvolvedores do ensaio BOB ELISA mostraram que infecções primárias e secundárias por DENV não foram detectadas, enquanto quase 92% das infecções por ZIKV confirmadas por PCR foram reconhecidas (MUNOZ-JORDAN, 2017).

Como métodos de rotina laboratorial, para se detectar pequenas quantidades de um determinado antígeno na presença de muitas outras proteínas, tal como um antígeno viral no sangue, são realizados imunoenaios como o WB. É uma alternativa simples e econômica, mas que não permite o *screening* de muitos peptídeos (BERG *et al*, 2004). Já a técnica de imunofluorescência indireta (IFI) pode ser aplicada para a seleção de múltiplos antígenos e também para o diagnóstico laboratorial, pois permite a avaliação do reconhecimento de anticorpos presentes no soro que reconhecem antígenos, como os peptídeos de ZIKV, por exemplo, e sendo, muitas vezes, possível a correlação clínicolaboratorial dos pacientes (AOKI *et al*, 2010). Estas são metodologias ideais para uma execução simples, que podem ser realizadas em fase de apuração para testar os peptídeos candidatos encontrados durante uma *seleção* em larga escala.

Por sua vez, os microarranjos de peptídeos oferecem novas oportunidades para mapear com precisão regiões discretas dentro dos proteomas virais e de outros patógenos, que podem facilitar o diagnóstico diferencial de doenças infecciosas. É possível realizar a triagem de epítomos com uma alta capacidade, fornecendo uma plataforma ideal para revelar antígenos candidatos para o diagnóstico diferencial de Zika, devido à alta processividade das amostras e à possibilidade de se testar muitos alvos ao mesmo tempo (NELSON & COX, 2014,

p. 337-339). Por ser um método específico e altamente sensível, são necessárias pequenas quantidades de soro para a sua execução e permite a triagem de um grande número de peptídeos, gerando resultados acurados.

A natureza das plataformas de microarranjo de peptídeos é favorável para a multiplexação, o que amplia o seu potencial de cobertura de assinaturas de biomarcadores para muitas doenças e leva ao desenvolvimento de ferramentas para a medicina personalizada e diagnósticos altamente precisos. Os microarranjos de peptídeos são perfeitamente adequados para preencher a lacuna entre a descoberta de um antígeno e o diagnóstico de uma doença de

difícil identificação como a Zika; nas mesmas plataformas, a estratégia pode ser validada e, no final, usada para os diagnósticos de rotina (CRETICH *et al*, 2014). Portanto, o microarranjo de peptídeos é a técnica de referência para a determinação do repertório de antígenos capazes de serem reconhecidos diferencialmente por soros de indivíduos infectados por ZIKV.

#### **1.6.4. Uso da bioinformática para elucidar as diferenças entre epítomos de ZIKV e outros flavivírus**

Para analisar grandes quantidades de dados e realizar previsões matemáticas aplicadas aos sistemas biológicos, a bioinformática se apresenta como uma ampla vantagem estratégica na predição de novos antígenos de importância médica, tal como para o uso no desenvolvimento de um diagnóstico específico para Zika.

Portanto, neste projeto utilizamos a imunoinformática, que tem como foco a estrutura, a função e a interação de moléculas envolvidas na imunidade. Um dos seus principais objetivos é a predição *in silico* de epítomos imunogênicos, na qual ferramentas são desenvolvidas para identificar, qualificar e prever epítomos reconhecidos por células B e T, importantes na infecção e na imunidade protetora contra patógenos. Para o desenvolvimento de testes diagnósticos sorológicos, são utilizados os preditores de epítomos para células B, que otimizam a busca por regiões específicas que podem ser triadas posteriormente *in vitro* para a comprovação dos resultados obtidos *in silico* (KORBER *et al*, 2006).

Na literatura são encontrados estudos que apresentam o sucesso em identificar peptídeos originários de proteínas de superfície de vírus, considerados um caminho interessante para o desenvolvimento de vacinas de peptídeos e diagnósticos para ZIKV. Um destes estudos, utilizou 60 sequências da proteína E disponíveis no GenBank, utilizando técnicas de caracterização numérica, foram identificados quatro peptídeos que são bem conservados e expostos à superfície, prevendo-se que tenham ligação como epítomo de eficiência razoável (DEY *et al*, 2017).

Em estudo, utilizando ferramentas de bioinformática para a busca de antígenos de ZIKV, foram selecionadas todas as sequências da proteína E disponíveis para isolados de ZIKV desde 1968 até 2017, e por meio de modelagem por homologia foram construídas estruturas 3D de proteínas E de diferentes cepas de ZIKV. A disponibilidade de dados estruturais 3D das proteínas de ZIKV contribuem para encontrar padrões e regiões conservadas de epítomos para células B, avaliando também a estabilidade estrutural após as mutações encontradas em diferentes sequências. Foram identificados 3 epítomos completamente conservados nas cepas pré-epidêmicas e nas epidêmicas que, de fato, não mudaram por quase 50 anos. Esses epítomos

são reconhecidos por anticorpos e têm potencial para uso no desenvolvimento de vacinas e imunoterapêuticos direcionados a Zika (ALMANSUR *et al*, 2019). Sourisseau *et al* contribuíram para a compreensão dos efeitos das mutações entre várias sequências do E de ZIKV e descreveram um roteiro útil para trabalhos futuros que visam mapear a seleção funcional e antigênica para o ZIKV em alta resolução.

Os trabalhos realizados por bioinformática orientam, aperfeiçoam e potencializam a busca de epítomos assertivos para o uso em plataformas para o diagnóstico. A predição de epítomos lineares para células B, por exemplo, é realizada a partir de valores (*score*) que são atribuídos para cada aminoácido de uma sequência, baseados na sua afinidade de interação com o anticorpo. Esta afinidade é conferida aos aminoácidos de acordo com as suas propriedades físico-químicas. Uma região da proteína para ser considerada um epítopo linear pelo preditor precisa ter um mínimo de aminoácidos em sequência com valor de *score* acima do escolhido pelo pesquisador (LARSEN *et al*, 2006). A limitação dos recursos *in vitro* e *ex vivo* se tornam melhor aproveitados promovendo respostas para a compreensão da interação entre proteínas, conhecimentos da estereoquímica dos aminoácidos e das informações adquiridas das estruturas terciárias, prevendo a conformação de proteínas a partir da sequência primária dos aminoácidos (PROSDOCIMI *et al*, 2002).

## 2. JUSTIFICATIVA

Sabendo-se da gravidade e das complicações causadas pelas principais arboviroses circulantes no Brasil e nas Américas, além da alta probabilidade de expansão dos *flavivírus*, a Organização Mundial de Saúde coloca como prioridade o desenvolvimento de testes diagnósticos específicos para tais doenças emergentes (WHO, 2016). O panorama observado atualmente no Brasil é de diagnósticos clínicos e laboratoriais que se confundem, devido às semelhanças dos sintomas iniciais de arboviroses tais como Dengue, Zika, febre amarela e febre do Chikungunya, e na manifestação de sintomas que não seguem um padrão semelhante nos indivíduos infectados. Para uma minoria de casos suspeitos para arboviroses é realizado o diagnóstico pela a RT-PCR, como preconizado pelo Ministério da Saúde. As amostras dos pacientes devem ser encaminhadas para os laboratórios centrais (LACEN), porém, a logística para armazenamento e transporte para a preservação do RNA viral demanda temperaturas abaixo de  $-70^{\circ}\text{C}$ , o que dificulta o processo em uma situação na qual o número de pacientes infectados é muito grande, portanto, a capacidade para atender a esta demanda é ilusória. Não há plataformas de instrumentação, nem técnicos hábeis suficientes para a execução das técnicas de RT-PCR para a detecção das arboviroses, altamente negligenciadas nos últimos 2 anos, por causa da pandemia de COVID-19 causada pelo SARS-CoV-2. Esses problemas também são encontrados para a realização do PRNT, considerado teste diagnóstico sorológico padrão-ouro pelo CDC, entretanto, este teste exige qualificação técnica para a sua execução, laboratórios de referência tecnológica, demanda tempo e alto investimento financeiro. Os testes diagnósticos sorológicos disponíveis atualmente não conferem confiabilidade, porque apresentam respostas cruzadas entre infecções por flavivírus. Estes falso-resultados podem ocasionar consequências graves para o paciente, que precisa receber o tratamento ideal, vistas as complicações que podem surgir no decorrer destas doenças.

Portanto, conclui-se que o teste diagnóstico ideal para Zika deve ser um teste *point of care*, que possa ser realizado na hora e no local da necessidade do paciente. Este teste deve ser desenvolvido com alta tecnologia e inovação, fornecer resultados diferenciais entre arboviroses, ser sensível, específico, rápido e de simples execução.

Os planos de preparação de atendimento aos pacientes durante os surtos de doenças virais precisam ir além dos laboratórios nacionais de referência, incluindo também os laboratórios hospitalares locais de resposta de primeira linha e fortalecendo as capacidades pontuais. Em particular, o diagnóstico de arboviroses é complicado pela sobreposição geográfica da circulação de diversos arbovírus, bem como a coincidência dos sintomas e os resultados dos

testes sorológicos de diagnósticos que são confundidos devido às reações cruzadas para a detecção de flavivírus. Para que o Brasil esteja preparado para uma epidemia causada por arbovírus, é preciso que as instituições de pesquisa e saúde nacionais e internacionais se dediquem a este propósito. Portanto, este trabalho propõe a seleção de epítomos por bioinformática e o screening de peptídeos antigênicos de ZIKV utilizando microarranjos, para o desenvolvimento de um teste diagnóstico sorológico diferencial e específico para a Zika.

### 3. HIPÓTESE

Peptídeos antigênicos específicos do ZIKV são capazes de serem reconhecidos de forma diferencial por anticorpos presentes nos soros de pacientes infectados pelo ZIKV e podem compor um sistema de diagnóstico sorológico para Zika, que minimize o risco de respostas cruzadas.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo geral

Identificar peptídeos de ZIKV para compor um sistema de diagnóstico sorológico diferencial, sensível e eficiente para a Zika, a partir de epítomos selecionados por predições *in silico* e avaliados *in vitro*.

#### 4.2 Objetivos específicos

- Realizar a predição de epítomos lineares para células B a partir das sequências de ZIKV, identificar, *in silico*, epítomos antigênicos específicos de ZIKV e desenhar peptídeos compostos pelos antígenos selecionados.
- Sintetizar quimicamente e purificar os peptídeos selecionados de ZIKV.
- Avaliar, *in vitro*, através de microarranjo proteico, a antigenicidade e a capacidade de diagnóstico diferencial dos peptídeos em discriminar soros de pacientes positivos especificamente para Zika.
- Testar, por meio de ensaios sorológicos convencionais de laboratório, o potencial de diagnóstico dos peptídeos para compor um teste sorológico diferencial para Zika.
- 

### 5. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 5.1 Estratégia de trabalho

Este projeto visa a identificação de peptídeos do ZIKV, que sejam reconhecidos diferencialmente de DENV -1, -2, -3 e -4 e YFV e, que dessa forma, possam compor um teste sorológico específico para Zika. Para este fim, a metodologia traçada consiste em 4 etapas principais:

- Etapa 1 - Coleta e caracterização de amostras de soros humanos;
- Etapa 2 - Desenho de peptídeos com potencial antigênico diferencial para Zika;
- Etapa 3 – Síntese e purificação dos peptídeos; e

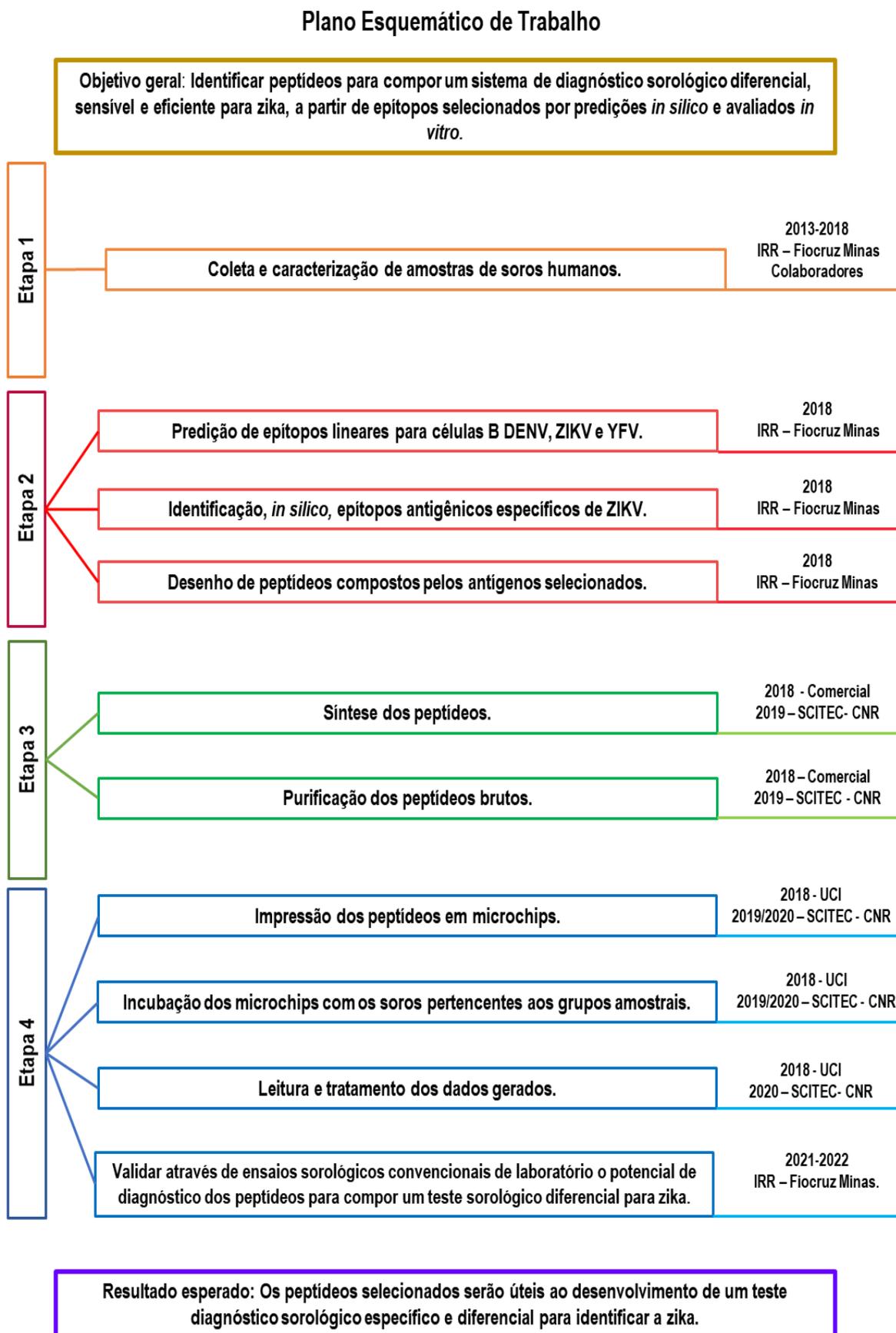
Etapa 4 - Avaliação da capacidade dos peptídeos em discriminar infecções por ZIKV, através de ensaios de microarranjo proteico e ensaios sorológicos de rotina de laboratório.

