

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

SAMILLE HENRIQUES PEREIRA

**PRODUÇÃO E USO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS QUIMÉRICAS DE FLAVIVÍRUS
DE CIRCULAÇÃO NACIONAL PARA PRODUÇÃO DE PLATAFORMAS
DIAGNÓSTICAS SOROLÓGICAS**

BELO HORIZONTE
2023

SAMILLE HENRIQUES PEREIRA

**PRODUÇÃO E USO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS QUIMÉRICAS DE FLAVIVÍRUS
DE CIRCULAÇÃO NACIONAL PARA PRODUÇÃO DE PLATAFORMAS
DIAGNÓSTICAS SOROLÓGICAS**

Versão final

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca

BELO HORIZONTE
2023

043

Pereira, Samille Henriques.

Produção e uso de proteínas heterólogas quiméricas de flavivírus de circulação nacional para produção de plataformas diagnósticas sorológicas [manuscrito] / Samille Henriques Pereira. – 2023.

147 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. *Zika virus*. 3. *Vírus da Dengue*. 4. Testes Sorológicos. 5. Ensaio de Imunoadsorção Enzimática. I. Fonseca, Flavio Guimarães da. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DE DEFESA DE TESE

ATA DA DEFESA DE TESE DE **SAMILLE HENRIQUES PEREIRA**

Nº REGISTRO: 2020712282

Às 14:00 horas do dia **18 de maio de 2023**, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Rodrigo Araújo Lima Rodrigues (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Leonardo Camilo Oliveira (Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG), Luiz Felipe Leomil Coelho (Universidade Federal de Lavras), Samuel Leite Guimarães (Centro Nacional de Pesquisa em Materiais e Energia) e o Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca (Orientador) para julgar o trabalho final "Produção e uso de proteínas heterólogas quiméricas de flavivírus de circulação nacional para produção de plataformas diagnósticas sorológicas" da aluna Samille Henriques Pereira, requisito final para a obtenção do Grau de **DOUTORA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. A candidata tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da tese ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 18 de maio de 2023

Membros da Banca:

Prof. Dr. Rodrigo Araújo Lima Rodrigues

Dr. Leonardo Camilo Oliveira

Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho

Prof. Dr. Samuel Leite Guimarães

De acordo:

Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca
(Orientador)

Profa. Dra. Daniele da Glória de Souza
(Coordenadora do Programa de Pós-graduação
em Microbiologia)



Documento assinado eletronicamente por Flavio Guimaraes da Fonseca, Professor do Magistério Superior, em 22/05/2023, às 08:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Rodrigo Araújo Lima Rodrigues, Professor do Magistério Superior, em 22/05/2023, às 12:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Luiz Felipe Leomil Coelho, Usuário Externo, em 22/05/2023, às 15:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Leonardo Camilo de Oliveira, Usuário Externo, em 22/05/2023, às 16:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Samuel Leite Guimarães, Usuário Externo, em 23/05/2023, às 08:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Daniele da Gloria de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação, em 23/05/2023, às 13:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 2319028 e o código CRC 2DDB3049.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus, por me dar força para passar por todos os obstáculos, fazendo com que meus objetivos fossem alcançados.

Ao professor Flávio que me acolheu em seu laboratório e me deu grandes oportunidades de aprendizado, pela confiança no meu trabalho e pela orientação. Você com seu jeito calmo de lidar com as coisas foi me mostrando que poderia levar tudo mais leve e que no final o resultado vem, mesmo eu surtando várias vezes com isso, rs. Você é um grande exemplo de pessoa e de profissional!

A professora Jordana e a professora Edel, pelo acolhimento e pela ótima convivência, sempre dispostas a ajudar, foram fundamentais nessa caminhada. A toda equipe do LVBA, pela ajuda no desenvolvimento do meu trabalho, a Thaís por ter me apresentado o professor Flávio, e que apesar de conhecê-la a muitos anos fomos nos tornar próximas só durante o doutorado, e com certeza foi uma grande amiga durante esse tempo, Adriana que foi a primeira a me acolher no laboratório em um momento tão difícil da pandemia, Ágata com seu jeito todo prestativo, me ajudando sempre, Caio que foi uma grande surpresa, uma pessoa que se tornou um amigo, conseguimos comunicar apenas pelo olhar, quero levar você para sempre na minha vida, ao Erik que se tornou um grande amigo dentro e fora do laboratório, sempre disposto a compartilhar uma cervejinha e boas conversas, Geovane meu parceiro de cachorro-quente e de tantas gordices, Laurinha minha parceira dos recombinantes e ELISA, sempre trocando experiências, com certeza vocês tornaram essa trajetória mais leve!

A toda equipe do CT Vacinas por contribuírem grandemente no desenvolvimento do meu trabalho e pela ótima convivência. Em especial eu agradeço a Flávia, que me ajudou em todas as etapas do meu trabalho, sempre tirando minhas dúvidas e compartilhando suas experiências, sua contribuição é incalculável. Ao Cris, tão solícito em me ajudar na produção de proteínas. Ao Cid, meu amigo, pela troca de experiências e por aguentar todos os meus desabafos, rs.

A professora Daniella Bartholomeu, a Vanessa Fraga e a Laila Viana do Laboratório de Imunologia e Genética de Parasitos por serem tão prestativas e contribuírem para o desenvolvimento desse trabalho. Ao Mateus Serafim do Laboratório de Vírus pela disponibilidade e o auxílio na reta final do trabalho. Ao professor Maurício Nogueira e a Nathalia Zini do Laboratório de Pesquisa em Virologia (FAMERP) por cederem as amostras utilizadas nesse trabalho e também por abrir as portas do laboratório para mim.

A minha mãe Vânia, meu pai Ilson e meu irmão Leandro por terem me proporcionado todo apoio necessário nessa caminhada, não só financeiramente (que foi muito importante rs) mas pelo apoio emocional, por aguentar meus choros, meus momentos de ansiedade, minha ausência e também por comemorarem e vibrarem comigo todas as conquistas, mesmo não sabendo muito bem o que era, rs. Aos meus avós por todas as orações, pelo carinho e preocupação. A todos os membros da minha família que torceram por mim! Ao Pedro por todo carinho, incentivo, paciência e pela ajuda emocional, tão fundamental no final do meu doutorado.

Ao Renan, meu grande amigo desde o início do meu doutorado, você foi minha família em Belo Horizonte, por mais que eu me esforce eu não tenho palavras para te agradecer. Você foi fundamental! As minhas amigas da UFOP, Ariane, Letícia, Bruna e Érica por todos os momentos compartilhados, as trocas de experiências, as conversas, os desabafos e os encontros, eu adoro vocês! A Carla por dividir o apartamento comigo, nossa convivência foi essencial nessa rotina pesada.

Aos 59.563.912 brasileiros, que em 30 de outubro de 2022, fizeram com que a esperança na ciência no Brasil se renovasse.

A todos que de alguma forma contribuíram para que eu pudesse chegar até aqui.

Aos laboratórios do ICB pela ajuda em diversos momentos.

Aos órgãos de fomento por terem permitido que esse trabalho fosse desenvolvido, Capes, Cnpq e Fapemig.

Ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, a Universidade Federal de Minas Gerais e a todos os funcionários, meu muito obrigada!

RESUMO

Os arbovírus constituem um grupo de vírus transmitidos principalmente por mosquitos. Representam um grande problema de saúde pública em todo o mundo. Dentre eles, destacam-se o vírus da Zika (ZIKV) e o vírus da Dengue (DENV). A dengue é arbovirose mais importante do mundo, sendo associada a uma significativa carga social e financeira, já que anualmente ocorrem surtos dessa doença. A chegada do Zika no Brasil (2015) chamou a atenção, pois apesar de ser uma doença com caráter agudo e autolimitada, parte dos indivíduos apresentaram manifestações neurológicas graves, complicações congênicas e síndrome de Guillain-Barré. A grande semelhança antigênica entre os flavivírus dificultam o diagnóstico diferencial. Assim, destaca-se a necessidade do aprimoramento de ferramentas diagnósticas. O objetivo deste trabalho foi gerar proteínas quiméricas capazes de diferenciar sorologicamente infecções por ZIKV ou DENV. As proteínas recombinantes (ZIKV-1, ZIKV-2, ZIKV-3 e DENV-1) foram desenhadas e seus respectivos genes codificadores foram subclonadas em vetor de expressão pET21a. As proteínas recombinantes foram, então, expressas e purificadas e a sua antigenicidade validada, com exceção de DENV-1, que não foi expressa. As proteínas purificadas foram testadas como antígenos em fase sólida na padronização de protocolos ELISA para detecção de anticorpos anti-ZIKV IgG. Os resultados obtidos após a padronização se mostraram promissores, sendo que os testes elaborados com os antígenos recombinantes apresentaram alta sensibilidade e especificidade, além de baixa reatividade cruzada com o interferente. A proteína ZIKV-1 apresentou 91% de sensibilidade e 97% de especificidade, a proteína ZIKV-2 apresentou 95% de sensibilidade e 96% de especificidade e a proteína ZIKV-3 apresentou 66% de sensibilidade e 84% de especificidade. Em relação ao interferente DENV, houve 10% de reatividade cruzada para ZIKV-1 e 19% para ZIKV-3, ZIKV-2 não apresentou reatividade cruzada. Os ensaios também foram realizados no “Laboratório de Pesquisa em Virologia” (FAMERP) e apresentaram resultados semelhantes, demonstrando reprodutibilidade do teste. Os resultados encontrados para ZIKV-1 e ZIKV-2 mostram grande potencial para o desenvolvimento de um teste diagnóstico específico para detecção de anticorpos IgG para ZIKV utilizando as proteínas quiméricas produzidas.

Palavras-chave: *Zika virus*, *Dengue virus*, Diagnóstico sorológico, ELISA.

ABSTRACT

Arboviruses constitute a group of viruses transmitted primarily by mosquitoes. They represent a major public health problem worldwide. Among them, Zika virus (ZIKV) and Dengue virus (DENV) stand out. Dengue is the most important arboviral disease in the world, being associated with a significant social and financial burden, outbreaks of this disease occur annually. The arrival of Zika in Brazil (2015) drew attention, because despite being an acute and self-limiting disease, part of the individuals had severe neurological manifestations, congenital complications and Guillain-Barré syndrome. The great antigenic similarity between flaviviruses makes diagnosis difficult. Thus, there is a need to improve diagnostic tools. The objective of this work was to generate chimeric proteins capable of serologically differentiating ZIKV or DENV infections. The recombinant proteins (ZIKV-1, ZIKV-2, ZIKV-3 and DENV-1) were designed and their respective genes subcloned into a pET21a expression vector. The recombinant proteins were expressed and purified and antigenicity validated, with the exception of DENV-1, which did not was expressed. Purified proteins were tested as solid phase antigens in standard ELISA protocols for detection of anti-ZIKV IgG antibodies. The results obtained after standardization are promising, and the tests elaborated with the recombinant antigens showing high sensitivity and specificity, in addition to low cross-reactivity with the interferent. The ZIKV-1 protein showed 91% sensitivity and 97% specificity, the ZIKV-2 protein showed 95% sensitivity and 96% specificity, and the ZIKV-3 protein showed 66% sensitivity and 84% specificity. Regarding the DENV interferent, there was 10% cross-reactivity for ZIKV-1 and 19% for ZIKV-3, ZIKV-2 did not show cross-reactivity. The assays were also carried out at the “Laboratório de Pesquisa em Virologia” (FAMERP) and presented similar results, demonstrating reproducibility. The results found for ZIKV-1 and ZIKV-2 show great potential for the development of a specific diagnostic test for the detection of IgG antibodies to ZIKV using the produced chimeric proteins.

