

REA 06 - Obtenção de aptâmeros para detecção do vírus Zika em testes diagnóstico – Estudos preliminares

Liliane Monteiro de Moraes^{1*}; Sheila Maria Barbosa de Lima¹; Ana Maria Bispo de Filippis²; Sotiris Missailidis¹.

1 Bio-Manguinhos / Fiocruz;

2 Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz.

Introdução:

O vírus Zika (ZIKV) é um Arbovírus pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivírus*, cuja transmissão ocorre principalmente por picadas de mosquitos do gênero *Aedes*. Embora as manifestações clínicas da doença sejam geralmente leves, evidências crescentes têm associado a infecção por ZIKV com o aumento de anomalias neurológicas congênitas e distúrbios neuropáticos. O diagnóstico laboratorial da infecção é realizado principalmente a partir de técnicas moleculares, uma vez que testes sorológicos podem apresentar reação cruzada com outros *Flavivírus*. Embora estas técnicas sejam altamente sensíveis e específicas, são dispendiosas, extensas e laboriosas, necessitando de laboratórios e pessoas especializadas. Atualmente, se faz necessário o desenvolvimento de testes eficazes, rápidos e escalonáveis, que permitam o diagnóstico precoce, evitando reações cruzadas e agilizando o diagnóstico em campo. Uma solução promissora é o desenvolvimento de reagentes à base de ácidos nucleicos, chamados aptâmeros, que são capazes de se ligar a agentes infecciosos com alta afinidade e especificidade, além de oferecerem várias vantagens, incluindo seleção *in vitro*, síntese química, estabilidade térmica e custo relativamente baixo.

Objetivo:

Estabelecer metodologias de seleção de aptâmeros específicos para a partícula viral a partir de uma biblioteca de DNA (SELEX); Obter clones dos aptâmeros selecionados e caracterizar a ligação destes com as proteínas de interesse; Avaliar, *in vitro*, a eficiência da utilização dos aptâmeros em testes sorológicos.

Metodologia:

A seleção de aptâmeros foi realizada através de um processo de seleção “*in vitro*” denominado SELEX. Uma biblioteca de ácidos nucleicos fita simples foi submetida à interação com a partícula íntegra do vírus Zika, onde foram selecionados aptâmeros ligantes. Estes aptâmeros pré-selecionados foram submetidos a uma seleção negativa frente aos vírus de febre amarela e aos 4 sorotipos de dengue. Aqueles não ligantes a outros *Flavivírus*, que apresentaram perfil eletroforético esperado, foram clonados em células Top10 quimicamente competentes, utilizando o vetor pCR TOPO do Kit TOPO TA de clonagem (Invitrogen). Os DNAs dos clones positivos foram extraídos e amplificados utilizando oligonucleotídeos iniciadores M13 (senso e anti-senso). As amostras foram sequenciadas e as seqüências, analisadas utilizando programas de alinhamento (Muscle) e predição de estrutura secundária (Mfold).

Resultado:

Foi possível obter 94 clones, dos quais 30 foram sequenciados, alinhados e analisados de acordo com sua estrutura secundária. Selecionamos 4 diferentes aptâmeros que serão sintetizados e submetidos a testes de afinidade e interação com o alvo.

Conclusão:

Os resultados preliminares indicam a existência de 4 aptâmeros altamente promissores para compor um kit diagnóstico, seja do tipo ELISA ou teste rápido.

Palavras-chave: Aptâmeros; Vírus Zika; Diagnóstico