As etapas 2 e 3 foram realizadas duas vezes, a primeira em 2018, em colaboração com a University of California – Irvine, e a segunda, em 2019 e 2020, durante o doutoramento sanduíche no Istituto di Scienze e Tecnologie Chimiche "Giulio Natta" (SCITEC) – Conselho Nacional de Pesquisas da Itália (CNR).

A estratégia experimental global está representada e detalhada no esquema abaixo, no qual as etapas 1 e 2, representadas respectivamente em laranja e vermelho foram realizadas no Instituto René Rachou/ Fiocruz Minas. A etapa 3, em verde, que constitui a síntese química dos peptídeos, foi realizada comercialmente em 2018, e no SCITEC - CNR, em 2019. A etapa 4, em azul, de avaliação do reconhecimento diferencial dos peptídeos por soros humanos em microarranjos proteicos, foi realizada, primeiramente em 2018, na University of California – Irvine, e em 2019/2020 no SCITEC – CNR.

## 5.1 Estrattégia de Trabalho

Figura 6 – Estratégia de Trabalho



## 5.2 Etapa 1: Coleta e caracterização de amostras de soros humanos

### 5.2.1 Apresentação das amostras utilizadas e Comitê de ética

Com o intuito de realizar a etapa 1 deste projeto, foram obtidos e caracterizados 300 soros humanos recebidos de colaborações com o Dr. Maurício Lacerda Nogueira – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), Dr. Flávio Fonseca – Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Dr. Pedro Augusto Alves – Grupo de Doenças Virais – IRR – Fiocruz Minas, Dra. Marina Cretich - Chemistry and Technology for Bioscience Group – SCITEC - CNR e coletas da própria equipe de trabalho do Dr. Carlos Eduardo Calzavara Silva - Grupo Imunologia Celular e Molecular - IRR - Fiocruz Minas.

Para a caracterização dos soros foram realizados ELISA IgM e IgG, testes imunocromatográficos IgM, PRNT e qRT-PCR. A data e a origem da coleta também foram critérios fundamentais para a composição dos grupos amostrais, como descrito na Tabela 3.

**Tabela 3: Banco de amostras de soros humanos caracterizadas e utilizadas neste trabalho**

Grupos amostrais	Quantidade de soros	Testes realizados para a caracterização	Origem da coleta
<b>Zika– aguda</b>	16	qRT-PCR Eco diagnóstica Trioplex – Dengue, Zika e Chikungunya	Belo Horizonte - MG/Brasil
		IgM Zika Euroimmun	Belo Horizonte - MG/Brasil
<b>Zika – convalescença</b>	62	20 IgG Euroimmun/ IgM Novagnost	Belo Horizonte - MG/Brasil
		28 IgG Zika ELISA <i>in house</i> USP	São José do Rio Preto - SP/Brasil
		14 IgM/IgG PRNT	Santo Antônio do Monte - MG/Brasil
<b>Dengue - convalescença (2014)</b>	42	14 IgM/IgG ELISA Dengue, Zika and Chikungunya (Euroimmun)	Divinópolis - MG/Brasil
		28 IgG ELISA Dengue Pan Bio	São José do Rio Preto - SP/Brasil
<b>Dengue - convalescença tardia</b>	30	IgG ELISA Dengue Abcam	São José do Rio Preto - SP/Brasil
<b>Zika e dengue – convalescença tardia</b>	30	IgG ELISA Zika <i>in house</i> USP + ELISA Dengue Abcam	São José do Rio Preto - SP/Brasil
<b>Febre amarela – convalescença</b>	10	IgM/IgG Febre Amarela – FUNED	Belo Horizonte - MG/Brasil
<b>Negativos para Zika e dengue</b>	60	30 IgG Euroimmun Zika - Dengue/ IgM Novagnost Zika/ Euroimmun IgM Zika	Belo Horizonte - MG/Brasil
		30 IgG ELISA Dengue Abcam + IgG ELISA Zika USP	São José do Rio Preto - SP/Brasil
<b>Zika – Itália</b>	4	PRNT	Milão – LOM/Itália
<b>Dengue – Itália</b>	20	PRNT	Milão - LOM/Itália
<b>Chikungunya – Itália</b>	4	PRNT	Milão – LOM/Itália
<b>Saudáveis – Itália</b>	22	-	Milão – LOM/Itália

Nota: O painel acima apresenta o grupo, a caracterização e a origem das amostras utilizadas neste trabalho.

Os 300 soros humanos foram caracterizados e distribuídos em 11 grupos distintos. Todos os testes realizados visaram minimizar as possíveis reações cruzadas durante os ensaios de microarranjo de proteínas.

**Grupo Zika – fase aguda** é composto por 16 amostras coletadas de voluntários em Belo Horizonte entre 2015 e 2016 pela equipe do grupo ICM – IRR – Fiocruz Minas. As amostras foram caracterizadas por qRT-PCR, utilizando o kit TRIOPLEX para detecção de RNA de ZIKV, DENV e CHIKV (Eco Diagnóstica). As 16 amostras foram confirmadas positivas unicamente para Zika. As mesmas amostras foram testadas para detecção de IgM por ELISA (Euroimmun).

**Grupo Zika – convalescença** é composto por 62 amostras:

(i) 20 soros coletados em 2015, em Belo Horizonte, pela equipe de pesquisa do Dr. Flávio Fonseca - UFMG, e testados positivos para IgM e IgG, utilizando teste rápido imunocromatográfico – Novagnost (IgM) e ELISA - Euroimmun (IgG).

(ii) 28 soros coletados em 2015 e 2016, em São José do Rio Preto, pela equipe do Dr. Maurício Nogueira – FAMERP, e caracterizados como IgG positivos para Zika em ELISA, teste desenvolvido e realizado na Universidade de São Paulo (USP).

(iii) 14 soros coletados em 2015 e 2016, em Santo Antônio do Monte, pela equipe do ICM – IRR. Foram testados positivos por ensaios de PRNT para a detecção de anticorpos neutralizantes para ZIKV pela equipe da FAMERP.

**Grupo Dengue convalescença (2014)** é composto por 42 soros de indivíduos positivos para dengue coletados nos anos anteriores a 2014. A data da coleta é muito importante, porque neste período o ZIKV ainda não havia sido introduzido no Brasil e, desta forma, é menor probabilidade de respostas cruzadas para diferentes arbovírus durante a caracterização dos soros. As 42 amostras foram obtidas de duas fontes diferentes:

(i) 14 soros coletados em Divinópolis pela equipe do ICM - IRR e testados por ELISA para a detecção de IgM e IgG para dengue, Zika e febre amarela através de kits comerciais da Euroimmun. Todas as amostras foram positivas somente para dengue.

(ii) 28 soros coletados em São José do Rio Preto e testadas IgG positivas para dengue por ELISA - Pan Bio.

**Grupo Dengue convalescença tardia** é composto por 30 soros coletados em São José do Rio Preto e testados IgG positivos para dengue por ELISA (Abcam).

**Grupo Zika e dengue – convalescença tardia.** As 30 amostras foram confirmadas IgG positivas por ELISA, utilizando o teste comercial Abcam para dengue e protocolo USP para Zika.

**Grupo Febre amarela – convalescença** é composto por 10 amostras de soros coletados em Belo Horizonte pela equipe do Dr. Pedro Alves e testadas positivas para IgM e IgG em ELISA para febre amarela, realizado pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED).

**O grupo controle negativo para Zika e dengue** é composto por 60 soros, sendo que:

(i): 30 soros coletados em Belo Horizonte e caracterizados como negativos em testes para a detecção de IgM para Zika, em teste imunocromatográfico rápido – Novagnost e ELISA – Euroimmun. As amostras também foram negativas para a detecção de IgG para Zika e para dengue em ELISA – Euroimmun.

(ii): 30 soros foram coletados de indivíduos saudáveis em São José do Rio Preto e testados IgG negativos para dengue em ELISA – Abcam e também negativos para Zika – teste USP.

Os últimos quatro grupos de amostras foram obtidos a partir da colaboração com a Dra. Marina Cretich e coletados em Milão - Itália, no Hospital San Raffaele, a saber:

(i): 4 soros positivos para **Zika** (PRNT).

(ii): 20 soros positivos para **dengue** (PRNT).

(iii): 4 soros positivos para **chikugunya** (PRNT).

(iv): 22 soros que compõem o banco de amostras utilizado neste projeto são de voluntários **saudáveis** coletados em Milão.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas envolvendo Seres Humanos do Instituto René Rachou com parecer favorável de número 16104819.0.0000.5091.

## 5.2.2 Protocolos de caracterização dos soros humanos

Todos os testes comerciais utilizados: imunocromatográfico rápido, ELISA e qRT-PCR foram realizados seguindo as instruções dos fabricantes. O protocolo do método ELISA realizado pela equipe colaboradora na USP não pode ser descrito, por motivo de sigilo para requerimento de patente como produto para uso diagnóstico.

### 5.2.2.1 Ensaio de Neutralização por Redução de Placa – PRNT

Os ensaios de PRNT foram realizados em parceria com a equipe de pesquisa do Dr. Maurício Nogueira e pelo Hospital San Raffaele.

Células Vero foram cultivadas em placas de 6 poços a uma densidade de  $6 \times 10^5$  células/poço a 37 °C por 24 h. Os soros humanos foram inativados a 56°C por 30 minutos. Para detectar anticorpos neutralizantes contra ZIKV, todas as amostras de soro inativado foram inicialmente diluídas com meio MEM (Gibco, Invitrogen) e 10 mg/mL de fração V de albumina sérica bovina em uma diluição de 1:10, seguida com diluições seriadas de duas vezes. Algumas amostras foram diluídas até que o ponto final da atividade de neutralização fosse alcançado. Os vírus ZIKV foram diluídos com meio MEM para obter uma concentração de infectividade viral de 50%. Depois disso, 100 µl da suspensão viral foram incubados com um volume igual de cada soro diluído ou meio livre de soro (controle de não neutralização), em duplicata, a 37 °C por 1 hora. A mistura de ZIKV e soro foi inoculada em monocamadas de células Vero com 60% de confluência e incubadas a 37°C com agitação leve constante por 2 horas. As células inoculadas foram suavemente sobrepostas com meio semi sólido contendo soro fetal bovino (SFB) a 2% e mantidas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. No sexto dia de incubação, as células foram fixadas com uma solução de formol (3,5 M) por 1 hora, lavadas 6 vezes H<sub>2</sub>O e incubadas por 30 minutos com cristal violeta a 1%. As células foram novamente lavadas 6 vezes H<sub>2</sub>O e secas de um dia para o outro. O número de placas de lise foi contado sendo os valores de PRNT50 e PRNT90 definidos como um recíproco da maior diluição do soro testado que resultou em uma redução da infectividade viral em 50% ou 90% quando comparado ao controle de não neutralização, respectivamente.

### **5.3 Etapa 2: Desenho de peptídeos com potencial antigênico diferencial para ZIKV**

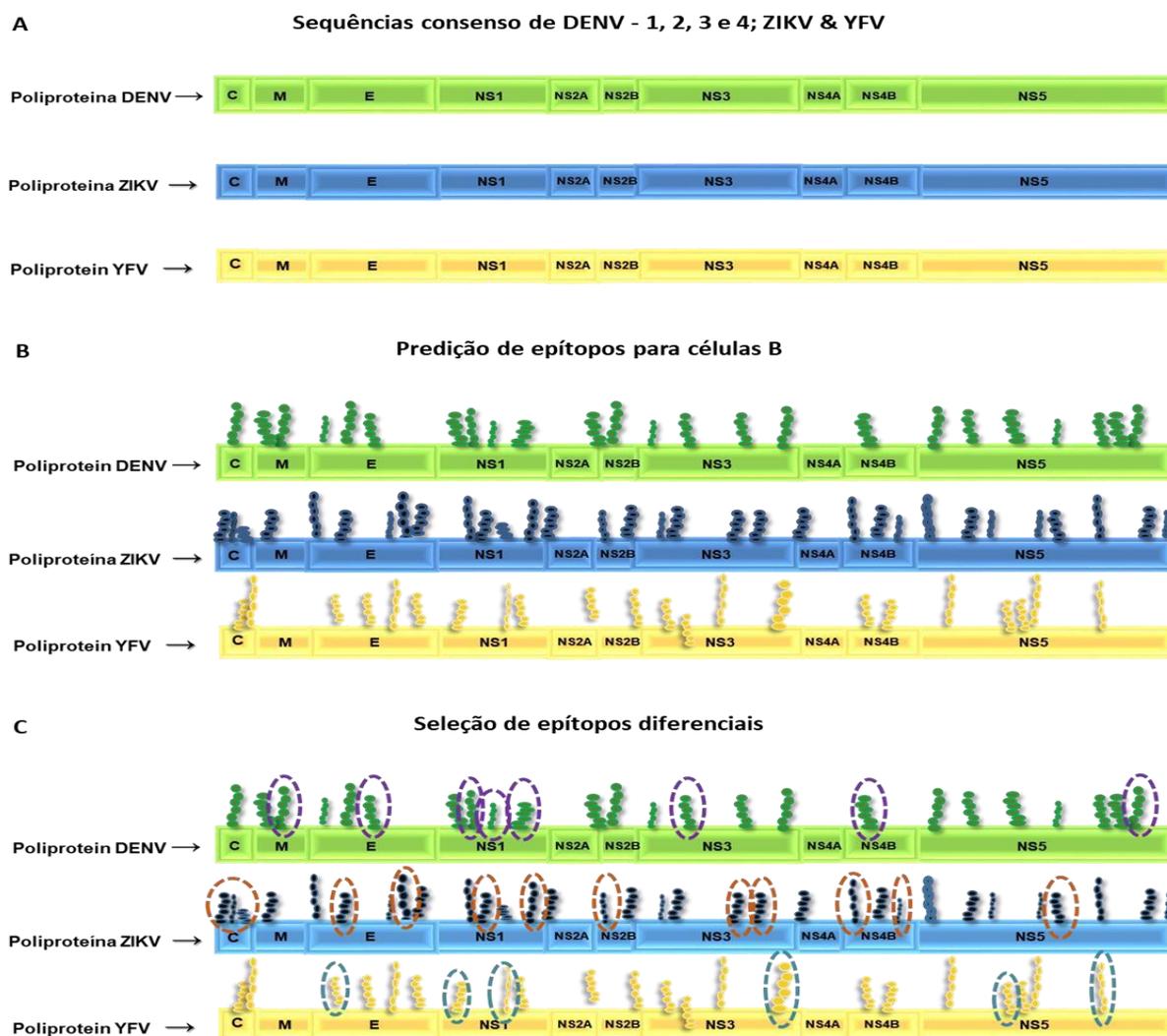
O objetivo principal desta etapa consiste em identificar potenciais regiões antigênicas específicas de ZIKV, que sejam diferentes de DENV e YFV. Esta etapa foi realizada em dois momentos diferentes, em 2018 e 2019, utilizando sempre o mesmo método *in silico* para a criação de um banco de dados próprio para este trabalho. Foi feito o *download* de todas as sequências completas de aminoácidos de ZIKV, DENV (1 - 4) e YFV isolados de hospedeiros humanos no Brasil (até junho de 2019), disponíveis no Genbank - NCBI. Foram selecionadas um total de 419 sequências para compor o banco de dados: 80 sequências de ZIKV; 276 sequências de DENV incluindo os 4 sorotipos (46 isolados de DENV-1, 95 de DENV-2, 77 de DENV-3, 58 de DENV-4) e 63 sequências de YFV.