Keywords: *Zika virus*, *Dengue virus*, Sorological diagnosis, ELISA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Esquema do ciclo de manutenção geral dos arbovírus.....	19
Figura 2: Esquema ilustrativo da organização do genoma dos flavivírus e a topologia de membrana de proteínas virais maduras.	21
Figura 3: Visão geral da estrutura do vírion de flavivírus.....	23
Figura 4: Ciclo de multiplicação dos flavivírus.....	24
Figura 5: Mapa da rota de migração dos arbovírus. A linha tracejada verde destaca a entrada do ZIKV na América do Sul.....	25
Figura 6: Mapa das áreas de risco de infecção pelo vírus da Dengue.	30
Figura 7: Janela de tempo das respostas de viremia e anticorpos contra infecções por arbovírus..	34
Figura 8: Esquematização de um ensaio de ELISA direto.....	35
Figura 9: Esquematização de um ensaio de ELISA indireto.....	36
Figura 10: Esquematização de um ensaio de ELISA sanduíche.	37
Figura 11: Esquema de uma proteína quimérica.	39
Figura 12: Mapa do Vetor bacteriano pET21a (+) para expressão induzível de proteínas marcadas com T7 no terminal N.....	46
Figura 13: Alinhamento das proteínas quiméricas.	63
Figura 14: Estruturas alvos modeladas e obtidas pelo SWISS-MODEL	64
Figura 15: Estruturas alvos modeladas e obtidas pelo AlphaFold.....	65
Figura 17: Painéis das superfícies das proteínas quiméricas de ZIKV, evidenciando os sítios de ligação, em vista lateral com rotação de 90°.	68
Figura 18: Análise eletroforética em gel de agarose 1 %.....	70
Figura 19: Análise da produção das proteínas após indução com IPTG 1 mM por 3 horas a 37 °C.....	71
Figura 20: Análise eletroforética dos clones induzidos por 3 horas a 37 °C ou por 16 horas a 18 °C.....	72
Figura 21: Análise eletroforética por SDS-PAGE dos clones contendo o plasmídeo pET21a+DENV-1 após indução com IPTG 1mM por 3 horas a 37 °C.	73
Figura 22: Sequenciamento do plasmídeo pET21a+DENV-1 pelo método dideoxi.....	74

Figura 23: Análise dos clones contendo o plasmídeo pET21a+DENV-1 após indução com IPTG 5 mM.	75
Figura 24: PCR de colônia dos clones transformados com o plasmídeo pET21a+DENV-1... ..	76
Figura 25: Avaliação da solubilidade das proteínas ZIKV-1, ZIKV-2 e ZIKV-3 após rompimento celular no Emulsifex.....	76
Figura 26: Teste de solubilidade das proteínas ZIKV-1, ZIKV-2 e ZIKV-3 em ureia 2, 4, 6 e 8 M.....	77
Figura 27: Frações da purificação das proteínas após eluição da coluna de cromatografia de afinidade.....	78
Figura 28: Análise de antigenicidade das proteínas ZIKV-1, ZIKV-2 e ZIKV-3 com pool de soros humanos.. ..	80
Figura 29: Avaliação do antígeno ZIKV-1 com soros negativos e positivos.....	82
Figura 30: Avaliação do antígeno ZIKV-2 com soros negativos e positivos.	83
Figura 31: Avaliação do antígeno ZIKV-3 com soros negativos e positivos.....	84
Figura 32: Avaliação do antígeno com soros negativos e positivos.	85
Figura 33: Avaliação dos antígenos nas concentrações 800, 400, 200 e 100 ng e utilização de bloqueio de BSA.	86
Figura 34: Avaliação dos antígenos nas concentrações 800, 400, 200 e 100 ng e utilização de bloqueio de leite em pó desnatado 5 % e lavagem com ureia 6 M.	88
Figura 35: Avaliação dos antígenos na concentração de 400 ng comparando a lavagem convencional com a lavagem com adição de tween 80 0,1%.	91
Figura 36: Avaliação dos antígenos com junção das proteínas ZIKV-1 e ZIKV-2.	93
Figura 37: Avaliação dos três antígenos após otimização do protocolo.	94
Figura 38: Avaliação do ELISA desenvolvido no LPV – FAMERP.	97
Figura 39: <i>Screening</i> dos epítomos lineares de célula B preditos para DENV.	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Interpretação do índice do ensaio de Elisa.....	55
Tabela 2: Parâmetros de avaliação de desempenho dos testes desenvolvidos.....	56
Tabela 3: Valores de AUC para avaliação do desempenho do teste.....	57
Tabela 4: Sequências brasileiras de DENV obtidas no GenBank.....	57
Tabela 5: Epítomos lineares de células B selecionados para ZIKV.....	60
Tabela 6: Epítomos lineares de células B selecionados para DENV.....	61
Tabela 7: Proteínas quiméricas para ZIKV e DENV.....	61
Tabela 8: Moléculas-sonda e suas respectivas características físico-químicas utilizadas nos servidores FTMap e FTSite.....	66
Tabela 9: Concentração e rendimento das proteínas após a purificação.....	79
Tabela 10: Avaliação do desempenho do antígeno ZIKV-1.....	82
Tabela 11: Avaliação do desempenho do antígeno ZIKV-2.....	83
Tabela 12: Avaliação do desempenho do antígeno ZIKV-3.....	84
Tabela 13: Avaliação do desempenho dos antígenos utilizando bloqueio de BSA.....	87
Tabela 14: Avaliação do desempenho dos antígenos com a utilização de bloqueio de leite em pó 5 % e lavagem com ureia 6 M.....	89
Tabela 15: Avaliação do desempenho dos antígenos ZIKV-1 ZIKV-2 e ZIKV-3 comparando a lavagem convencional com a lavagem com adição de Tween-80 0,1 %.....	92
Tabela 16: Avaliação do desempenho dos antígenos ZIKV-1, ZIKV-2 e ZIKV-3 após otimização. (ZIKV+) = soros positivos para Zika; (DENV+) = soros positivos para dengue. (CHIKV+) = soros positivos para Chikungunya; (FR+) = soros fator reumatoide elevados... 95	95
Tabela 17: Avaliação do desempenho dos antígenos ZIKV-1, ZIKV-2 e ZIKV-3 após otimização. (ZIKV+) = soros positivos para Zika; (DENV+) = soros positivos para dengue. 98	98
Tabela 18: Epítomos lineares de célula B de DENV preditos pelo software BepiPred 2.0 conservados entres os quatro sorotipos de DENV e diferenciais para ZIKV.....	102
Tabela 19: Potenciais epítomos para diagnóstico diferencial de DENV após análise em membrana spot.....	106

LISTA DE QUADRO

Quadro 1: Referência para classificação dos resultados.....	51
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC – Acurácia

ADE – Aprimoramento dependente de anticorpo

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APS – Persulfato de amônio

AUC – Área sobre a curva

BG-250 – Comassie Brilliant Blue 250

BSA – Albumina do soro bovino

CHIKV – Vírus da Chikungunya

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*

CT Vacinas – Centro de Tecnologia em Vacinas

DENV – Vírus da dengue

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DDT - Dicloro-Difenil-Tricloroetano

DO – Densidade ótica

E – Especificidade

E. coli – *Escherichia coli*

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

ESPII – Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional

FDA – *Food and Drug Administration*

FUNED – Fundação Ezequiel Dias

H₂O_{dd} – Água destilada e deionizada

HI – Inibição de hemaglutinação

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IPTG - Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida

JEV – Vírus da encefalite japonesa

LVBA – Laboratório de Virologia Básica e Aplicada

NS – Não estrutural

NTR – Região não codificante

OHFV - Vírus da febre hemorrágica de Osmk

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – Tampão fosfato salino

PCR – Reação em cadeia de polimerase

PRNT – Teste de neutralização com redução de placa

qRT-PCR – Reação em cadeia de polimerase quantitativa com transcriptase reversa

RNA – Ácido ribonucleico

S – Sensibilidade

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SLEV – Vírus da encefalite de Saint Louis

TBEV – Vírus da encefalite do carrapato

TMB – 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine

TMED – N,N,N',N'-Tetramethyl ethylenediamine

VPP – Valor preditivo negativo

VPP – Valor preditivo positivo

WNV – Vírus do oeste do Nilo

YFV – Vírus da febre amarela

ZIKV – Vírus da Zika

SUMÁRIO

1. Introdução.....	18
1.1 Arbovírus.....	18
1.2 Família <i>Flaviviridae</i> , gênero <i>Orthoflavivirus</i>	20
1.2.1 Genoma e estrutura.....	21
1.2.2 Ciclo de multiplicação.....	23
1.2.3 Vírus Zika.....	24
1.2.3.1 Epidemiologia.....	24
1.2.3.2 Patogenia.....	27
1.2.3.3 Tratamento e profilaxia.....	27
1.2.4 Vírus dengue.....	28
1.2.4.1 Epidemiologia.....	28
1.2.4.2 Patogenia.....	30
1.2.4.3 Tratamento e profilaxia.....	31
1.3 Diagnóstico de flavivírus.....	32
1.3.1 ELISA.....	34
1.4 Sítios antigênicos.....	38
1.4.1 Proteínas quiméricas.....	39
2. Justificativa.....	42
3. Objetivos.....	44
3.1 Objetivo geral.....	44
3.2 Objetivos específicos.....	44
4. Materiais e Métodos.....	45
4.1 Produção das proteínas recombinantes.....	45
4.1.1 Construção dos genes.....	45
4.1.2 Análise conformacional das proteínas quiméricas.....	46
4.1.2.1 Modelagem de estruturas quiméricas de ZIKV.....	46
4.1.2.2 Identificação de potenciais sondas e sítios de ligação das estruturas quiméricas de ZIKV.....	47
4.1.3 Produção de clones bacterianos contendo os genes de interesse.....	47
4.1.3.1 Preparação de células competentes.....	47
4.1.3.2 Transformação bacteriana em <i>E. coli</i> (DH5 α) por choque térmico.....	48
4.1.3.3 Extração e digestão do DNA plasmidial.....	48
4.1.3.4 Transformação bacteriana em <i>E. coli</i> (BL21-DE3, Arctic Express-DE3 e NiCo21-DE3) por choque térmico.....	49
4.1.3.5 PCR de colônia.....	49
4.1.3.6 Expressão das proteínas recombinantes.....	49

4.1.3.7 Teste de solubilidade em ureia das proteínas recombinantes	50
4.1.3.8 Purificação das proteínas recombinantes	50
4.1.4 SDS-PAGE	51
4.1.5 Western blot	51
4.1.6 Quantificação proteica pelo método de Bradford.....	52
4.1.7 Obtenção e caracterização da soroteca humana	52
4.1.8 Ensaio de soroneutralização	53
4.1.9 Ensaio Imunoenzimático indireto (ELISA).....	53
4.1.8.1 Protocolo otimizado para ELISA anti-ZIKV.....	54
4.1.8.2 Análise dos resultados de ELISA.....	54
4.1.8.3 Avaliação do desempenho do ELISA.....	55
4.1.8.4 Análise estatística.....	56
4.2 Identificação de potenciais epítomos para diagnóstico de DENV.....	57
4.2.1 Predição de epítomos lineares de célula B para DENV	57
4.2.2 <i>Screening</i> de peptídeos em membrana spot	58
4.3.2.1 Análises densiométricas em imunoblot do tipo dot blot utilizando o ImageJ	59
5.Resultados e Discussão	60
5.1 Construção das proteínas quiméricas	60
5.2 Produção das proteínas recombinantes	70
5.2.1 Estoque plasmidial e digestão enzimática	70
5.2.2 Padronização da expressão das proteínas	70
5.2.3 Purificação das proteínas	78
5.3 Verificação da antigenicidade das proteínas produzidas.....	80
5.4 ELISA indireto para detecção de anticorpos anti-ZIKV.....	81
5.4.1 Otimização do ELISA anti-ZIKV	86
5.4.2 Avaliação do ELISA anti-ZIKV no Laboratório de Pesquisa em Virologia (LPV) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP)	97
5.4 Identificação de potenciais epítomos para diagnóstico de DENV.....	101
6.Conclusões.....	108
7.Referências	109
MATERIAL SUPLEMENTAR	118

1. Introdução

1.1 Arbovírus

Arbovírus é o termo que define vírus que são mantidos na natureza por meio da transmissão entre um hospedeiro vertebrado susceptível e vetores artrópodes hematófagos, principalmente mosquitos e carrapatos. O termo derivou-se da expressão *arthropod borne viruses* (WHO, 1967).

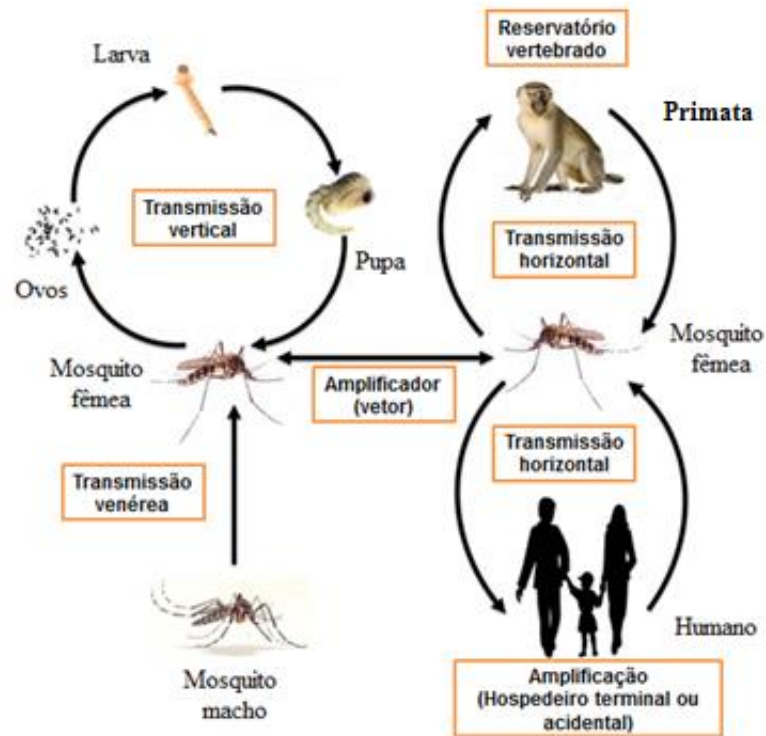
Os arbovírus estão compreendidos em cinco famílias, *Perybunyaviridae*, *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae*. É estimado que exista cerca de 500 espécies de arbovírus, podendo causar principalmente doenças em humanos e outros animais homeotérmicos (KERKHOF et al., 2020).