As sequências de ZIKV, DENV (1 - 4) e YFV foram alinhadas entre si gerando uma sequência consenso para cada espécie de vírus utilizando o programa Multalin (versão disponível online inserir aqui o link). As quatro sequências consenso de DENV obtidas, referentes aos sorotipos 1 a 4, foram realinhadas gerando uma única sequência-consenso. Desta

forma, a partir das três sequências-consenso obtidas (ZIKV, DENV e YFV), foi realizado um Blast-p e as sequências disponíveis que apresentaram maior valor de identidade com as respectivas consenso foram selecionadas para a próxima etapa.

Utilizando o programa Bepipred 2.0 (versão disponível online <https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?BepiPred-2.0>) foi realizada a predição de epítomos para células B para ZIKV, DENV e YFV. Os epítomos identificados foram analisados considerando a semelhança e a diferença entre os epítomos de ZIKV quando comparados aos epítomos de DENV e YFV; a localização na poliproteína e o *score* médio de cada epítomo utilizado. Inicialmente a predição foi realizada aplicando o valor padrão de setup do programa, que corresponde a um *score* médio do epítomo de valor igual ou superior a 0,5. Posteriormente, visando uma maior especificidade dos epítomos gerados, este valor foi ajustado para 0,52. Na Figura 7 está representado esquematicamente o processo de seleção dos epítomos.

**Figura 7: Representação do processo de seleção dos epítomos.**



Em A, estão representadas as sequências consenso de DENV, ZIKV e YFV. Em B, a identificação dos epítomos para células B quando realizada a predição pelo Bepipred 2.0. Em C, a seleção dos epítomos potencialmente diferenciais entre DENV, ZIKV e YFV que foram utilizados no screening por microarranjos.

Em seguida, os epítomos candidatos foram submetidos a análises na plataforma ExPASy utilizando a ferramenta ProtScale para a avaliação de hidrofobicidade dos peptídeos por Kyte J. & Doolittle R. F. e a análise de tendência transmembrana por Zhao, G. & London E. Os epítomos foram submetidos novamente ao Blast-p para evitar a seleção de possíveis peptídeos similares a outros patógenos ou proteínas humanas.

O tamanho dos epítomos selecionados também foi considerado como um elemento importante para o reconhecimento diferencial. Desta forma, os epítomos foram padronizados de forma que os peptídeos finais a serem testados *in vitro* fossem compostos por ao menos 9 aminoácidos e não excedessem 30 aminoácidos.

#### **5.4 Etapa 3: Síntese de peptídeos com potencial antigênico diferencial**

Em 2018, os peptídeos selecionados de ZIKV foram sintetizados comercialmente pela empresa BioMatik, contendo uma molécula de biotina na porção N-terminal. Tais peptídeos foram sintetizados diretamente em escala nanométrica em lâminas de vidro recobertas com nitrocelulose, estando prontas para uso em ensaios de microarranjo proteicos.

Já em 2019, os peptídeos resultantes da segunda seleção de ZIKV e, desta vez, um peptídeo de DENV e um peptídeo de YFV foram sintetizados quimicamente a partir de protocolos estabelecidos no SCITEC-CNR, durante o período de doutorado sanduíche.

Os peptídeos foram sintetizados em equipamento Fmoc-SPPS microwave-assisted, Biotage ALSTRA Iniciador + sintetizador de peptídeos. De acordo com as sequências peptídicas de interesse, os aminoácidos foram pesados e dissolvidos em uma concentração de 0,25 mol/l.

Os peptídeos foram montados em aparelho de resina de cloreto de 2-clorotritilo, no qual ocorreu o alongamento da sequência dos peptídeos por ciclos interativos de acoplamento de aminoácidos (usando cianoglicoxato de etila-2-oxima como ativadores) e proteção por fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) com solução de piperidina a 20% em DMF. Em seguida, para a clivagem dos peptídeos ligados à resina, foi utilizada a solução 2,5% de TIS, 2,5% de tioanisol, 2,5% de água e 92,5% de TFA (5 mL/100-150 µl). Os tubos foram agitados em agitador orbital por 3 horas em temperatura ambiente. Foi adicionado Et<sub>2</sub>O gelado na proporção

1:8 em TFA (5 ml TFA/40 ml Et<sub>2</sub>O), sob leve agitação. A resina foi, em seguida, lavada adicionando-se gotas de TFA na solução de éter (3 ml /100 -150 µl). Os tubos foram centrifugados por 40 segundos a 7000 rpm. O supernadante foi descartado. O pellet formado foi ressuspensionado em Et<sub>2</sub>O gelado (20 ml/100 -150 µl). Os tubos foram novamente centrifugados por 40 segundos a 7000 rpm e o sobrenadante descartado.

O pellet foi armazenado em -20°C até a purificação.

Os peptídeos brutos foram purificados em aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Performance (HLPC). Aos peptídeos anteriormente dissolvidos em Et<sub>2</sub>O, foi adicionado o solvente polar (70% MeCN/ 30% H<sub>2</sub>O). O tubo foi levado ao sonificador para homogeneização da solução. Em seguida, o Et<sub>2</sub>O foi evaporado utilizando jatos de N<sub>2</sub>. A solução (2 mL) límpida, homogênea e de cor amarelada foi transferida através de uma seringa para o equipamento de HLPC, que utiliza um gradiente de concentração que varia de soluções solventes de 90% H<sub>2</sub>O / 10% MeCN até 30% H<sub>2</sub>O / 70% MeCN, até a purificação do produto em coluna de sílica.

Em seguida, o produto purificado foi liofilizado.

#### **5.5 Etapa 4: Microarranjos de peptídios para identificação dos peptídeos reconhecidos diferencialmente por anticorpos anti-ZiIKV**

Após a seleção dos epítomos *in silico* e a produção dos peptídeos, foram realizadas triagens por meio da técnica de microarranjo de peptídeos para identificar os antígenos capazes de serem reconhecidos especificamente por anticorpos anti-ZIKV presentes nos soros de indivíduos infectados por Zika.

A técnica foi realizada duas vezes neste trabalho, como descrito anteriormente, em colaboração com a UCI, em 2018, e em colaboração com o SCITEC – CNR, em 2019/2020.

##### **5.5.1 Microarranjos proteicos desenvolvidos na UCI, em 2018**

A técnica foi executada pelo Dr. Carlos Eduardo Calzavara Silva e Dr. Rafael Ramiro de Assis no Laboratório de Pesquisa em Proteômica Aplicada na UCI - EUA, em colaboração com o Dr. Philip Felgner.

Os peptídeos de ZIKV, bem como proteínas inteiras E e NS1 de ZIKV e DENV foram produzidas comercialmente pela empresa BioMatik. A Figura 8 representa a organização de um *pad* utilizado no microarranjo proteico na UCI: em cada *pad* foram impressas as proteínas E e NS1 de ZIKV e DENV, que foram utilizadas como controles positivos. Como controles foram utilizados *spots* vazios (sem peptídeos), anticorpos purificados e anticorpos contra cada isotipo

sendo os peptídeos identificados *in silico* impressos em triplicata. Cada um destes pads foi incubado com uma amostra diferente de soro humano, também em triplicata.

**Figura 8: Representação da organização de um pad do microarranjo proteico.**

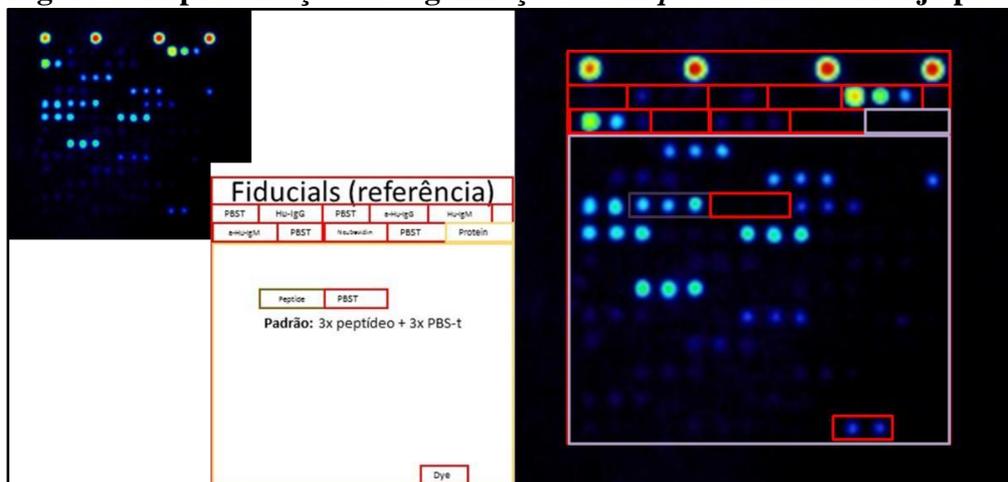


Imagem representativa gerada durante a leitura de fluorescência dos controles positivos e peptídeos em *scanner* ArrayCam®. Os quatro pontos vermelhos visualizados no alto do arranjo correspondem às proteínas controle E e NS1 de ZIKV e DENV. Logo abaixo estão dispostos, intercaladamente, os *spots* vazios e os controles de isotipo. Em seguida, os peptídeos são visualizados em triplicata, intercalados por *spots* vazios. Cada arranjo foi submetido à interação com uma amostra de soro, esperando que os peptídeos identificados *in silico* fossem reconhecidos especificamente pelas amostras de soro positivas para Zika.

Soros dos pacientes, escolhidos de forma aleatória, foram diluídos (1:50) em solução de bloqueio – *Protein Array Blocking Buffer* (GVS FILTER TECHNOLOGY, SANFORD, MAINE, EUA) e incubados por 1h em temperatura ambiente (TA) sob leve agitação. Ao mesmo tempo, os microarranjos foram reidratados com solução de bloqueio por 1h a TA também sob leve agitação. Os microarranjos foram lavados 5 vezes com TBS-T, secos e incubados com os soros humanos por 1 h em TA sob leve agitação. Em seguida, os microarranjos foram novamente lavados 5 vezes com TBS-T e incubados com os anticorpos secundários conjugados com biotina anti porção Fc de IgM e IgG humanos (diluídos 1:200 em solução de bloqueio). Para a detecção do sinal, os microarranjos foram lavados 5 vezes com TBS-T e incubados por 30 minutos em solução de estreptavidina conjugada com nanocristais fluorescentes (QDOT®, THERMO). Posteriormente, os pads foram escaneados para aquisição de imagem com o *scanner* ArrayCam® (GRACE-BIOLABS) utilizando leitura para IgG de Q800 (800nm) e IgM Q655 (655nm). A quantificação foi realizada utilizando o software *ScanArray Express*

(PERKIN ELMER) versão 3.0, utilizando a subtração automática do ruído de fundo (MÉTODO LOWESS).

### **5.5.2 Microarranjos proteicos desenvolvidos no SCITEC – CNR, em 2019 - 2020**

Entre setembro de 2019 e fevereiro de 2020, durante o período de doutorado sanduíche no SCITEC – CNR, sob a supervisão da Dra. Marina Cretich e suporte científico do Dr. Alessandro Gori, os experimentos foram realizados 100% *in house*, desde a síntese dos peptídeos, bem como os microarranjos de proteínas. Considerando o tempo e os recursos disponíveis, os ensaios foram limitados a testar 5 peptídeos: 3 peptídeos de ZIKV, 1 peptídeo de DENV e 1 peptídeo de YFV.

Os resultados do *screening* dos peptídeos realizados na UCI, em 2018, foram fundamentais para a decisão de escolha dos peptídeos de ZIKV a serem testados no novo microarranjo, que trouxe a possibilidade de investigar e confirmar diferentes possibilidades de um mesmo peptídeo que se destacou por apresentar um resultado promissor de reconhecimento específico e diferencial para os soros positivos de Zika. Já os peptídeos avaliados de DENV e YFV foram selecionados porque foram identificados na proteína NS1, que é sabidamente secretada durante a multiplicação dos flavivírus, sendo alvo do sistema imune e, conseqüentemente, a probabilidade de serem reconhecidos por ensaios sorológicos é alta. Outro motivo importante para a seleção destes peptídeos é que as sequências de aminoácidos são muito diferentes entre si (ZIKV, DENV e YFV), aumentando a possibilidade de que fossem reconhecidos diferencialmente por anticorpos específicos para Zika, dengue, e febre amarela.

#### **5.5.2.1 Preparação das lâminas de silicone**

Os microarranjos foram realizados em lâminas de silicone que foram limpas utilizando jatos de N<sub>2</sub> e submetidos ao aparelho Plasmaclean para a remoção de resíduos orgânicos. Em seguida, foi realizada a incubação das lâminas com o polímero Copoly-N3 (1% Copoly-N3, 20% sulfato de amônio, H<sub>2</sub>O) por 30 minutos. As lâminas foram submersas em H<sub>2</sub>O deionizada, secas em N<sub>2</sub> e colocadas em estufa a 80°C por 20 minutos.

#### **5.5.2.2 Impressão dos peptídeos**

Os peptídeos (1 mM) foram diluídos em tampão (5 mM Sulfato de cobre pentahidratado; 150 mM Ácido Ascórbico; 20 mM Tris (3- hidroxipropiltriazolilmetil) amina; Ac. Trez. N<sub>2</sub>) e impressos por Scienion AG's sciFLEXARRAYER S12 em oito spots. As lâminas foram incubadas de um dia para o outro em solução saturada de NaCl em câmara fechada em TA.

Após 18h, as lâminas foram bloqueadas com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) por 1h, lavadas por imersão em H<sub>2</sub>O deionizada e secas com N<sub>2</sub>.

### **5.5.2.3 Incubação com os soros humanos e anticorpos secundários**

Os soros foram diluídos a 1:50 em tampão de incubação (0,05 Tris/HCl, 0,15 M NaCl, 0,02% Tween 20) + 1% BSA e, em seguida, incubados com os microarranjos por 30 minutos em câmara fechada, TA, sob leve agitação. As lâminas foram então transferidas para placas de Petri contendo PBS para a lavagem por 10 minutos, sob suave agitação. Posteriormente, foram submersas em H<sub>2</sub>O deionizada e secas com N<sub>2</sub>.

Em seguida, os microarranjos foram incubados com os anticorpos secundários anti-IgM e anti-IgG humanos, diluídos a 1:1000 em tampão de incubação + 1 % BSA por 30 minutos em TA, sob leve agitação em câmara fechada e na ausência de luz. As lâminas foram posteriormente lavadas com solução de lavagem (0,05 Tris/HCl, 0,25 M NaCl, 0,05% Tween 20) em placas de petri sob leve agitação por 15 minutos. As lâminas foram submersas em H<sub>2</sub>O deionizada, secas com N<sub>2</sub> e submetidas à leitura da fluorescência em scanner *ArrayCam*® (GRACE-BIOLABS). A quantificação do sinal foi realizada utilizando o software *ScanArray Express* (PERKIN ELMER) versão 3.0 utilizando a subtração automática do ruído de fundo (MÉTODO LOWESS).

### **5.5.3 Confirmação do reconhecimento diferencial dos peptídeos por ELISA**

Os peptídeos selecionados por microarranjo, capazes de distinguir soros positivos para Zika, de soros positivos para dengue e febre amarela, foram testados por ELISA para que fosse feita a confirmação do reconhecimento dos peptídeos por técnica experimental sorológica convencional de laboratório. Esta etapa foi realizada no Instituto René Rachou – Fiocruz Minas.