Alguns exemplos de arbovírus são o vírus da dengue (*Orthoflavivirus denguei*, DENV), vírus da Zika (*Orthoflavivirus zikaense*, ZIKV), vírus da Chikungunya (*Chikungunya virus*, CHIKV), vírus da febre do Mayaro (*Mayaro virus*, MAYV), vírus da febre amarela (*Orthoflavivirus flavi*, YFV), vírus do oeste do Nilo (*Orthoflavivirus nilense*, WNV), vírus da encefalite japonesa (*Orthoflavivirus japonicum*, JEV) e vírus da encefalite transmitida por carrapatos (*Orthoflavivirus encephalitidis*, TBEV). São vírus de grande importância na saúde pública, já que cerca de 3 bilhões de pessoas vivem em áreas endêmicas sob risco de infecção (ICTV, 2023; MURRAY; QUAM; WILDER-SMITH, 2013; WILDER-SMITH et al., 2019)

Estes vírus são mantidos na natureza por ciclos silvestres e urbanos. Existem três formas importantes do ciclo de manutenção dos arbovírus: a transmissão vertical, por meio da qual ocorre a passagem do vírus entre diferentes gerações de mosquitos através dos ovos, o que favorece a manutenção durante períodos desfavoráveis de conservação na natureza; transmissão horizontal, que ocorre através da picada do vetor no hospedeiro vertebrado; e transmissão venérea, que é a transferência do vírus do mosquito macho infectado para o mosquito fêmea durante a cópula (AGARWAL; PARIDA; DASH, 2017).

A maioria dos arbovírus causam zoonoses e dependem de animais para manutenção na natureza (MUSSO; GUBLER, 2016). Na Figura 1 é possível observar o esquema do ciclo de manutenção dos arbovírus.

Figura 1: Esquema do ciclo de manutenção geral dos arbovírus. São mantidos na natureza em ciclos complexos envolvendo vetores artrópodes e hospedeiros vertebrados, destacando os três importantes ciclos de manutenção e amplificação dos arbovírus, vertical, horizontal e venéreo.



Fonte: adaptado de AGARWAL, PARIDA, DASH, 2017.

A rápida dispersão dos arbovírus se deve principalmente à disseminação dos vetores, já que esses vírus podem ser transmitidos por mosquitos selvagens, mas se adaptaram a mosquitos urbanizados em alguns casos. Outros fatores que podem estar relacionados são as alterações genéticas desses vírus, mudanças climáticas, transformações geográficas, como aumento da população e da extensa urbanização, uso não controlado de inseticidas, perturbações de sistemas naturais, que são geralmente antropogênicos, falta de controle efetivo dos mosquitos, aumento de viagens internacionais e transportes de cargas. Os países mais afetados pelas arboviroses são os localizados entre os trópicos, sendo que a Ásia e a América Latina concentram 80% dos casos clínicos (DUTRA; CARAGATA; MOREIRA, 2017; MUSSO; GUBLER, 2016).

Dentre os arbovírus de maior importância médica, destacam-se aqueles transmitidos pelos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. O *Aedes aegypti* prevalece em várias partes do mundo, englobando Ásia, África, as Américas e partes da Austrália. O *Aedes albopictus* é encontrado principalmente na Ásia, Europa e Américas. Estes mosquitos são competentes para transmissão do DENV, ZIKV, YFV e CHIKV (KRAEMER et al., 2015).

Cerca 215 países têm condições sócio geográficas favoráveis para o estabelecimento do *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* e, destes, 50% apresentam cocirculação de DENV, ZIKV, YFV e CHIKV (LETA et al., 2018). Essas viroses apresentam sintomas clínicos na fase inicial muito parecidos, como febre aguda, cefaleia, erupção cutânea, náusea, mal estar e fadiga, o que impossibilita o diagnóstico diferencial apenas pela análise dos sintomas (CDC, 2022).

Na maioria das vezes, essas arboviroses são assintomáticas ou autolimitadas, porém o diagnóstico correto é de suma importância para o acompanhamento epidemiológico, tratamento e monitoramento do paciente. Exemplos de casos em que o diagnóstico é crítico incluem a síndrome congênita desenvolvida nos fetos após infecção por Zika pela mãe, manifestações neurológicas já relatadas para diversos vírus, o aumento da infecção dependente de anticorpo (ADE) descrito para pacientes infectados por dengue pela segunda vez (KERKHOF et al., 2020), entre outros casos clínicos.

1.2 Família *Flaviviridae*, gênero *Orthoflavivirus*

A família *Flaviviridae* (Super-reino *Riboviria*, Reino *Orthornavirae*, Filo *Kitrinoviricota*; Classe *Flasuviricetes*, Ordem *Amarillovirales* – ICTV, 2023) é constituída por vírus envelopados, com material genético RNA senso positivo de fita simples com aproximadamente 9 a 13 kb, capazes de codificar uma única poliproteína. O vírion possui um diâmetro de 40-60 nm (SIMMONDS et al., 2017).

Os membros desta família compartilham semelhanças morfológicas na organização genômica e nas estratégias de multiplicação e são classificados em quatro gêneros: os *Orthoflavivirus* (com 53 espécies), os *Hepacivirus* (com 14 espécies), os *Pegivirus* (com 11 espécies) e *Pestivirus* (com 19 espécies) (ICTV, 2023; NEUFELDT et al., 2018; SIMMONDS et al., 2017).

Pertencem ao gênero *Orthoflavivirus* membros de grande importância médica e que compartilham sítios antigênicos em comum, o que originalmente formam a base da sua classificação (KNIPE; HOWLEY, 2013).

Esse gênero é constituído por cerca de 50 espécies e, em sua maioria, são transmitidos por artrópodes, com grupos que infectam mosquitos e outros que infectam carrapatos, tendo como hospedeiros aves ou mamíferos (SIMMONDS et al., 2017).

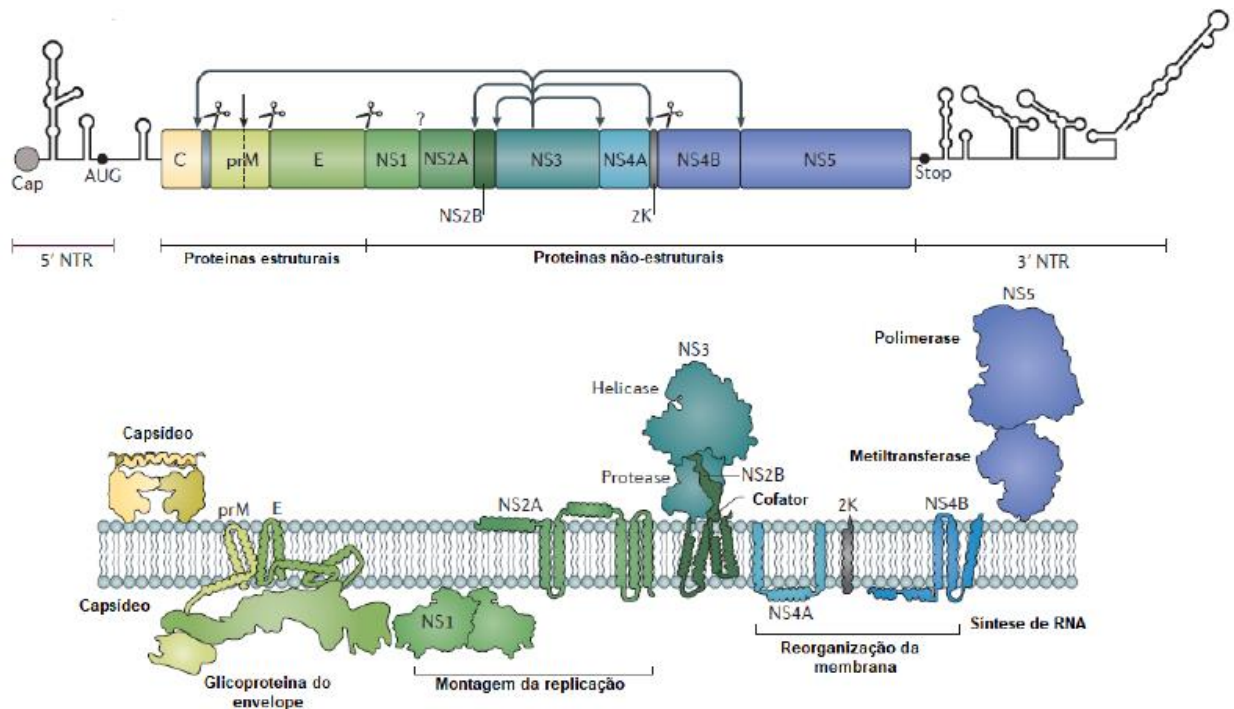
Uma das principais doenças causadas por flavivírus é a dengue, que ocorre pelo agente etiológico *Orthoflavivirus denguei* e acomete cerca de 390 milhões de pessoas por ano,

causando cerca de 10 mil mortes/ano (NEUFELDT et al., 2018). Outros flavivírus de importância na saúde pública são o YFV, JEV, WNV e o ZIKV (WIKAN, SMITH, 2016). Outros membros causam doenças economicamente importantes em animais domésticos e silvestres, ou infectam apenas artrópodes (SIMMONDS et al., 2017).

1.2.1 Genoma e estrutura

Os flavivírus compartilham semelhanças em seu genoma e estrutura morfológica. O genoma é composto com um RNA de fita simples que gera um único RNA mensageiro. É estrategicamente organizado para conter o mínimo de genes necessário para multiplicação, facilitando a evasão do sistema imune. Possui uma janela aberta de leitura com cerca de 10.000 nucleotídeos, a qual codifica uma poliproteína que posteriormente é clivada em proteínas estruturais e não estruturais, e nas extremidades 5' e 3' há uma região não codificante (NTR) (KING et al., 2012). Na Figura 2 é possível observar a organização do genoma viral e a topologia de membrana das proteínas.

Figura 2: Esquema ilustrativo da organização do genoma dos flavivírus e a topologia de membrana de proteínas virais maduras. As tesouras representam o local de clivagem da poliproteína, AUG o códon de iniciação e NTR as regiões não codificantes do genoma.



Fonte: adaptado de NEUFELDT et al., 2018.

A poliproteína é clivada em dez proteínas, tanto por proteases virais como por proteases do hospedeiro. Destas, três são proteínas estruturais (C do capsídeo, prM de membrana e

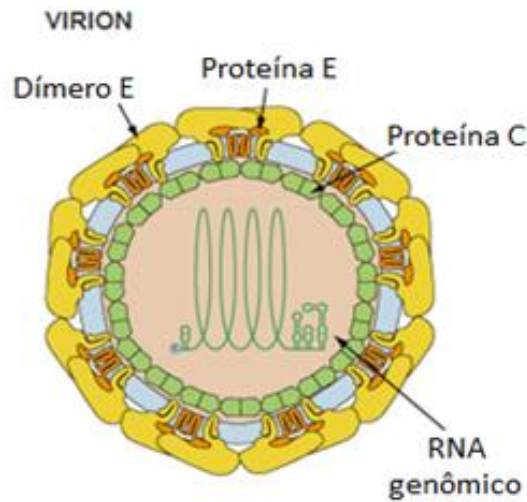
proteína E do envelope) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). A clivagem entre NS2/NS3 ocorre por uma protease viral, a separação de C/prM, prM/E, E/NS1, 2K/NS4B ocorre por uma peptidase de sinal do hospedeiro e a fragmentação de NS1/NS2A ocorre por uma protease do hospedeiro (BEAVER et al., 2018).