Para tal, foram utilizadas microplacas de 96 poços de fundo chato (CORNING), sensibilizadas utilizando 50 µl de antígeno na concentração de 1,0 µg/ml em tampão carbonato bicarbonato (pH=9,6) e incubadas a 37°C por 1 h em câmara úmida fechada. Em seguida, as placas foram transferidas para 4°C e incubadas por 16h, lavadas 3 vezes com 300 µl de PBS-T 0,05% e imediatamente secas. O bloqueio de reações inespecíficas foi realizado utilizando-se 200 µl de PBS-T + 2% de soro fetal bovino (SFB) por 2 h a 37°C em câmara úmida fechada. Em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes com 300 µl de PBS-T e secas. As amostras de soros humanos foram diluídas a 1:100 em PBS-T + 0,5% de soro fetal bovino (SFB) sendo 50 µl foram aplicados em cada poço, em triplicata. As placas foram incubadas em câmara úmida por 1 h a 37°C, lavadas 3 vezes com 300 µl de PBS-T e secas. Em seguida foram adicionados

50 µl de anticorpos secundários conjugados com peroxidase anti-IgM e anti-IgG humanos diluídos a 1:500, em PBS-T + 0,5% SFB e incubadas por 1 h a 37°C em câmara úmida e foi lavada 3 vezes utilizando 300 µl de PBS-T, seca. Para a revelação da reação foram adicionados 50 µl de TMB (SIGMA). Após 5 minutos a reação foi interrompida adicionando-se 50 µl de ácido sulfúrico 1N por poço. A leitura de absorbância foi realizada em leitor de ELISA a 450/620 nm.

#### 5.5.4 Análise dos dados

As análises dos ensaios de microarranjo foram realizadas após a quantificação de fluorescência em scanner de alta resolução e ajuste dos dados em software com normalização dos dados gerados: a eliminação do ruído de fundo pelo método lowess e, em seguida, foi subtraída a média do sinal dos *spots* do controle negativo interno de cada microarranjo. Para determinação dos sinais positivos, foi considerado um *cut-off* de 1 desvio padrão acima da média dos controles negativos internos de cada arranjo.

Para a avaliação do reconhecimento dos peptídeos pelos soros, tanto nos ensaios de microarranjo, quanto no ELISA, foi realizada a comparação entre os grupos amostrais definidos utilizando o teste Kluskal-Wallis com correção de Dunn. Os testes foram realizados no programa GraphPad Prisma versão 8.0 (GRAPHPAD SOFTWARE INCORPORATED) sendo considerados significativos os valores de \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ . Também foi realizada a Curva ROC para obtenção dos valores de especificidade e sensibilidade dos peptídeos testados e reconhecidos diferencialmente.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Grupos amostrais caracterizados

Este trabalho utilizou 300 amostras de soros humanos caracterizados criteriosamente em 11 grupos amostrais distintos, considerando-se a data; local de coleta; resultados em diferentes testes sorológicos e moleculares, que formaram um banco de amostras apropriado para ser utilizado em um projeto que visa justamente o desenvolvimento de uma tecnologia que proporcione resultados robustos durante o diagnóstico específico e diferencial para Zika. Na tabela 4 estão descritos os 11 grupos de soros que foram utilizados nos ensaios de screening dos peptídeos realizados *in vitro*.

**Tabela 4: Grupos de amostras de soros humanos utilizados nos ensaios *in vitro***

Zika aguda	Zika Convalescência	Dengue convalescência (2014)	Dengue convalescência tardia	Zika e dengue convalescência tardia	Febre amarela convalescência	Negativos Zika e dengue	Zika Itália	Dengue Itália	Chikungunya Itália	Saudáveis Itália
(IgM e RNA)	(IgM/IgG)	(IgM/IgG)	(IgG)	(IgG)	(IgM/IgG)	(IgM/IgG)	(IgM/IgG)	(IgM/IgG)	(IgM/IgG)	(IgM/IgG)
n = 16	n = 62	n = 42	n = 30	n = 30	n = 10	n = 60	n = 4	n = 20	n = 4	n = 22
ELISA	ELISA	ELISA	ELISA	ELISA	ELISA	ELISA	PRNT	PRNT	PRNT	-
qRT-PCR	PRNT									
	IMCR									

Nota: Os soros estão apresentados nos grupos amostrais considerando a detecção de IgM, IgG e/ou RNA viral, seguido pelo número de amostras que compõem cada grupo e os testes que foram utilizados para caracterizá-los.

### 6.2 Identificação *in silico* de epítomos de ZIKV potencialmente específicos, síntese e purificação de peptídeos

Durante a segunda etapa foi realizada a predição de epítomos lineares para células B a partir das sequências de ZIKV, DENV e YFV a seleção, *in silico*, de epítomos antigênicos específicos e o desenho dos peptídeos compostos pelos epítomos selecionados.

Desta forma, 71 epítomos de ZIKV foram preditos e, destes, 30 foram selecionados (Tabela 5). Para esta seleção, além de considerar epítomos com valores de *score* superiores a 0,5, as suas sequências foram comparadas às mesmas regiões nas sequências de DENV1, -2, -3 e -4 e YFV. Aqueles epítomos de ZIKV, que possuíam menor identidade com os vírus DENV e YFV, deveriam apresentar maior especificidade no reconhecimento por anticorpos distintos para ZIKV.

Os 30 epítomos selecionados foram identificados distribuídos em quase toda a extensão da poliproteína, nas proteínas estruturais: C, M e E, e em 6 proteínas não-estruturais: NS1, NS2-

A e NS2-B, NS3, NS4-B e NS5. A partir destes epítomos, foram desenhados peptídeos contendo entre 9 a 30 aminoácidos (aa). No caso dos epítomos preditos com mais de 30 aa, estes foram divididos em 2 partes de modo que fossem compostos por, no máximo, de 30 aa.

Também foram preditos epítomos para a sequência consenso de DENV, referente aos quatro sorotipos. Ao todo, foram obtidos 49 epítomos e, destes, 8 epítomos identificados nas proteínas M, E, NS1, NS3, NS4-B e NS5, foram selecionados por apresentarem *score* acima de 0,5, além de apresentarem pouca semelhança quando comparados às sequências de ZIKV e YFV.

A sequência de YFV também foi submetida à predição de epítomos para células B e, como resultado, foram obtidos 46 epítomos. Destes, 8 foram selecionados como potencialmente específicos quando confrontados às sequências de ZIKV e DENV. Os epítomos escolhidos possuem valores de *score* acima de 0,5 e são identificados nas proteínas M, E, NS1, NS3, NS4-B e NS5. A partir dos epítomos selecionados, 10 peptídeos foram desenhados, de maneira que as suas sequências fossem compostas de 9 a 30 aa.

Assim, após a predição e a seleção dos epítomos, 35 diferentes peptídeos de ZIKV foram desenhados e sintetizados: 33 comercialmente (destacados em preto na tabela 5) 3 sintetizados *in house* (o peptídeo S-02 foi sintetizado tanto comercialmente, quanto *in house*, destacados em azul na tabela 5).

Para a síntese em laboratório também foram escolhidos um peptídeo de DENV, destacado em verde, e um peptídeo de YFV, destacado na tabela 5, em amarelo.

**Tabela 5: Epítotos de ZIKV, DENV e YFV selecionados *in silico* como potencialmente específicos.**

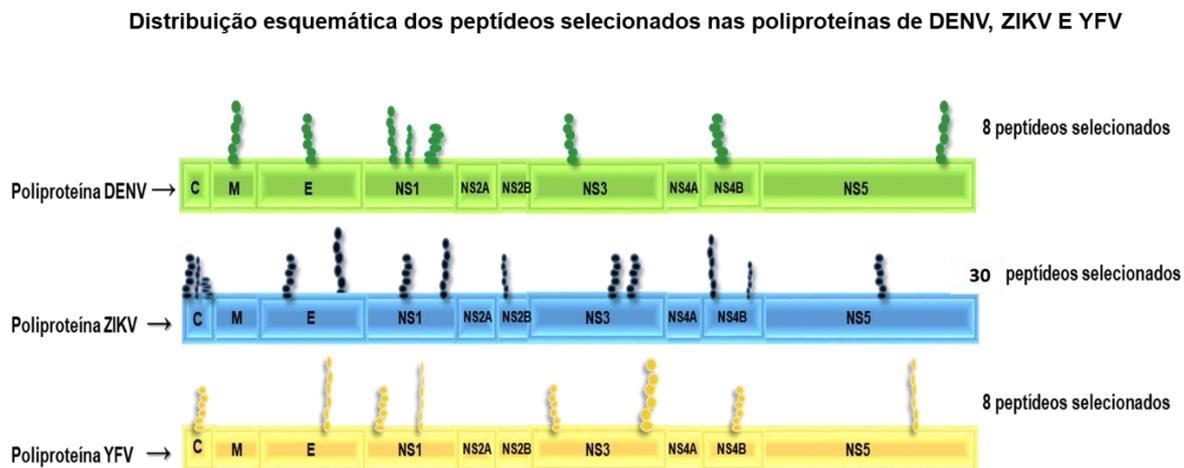
Vírus	Nº epítoto	Proteína original	Score	Nº aminoácidos	Sequência dos peptídeos desenhados
ZIKV	1	Capsídeo	0,588	30	MKNPKKKSGFRIVNMLK RGVARVSPFGGL
	2	Capsídeo	0,544	28	RFTAIKPSLGLINRWGSV GKKEAMEIIK
	3 (S-01)	Capsídeo	-	12	<b>ARKEKKRRGADT</b>
	3 (S-02)	Capsídeo	0,609	19	<b>RIINARKEKKRRGADTSVG</b>
	4	Membrana	0,56	30	TLPSTRKQLQTRSQTWLE SREYTKHLIRV
	5	Envelope	0,568	44	ASISDMASDRSRTCPTQGEAYLDKQSD TQYVCKRTLVDGWDGNGCG
	5 <sup>a</sup>	Envelope	-	30	ASISDMASDRSRTCPTQGEAY LDKQSDTQYVC
	5 <sup>b</sup>	Envelope	-	30	CPTQGEAYLDKQSDTQYV CKRTLVDGWDGWN
	6	Envelope	0,506	16	SKKMTGKSIQPENLEY
	7	Envelope	0,612	24	VHGSQHSGMIVNDTG HETDENRAK
	8	Envelope	0,577	30	KEWFHDIPLPWHAGADTG TPHWNNKEALVE
	9	Envelope	0,517	21	TPHWNNKEALVEFK DAHAKRQ
	10	Envelope	0,505	16	GALEAEMDGAKGRLSS
	11	Envelope	0,545	16	AAFTFTKIPAETLHGT
	12	Envelope	0,522	17	KKITHHWHRSSTIGKA
	13	Envelope	0,577	22	FHDIPLPWHAGADTG TPHWNNKE
	14	Envelope	0,546	9	TFTKIPAETL
	15	NS1	0,559	20	NDVEAWRDYKYHPDSPRRL
	16	NS1	0,538	18	VVDGDTLKECPLKHRAWN
	17	NS1	0,541	14	LKVREDYSLECDPA
	18	NS1	0,56	45	VGSVKNPMWRGPQRLPVPVNLPH GWKAWGKSYFVRAAKTNSFV
	18 <sup>a</sup>	NS1	-	30	VKNPMWRGPQRLPVPVN ELPHGWKAWGKSY
	18 <sup>b</sup>	NS1	-	30	QRLPVPVNLPHGWKAW GKSYFVRAAKTNN
	19	NS1	0,571	30	SLAGPLSHHNTREGYRTQ MKGPWHSEELEI
	20	NS1	0,53	14	VTAGSTDHMDHFSL
	21 (S-03)	NS1	0,550	12	<b>EAWRDYKYHPDS</b>
	22	NS2A	0,539	13	EGLKRRMTTKIII
	23	NS2B	0,529	19	ALDESGDFSLVEDDGPPMR
24	NS3	0,541	15	YCGPWKLDAAWDGHS	
25	NS3	0,549	10	TFETEFQKTKH	
26	NS3	0,536	30	LQDGLIASLYRPEADKVAA IEGEFKLRTEQR	
27	NS3	0,549	28	VVIKNGSYVSAITQGRRE EETPVECFEP	
28	NS4-B	0,530	9	MGKGMPPFYAW	

	29	NS4B	0,59	22	LSHLMGRREEGATIG FSMDIDL
	30	NS5	0,574	11	ESSSSPEVEEAR
<b>DENV</b>	1	Membrana	0,532	10	PLLTETEPEDI
	2	Envelope	0,543	12	ALKLNFVKKSSSI
	3	NS1	0,562	14	HTWTEQYKFPDSPK
	4 (DENV)	NS1	0,546	16	<b>QPMELKYSWKTWGKAK</b>
	5	NS1	0,520	9	PDTPECPNEN
	6	NS3	0,547	11	KTFDTEYQKTKL
	7	NS4-B	0,581	21	DLGFGQVTTEESHHT TILDVDL
	8	NS5	0,573	16	GVFSQSDMENPNLPEKK
<b>YFV</b>	1	Capsídeo	0,581	11	SSRKRSHDVLVT
	2	Envelope	0,543	12	VTKDTNDNNLYKL
	3 (YFV)	"NS1"	0,541	13	<b>SDDWLNKYSYPED</b>
	4	"NS1"	0,552	56	DPKNVYQRGTHPFSRIRDGLQYGWKT WGKNLVFSPGRKNGSFIIDGKSR KECPFSNR
	4 <sup>a</sup>	"NS1"	-	30	DPKNVYQRGTHPFSRIRDGLQYGWKT WGKN
	4 <sup>b</sup>	"NS1"	-	30	GKNLVFSPGRKNGSFIIDGKSRKECPFS NR
	5	"NS3"	0,540	10	TFEREYPTIKQ
	6	"NS3"	0,522	11	FKPVLVDEGRKV
	7	"NS4-B"	0,534	10	LSFMDKGIPFM
	8	"NS5"	0,549	15	RRFGGTVIRNPLSRNS

Notas: Os epítomos para células B preditos *in silico* foram selecionados para triagem *in vitro*. Destacados em azul, verde e amarelo, correspondentes respectivamente ao ZIKV, DENV e YFV, são aqueles produzidos *in house*. A partir destes, 35 peptídeos de ZIKV, 8 peptídeos de DENV e 10 peptídeos de YFV foram desenhados para a síntese

Todos os epítomos selecionados possuem *score* médio acima de 0,52, o que resultaria em uma especificidade de 80% pelo método de avaliação *in silico* indicado pelo preditor de epítomos Bepipred (2.0). A Figura 9 representa esquematicamente a identificação e distribuição de epítomos específicos de ZIKV, DENV e YFV.

**Figura 9: Desenho esquemático dos epítomos selecionados distribuídos nas poliproteínas de DENV, ZIKV e YFV.**



Em verde, azul e amarelo estão representadas as poliproteínas de DENV, ZIKV e YFV, respectivamente, com os epítomos selecionados em cada uma das sequências. Para DENV foram selecionados 8 epítomos, para ZIKV 30 epítomos e 8 epítomos para YFV, totalizando 46 epítomos com potencial de reconhecimento diferencial.

Dentre todos os peptídeos sintetizados, 5 foram produzidos e purificados *in house*: 3 peptídeos de ZIKV, 1 de DENV e 1 de YFV, de modo que entre os peptídeos de ZIKV, 2 foram elaborados a partir do epítopo 3, identificado na proteína C, e o terceiro peptídeo identificado na proteína NS1 - epítopo 21. Os peptídeos criados a partir do epítopo 3 foram desenhados em duas diferentes versões:

- Versão mais curta composta por 12 aa, denominada **S-01**: ARKEKKRRGADT;
- Versão original composta por 19 aa, denominada **S-02**: RIINARKEKKRRGADTSVG.

Já o peptídeo referente ao epítopo 21 foi sintetizado exatamente como predito e denominado **S-03**: EAWRDRYKYHPDS.

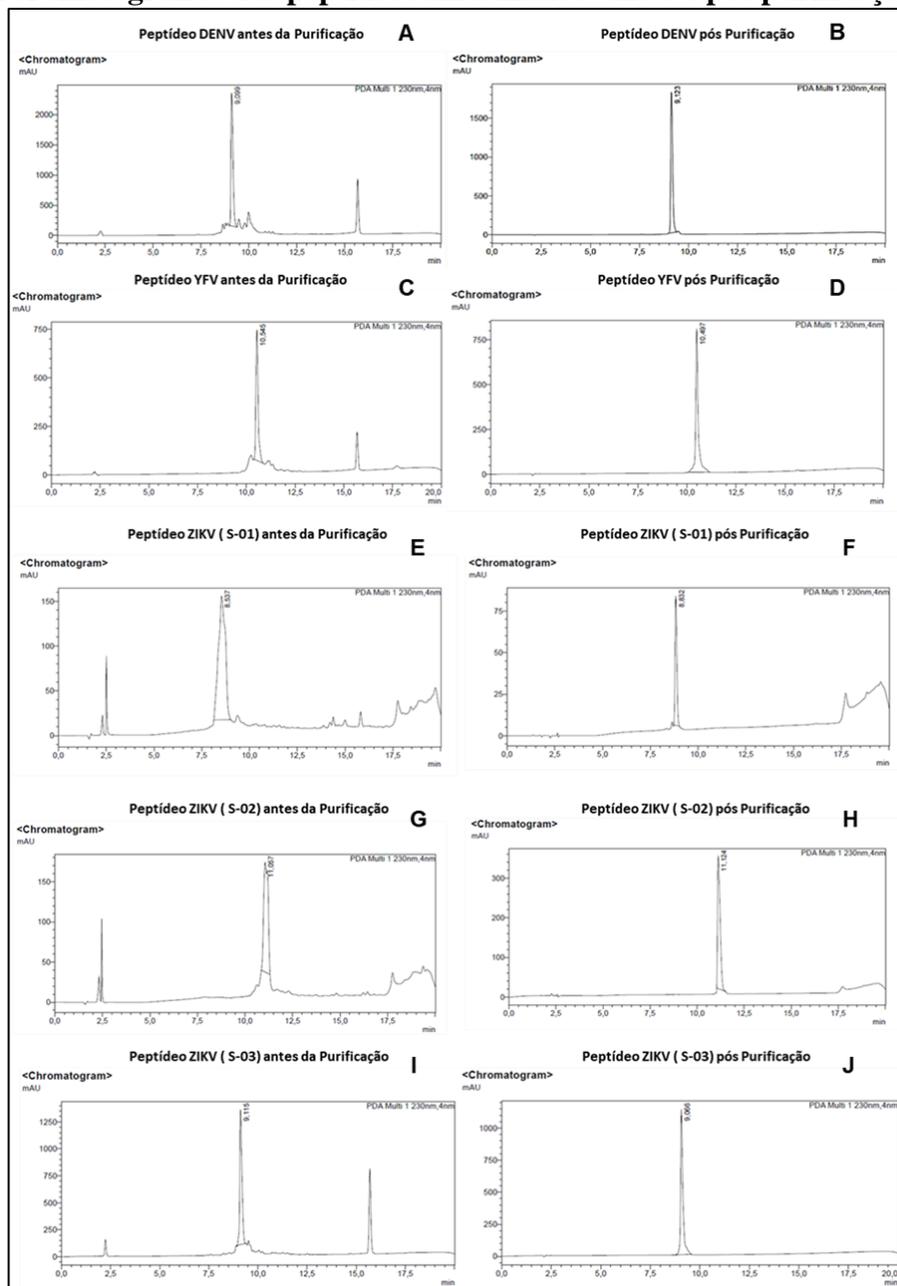
Os peptídeos de DENV e YFV referentes ao epítopo 4 de DENV, e ao epítopo 3 de YFV, foram identificados na proteína NS1 e desenhados exatamente como preditos. Denominados respectivamente:

- **DENV**: QPMELKYSWKTWGKAK;
- **YFV**: SDDWLNKYSYYPED.

Os peptídeos sintetizados *in house* foram purificados por HLPC e perfis cromatográficos obtidos antes e após a purificação para os cinco peptídeos DENV, YFV e ZIKV - S-01; S-02 e

S-03 são representados no Gráfico 1. A presença de um único pico evidencia a purificação dos peptídeos selecionados.

**Gráfico 1: Processo de purificação por HPLC dos peptídeos sintetizados. Perfil cromatográfico dos peptídeos sintetizados: antes e pós purificação**



Os gráficos A e B são referentes ao peptídeo DENV, em A) produto antes da purificação e em B) produto pós purificação. O mesmo padrão de resultados é visto para os peptídeos descritos seguintes: C e D, referentes ao peptídeo YFV; E e F referentes ao peptídeo S-01, G e H referentes ao peptídeo S-02 e I e J referentes ao peptídeo S-03 – (ZIKV).

### 6.3 Microarranjo Proteico

Para verificar o reconhecimento dos peptídeos sintetizados por anticorpos específicos nas amostras de soros humanos foram realizados ensaios de microarranjo de peptídeos. Os experimentos foram realizados em dois momentos diferentes, utilizando-se estratégias diferentes. Em um primeiro momento, os ensaios foram realizados em colaboração com o Laboratory of Microarrays, na Universidade da Califórnia – Irvine (EUA), onde os peptídeos 1 a 20; 22 a 30 de ZIKV (Tabela 4) foram testados para 210 soros organizados em 7 grupos amostrais. Após a leitura, a normalização dos dados e a realização dos testes estatísticos, quando analisadas as respostas para IgM e IgG, os peptídeos 1, 2, 3, 18, 18a e 18b foram capazes de diferenciar os grupos *Zika - fase aguda* e *Zika – convalescença* do grupo *Dengue – convalescença de 2014*.

Os resultados obtidos para o restante dos peptídeos não serão apresentados por apresentarem discordância em relação às respostas para IgM e IgG, ou mesmo, devido ao fraco reconhecimento pelos grupos de soros durante a triagem nos ensaios *in vitro*.

Entre os 6 antígenos capazes de diferenciar soros positivos para *Zika*, durante a *fase aguda* ou de *convalescença*, dos soros positivos para *dengue - fase de convalescença*, os peptídeos 1, 2 e 3, têm origem na proteína C e os peptídeos 18, 18a e 18b, têm origem na proteína NS1 de ZIKV. Para localizá-los nas proteínas, foram propostos seus respectivos modelos estruturais, realizados utilizando *software* Swiss-Model. Os antígenos foram identificados utilizando-se o visualizador RasMol (Figura 9). Tanto a proteína do capsídeo, quanto a proteína NS1, foram representadas em duplas conformações (acopladas uma a outra) e, foi por este motivo, que os antígenos foram evidenciados diametralmente em cada estrutura. A cobertura de modelagem atingida para a proteína do capsídeo viral foi de 72,8%, de maneira que as estruturas iniciais (7 primeiros aminoácidos) e finais (compreendida entre os aa 98 e aa125), não foram resolvidas. Para melhor esclarecimento:

- Peptídeo 1, representado em (A) e destacado em azul, consiste na porção inicial da proteína do capsídeo e a sua localização na poliproteína está entre o aa1 e aa 32.

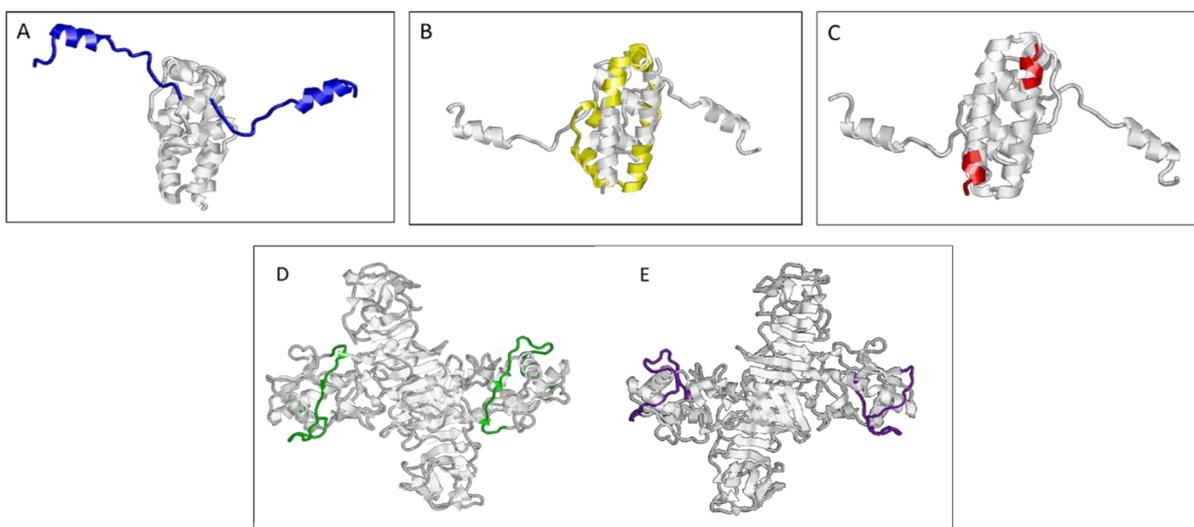
- Peptídeo 2, representado em (B) e em amarelo, é identificado na parte central da proteína, do aa 55 ao aa 82;

- Peptídeo 3, representado em (C) e em vermelho, está localizado na parte terminal do capsídeo, na qual a estrutura foi resolvida somente para o início da sequência. O peptídeo 3 está localizado na região denominada âncora do capsídeo (Ca), que varia de 14 a 22 aminoácidos

entre os diferentes flavivírus. A região Ca é composta por resíduos básicos, seguido por uma série de aminoácidos hidrofóbicos ininterruptos.

Peptídeos 18a e 18b foram destacados em verde e roxo, em (D) e (E), respectivamente, na proteína NS1, que obteve cobertura de 78%, porém não afetou a modelagem e a identificação dos peptídeos 18, 18a e 18b. O peptídeo 18 não foi representado diretamente na figura, porque os peptídeos 18a e 18b, que em parte estão sobrepostos, constituem o próprio peptídeo 18.

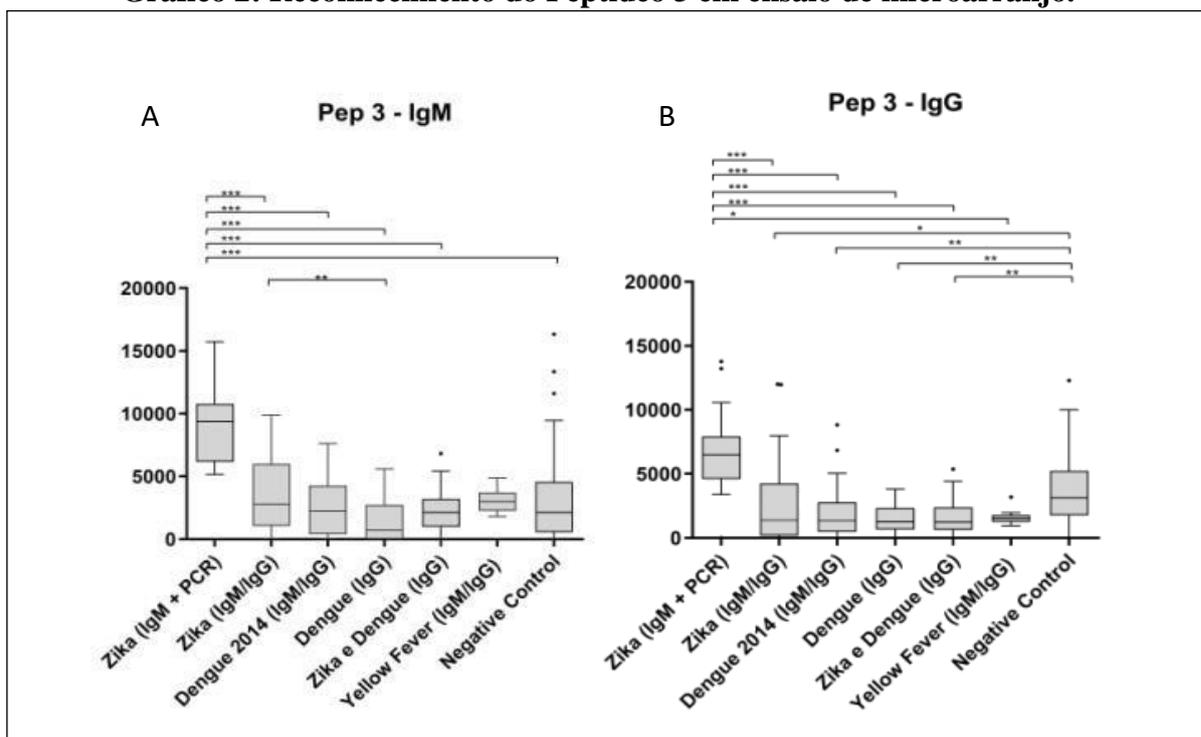
**Figura 10: Identificação dos peptídeos nas proteínas C e NS1 de ZIKV.**



Em A, B e C: Proteína do Capsídeo de ZIKV, identificadas em azul, amarelo e vermelho os peptídeos 1, 2 e 3, respectivamente. Em D e E: Proteína NS1 de ZIKV, destacados em verde e roxo os peptídeos 18a e 18b, respectivamente.

Dentre todas as análises, o peptídeo 3, em especial, destacou-se por ser reconhecido específica e diferencialmente pelos grupos de soros positivos para Zika (*fase aguda e de convalescença*) dos grupos positivos para dengue (*Dengue - convalescença 2014 e Dengue – convalescença tardia*), grupos positivos para Zika e dengue e grupo negativos. No Gráfico 2 estão representados os resultados obtidos com o peptídeo 3 para as respostas de IgM e IgG.