O processo de formação da partícula viral inclui todas as proteínas codificadas por seu genoma e são expressas em momentos e localizações celulares específicos. As proteínas não estruturais estão envolvidas no processo de multiplicação. A proteína NS1 juntamente com a NS2A são fundamentais para a multiplicação viral e produção de novas partículas infecciosas. A NS2B apresenta uma subunidade de serina que funciona como cofator de NS3. A NS3 possui função de helicase e protease. Já NS4A é uma proteína integral de membrana com atividade indutora de curva de membrana. A NS4B é uma proteína sem relato de atividade enzimática, mas sabe-se que interage com a NS3 (NEUFELDT et al., 2018).

As proteínas NS3 e NS5 possuem a maior parte das atividades catalíticas fundamentais para a multiplicação. A NS3 apresenta múltiplos domínios, com N-terminal e uma porção C-terminal possuindo as atividades de RNA trifosfatase e RNA helicase que estão envolvidas na captação e síntese de RNA viral. A NS5 contém um domínio N-terminal com atividade multitransferase e no domínio C-terminal atividade RNA polimerase depende de RNA (ZHANG et al., 2017).

Dentre as proteínas estruturais, a proteína C é componente do capsídeo viral e interage com o material genético para formação dos nucleocapsídeos. A glicoproteína prM participa do processo de maturação viral através da clivagem de pr/M em um sítio próximo à membrana pela protease furina do hospedeiro, localizada na rede *trans*-Golgi, assim, a porção M fica ancorada à membrana e uma molécula pr permanece associada ao vírion até o momento da liberação. Após a liberação da partícula viral, a proteína pr se desliga e ocorre a maturação do vírus. A presença da proteína pr evita que o vírus promova fusões de membrana antes de ser liberado da célula hospedeira. Além disso, a proteína M compõe a estrutura externa do vírus juntamente com a proteína E, estas proteínas possuem hélices transmembranas (BEAVER et al., 2018; SCREATON et al., 2015). A proteína E do envelope é a principal proteína estrutural, responsável por promover a adsorção e a entrada do vírus nas células. É o antígeno viral dominante presente na superfície dos vírus, sendo responsável por gerar resposta imune protetora (MODIS et al., 2005; PRASAD et al., 2017). A estrutura dos flavivírus pode ser observada na Figura 3.

Figura 3: Visão geral da estrutura do vírion de flavivírus. Proteína do envelope (E), proteína do capsídeo (C).



Fonte: "[Zika virus: Virion](https://viralzone.expasy.org/6756?outline=all_by_species)," por ViralZone, Swiss Institute of Bioinformatics, disponível em: <https://viralzone.expasy.org/6756?outline=all_by_species>.

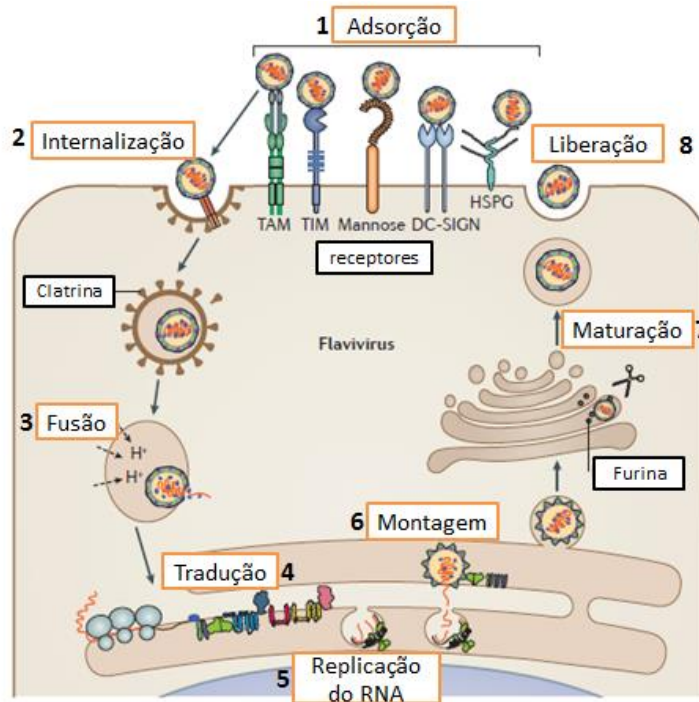
1.2.2 Ciclo de multiplicação

A multiplicação dos flavivírus ocorre no citoplasma de células susceptíveis e permissivas. As partículas virais interagem com os receptores necessários para adsorção do vírus na superfície da célula, seguido por outras interações específicas com os receptores secundários, mediando a internalização endocítica. Os vírus são internalizados por um mecanismo de endocitose mediada por receptor através da interação da proteína E com os receptores da célula hospedeira (NEUFELDT et al., 2018).

O baixo pH do endossoma, resultante da acidificação dos endossomas primários, faz com que o envelope viral se funda com a membrana da vesícula, ocorrendo o desnudamento e liberação do genoma do vírus no citoplasma, onde o nucleocapsídeo é desnudado. Com a liberação do RNA (+), sua identificação ocorre pelos ribossomos, que iniciam a tradução na membrana do retículo endoplasmático rugoso, gerando uma única poliproteína. As proteases virais e celulares catalisam a clivagem co-traducional e pós-traducional da poliproteína. As moléculas de RNA (+) geradas pelo complexo de replicase viral podem ser incorporadas às novas partículas virais por um processo que envolve a encapsidação do RNA, seguido do brotamento no lúmen do retículo endoplasmático, o que ocorre predominantemente em regiões opostas aos locais de replicação. A maturação das partículas nascentes contendo prM acontece ao longo da via secretória por clivagem de prM mediada por furina (SCATURRO et al., 2015;

ZHANG et al., 2017). A esquematização do ciclo de multiplicação dos flavivírus pode ser observada na Figura 4.

Figura 4: Ciclo de multiplicação dos flavivírus. (1) Ligação do vírion nos receptores; (2) Endocitose mediada por clatrina; (3) Acidificação, fusão membranar e liberação do RNA; (4) Tradução do mRNA no retículo endoplasmático; (5) Replicação do RNA e processamento; (6) Montagem do nucleocapsídeo com ativação das furinas para clivagem da prM; (7) Maturação da partícula viral e brotamento; (8) Liberação do vírus maduro por exocitose.



Fonte: adaptado de NEUFELDT et al., 2018.

1.2.3 Vírus Zika

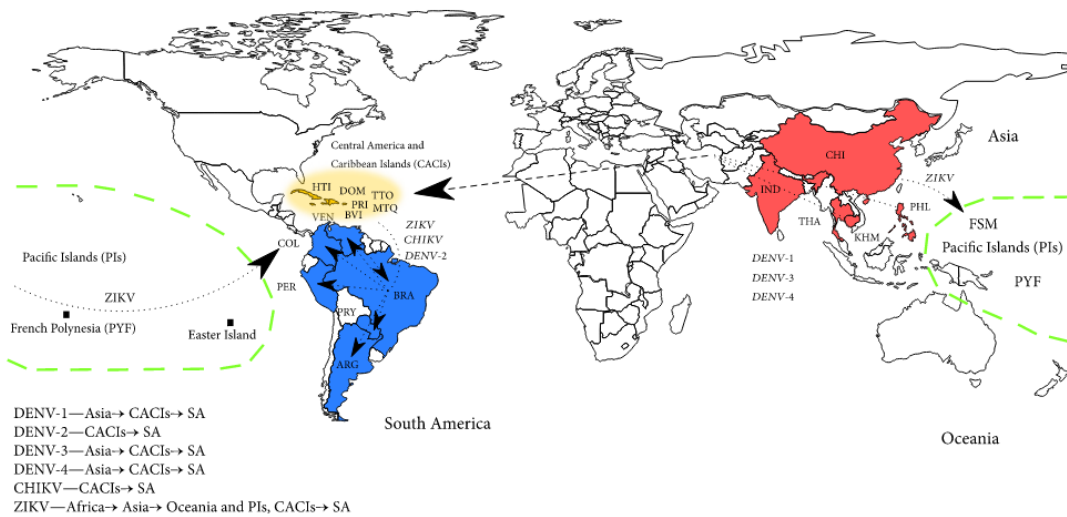
1.2.3.1 Epidemiologia

A descoberta do ZIKV ocorreu em 1947 durante um monitoramento de febre amarela em primatas e em mosquitos *Aedes africanus* na Floresta de Zika, em Uganda. O primeiro relato de caso em humanos, também na Uganda, foi reportado em 1952. Em 1983 foi descoberta uma nova linhagem asiática diferente da africana. Desde então duas linhagens de ZIKV são oficialmente conhecidas, a asiática e a africana. A primeira epidemia fora dos continentes africano e asiático ocorreu nas Ilhas de Yap, localizada na Micronésia, no ano de 2007, atingindo quase 70% da população local. Após alguns anos, em 2013, uma nova epidemia foi relatada, desta vez na Polinésia Francesa. Nos anos de 2014 e 2015 a presença deste vírus foi detectada no continente americano, sendo que no ano de 2015 ocorreu uma grande epidemia no

Brasil. No País, os primeiros casos foram relatados no Rio Grande do Norte, com sintomas parecidos com dengue e, logo após, o isolamento do vírus em pacientes na Bahia (CAO-LORMEAU et al., 2016; FAYE et al., 2014; FERRARIS; YSSEL; MISSÉ, 2019; MUSSO; NILLES; CAO-LORMEAU, 2014).

A princípio a entrada do ZIKV no Brasil foi associada a dois grandes eventos: a Copa do Mundo de Futebol (2014), trazidos por turistas africanos, e ao Campeonato Mundial de Canoagem, também no ano de 2014, do qual participaram esportistas de países do Pacífico afetados pelo vírus (ZANLUCA et al., 2015). No entanto, em um estudo desenvolvido em 2018, foi descoberto que o vírus em circulação no Brasil veio do Haiti através de imigrantes e militares em missões de paz, tendo o vírus migrado da Polinésia Francesa para a Oceania, posteriormente para a Ilha de Páscoa e, em seguida, para América Central e Caribe, chegando ao Brasil no final de 2013, o mesmo caminho percorrido pelo vírus da dengue e da Chikungunya (CAMPOS et al., 2018). A trajetória do ZIKV pode ser observada na Figura 5.

Figura 5: Mapa da rota de migração dos arbovírus. A linha tracejada verde destaca a entrada do ZIKV na América do Sul. O vírus migrou da Polinésia Francesa para a Oceania, passando pela Ilha de Páscoa e, em seguida, para América Central e Caribe, chegando ao Brasil.



Fonte: CAMPOS et al., 2018.

Embora o ZIKV esteja amplamente distribuído geograficamente e, das epidemias que foram documentadas, as infecções em humanos pelo ZIKV eram esporádicas antes da epidemia no Brasil. A Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou em 2016 Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (ESPII) e começou a emitir relatórios mensais sobre a situação da epidemia do ZIKV. Ao fim da ESPII foi declarado um total de 61 áreas com a

presença do vírus, com 13 países com evidência da transmissão de pessoa para pessoa, 31 países com relatos de distúrbios neurológicos associados à infecção pelo ZIKV (microcefalia e má formação congênita) e 23 países com aumento de casos de Síndrome de Guillan-Barré (FERRARIS; YSSEL; MISSÉ, 2019).

No decorrer do surto de ZIKV na América, o número de casos pode ter chegado a quase 1,5 milhões, uma vez que 80% são assintomáticos. O número de casos de ZIKV a partir do ano de 2017 caiu significativamente, apesar de casos isolados ainda serem relatados (FERRARIS, 2019). No ano de 2021 foram detectados 25 casos de febre Zika nos EUA por testes sorológicos. Alguns casos também surgiram na Índia, embora não tenha atingido condições graves, alertas vermelhos foram emitidos (CDC, 2022). Até a semana epidemiológica 48 de 2022 foram reportados pelo Ministério da Saúde quase 10.000 casos prováveis de febre Zika no Brasil, correspondendo a uma taxa de incidência de 4,3 casos por 100 mil habitantes no País (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023). Segundo a Organização Panamericana de Saúde (PAHO) foram reportados 34.176 casos de ZIKV até a semana epidemiológica 53 de 2022 (PAHO, 2023a). Atualmente o risco de transmissão é baixo, no entanto, o vírus da Zika ainda não desapareceu, com isso é necessária vigilância constante e cautela especialmente para mulheres grávidas (CHAKRABARTTY et al., 2022).

O diagnóstico de ZIKV ainda é falho, métodos de detecção disponíveis no mercado apresentam reações cruzadas com outros flavivírus e, com isso, existe um grande número de casos não-notificados ou diagnosticados incorretamente como outra arbovirose (LO; PARK, 2018). Bagno et al. (2019) demonstrou em uma triagem adicional em amostras de pacientes com diagnóstico emitido por um laboratório estadual (de acordo com a política do Ministério da Saúde) casos não notificados ou com diagnóstico errôneo para ZIKV, DENV e CHIKV.

A transmissão do ZIKV ocorre principalmente pela picada da fêmea de mosquitos infectados, sendo os mosquitos do gênero *Aedes* os principais vetores, com predominância para o *Aedes aegypti* nas regiões tropicais (FERRARIS; YSSEL; MISSÉ, 2019). Outras formas de transmissão descritas foram de humano para humano sem a presença do vetor, como de uma mulher grávida para o feto (perinatal), transmissão sexual e durante o aleitamento materno (CDC, 2022). Estudos indicam que a amostra africana é mais bem adaptada à transmissão por mosquitos, enquanto a amostra encontrada nas Américas (origem asiática) pode ter obtido uma maior capacidade de transmissão vertical (AUBRY et al., 2021; BRASIL; NIELSEN-SAINES, 2016; CALVET et al., 2016).

1.2.3.2 Patogenia

A multiplicação do ZIKV ocorre principalmente nas células dendríticas após a inoculação pela picada do mosquito (HASAN et al., 2019). Posteriormente, ocorre a disseminação da infecção, atingindo os linfonodos, miocárdio, sistema nervoso central, músculos esqueléticos e para o feto no caso de gestantes (CHAN et al., 2016). A viremia ocorre de três a quatro dias após o aparecimento dos sintomas e o RNA viral pode ser encontrado a partir do primeiro dia de infecção até o décimo primeiro dia (HASAN et al., 2019).

As manifestações clínicas da febre Zika são semelhantes a outras arboviroses, como dengue e chikungunya. A doença dura em média uma semana e os principais sintomas são febre, erupção cutânea, dor de cabeça, dor nas articulações, conjuntivite e dor muscular. Cerca de 80% das pessoas infectadas por ZIKV são assintomáticas (CDC, 2022). A patogenia do ZIKV se tornou tema de grande preocupação quando o desenvolvimento de doenças graves em recém-nascidos foi relacionado a essa infecção. Na epidemia ocorrida no Brasil, 42% dos fetos nascidos de grávidas infectadas nasceram com algum tipo de anormalidade, como calcificações cerebrais, microcefalia, restrição de crescimento intrauterino ou morte fetal (HASAN et al., 2019).

Embora a infecção por ZIKV tenha caráter agudo e autolimitado, alguns casos apresentam complicações neurológicas graves que podem manifestar até anos depois da infecção. O ZIKV foi relacionado ao desenvolvimento da Síndrome de Guillain-Barré, uma doença autoimune que acomete o sistema nervoso. Depois da epidemia na Polinésia Francesa, o número de casos aumentou mais de vinte vezes (TAPPE et al., 2015).

A população considerada de risco para a infecção pelo ZIKV são as gestantes, principalmente nos três primeiros meses de gestação, momento em que o feto está em formação. O risco também existe para gestantes no segundo trimestre de gestação, porém em nível menor, uma vez que o desenvolvimento de microcefalia no feto é considerado baixo, mesmo que o sistema nervoso do feto não esteja totalmente formado (BRASIL; NIELSEN-SAINES, 2016).

1.2.3.3 Tratamento e profilaxia

Ainda não existe antivirais para o combate da infecção pelo ZIKV. A recomendação é que sejam administrados aos pacientes medicamentos para o controle dos sintomas, como analgésicos e anti-inflamatórios não esteroides, repouso e hidratação (CDC, 2022).

Até o momento não há vacinas disponíveis para o combate do ZIKV. Pesquisas extensas estão sendo realizadas para o desenvolvimento de uma vacina contra o ZIKV. Alguns estudos

demonstram vacinas candidatas para avaliação clínica, como vacinas de DNA, RNA modificado, vírus inativados e uma vacina com vetor de sarampo, no entanto essas ainda se encontram em fase de desenvolvimento (HASAN et al., 2019), sendo que duas já se encontram em fase 3 (CLINICALTRIALS, 2023).

O combate ao vetor é uma medida importante baseada em ações governamentais e privadas com a participação efetiva da comunidade, mobilizada por campanhas e ações educacionais. As principais medidas são o monitoramento da infestação, dispersão de inseticidas, agentes de controle biológico e técnicas moleculares para controle populacional dos mosquitos, assim como a combinação de mais de uma técnica. Intensas pesquisas vêm sendo desenvolvidas para o controle do vetor, como mosquitos geneticamente modificados, infecção de mosquitos com a bactéria *Wolbachia* para interrupção do ciclo reprodutivo, nebulização espacial, entre outras (XAVIER et al., 2017; ZARA et al., 2016). Porém, apesar das novas estratégias, o combate do vetor não foi eficaz nos últimos anos para o controle das arboviroses. Faz-se necessário o desenvolvimento de um planejamento estratégico e contínuo, além de avaliações científicas que buscam apontar ações integradas de controle vetorial aliada a inovações tecnológicas, além de aumentar a atuação conjunta de diversos setores da sociedade.

1.2.4 Vírus dengue

1.2.4.1 Epidemiologia

O DENV possui quatro sorotipos (DENV-1 a DENV-4) e o aumento de número de casos ocorreu à medida que esses sorotipos expandiram sua disseminação e passaram a cocircular globalmente (MESSINA et al., 2014).

Há relatos de epidemias de dengue desde o século XVII, mas os primeiros registros plausíveis estão entres os anos 1779 e 1780. Os primeiros surtos de dengue ocorreram no século XVIII em Java (sudoeste asiático), na Filadélfia (Estados Unidos) e no Cairo e Alexandria (Egito). No século seguinte, quatro grandes epidemias assolaram o Caribe e o sul dos Estados Unidos (GUBLER, 1998).

Em 1906 foi confirmado que essa doença era transmitida por mosquitos do gênero *Aedes* e, no ano seguinte, foi demonstrado que a dengue era causada por um vírus. Mais tarde, pesquisas de John Burton Cleland e Joseph Franlin Siler completaram a compreensão básica da transmissão de dengue (HENCHAL; PUTNAK, 1990). Durante a Segunda Guerra Mundial houve uma pandemia da doença, mas graças a um extenso esforço para reduzir o número de

Aedes aegypti os casos de dengue caíram (MURRAY; QUAM; WILDER-SMITH, 2013; WILDER-SMITH et al., 2019).

Os primeiros casos de dengue grave foram relatados em 1950 nas Filipinas e na Tailândia. Em 1958, também na Tailândia, há o primeiro registro de síndrome do choque (queda ou ausência de pressão arterial). Após 1980 o número de casos voltou a expandir drasticamente, ocorrendo uma segunda expansão da dengue na Ásia, quando o Sri Lanka, a Índia e as Ilhas Maldivas tiveram as primeiras epidemias de dengue grave. Desde então, epidemias de dengue causadas pelos quatro sorotipos também se intensificaram na África (MURRAY; QUAM; WILDER-SMITH, 2013; WILDER-SMITH et al., 2019).

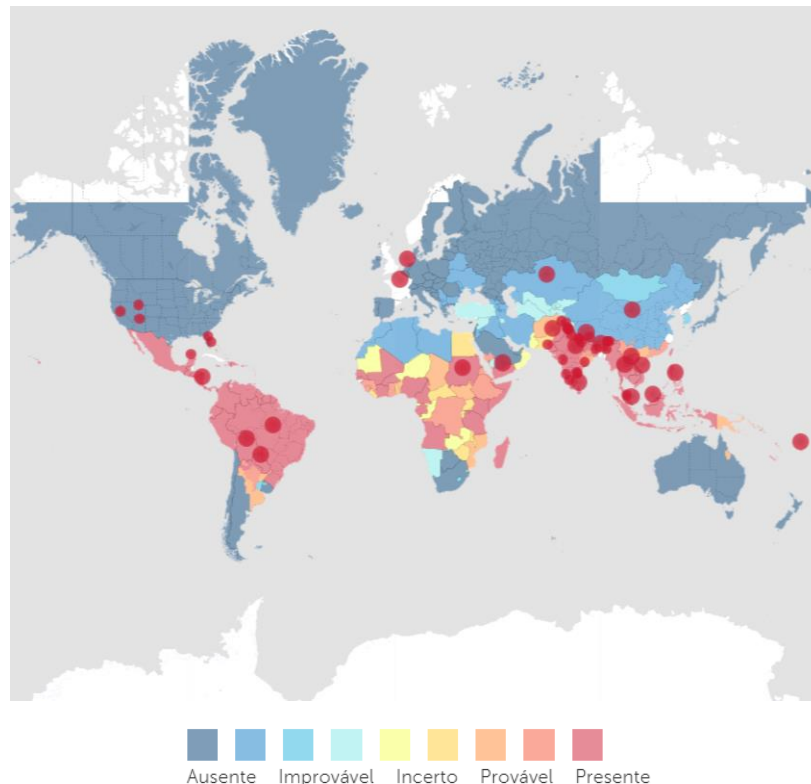
O isolamento do vírus do tipo 2 na América ocorreu em 1953, na ilha de Trindad, mas a presença do vírus se intensificou após a década de 60. A primeira epidemia confirmada neste continente foi associada ao sorotipo 3, isolado no Caribe e na Venezuela em 1964. Esse sorotipo não havia mais sido encontrado até 1978, quando detectado na Nicarágua e no Panamá. Já o sorotipo 1 foi isolado pela primeira vez em 1977 na Jamaica, vindo provavelmente da África. A partir de então, países da América do Sul, como Brasil, Bolívia, Paraguai, Equador e Peru possuem surtos periódicos. O sorotipo 2 foi o responsável pelo primeiro surto de dengue grave ocorrido fora da Ásia. O surto aconteceu em 1981, em Cuba. O segundo surto dessa manifestação da dengue ocorreu na Venezuela, em 1989. Em 1981 houve a introdução do tipo 4 no continente, causando diversas epidemias. Em 1995, a dengue já era a doença viral transmitida por mosquitos mais importante do mundo (PATHAK; MOHAN, 2019).

No Brasil ocorre a circulação dos quatro sorotipos e, ano após ano, é um dos países com maior número de casos de dengue no mundo. Cerca de 1/3 da população mundial está sob risco de infecção por algum sorotipo da dengue, estima-se que o número de casos anuais em humanos chegue a 390 milhões (ROSSI et al., 2018).

Os casos de DENV aumentaram significativamente no ano de 2022, até a semana epidemiológica 52 de 2022 foram reportados pelo Ministério da Saúde quase um milhão e meio de casos prováveis no Brasil, podendo ser comparado aos altos índices dos anos de 2016 e 2020 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023). Segundo a PAHO houveram 2.636.490 casos de dengue no Brasil até a semana epidemiológica 52 (PAHO, 2023b).

Em um mapa divulgado do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) em 2023 (Figura 6) é possível observar os países que se encontram em risco contínuo infecção pelo DENV.

Figura 6: Mapa das áreas de risco de infecção pelo vírus da Dengue.



Fonte: Adaptado de CDC, 2023. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dengue/areaswithrisk/around-the-world.html>>. Acesso em 02/02/2023.

O ciclo de transmissão do DENV ocorre por dois vetores, o *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, e possui como reservatórios os humanos e outros primatas nos quais o vírus se multiplica e se mantém na natureza. O maior número de casos de transmissão é pelo mosquito *Aedes aegypti* fêmea, que se alimenta de sangue humano para amadurecimento de seus ovos e, caso esteja infectada, é capaz de infectar o hospedeiro. O *Aedes albopictus* é um vetor secundário, que originalmente era encontrado apenas na Ásia, porém já se adaptou a outros ambientes, como na América do Norte e Europa. Outras formas mais raras de transmissão do DENV são através de produtos sanguíneos, transplante de órgãos e transmissão perinatal (GUARNER; HALE, 2019).

1.2.4.2 Patogenia

Como já mencionado, o vírus da dengue possui quatro sorotipos. A infecção por um sorotipo confere imunidade ao longo da vida para esse sorotipo em particular, mas não confere

imunidade permanente aos outros. Com isso, uma pessoa que vive em uma área endêmica pode se infectar com os quatro sorotipos (CHONG; KHAN, 2019).

A patogenia da dengue pode variar desde infecções assintomáticas a casos graves, caracterizadas por hemorragia, choque e falência de órgãos vitais. As manifestações clínicas derivam de uma confluência de fatores, tanto do vírus quanto do hospedeiro, fatores como virulência da amostra viral, histórico de infecções, idade, gênero e etnia podem contribuir para gravidade da infecção (WHITEHORN; SIMMONS, 2011).

O período de incubação do DENV pode variar de 3 a 14 dias e a resolução ocorre entre os dias 4 e 7 após o aparecimento dos sintomas. Os principais sintomas são febre, náusea, vômito, erupção cutânea e dores atrás dos olhos, músculos e articulações (CDC, 2022). Também pode ocorrer trombocitopenia, leucopenia e é comum notar elevação moderada dos níveis de aminotransferase hepática (CHONG; KHAN, 2019).