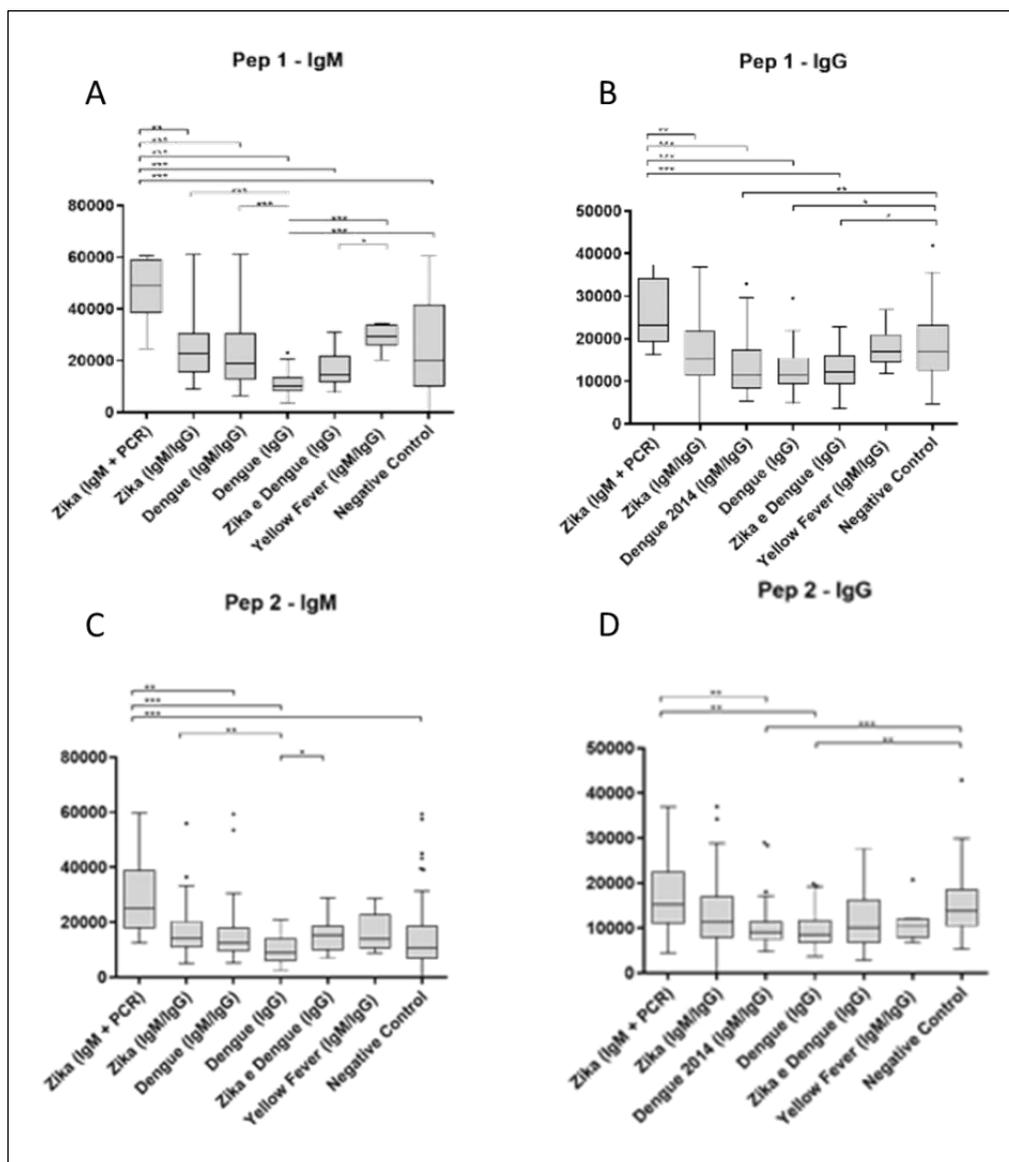
**Gráfico 2: Reconhecimento do Peptídeo 3 em ensaio de microarranjo.**



Em (A): Leitura do anticorpo secundário IgM. Em (B): Leitura do anticorpo secundário IgG. Foi realizado o teste não paramétrico de Kluskal-Wallis que, compara os os grupos definidos entre si, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  e \*\*\* $P < 0,001$ .

Ainda sobre os peptídeos identificados na proteína C (peptídeos 1 e 2), ambos os peptídeos foram reconhecidos diferencialmente entre os grupos de soros positivos para *Zika* e os grupos de soros positivos para *dengue*, como representado no Gráfico 3.

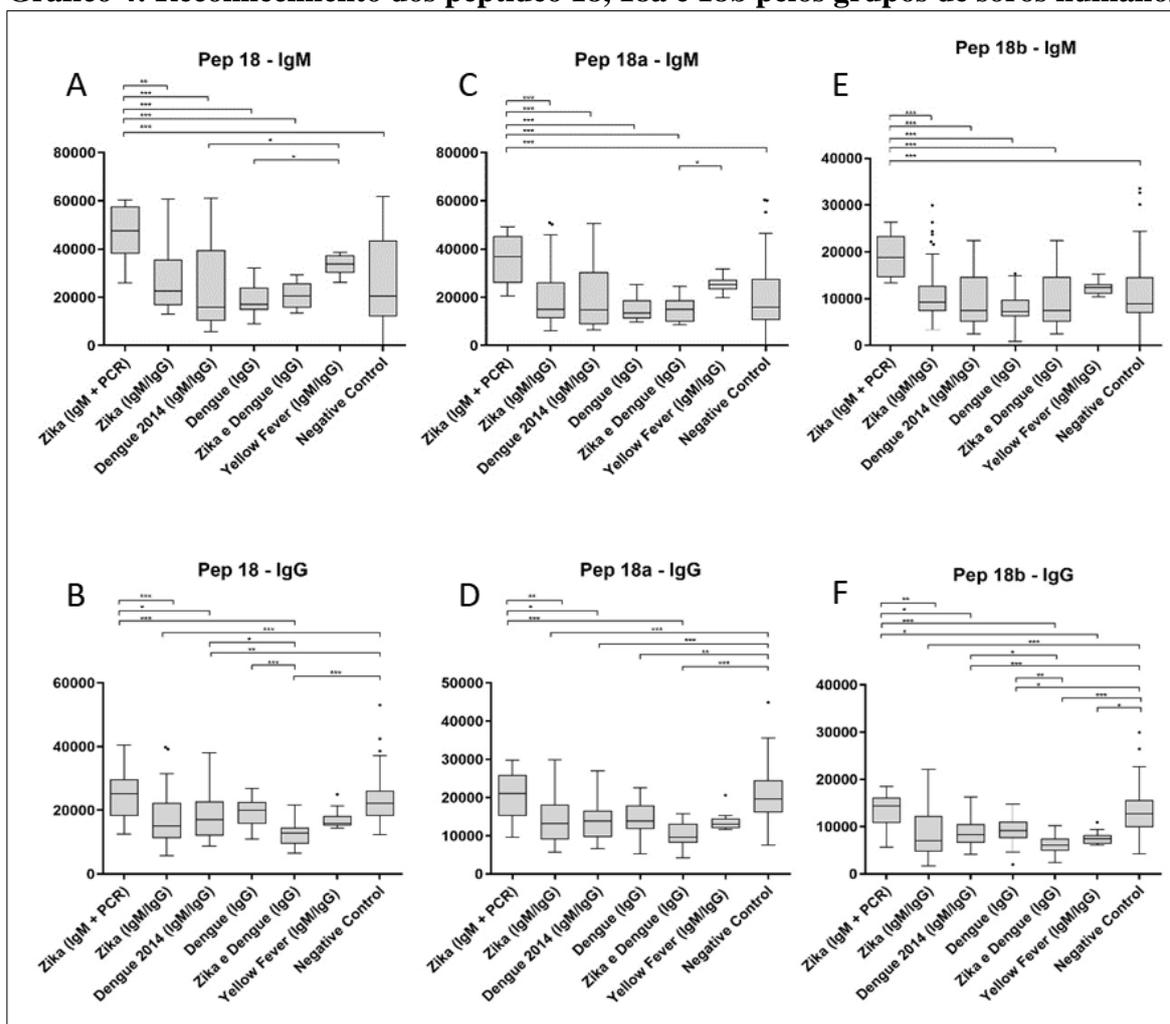
**Gráfico 3: Reconhecimento dos peptídeos 1 e 2 pelos grupos de soros humanos.**



Em A e B: Reconhecimento do peptídeo 1 para a leitura de IgM e IgG, respectivamente. Em C e D: Reconhecimento do peptídeo 2 respectivamente para IgM e IgG. Foi realizado o teste não paramétrico de Kluskal-Wallis, que compara os os grupos definidos entre si, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  e \*\*\* $P < 0,001$ .

Os peptídeos 18, 18a e 18b, estão entre os seis peptídeos melhores reconhecidos na primeira triagem sorológica por microarranjo. Estes peptídeos são originados da proteína NS1 do ZIKV. Todos os 3 peptídeos foram capazes de distinguir os grupos de soros positivos para Zika, em relação a um dos grupos de soros positivos para dengue, como mostrado no Gráfico 4.

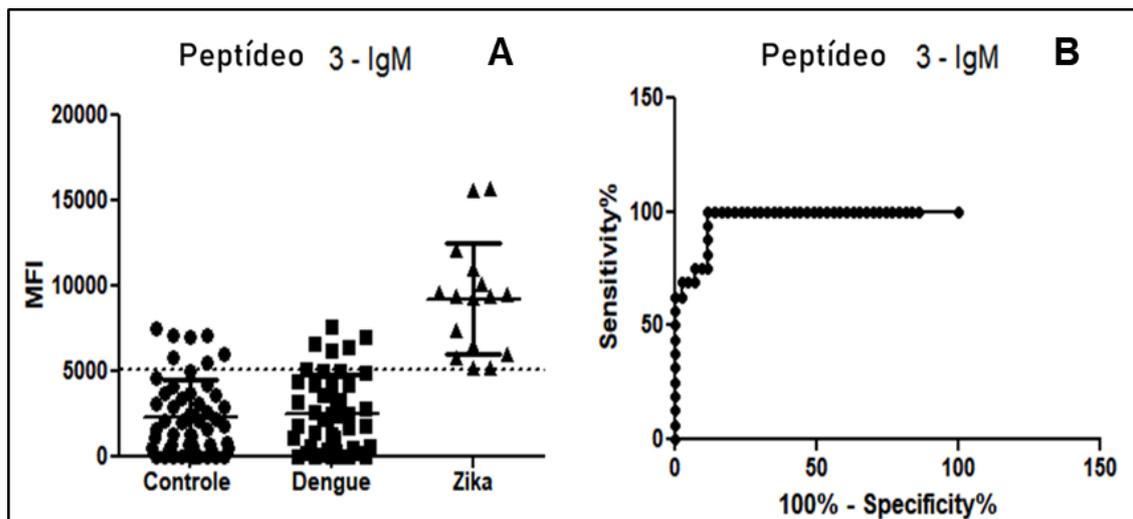
**Gráfico 4: Reconhecimento dos peptídeo 18, 18a e 18b pelos grupos de soros humanos.**



Em A e B: Reconhecimento do peptídeo 18, para IgM e IgG. Em C e D: Reconhecimento do peptídeo 18a em leitura do anticorpo secundário IgM e IgG. Em E e F: Reconhecimento do peptídeo 18b para IgM e IgG, respectivamente. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste não paramétrico de Kluskal-Wallis com correções de Dunn. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  e \*\*\* $P < 0,001$ .

A curva ROC foram obtidas para avaliar-se a variação de sensibilidade e especificidade dos peptídeos em discriminar os grupos de amostras positivas para Zika e dengue, já que o objetivo principal deste trabalho é encontrar um (ou mais) peptídeos que sejam específicos para compor um teste diagnóstico sorológico diferencial para Zika. Dentre os seis peptídeos, novamente o peptídeo 3 apresentou os melhores resultados, como mostrado no Gráfico 5.

**Gráfico 5: Curva ROC gerada para o peptídeo 3 em análises de IgM.**

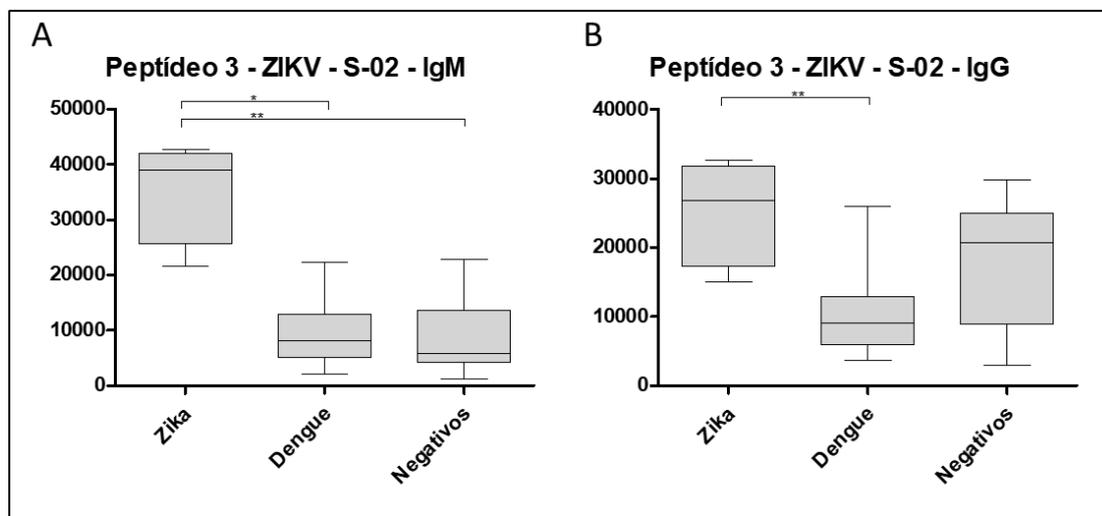


Em A: O peptídeo 3 foi capaz de distinguir as amostras positivas para Zika das amostras positivas para dengue e do grupo controle - amostras negativas para Zika e dengue. Em B: o peptídeo 3 discriminou as amostras de Zika com uma sensibilidade de 100% e especificidade de 88.37% das amostras positivas para dengue.

A curva ROC demonstrou que o peptídeo 3 diferencia as amostras positivas para Zika das amostras positivas para dengue, com uma sensibilidade de 100% e especificidade de 88,37%, durante a fase aguda da doença, utilizando-se o método de identificação de IgM.

Em um segundo momento, novos ensaios de microarranjos para screening de peptídeos foram realizados. Foram avaliados cinco peptídeos (DENV, YFV, ZIKV S-01; S-02 e S-03) sintetizados, purificados e liofilizados *in house* e, novamente, o único peptídeo que apresentou reconhecimento diferencial entre as amostras positivas para as flaviviroses foi o peptídeo 3 (Gráfico 6) confirmando os resultados obtidos na triagem anterior.

**Gráfico 6: Reconhecimento do peptídeo 3 (S-02) durante a segunda análise por microarranjo.**



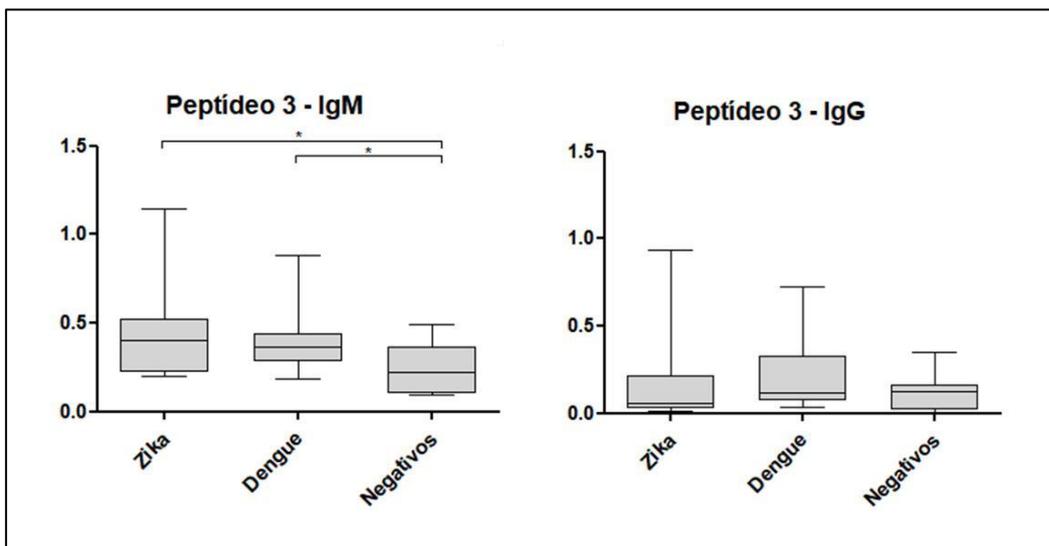
Em A e B: resultados apresentados para o peptídeo 3 (S-02) em análises de IgM e IgG.