Os sinais de alerta para evolução de dengue grave ocorrem após a resolução da febre, geralmente entre o dia 3 a 7. Outros sintomas podem aparecer, como dor no estômago ou dor abdominal, vômitos (três vezes ao dia), sangramento no nariz e gengiva, vômito de sangue ou sangue nas fezes, sentimento de cansaço, inquietação e irritabilidade. Esses sintomas estão associados ao aumento do risco de ruptura capilar e hemorragia e deve ser acompanhado imediatamente por uma equipe médica, pois pode evoluir para complicações circulatórias ou complicações atípicas como miocardite, encefalite, hepatite, pancreatite e rinite. Nos casos de dengue grave, a viremia pode ser aumentada de 10 a 100 vezes quando comparado a forma clássica. A forma grave acomete principalmente crianças (CDC, 2022; CHONG; KHAN, 2019)

O risco de desenvolvimento da forma grave é maior em pacientes com infecção secundária por sorotipos heterólogos, isso ocorre devido ao aumento da infecção dependente de anticorpo (ADE), no qual os anticorpos adquiridos a partir de uma infecção anterior se ligam ao vírus, mas falham em neutralizar efetivamente o sorotipo secundário e facilitam penetração da partícula viral nas células (CHONG; KHAN, 2019).

1.2.4.3 Tratamento e profilaxia

Assim como para a febre Zika, não existe tratamento antiviral específico para a dengue e, novamente, é realizado o tratamento dos sintomas, repouso e reidratação. No caso de dengue grave o paciente deve ser encaminhado imediatamente para um pronto-atendimento (CDC, 2022).

Em 2015, a Dengvaxia (Sanofi-Pasteur), uma vacina de vírus recombinante que confere proteção contra os quatro sorotipos de dengue foi licenciada. No entanto, surgiram muitas controvérsias em relação a essa vacina. Nos ensaios de fase III foi recomendado que a vacina fosse utilizada em pacientes entre 9 e 45 anos, pois não apresentou boa eficácia em idades inferiores ou superiores aos limites estabelecidos. Após a comercialização, uma modelagem previu que a vacinação poderia aumentar a incidência de dengue em ambientes com baixo índice de infecção. Com isso, a OMS recomendou uma pesquisa de soroprevalência em toda a população antes da vacinação (“Dengue vaccine: WHO position paper, September 2018 – Recommendations”, 2019; NASAR; RASHID; IFTIKHAR, 2020). Atualmente no Brasil só é recomendado a vacinação de pessoas que já tiveram a doença causada por algum sorotipo do vírus (ANVISA, 2019). Recentemente, foi licenciada uma nova vacina de proteção contra os quatro sorotipos de dengue, a Qdenga (Takeda Pharma), destinada a crianças a partir de 4 anos de idade e adultos até os 60 anos. A vacina apresentou cerca de 60% de proteção para indivíduos soronegativos para dengue e cerca de 75% para pacientes soropositivos para dengue. O imunizante segue sob monitoramento de efeitos adversos (ANVISA, 2023). Atualmente 11 estudos encontram em fase III de desenvolvimento (CLINICALTRIALS, 2023).

Como já revisado, o controle do vetor é feito por meios mecânicos, químicos e biológicos, porém sem muito sucesso.

1.3 Diagnóstico de flavivírus

As infecções por flavivírus trazem grandes implicações na saúde pública em todo o mundo, por isso, é importante desenvolver plataformas diagnósticas precisas, específicas e de fácil detecção (CHONG et al., 2019). O diagnóstico presuntivo dos flavivírus, na maioria das vezes, é realizado a partir da observação dos sintomas clínicos, no entanto, como já descrito, os sintomas iniciais são muito semelhantes, o que dificulta o diagnóstico correto.

No Brasil, os casos de dengue, Zika e febre amarela são de notificação compulsória, estão presentes na “Lista Nacional de Notificação Compulsória” do Ministério da Saúde. Segundo este órgão, metade dos casos prováveis não é confirmado devido ao diagnóstico diferencial ser inacessível (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

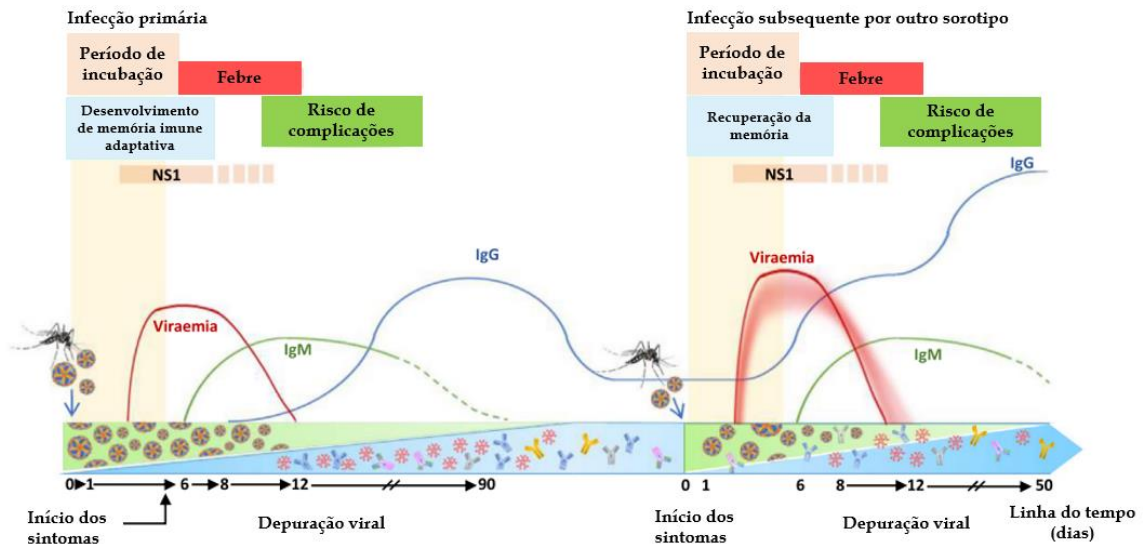
Os principais métodos para detecção desses vírus podem ser classificados em direto ou indiretos. Os métodos moleculares consistem na detecção direta do genoma viral na amostra do paciente utilizando técnicas de RT-PCR convencional ou RT-qPCR. As técnicas moleculares são consideradas padrão ouro, uma vez que conseguem identificar de forma precoce a presença

do vírus, não dependem de soroconversão, são sensíveis e específicos. Contudo, esses métodos possuem algumas limitações, uma vez que só são aplicáveis durante a fase aguda (1-10 dias). Outra limitação é a complexidade associada a essas ferramentas, já que exigem um laboratório com uma equipe treinada e equipamentos especializados e nem sempre é uma opção para locais remotos e com assistência médica limitada ou não acessível, onde muitas das vezes essas viroses estão presentes. Apesar da disponibilidade de testes comerciais, a maior parte das PCRs é desenvolvida internamente e precisam ser protocolizados e padronizados em cada laboratório (LAND et al., 2019; MULLER; DEPELSENAIRE; YOUNG, 2017).

Os métodos indiretos consistem na detecção da resposta imune desenvolvida após a infecção, especialmente anticorpos específicos direcionados aos antígenos virais. Os métodos indiretos consistem em uma alternativa plausível no diagnóstico tardio da infecção e monitoramento de sua prevalência na população. Existem inúmeros métodos sorológicos disponíveis, sendo o ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) o mais utilizado em laboratórios de análises clínicas. São considerados métodos com aplicabilidade clínica imediata e mais empregados durante epidemias devido a rapidez no processamento, facilidade de manuseio e custo relativamente baixo (KERKHOF et al., 2020). No entanto, esses testes possuem a limitação da reatividade cruzada entre os flavivírus. O PRNT (do inglês, *Plaque reduction neutralization test*), é um teste que também consiste na detecção de anticorpos, os neutralizantes. É um ensaio de referência para detecção de ZIKV e DENV, porém é uma técnica laboriosa e demorada que requer laboratórios com nível de biossegurança necessária para manipulação desses patógenos, se tornando muitas vezes inviável no diagnóstico clínico.

A detecção de anticorpos fornece uma janela mais ampla de oportunidades de diagnóstico devido à permanência por longos períodos. Na Figura 7 é possível observar as fases de incubação, viremia e da presença de anticorpos após a entrada do vírus no hospedeiro, tanto em infecções primárias como secundárias, no caso de dengue.

Figura 7: Janela de tempo das respostas de viremia e anticorpos contra infecções por arbovírus. Uma infecção típica por arbovírus começa por um período de incubação assintomática, seguida por uma fase virêmica relativamente curta (5-7 dias). Normalmente os anticorpos IgM aparecem alguns dias após a infecção e podem persistir por até seis meses, já os IgG aparecem vários dias após a infecção e podem ser detectados por vários meses, anos ou resto da vida.



Fonte: adaptado de KERKHOF et al., 2019.

A presença de IgM e IgG devem ser interpretadas de forma cuidadosa. Geralmente durante uma infecção por um flavivírus detecta-se IgM entre 6 e 14 dias de infecção. Após duas semanas a quantidade de IgM começa a diminuir, embora existam casos excepcionais de níveis de IgM persistentes, o que pode dificultar a identificação de uma infecção aguda. A presença de IgG aumentada com dias de atraso após o aparecimento de IgM demonstra infecção primária. Durante uma infecção secundária a resposta de IgM é geralmente atrasada, enquanto IgG aumenta rapidamente (OHST et al., 2018; ROCKSTROH et al., 2015).

1.3.1 ELISA

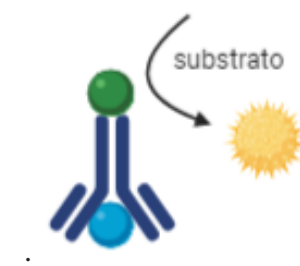
Existem vários testes sorológicos disponíveis no mercado, os testes ELISA são amplamente utilizados para a detecção de arbovírus. O método baseia-se na interação entre o antígeno e o um anticorpo. O teste combina a especificidade da ligação antígeno-anticorpo com a sensibilidade das reações enzimáticas, além da utilização de uma substância reveladora. Geralmente o ensaio é realizado em placas de 96 poços com a superfície tratada, onde são ligados os antígenos de forma direta ou indireta que irão se ligar a anticorpos. O fato de poder imobilizar os reagentes ao poço torna o teste uma ferramenta poderosa, uma vez que é possível

lavar o poço para eliminar o que não se ligou, tornando o ensaio mais específico (CROWTHER, 2000).

É necessário ligar ao anticorpo primário ou secundário um marcador para detecção do antígeno. Os marcadores mais utilizados são as enzimas peroxidase de rabanete silvestre e fosfatase alcalina, essas enzimas catalisam um substrato específico que é adicionado ao poço gerando um produto mensurável que é medido por absorvância (CROWTHER, 2000). Os testes de ELISA podem ser realizados em vários formatos, sendo que os procedimentos básicos são rotineiramente modificados. Os formatos mais conhecidos são o direto, o indireto e o sanduíche, sendo que o passo crucial é a fixação do antígeno.

No ELISA direto ocorre a adição da amostra tamponada, geralmente o soro de paciente, posteriormente, adiciona-se o anticorpo primário acoplado a enzima. Caso a amostra possua o antígeno alvo, o anticorpo irá se ligar e, logo após, adiciona-se o substrato que será consumido caso o anticorpo tenha se ligado ao antígeno. Entre cada etapa é realizada sucessiva lavagens para eliminação dos contaminantes. É considerado o procedimento básico, pois não utiliza anticorpos de captura. Neste procedimento é necessário que possua o anticorpo conjugado específico para cada antígeno testado (CAI et al., 2015). Na Figura 8 é possível observar a construção deste teste.

Figura 8: Esquematização de um ensaio de ELISA direto. A esfera azul clara representa o antígeno, acoplado ao antígeno se encontra o anticorpo primário conjugado com a enzima, representado de azul escuro, com a adição do substrato tem-se a geração de cor (representada pela estrela amarela).

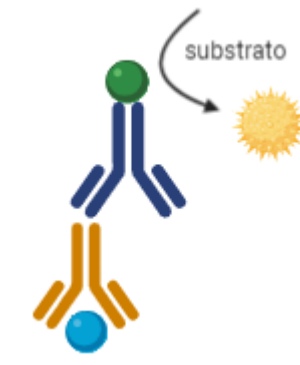


Fonte: o autor (gerado no software Biorender).

O ELISA indireto consiste na utilização de um antígeno aderido a um suporte, onde é adicionado o soro do paciente, caso este contenha anticorpos específicos para o antígeno, haverá formação de um complexo. Posteriormente é adicionado um anticorpo secundário dirigido contra imunoglobulinas da espécie onde se busca detectar os anticorpos (no caso, humano). Nesse anticorpo é conjugado uma enzima que, ao entrar em contato com o substrato, é

responsável pela mudança de cor nas condições em que houve formação do complexo (Figura 9). Neste procedimento não é necessário que o anticorpo secundário seja específico ao antígeno e sim ao anticorpo primário (CAI et al., 2015).

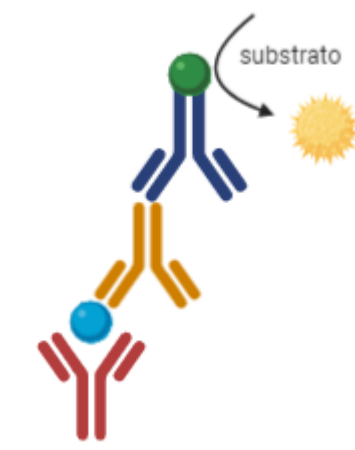
Figura 9: Esquematização de um ensaio de ELISA indireto. A esfera azul representa o antígeno, acoplado a ele (laranja) está o anticorpo presente na amostra do paciente. Em azul, o anticorpo secundário conjugado com a enzima, com a adição do substrato tem-se a geração de cor (representada pela estrela amarela).



Fonte: o autor (gerado no software Biorender).

O ELISA sanduíche utiliza um anticorpo de captura e um de detecção. Primeiramente são imobilizados ao fundo da placa os anticorpos de captura, posteriormente, é adicionado a amostra de interesse e, se existir o antígeno alvo, ele se ligará ao anticorpo de captura. Adiciona-se, então, o anticorpo primário. Logo após, adiciona-se o anticorpo secundário conjugado com a enzima, que irá se ligar ao antígeno. E, por fim, é adicionado o substrato que reage com a enzima, gerando a cor que será detectada ao final da reação (Figura 10).

Figura 10: Esquematização de um ensaio de ELISA sanduíche. Em vermelho está representado o anticorpo de captura, a esfera azul representa o antígeno presente no soro do paciente, acoplado a ele (laranja) está o anticorpo primário. Em azul, o anticorpo secundário conjugado com a enzima, com a adição do substrato tem-se a geração de cor (representada pela estrela amarela).



Fonte: o autor (gerado no software Biorender).

Existem diversos testes disponíveis para diagnóstico sorológico de flavivírus, por ELISA ou teste-rápido (imunocromatografia de fluxo lateral), sendo a maior parte dos testes total ou parcialmente importados. Os testes totalmente importados são aqueles produzidos e comercializados por empresas multinacionais, como a Euroimmun (Alemanha). Ao passo que os testes parcialmente importados são aqueles cujos insumos são importados e o kit diagnóstico é montado por uma empresa brasileira, como a Bioclin (Brasil). Alguns poucos testes são produzidos e montados com produtos totalmente nacionais, como pela Biomanguinhos (Brasil). Esses testes possuem algumas limitações devido apresentação de reação cruzada entre os flavivírus, porém, o uso de proteínas recombinantes, principalmente do envelope e NS1, demonstraram melhorar seu desempenho (GONCALVES et al., 2018).

Testes imunocromatográficos, também conhecidos como testes rápidos, tem sido uma ferramenta de diagnóstico cada vez mais utilizada. A maioria dos métodos são capazes de detectar antígenos ou anticorpos. Possuem diversas vantagens, como, rapidez no resultado, custo de fabricação relativamente baixo, vida de prateleira longa e independência de equipamentos de leitura, no entanto, possui limitações relacionadas a sensibilidade e reprodutibilidade. Alguns exemplos os para detecção do antígeno NS1 do ZIKV são os produzidos pela Gold Analisa Diagnóstico e Advagen e para detecção de anticorpos IgM e IgG os produzidos pela Ecodiagnóstica e Biomanguinhos. Para a detecção do antígeno NS1 de

DENV alguns exemplos são os testes rápidos produzidos pela Ecodiagnóstica, Bicon e Celer e para detecção de IgM e IgG os desenvolvidos pela MedLevensohn e Ecodiagnóstica.

A detecção dessas arboviroses ainda é um grande desafio, principalmente em países que possuem a cocirculação de flavivírus. Isso ocorre devido aos epítomos reativos compartilhados, acarretando a reação cruzada da reatividade dos anticorpos (MULLER; DEPELSENAIRE; YOUNG, 2017). Os flavivírus possuem alto grau de identidade estrutural e de sequência de nucleotídeos. Possuem cerca de 60% da identidade de sequência de aminoácidos (C 55%, prM 59%, E 61,4%, NS1 62,5%, NS2A 46,8%, NS2B 54,8%, NS3 67,7%, NS4A 58,4%, NS4B 64% e NS5 67,3%) (KERKHOF et al., 2020). Além da semelhança entre os ZIKV, DENV e YFV, a reação cruzada também ocorre com outros flavivírus com WNV, SLEV, JEV, sendo que para o DENV ainda pode ocorrer reação entre os quatro sorotipos.

Assim, buscar novos sítios antigênicos para detecção desses vírus, bem como a produção de proteínas quiméricas contendo mais de uma região imunogênica, torna-se uma alternativa promissora para desenvolvimento de métodos diagnósticos diferenciais e eficazes.

1.4 Sítios antigênicos

Apesar da similaridade genômica entre os flavivírus, alguns epítomos apresentam diferenças, tornando-se promissores no diagnóstico diferencial (XU et al., 2016).

Muitas das plataformas diagnósticas disponíveis utilizam como antígeno a proteína E, visto que é a região onde a resposta dos anticorpos é direcionada. Comumente a proteína E é utilizada em sua totalidade ou com a remoção da porção transmembrana, que aumenta a imunogenicidade (LIANG et al., 2018; MEN; BRAY; LAI, 1991). A proteína E possui três domínios (EI, EII e EIII). O domínio III (EIII) é o responsável por induzir a maior parte dos anticorpos neutralizantes e é considerado como tendo maior potencial antigênico (CORZO-GÓMEZ et al., 2019). Combe et al. (2017) demonstraram que, no ponto de vista sorodiagnóstico, o domínio EIII da proteína do envelope carrega as regiões mais importantes. No entanto, o domínio EIII possui grande similaridade entre os flavivírus e seu uso acaba se tornando inviável, sendo interessante o uso de sítios antigênicos de outras proteínas virais.

Além da proteína E, a proteína NS1 é muito utilizada no diagnóstico sorológico. Essa glicoproteína está associada a ativação de receptores toll-like (TLRs), inibição do sistema complemento e indução da resposta imune ligada à fase aguda em casos graves e é a primeira proteína presente na corrente sanguínea. No entanto, a NS1 é uma proteína muito conservada

entre os flavivírus, possuem sítios de reação cruzada e o uso da proteína em sua totalidade não consegue diferenciar ZIKV e DENV (AVIRUTNAN et al., 2010; LIBRATY et al., 2002).

O uso de proteínas quiméricas com a associação de diversos antígenos aumenta o desempenho de imunoenaios, tornando-se uma abordagem promissora. O uso combinado de duas ou mais proteínas em um único ensaio intensifica a sensibilidade e a especificidade do teste (SANTOS et al., 2017).

1.4.1 Proteínas quiméricas

O progresso nas áreas de microbiologia, genética, biotecnologia e bioinformática fornecem ferramentas importantes para desenvolvimento de estratégias de diagnóstico, dentre elas, o uso de proteínas quiméricas.

As proteínas quiméricas são proteínas criadas a partir de engenharia genética com a fusão de dois ou mais genes. Podem ser combinados peptídeos inteiros, contendo todo o domínio funcional da proteína original, ou apenas uma parte da sequência. As proteínas quiméricas podem ser produzidas por meio de tecnologias recombinantes. Os genes são fundidos e adicionados a um vetor de expressão e são ligados entre si a partir de ligantes. As extremidades 3' e 5' dos genes são excluídas, com exceção dos nucleotídeos da extremidade onde a primeiro domínio irá manter o terminal 5' e o último domínio o terminal 3'. Além disso, são excluídos os códons de terminação (STROHL, 2017). O esquema da construção de uma proteína quimérica pode ser observado na Figura 11:

Figura 11: Esquema de uma proteína quimérica. Os domínios são ligados a partir de ligantes, no domínio 1 é mantida a extremidade NH₂ e no domínio 2 a extremidade COOH.



Fonte: adaptado de STROHL, 2017.

As estruturas das proteínas quiméricas podem ser compostas por milhares de aminoácidos, com ligações da cadeia principal e cadeias laterais, sendo possíveis inúmeras configurações para a proteína sintética (SAMISH et al., 2011).

Os epítomos selecionados para a construção de uma quimera devem atender alguns critérios fundamentais:

I – ser imunodominantes, ou seja, precisam ser capazes de induzir resposta imune mais fortes;

II – possuir especificidade para anticorpos contra o antígeno, capazes de reconhecer os anticorpos específicos para o patógeno, exibindo imunorreatividade para as amostras de soro infectadas;

III – ser linear, para conservação de sua integridade estrutural;

IV – ser filogeneticamente conservado (DIPTI; JAIN; NAVIN, 2006).

Para ligação dos epítomos é necessário adicionar ligantes “*hinge*” (dobradiças) que forneçam espaçamento apropriado entre os domínios, apoiando o dobramento correto da proteína. Além disso, os ligantes fornecem interações importantes entre os domínios, reforçam a estabilidade e reduzem impedimentos estéricos. Existem ligantes flexíveis, rígidos ou cliváveis *in vivo*. Os ligantes flexíveis permitem que os domínios se curvem de forma dinâmica e adaptável, o mais utilizado são pequenos peptídeos compostos por resíduos de glicina. Os rígidos são utilizados quando é necessário manter um espaçamento altamente específico entre os domínios, pode ser utilizado resíduos grandes de prolina. Os cliváveis são projetados para permitir a liberação de um ou mais domínios sob certas condições, como reduções de pontes dissulfeto, ou quando entra em contato com outra biomolécula (proteases). A escolha dependerá do tipo de aplicação (CHEN; ZARO; SHEN, 2013).

A escolha do ligante utilizado é de grande importância, pois pode alterar a estabilidade, o estado oligomérico, resistência proteolítica e solubilidade. Os mais utilizados são os ligantes flexíveis, a glicina é geralmente escolhida, pois a ausência de um β -carbono facilita a interação da cadeia principal de polipeptídeo com ângulos diedros que são energeticamente impossibilitados para outros aminoácidos. O tamanho é calculado de forma que exista a menor distância entre a região COO^- de uma proteína e a região NH^+ da outra proteína (DIPTI; JAIN; NAVIN, 2006; ROBINSON; SAUER, 1998).

O número quase infinito de combinações possíveis para geração de proteínas quiméricas se tornou uma ferramenta versátil e útil para aplicações bioquímicas e diagnósticas. Essa abordagem já foi bem estabelecida na literatura com resultados satisfatórios para o diagnóstico de diversas doenças. Gao e Zhao (2019) desenvolveram um ensaio de diagnóstico para *Mycobacterium tuberculosis* utilizando uma proteína multi-epítomos, Galdino et al. (2016) para diagnóstico de hepatite C, Faria et al., (2015) para o diagnóstico de *Leishmania infantum*,

Taherkhani et al. (2015) para a o diagnóstico de hepatite E e Souza et al. (2013) para o diagnóstico de hepatite B.

2. Justificativa

As arboviroses emergentes e reemergentes representam um grande problema de saúde pública. Dentre as arboviroses, a Dengue continua sendo a doença mais importante do planeta e está associada a uma carga social e financeira significativa. Anualmente os casos no mundo têm aumentado drasticamente, tornando-se um grande desafio de saúde pública global. Estimativas indicam que ocorrem cerca de 390 milhões de casos de dengue por ano.

A Febre Zika chamou a atenção de todo o mundo após o grande surto de 2016, quando foi associada com complicações congênitas e cerca de 40% das crianças nasceram com alguma anormalidade, além disso, essa virose foi associada à Síndrome de Guillain-Barré. Apesar da diminuição dos números de ocorrências, ainda são registrados novos casos em todo o Brasil. Em um estudo divulgado por Ferguson et al. (2016) foi previsto que a imunidade de rebanho atrasa novas epidemias em uma década, sugerindo que após este período novos surtos de Zika podem vir a acontecer. A ausência de uma vacina efetiva e medicamentos antivirais específicos dificultam o controle dessas doenças, uma vez que medidas como o combate do vetor não têm sido eficazes.