Conclui-se, portanto, que entre os cinco peptídeos avaliados, o peptídeo 3 (S-02) apresentou resultado satisfatório, porque demonstrou ser reconhecido específica e diferencialmente pelo grupo de amostras positivas para Zika das amostras positivas para dengue e amostras negativas tanto durante a fase aguda da doença (IgM) quanto durante a fase de convalescença (IgG).

#### **6.4. Avaliação do peptídeo 3 (S-02) pelo ELISA**

O peptídeo 3 originário da proteína de capsídeo de ZIKV, também denominado S-02, foi capaz de distinguir grupos de soros humanos positivos para Zika, de soros positivos para dengue, em ensaios de microarranjo proteico. A próxima etapa foi testar a especificidade deste peptídeo por outra técnica sorológica, no caso um protocolo de ELISA *in house* (com descrito em material e métodos) que eventualmente possa ser utilizadas no diagnóstico de Zika. Como mostrado no Gráfico 7, nos ensaios de ELISA o peptídeo 3 foi capaz de distinguir os soros positivos para Zika dos soros negativos (IgM). Entretanto, o reconhecimento do peptídeo 3 não foi diferencial entre os grupos Zika e dengue, evidenciando a diferença de sensibilidade entre as técnicas de microarranjo e ELISA.

**Gráfico 7: Avaliação do peptídeo 3 S-02 em ensaios de ELISA.**



Em A e B: reconhecimento do peptídeo 3 para IgM e IgG, respectivamente, pelos grupos de amostras positivas para Zika, dengue e soros negativos.

## 7. DISCUSSÃO

O surto de Zika em 2015 e 2016 foi responsável por variadas anomalias neurológicas e estruturais desenvolvidas em fetos durante a gestação de grávidas infectadas pelo ZIKV, causando um dramático problema de saúde pública. Certamente, tal situação requer a assistência e o apoio governamental para as famílias das vítimas vivas e também o esforço da comunidade científica para atender a população. Como parte do trabalho desenvolvido em instituições de pesquisa, o desenvolvimento de um teste diagnóstico sorológico específico para Zika é fundamental, visto que no Brasil os diagnósticos realizados se confundem pela co-circulação de vários flavivírus no país. Os estudos, após 2016, para se obter o teste diagnóstico ideal para Zika avançaram, mas até hoje, não há, comprovadamente, um bom teste sorológico que possa ser realizado na proximidade do leito hospitalar e que apresente especificidade e sensibilidade satisfatórias, especialmente quando utilizados na fase aguda da doença. Isso acontece devido à similaridade genética dos flavivírus, principalmente, entre o DENV e o ZIKV, e o conseqüente desafio para identificação de regiões antigênicas reconhecidas de forma diferencial por anticorpos específicos contra o ZIKV (BOEUF *et al*, 2016, SPEER & PIERSON, 2016; STETTER *et al*, 2016). Os testes diagnósticos para Zika comercialmente disponíveis utilizam como antígeno proteínas inteiras ou grandes porções das proteínas E ou NS1, que são descritas na literatura como capazes de gerar uma forte resposta imune no

hospedeiro humano. Desta forma, os testes desenvolvidos são realmente sensíveis, porque são capazes de detectar o reconhecimento de anticorpos durante uma infecção por flavivírus, seja IgM ou IgG. Porém, tais testes apresentam performance razoável quanto à sua especificidade. Isso acontece justamente porque as proteínas E e NS1 de ZIKV e DENV possuem muitos domínios similares, o que resulta na produção de anticorpos vírusespecíficos, e também anticorpos que reconhecem regiões similares entre flavivírus, gerando as reações cruzadas que podem confundir o diagnóstico da Zika. Esse problema é ainda maior em regiões endêmicas para dengue e febre amarela, como o Brasil, porque grande parte da população já teve contato com um dos quatro sorotipos de DENV durante a vida, possibilitando a detecção de anticorpos gerados durante uma prévia exposição e não só durante a fase aguda da doença. Além disso, no Brasil, devido à reemergência da febre amarela no país, foram feitas campanhas de vacinação contra a doença com a vacina YFV DD produzida pela Fiocruz, feita a partir de YFV atenuado que estimula o sistema imune a produzir uma forte reação contra as proteínas do YFV, permitindo que uma grande parte da população brasileira tenha desenvolvido anticorpos para diversas proteínas deste vírus. Esta exposição frequente de uma mesma população a diferentes flavivírus com antígenos muito similares, produz respostas inespecíficas que são observadas diretamente nos testes sorológicos realizados.

Considerando o cenário epidemiológico em relação aos arbovírus no Brasil e relacionando à similaridade das proteínas dos flavivírus, nossa proposta para solucionar e evitar reações cruzadas nos testes diagnósticos para Zika, foi identificar regiões singulares nas sequências de ZIKV que poderiam estimular a produção de anticorpos específicos para ZIKV, que posteriormente seriam detectados em uma metodologia sensível de diagnóstico. Com este objetivo, neste trabalho foram selecionados seis antígenos do ZIKV capazes de diferenciar soros humanos positivos para Zika de soros humanos positivos para dengue, ambos os grupos em fase aguda ou de convalescença da doença. Os três primeiros peptídeos apresentados, 1, 2 e 3, foram identificados na proteína C do capsídeo viral, que possui papel fundamental para a multiplicação do vírus. Dentre eles, o peptídeo 3 (S-02) apresentou resultados promissores para compor um teste diagnóstico específico para Zika. Este peptídeo é constituído, em parte, pela sequência da âncora do capsídeo, que possui como principal função a sinalização para a translocação da proteína prM até o lúmen do retículo endoplasmático, onde a âncora desempenha um papel essencial no controle da estabilidade da poliproteína estrutural, participando assim do destino da montagem do vírus (RANA *et al*, 2018). Os peptídeos 18, 18a e 18b foram identificados na proteína NS1 de ZIKV, que é uma proteína solúvel e secretada. Por este motivo, a NS1 é considerada, juntamente com a proteína E, como um dos principais

antígenos dos flavivírus, sendo comumente utilizada para o diagnóstico sorológico precoce da Zika (XIA *et al*, 2018).

Estudos *in vivo* demonstraram os desafios dos ensaios sorológicos em casos clínicos, em que a resposta a epítomos antigênicos de ZIKV está associada a um repertório complexo de anticorpos, que têm como alvo várias conformações de um mesmo epítomo. Em ensaios como o microarranjo de peptídeos e o ELISA, a resposta policlonal do paciente aumenta as interações inespecíficas, enquanto o potencial de discriminação do peptídeo depende de uma linha tênue entre a detecção do sinal e o ruído de fundo. Desta forma, para obter especificidade e sensibilidade ótimas, a distribuição dinâmica dos peptídeos deve proporcionar conformações ideais para o total acesso à gama de anticorpos induzidos pelo antígeno. Portanto, esta pode ser uma explicação plausível para a diferença dos resultados apresentados entre a técnica de microarranjo e do ELISA. Qualquer estratégia direcionada a aumentar a afinidade dos peptídeos imobilizados para anticorpos específicos da doença, incluindo a orientação espacial dos epítomos, o controle fino da densidade do peptídeo e as multivalentes apresentações, são benéficos para o desenvolvimento de um teste sorológico que apresente resultados robustos. Nos ensaios de microarranjo, os peptídeos são espacialmente direcionados, enquanto que em uma placa de ELISA utilizando o método convencional de sensibilização, não é garantida a exposição do antígeno para ligação a anticorpo, o que pode ser particularmente um transtorno para discriminar infecções que apresentam um alto grau de reconhecimento cruzado entre anticorpos, como no caso dos flavivírus. Outro ponto importante relacionado à limitação do ELISA para diagnóstico diferencial seria a disposição dos peptídeos de forma aleatória na placa de polietileno, onde qualquer possibilidade de conformação destes peptídeos, mesmo que eles tenham tamanhos reduzidos e que apresentem, na maior parte das vezes, estruturas lineares, são reduzidas ao mínimo. É por isso que o sucesso do método ELISA não orientado é visto quando são testadas proteínas maiores. Os peptídeos de ZIKV avaliados neste trabalho são compostos por 9 a 30 aminoácidos, configurando tamanho razoável para a formação de *loopings*, que são perfeitos para o reconhecimento de anticorpos específicos a um antígeno. O microarranjo, por sua vez funciona muito bem, porque os peptídeos foram impressos de modo que o mínimo de exposição e, conseqüente, conformação fossem possíveis. Isto explica resultados que apresentam valores de sensibilidade e especificidade suficientes para discriminar soros positivos para Zika e dengue. Outra característica importante do microarranjo de proteínas é o bloqueio de reações inespecíficas com maior eficiência devido ao modo pelo qual os peptídeos são dispostos em uma lâmina horizontal e controlada, diferente de placas utilizadas no ELISA. Outro aspecto que proporciona maior sensibilidade ao microarranjo é a leitura da fluorescência

realizada em scanner de alta resolução, que possibilita que os dados obtidos sofram menor interferência de ruídos de fundo. Portanto, o microarranjo permitiu que o *screening* dos peptídeos de ZIKV fosse realizado de modo apropriado.

A grande proposta deste projeto é o desenvolvimento de um teste diagnóstico que atenda à população frente a uma epidemia causada por ZIKV, entretanto, o microarranjo de proteínas é uma metodologia ideal para fins de pesquisa, que ainda não alcança às expectativas de um diagnóstico de rotina. Estes aspectos estimulam a busca de alternativas para a melhora na detecção do sinal e da especificidade do teste sorológico convencional.

A primeira proposta como solução para aumentar a sensibilidade do ELISA seria o uso combinado de múltiplos peptídeos, formando um *pool* que poderia proporcionar uma capacidade discriminativa superior ao do peptídeo único. Por exemplo, a utilização do peptídeo 3 juntamente com peptídeo 18A poderia aumentar a sensibilidade da técnica proporcionando maiores oportunidades de ligação a anticorpos e, conseqüentemente, aumentariam o sinal de fluorescência da reação. Teoricamente, a especificidade ser aumentada, já que regiões das proteínas virais foram capazes de serem reconhecidas especificamente e, juntas, não formarizem uma estrutura natural que poderia induzir a produção de anticorpos comuns aos flavivírus.

Outra perspectiva seria o desenvolvimento de um Zika-ELISA ultrasensível utilizando nanopartículas de ouro ligadas ao peptídeo 3 (CIAURRIZ *et al*, 2017). O ensaio que seria realizado em suspensão, poderia resolver o problema da conformação, disposição e orientação dos peptídeos, aumentando assim a sensibilidade do método e proporcionando que anticorpos específicos possam ser detectados com maior avidez. O mesmo método poderia ser empregado utilizando microesferas de sílica revestidas pelo mesmo polímero,

Copoly- N3, utilizado para recobrir a lâmina de microarranjo realizado em 2019 (BRAMBRILLA *et al*, 2022). A este polímero seria ligado o peptídeo 3, de forma orientada que permitiria a sua exposição no ensaio realizado em suspensão. As regiões de ligação do peptídeo seriam expostas com maior organização viabilizando a detecção de anticorpos específicos, que produzem um sinal maior de fluorescência e conseqüente aumento da sensibilidade.

Por meio dessas possibilidades, esperamos dar a continuidade a este projeto, trazendo a qualidade do ensaio de microarranjo para um ensaio laboratorial de rotina, como o ELISA, e assim, desenvolver um teste diagnóstico sorológico sensível e específico para a Zika.

## 8. CONCLUSÃO

Este projeto teve início com a necessidade de atender a uma demanda da OMS para o desenvolvimento de testes diagnósticos eficientes em identificar indivíduos infectados pelo ZIKV. A metodologia traçada envolveu etapas *in silico* e etapas *in vitro*.

Concluimos que:

(i) A estratégia *in silico* para a predição de epítomos para células B, bem como para a seleção destes epítomos para a validação *in vitro* foi executada com sucesso.

(ii) Foi possível identificar epítomos lineares de células B e, entre eles, 6 apresentaram potencial *in vitro* de reconhecimento diferencial. Assim, é possível concluir que o *pipeline* de análises *in silico* foi estabelecido com sucesso e poderá ser utilizado em trabalhos futuros.

(iii) O peptídeo 3 poderá ser utilizado para o desenvolvimento de um teste diagnóstico diferencial de ZIKV

Nota: Os resultados e o sucesso da metodologia utilizada neste trabalho possibilitaram a escrita do capítulo “*Peptide microarrays for Flavivirus diagnosis*”, que será publicado na terceira edição do livro “*Peptide Microarrays*“, pela editora *Springer Nature*, em novembro de 2022.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBUQUERQUE, I. G. C.; MARANDINO, R.; MENDONÇA, A. P.; NOGUEIRA, R. M. R.; VASCONCELOS, P. F. DA C.; GUERRA, L. R.; BRANDÃO, B. C.; MENDONÇA, A. P. P.; AGUIAR, G. R.; BACCO, P. A. M de. Chikungunya vírus infection: report of the first case diagnosed in Rio de Janeiro, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 45, n. 1, p. 128-129, 2012.
2. ALIOTA, M. T.; BASSIT, L.; BRADRICK, S. S.; COX, B.; GARCIA-BLANCO, M. A.; GAVEGNANO, C.; FRIEDRICH, T. C.; GOLOS, T. G.; GRIFFIN, D. E.; HADDOW, A. D. Zika in the Americas, year 2: What have we learned? What gaps remain? A report from the Global Virus Network. **Antiviral Research**, v. 144, p. 223-246, 2017.
3. ALMANSOUR, I.; ALFARES, R.; ALJOFI, H. Large-scale analysis of B-cell epitopes of envelope: Implications for Zika vaccine and immunotherapeutic development. [version 2; peer review: 2 approved]. **F1000Research**, v. 7, 1624, 2019.
4. AL-QAHTANI, A.; NAZIR, N.; AL-ANAZI, M. R.; RUBINO, S.; AL-AHDAL, M. N. Zika virus: a new pandemic threat. **J Infect Dev Ctries**, v. 10, n. 3, p. 201207, 2016.
5. AOKI, V.; SOUSA-JR, J. X.; FUKUMORI, L. M. I.; PÉRIGO, A. M.; FREITAS, E. L.; OLIVEIRA, Z. N. P. Imunofluorescência direta e indireta. **An Bras Dermatol**, v. 85, n. 4, p. 490-500, 2010.
6. DE ARAÚJO, T. V. B.; RODRIGUES, L. C.; XIMENES, R. A. A.; MIRANDA-FILHO, D. B.; MONTARROYOS, U. R.; DE MELO, A. P. L.; VALONGUEIRO, S.; DE ALBUQUERQUE, M. F. P. M.; SOUZA, W. V.; BRAGA, C.; FILHO, S. P. B.; CORDEIRO, M. T.; VAZQUEZ, E.; DI CAVALCANTI, S. C. D.; HENRIQUES, C. M. P.; BEZERRA, L. C. A.; DA SILVA CASTANHA, P. M.; DHALIA, R.; MARQUES-JÚNIOR, E. T. A.; MARTELLI, C. M. T. Association between Zika virus infection and microcephaly in Brazil, January to May, 2016: preliminary report of a case-control study. **Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 12, p. 1356-1363, DOI: 10.1016/S14733099(16)30318-8
7. DE ARAÚJO, T. V. B.; RODRIGUES, L. C.; XIMENES, R. A. A.; MIRANDA-FILHO, D. B.; MONTARROYOS, U. R.; DE MELO, A. P. L.; VALONGUEIRO, S.; DE ALBUQUERQUE, M. F. P. M.; SOUZA, W. V.; BRAGA, C.; FILHO, S. P. B.; CORDEIRO, M. T.; VAZQUEZ, E.; CRUZ, D. D. C. S.; HENRIQUES, C. M. P.; BEZERRA, L. C. A.; CASTANHA, P. M. D. S.; DHALIA, R.; MARQUES-JÚNIOR, E. T. A.; MARTELLI, C. M. T.; RODRIGUES, L. C. Association between microcephaly, Zika virus infection and other risk

- factors in Brazil: final report of a a case-control study. **Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 328-336, 2018. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30727-2
8. BARBA-SPAETH, G. et al. Base estrutural da potente neutralização cruzada de anticorpos contra o vírus Zika-dengue. **Nature**, v. 536, p. 48 – 53, 2016.
  9. BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. Bioquímica. 5ª Edição. Estados Unidos: W. H. Freeman and Company, 2004.
  10. BOEUF, P.; DRUMMER, H. E.; RISHARDS, J. S.; SCOULLAR, M. J. L.; BEESON, J. G. The global threat of Zika virus to pregnancy: epidemiology, clinical perspectives, mechanisms and impact. **BioMed Central Medicine**, v. 14, n. 112, DOI: 10.1186/s12916-016-0660-0, 2016.
  11. BRAMBILLA, D.; MUSSIDA, A.; FERRETI, A. M.; SOLA, L.; DAMIN, F.; CHIARI, M. Polymeric Coating of Silica Microspheres for Biological Applications: Suppression of Non-Specific Binding and Functionalization with Biomolecules. **Polymers**, v. 14, n. 4, p. 730, DOI: 10.3390/polym14040730, 2022.
  12. BRASIL, P.; CALVET, G. A.; SIQUEIRA, A. M.; WAKIMOTO, M.; SEQUEIRA, P. C.; NOBRE, A.; QUINTANA, M. S. B.; MENDONÇA, M. C. L.; LUPI, O.; SOUZA, R. V.; ROMERO, C.; OGBI, H.; BRESSAN, C. S.; ALVES, S. S.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; NOGUEIRA, R. M. R.; CARVALHO, M. S.; FILIPPIS, M. B.; JAENISCH, T. Zika Virus Outbreak in Rio de Janeiro, Brazil: Clinical Characterizations, Epidemiological and Virological Aspects. **Neglected tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. 1-13, 2016.
  13. CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, p. 1885-1886. 2015.
  14. CALISHER, CH; KARABATSOS, N; DALRYMPLE, JM; SHOPE, RE; PORTERFIELD, J; WESTAWAY, EG; BRANDT, WE. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by crossneutralization tests with polyclonal antisera. **J Gen Virol**, v. 70, p. 37-43, 1989.
  15. CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS. Dengue. Disponível em <https://www.cdc.gov/dengue/epidemiology/index.html>. acesso em: 12 de agosto de 2020.

16. CHAN, J. F. W.; CHOID, G. K.Y.; YIP, C. C.Y.; CHENG, V. C. C.; YUEN, K-Y. Zika fever and congenital Zika syndrome: An unexpected emerging arboviral disease. **Journal of Infection**, v. 72, p. 207-524, 2016.
17. CHARREL, R. N.; LEPARC-GOFFART, I.; PAS, S.; LAMBALLERIE, X.; KOOPMANS, M.; REUSKENS, C. Background review for diagnostic test development for Zika virus infection. **Bull World Health Organ**, v. 94, p. 574–584, 2016.
18. CHEN, L. H.; HAMER, D. H. Zika virus: fast spread in Occidental Hemisphere. **Ann. Estagiário. Med.**, v. 164, n. 9, p. 613-615, 2016.
19. CIAURRIZ P.; FERNÁNDEZ F.; TELLECHEA E.; MORAN J. F.; ASENSIO A. C. Comparison of four functionalization methods of gold nanoparticles for enhancing the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Beilstein J Nanotechnol.** v. 25, n. 8, p. 244-253, DOI: 10.3762/bjnano.8.27, 2017.
20. COFFEY, L. L.; FORRESTER, N.; TSETSARKIN, K.; VASILAKIS, N.; WEAVER, S. C. Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: implications for the emergence of disease. **Future Microbiol**, v. 8, n. 2, p. 155-176, 2013.
21. COX, B. D.; STANTON, R. A.; SHINAZI, R. F. Predicting Zika virus structural biology: Challenges and opportunities for intervention. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, v. 24, n. 3-4, p. 118-126, 2015.
22. CRETICH, M.; DAMIN, F.; CHIARI, M. Protein microarray technology: how far off is routine diagnostics? **Analyst**, v. 139, n. 3, p. 528-42. doi: 10.1039/c3an01619f.
23. DEY, S.; NANDY, A.; BASAK, S. C.; NANDY, P.; DAS, S. A Bioinformatics approach to designing a Zika virus vaccine. **Computational Biology and Chemistry**, v. 68, p. 143-152, 2017.
24. DICK, G. W. A.; KITCHEN S. F.; HADDOW, A. J. Zika Virus Isolations and Serological Specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. V. 46, p. 509-520, 1952.

25. FAIZAN, M. I.; ABDULLAH, M.; ALI, S.; NAQVI, I. H.; AHMED, A.; PARVEEN S. Zika Virus Induced Microcephaly and Its Possible Molecular Mechanism. **Intervirology**, v. 59, p. 152–158, 2016.
26. FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviruses in Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 224-229, 2007.
27. HILLS S. L., RUSSELL K., HENNESSEY M, WILLIAMS C, OSTER AM, FISCHER M, MEAD P. 2016. Transmission of Zika virus by sexual contact with travellers to endemic transmission – United States continental. **Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, v. 65, n. 8, p. 215-216, 2016.
28. HUANG; Y.-J. S.; HIGGS, S.; VANLANDINGHAM, D. L. Emergence and re-emergence of mosquito-borne arboviruses. **Current Opinion in Virology**, v. 34, p. 104-109, 2019.
29. MUNOZ-JORDAN, Jorge L. Diagnosis of Zika Virus Infections: Challenges and Opportunities. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. 10, p. S951 – S956, 2017.
30. KEASEY, S. L.; PUGH, C. L.; JENSEN, S. M. R.; SMITH, J. L.; HONTZ, R. D.; DURBIN, A. P.; DUDLEY, D. M.; O’CONNOR, D. H.; ULRICH, R. G. Antibody Responses to Zika virus Infections in Environments of Flavivirus Endemicity. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 24, n. 4, p. 1-16, 2017.
31. KELLEY, T.; RICHARDS, S. Insights into Zika Virus History, Human health Effects, and Control Measures. **Environmental Health Insights**, v.10, p. 173-174, 2016.
32. KORBER, B.; LABUTE, M.; YUSIM, K. Immunoinformatics comes of age. **PLoS Computational Biology**, v. 2, n. 6, p. 71, 2006. doi: 10.1371/journal.pcbi.0020071.
33. LARSEN, J. E. P.; LUND, O.; NIELSEN, M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. **Immunome Research**, v. 2, n. 2, 2006. doi: 10.1186/1745-7580-2-2.
34. LESSLER, J.; CHAISSON, L. H.; KUCIRKA, L. M.; QIFANG BI; GRANTZ, K.; SALJE, H.; CARCELEN, A. C.; OTT, C. T.; SHEFFIELD, J. S.; FERGUSON, N. M.; DEREK, A. T.; CUMMINGS, C.; METCALF, J. E.; RODRIGUEZ-BARRAQUER, I. Assessing the global threat from Zika virus. **Science**, v. 353, p. 663-671, 2016.

35. LOWE, R.; BARCELLOS, C.; BRASIL, P.; CRUZ, O. C.; HONÓRIO, N. A.; KUPER, H.; CARVALHO, M. S. The Zika Virus Epidemic in Brazil: From Discovery to Future Implications. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 15, p. 96, 2018. doi:10.3390/ijerph15010096.
36. LIN, H.-H.; YIP, B.-S.; HUANG, L.-M.; WU, S. C. Zika virus structural biology and progress in vaccine development. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 1, p. 47-53. doi: 10.1016 / j.biotechadv.2017.09.004,. 2018.
37. LINDENBACH, B. D.; Rice, C. M. Molecular biology of flaviviruses. **Advances in Virus Research**, v. 59, p. 23-61, 2003.
38. LINDENBACH, B. D.; THIEL, H. J.; RICE, C. M. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: Fields Virology. KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). Virology. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, p. 1101-1154, 2007.
39. MARINHO, P. S.; CUNHA, A. J.; AMIM-JUNIOR, J.; PRATA-BARBOSA, A. A review of selected Arboviruses during pregnancy. **Maternal Health, Neonatology, and Perinatology**, v. 3, n. 17, DOI10.1186/s40748-017-0054-0, 2017.
40. MARTYN, K.; WHITE, D. P.; WOLLEBO, H. S.; BECKHAM, J. D.; TYLER, K. L.; KHALILI, K. Zika virus: An emergent neuropathological agent. **Annals of Neurology**, v. 80, p. 479-489, 2016.
41. MESSIAS, C. V.; LEMOS, J. P.; CUNHA, D. P.; VASCONCELOS, Z.; RAPHAEL, L. M. S.; BONALDO, M. C.; CISTER-ALVES, B.; BOU-HABIB, D. C.; COTTA-DE-ALMEIDA, V.; SAVINO, W.; MENDES-DA-CRUZ, D. A. Zika virus infects human blood mononuclear cells. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, p. 986, 2019.
42. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Plano de Contingência para a Introdução do Vírus Chikungunya. Brasília, 2018.
43. MODIS, Y. et al. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature**, v. 427, p. 313–319, 2004.

44. MUSSO, D.; ROCHE, C.; ROBIN, E.; NHAN, T.; TEISSIER, A.; CAO-LORMEAU, V. M. Potential Sexual Transmission of Zika Virus. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 21, n. 3, p. 359-361, 2015.
45. NELSON, D. L. & COX, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 6ª Edição. Estados Unidos: W. H. Freeman & Company, 2014.
46. PARASHAR, D.; CHERIAN, S. Antiviral perspectives for Chikungunya virus. **BioMed Research International**, v. 2014, n. 631-642, p. 1-11, 2014.
47. POLÔNIA, G. A.; KENNEDY, R. B.; OVSYANNIKOVA, I. G.; Palacios, R. Ho, P. L.; Kalil, J. Development of vaccines against Zika virus. **Lancet Infect. Dis.**, v. 18, n. 7, p. 211-219, 2018
48. PROSDOCIMI, F.; CERQUEIRA, G. C.; BINNECK, E; FERNANDES-SILVA, A.; NEVES-DOS-REIS, A.; JUNQUEIRA, A. C. M; FEIO-DOS-SANTOS, A. C.; NHANI-JÚNIOR, A.; Wust, C. I.; CAMARGO FILHO, F.; KESSEDJIAN, J. L.; PETRETSKI, J. H.; CAMARGO, L. P.; FERREIRA, R. G. M.; LIMA, R. P.; PEREIRA, R. M.; JARDIM, S.; SAMPAIO, V. S.; FOLGUERAS-FLATSCHART, A. V. Bioninformática: Manual do Usuário, Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, n. 29, p. 12-25, 2002.
49. RANA, J.; CAMPOS, J. L. S.; LECCESE, G.; FRANCOLINI, M.; BESTAGNO, M.; POGGIANELLA, M.; BURRONEA, O. R. Role of Capsid Anchor in the Morphogenesis of Zika Virus. **Journal of Virology**, v. 92, n. 22, e01174-18, 2018. doi: 10.1128/JVI.01174-18.
50. RASTOGI, M.; SHARMA, N.; SINGH, S. K. Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein. **Virology Journal**, v. 13, n. 131, p. 1-10, 2016.
51. RATHER, I. A.; KUMAR, S.; BAJPAI, V. K.; LIM, J.; PARK, Y. H. Strategies of Preventions and Control for Zika epidemic. **Microbiology**, v. 8, p 305, 2017.
52. REUSKEN, C. B.; IEVEN, M.; SIGFRID, L.; ECKERLE, I.; KOOPMANS, M. Laboratory preparedness and response with a focus on arboviruses in Europe. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, p. 221 – 228, 2018.

53. REY, F et al. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. **Nature**, v. 375, p. 291–298, 1995.
54. SILVA, L. R. C.; SOUZA, A. M. Zika virus: what do we know about the viral structure, mechanisms of transmission, and neurological outcomes? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 3, p. 267-273, 2016.
55. SIRONI, M.; FORNI, D.; CAGLIANI, R. Nonstructural Proteins Are Preferential Positive Selection Targets in Zika Virus and Related Flaviviruses. **Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 9. e0004978, 2016. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004978.
56. SOURISSEAU, M.; LAWRENCE, D. J. P.; SCHWARZ, M. C.; STORRS, C. H.; VEIT, E. C.; BLOOM, J. D.; EVANS, M. J. Deep Mutational Scanning Comprehensively Maps How Zika Envelope Protein Mutations Affect Viral Growth and Antibody Escape. **Journal of Virology**, v. 93, n. 23, 2019.
57. SPEER, S. D. ; PIERSON, T. C. Diagnostics for Zika virus on the horizon. **Science**, v. 353, n. 6301, p. 750-451, 2016.
58. STETTER, K.; BELTRAMELLO, M.; ESPINOSA, D. A.; GRAHAM, V.; CASSOTTA, A.; BIANCHI, S.; VANZETTA, F.; MINOLA, A.; JACONI, S.; MELE, F.; FOGLIERINI, M.; PEDOTTI, M.; SIMONELLI, L.; DOWALL, S.; ATKINSON, B.; PERCIVALLE, E.; SIMMONS, C. P.; VARANI, L.; BLUM, J.; BALDANTI, F.; CAMERONI, E.; HEWSON, R.; HARRIS, E.; LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F.; CORTI, Davide. Specificity, cross-reactivity and function of antibodies elicited by Zika virus infection. **Science**, v. 353, n. 6301, p. 823-826, 2016. doi: 10.1126/science.aaf8505.
59. WEAVER, S. C. Arrival of Chikungunya Virus in the New World: Prospects for Spread and Impact on Public Health. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 6, p. 29212925, 2012.
60. XU, X.; VAUGHAN, K.; WEISKOPF, D.; GRIFONI, A.; DIAMOND, M. S.; SETTE, A.; PETERS, B. Identifying Candidate Targets of Immune Responses in Zika virus Based on Homology to Epitopes in Other Flavivirus Species. **PLOS Currents**, 2016.

61. YOUNG, PR. Arbovirus: a family on the move. **Adv Exp Med Biol.**,v. 1062, p. 1-10, 2018.  
doi: 10.1007/978-981-10-8727-1\_1.
  
62. ZHANG, L.; Du, X.; CHEN, C.; CHEN, Z.; ZHANG, L.; HAN, Q.; XIA, X.; SONG, Y.; ZHANG, J. Development and Characterization of Double-Antibody Sandwich ELISA for Detection of Zika Virus Infection. **Viruses**, v. 10, p. 634, 2018.