No ano de 2022, o Brasil viveu um novo surto da Dengue, com quase um milhão e meio de casos registrados, os casos de Zika aumentaram 118% comparados ao ano anterior, com números de casos conflitantes entre o Ministério da Saúde e a Organização Panamericana de Saúde. O aumento do número de casos pode estar relacionado com a diminuição das ações de controle de arboviroses durante a pandemia de COVID-19. Aliado a esse relaxamento, as condições climáticas com longos períodos de chuva e calor intenso no final do ano de 2021 e começo de 2022 favoreceram a multiplicação do principal vetor, o *Aedes aegypti*. Houve também um aumento nos casos de Chikungunya.

As arboviroses possuem sintomas na fase inicial muito semelhantes, como febre, erupção cutânea, dor de cabeça, dor nas articulações e dor muscular (CDC, 2022), tornando o diagnóstico presuntivo extremamente desafiador. Ainda, a semelhança genética entre ZIKV e DENV resulta na reatividade cruzada nos testes sorológicos disponíveis (YAN et al., 2018). O diagnóstico correto entre essas infecções é fundamental, principalmente para geração de dados epidemiológicos para coordenar ações de saúde pública, informar às atividades de vigilância, incluindo monitoramento da circulação do vírus, acompanhamento de sintomas neuronais tardios ocasionados por infecção por ZIKV, orientar ações preventivas e informar gestantes sobre o risco de infecção gestacional.

Dessa forma, faz-se necessário o desenvolvimento de estratégias diagnósticas que sejam específicas, sensíveis, rápidas e de fácil execução. Dentre essas estratégias, o uso de proteínas quiméricas pode intensificar a sensibilidade e a especificidade do teste, como já descrito na literatura para outras doenças.

Diante do contexto discutido acima, esse trabalho tem como proposta o desenvolvimento de uma ferramenta imunoenzimática a partir da geração de proteínas quiméricas, com alta especificidade e sensibilidade para detecção dos flavivírus DENV e ZIKV.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Desenvolver e padronizar um teste sorológico baseado em ELISA para os flavivírus ZIKV e DENV a partir da geração de proteínas recombinantes quiméricas.

3.2 Objetivos específicos

- Produzir proteínas quiméricas para os vírus DENV e ZIKV;
- Obter o perfil de antigenicidade das proteínas produzidas e avaliar o potencial antigênico das proteínas produzidas em ELISA indireto.
- Avaliar a funcionalidade *in silico* das proteínas quiméricas produzidas.

4. Materiais e Métodos

4.1 Produção das proteínas recombinantes

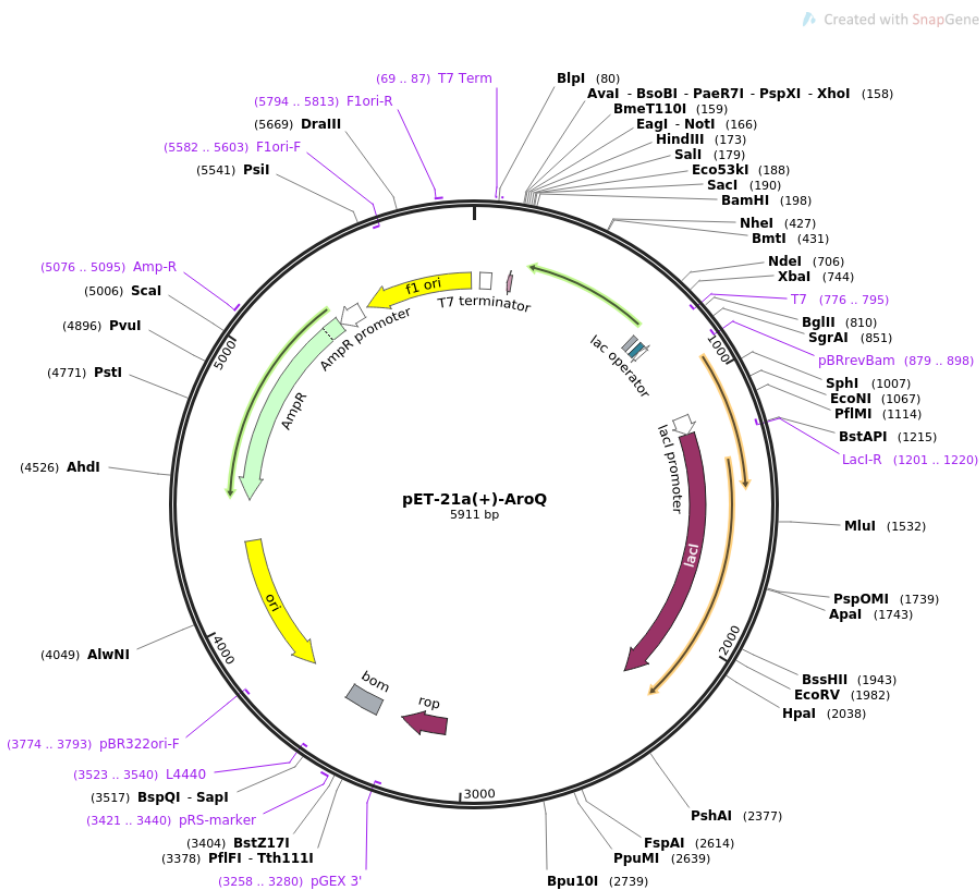
4.1.1 Construção dos genes

Foram desenhadas proteínas quiméricas para os flavivírus ZIKV e DENV a partir de epítomos imunogênicos, provenientes de proteínas estruturais e não estruturais dos vírus.

Para isso, inicialmente foi criado um banco de epítomos lineares de célula B que já haviam sido descritos na literatura e que apresentavam bons resultados ao serem utilizados em testes sorológicos, com alta sensibilidade e especificidade. Os epítomos de ZIKV foram alinhados com as sequências Refseq do NCBI de DENV 1-4 (NC_001477.1; NC_001474.2; NC_001475.2; NC_002640.1) e YFV (NC_002031.1), utilizando o programa Blastp (NCBI) para obtenção do percentual de identidade e os epítomos de DENV foram alinhados com a sequência Refseq do NCBI de ZIKV (NC_012532.1) e YFV (MATERIAL SUPLEMENTAR).

Os epítomos mais promissores foram selecionados e as proteínas quiméricas desenhadas. As sequências aminoacídicas das proteínas foram traduzidas reversamente em sequências nucleotídicas com adição de uma metionina inicial, códon de parada e cauda *his-tag* contendo seis resíduos de histidina para posterior purificação. As sequências foram sintetizadas comercialmente (GenOne Biotech) e códon-otimizadas para expressão em sistema *E. coli*. Após, foram subclonadas em vetor de expressão pET-21a(+) (Figura 12) entre os sítios de restrição NdeI e XhoI. Com essa construção foi fornecida a sequência do promotor da RNA polimerase T7 na porção N terminal pelo plasmídeo. Este plasmídeo contém o gene de resistência a ampicilina, o que permite a seleção após transformação em bactérias competentes.

Figura 12: Mapa do Vetor bacteriano pET21a (+) para expressão induzível de proteínas marcadas com T7 no terminal N.



Fonte: AddGene

Os plasmídeos sintetizados foram ressuspendidos em tampão TE [80% Tris-HCl (1 M, pH 8,0) e 20% EDTA (0,5 M, pH 8,0)] na concentração de 100 ng/μL.

4.1.2 Análise conformacional das proteínas quiméricas

4.1.2.1 Modelagem de estruturas quiméricas de ZIKV

As sequências das proteínas foram submetidas aos programas AlphaFold2 (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipyn#scrollTo=G4yBrceuFbf3>) (MIRDITA et al., 2022) e ao SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) (WATERHOUSE et al., 2018) para modelagem de suas estruturas tridimensionais. A modelagem de cada sequência alvo gerada por SWISS-MODEL foi avaliada em um modelo ZIKV NS1 disponível (PDB ID: 5GS6) (XU et al., 2016). O alinhamento e a análise dos modelos foram avaliados com o software PyMOL (v0.99c)

(DELANO, 2006). Além disso, para comparar os perfis de semelhança e identidade das sequências, foi avaliado um alinhamento das sequências FASTA com a ferramenta MUSCLE (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>). As figuras foram geradas em PyMOL.

4.1.2.2 Identificação de potenciais sondas e sítios de ligação das estruturas quiméricas de ZIKV

Com o objetivo de prever potenciais resíduos de ligação nos alvos modelados, empregou-se as previsões dos webserver FTSite e FTMap para potenciais cavidades de proteínas que poderiam atuar como locais de ligação ou *hot-spots*, ou seja, resíduos relevantes que geralmente são responsáveis diretos por interações (por exemplo, proteína-proteína) (KOZAKOV et al., 2015). Aqui, os aglomerados de moléculas de sonda resultantes de FTMap em cada sítio previsto também puderam sugerir a afinidade dessas regiões de ligação potenciais. As análises de sítios e estruturas foram realizadas em PyMOL e todas as figuras foram geradas em PyMOL.

4.1.3 Produção de clones bacterianos contendo os genes de interesse

4.1.3.1 Preparação de células competentes

A clonagem e expressão dos genes de interesse foram realizadas em células competentes de *E. coli* da linhagem DH5 α e BL21 (DE3), respectivamente.

Para isso, células sementes foram descongeladas no gelo e inoculadas em 5 mL de meio LB - Luria Bertani (Kasvi) [10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de NaCl, pH 7,0] e incubadas *overnight* a 37 °C, sob agitação de 200 rpm. Posteriormente, as culturas foram transferidas para *erlenmeyers* contendo 200 mL de meio LB suplementado [10 mM MgSO₄, glicose 0,2 %] e incubadas sob as mesmas condições até atingir uma densidade ótica (DO) a 600 nm entre 0,4 e 0,6. Logo após, as células foram mantidas em gelo por 10 minutos e centrifugadas a 1.500 x *g* por 15 minutos a 4 °C, ressuspensas em uma solução de CaCl₂ [100 mM CaCl₂, 10 mM HEPES], incubada em gelo e novamente centrifugada. O sedimento foi ressuspensado em 1 mL de solução de CaCl₂ com glicerol [100 mM CaCl₂, 10 mM HEPES, glicerol 10 %]. Foram preparadas alíquotas de 100 μ L e armazenadas em freezer -80 °C.

4.1.3.2 Transformação bacteriana em *E. coli* (DH5 α) por choque térmico

As células competentes *E. coli* da linhagem DH5 α , células específicas para clonagem, foram transformadas com os plasmídeos sintetizados. Para isso, foram descongeladas alíquotas de células competentes, previamente preparadas, e adicionado 100 ng de cada plasmídeo, sendo que uma alíquota foi utilizada como controle negativo. Os microtubos contendo as culturas e os plasmídeos foram incubados em gelo por 30 minutos, logo após foram incubados a 42 °C por 45 segundos e novamente incubados no gelo por 2 minutos. Em seguida, adicionou-se 1 mL de meio LB a cada microtubo e o conteúdo foi transferido para um tubo de 50 mL. Os tubos foram incubados por 1 hora a 37 °C e 200 rpm. Por fim, as culturas foram semeadas em placas de Petri contendo meio LB ágar e ampicilina (100 μ g/mL – Sigma-Aldrich) e incubadas *overnight* a 37 °C.

Após a incubação, colônias crescidas na placa de Petri foram selecionadas e inoculadas em 50 mL de meio LB suplementado com ampicilina para posterior extração.

4.1.3.3 Extração e digestão do DNA plasmidial

Os plasmídeos foram extraídos com o kit *QIAprep Spin Midiprep Kit* (Qiagen) de acordo com as recomendações do fabricante e quantificados no NanoDrop (Thermo Scientific).

Os produtos do miniprep foram digeridos com as enzimas XbaI e XhoI. Inicialmente, em um microtubo foram adicionados 2 μ L de tampão D (10x - Promega), 0,2 μ L de albumina sérica bovina (BSA, 10 μ L/mL - Promega), 0,5 μ L de XbaI (10 U/ μ L - Promega) e 0,5 μ L de XhoI (10 U/ μ L - Promega), 11,8 μ L ddH₂O e 5 μ L de DNA (0,5 μ g). Os microtubos foram incubados por 3 horas em banho maria a 37 °C.

O produto da digestão foi analisado em gel de agarose a 1 % com SYBR Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher) e comparado com o padrão Quick-Load 100 bp DNA ladder (New England Biolabs).

4.1.3.4 Transformação bacteriana em *E. coli* (BL21-DE3, Arctic Express-DE3 e NiCo21-DE3) por choque térmico

Após a avaliação dos plasmídeos e seus insertos, as bactérias *E. coli* competentes da linhagem BL21 (DE3), ArcticExpress (DE3) e NiCo21 (DE3) foram transformadas com os plasmídeos contendo os genes de interesse conforme descrito no item 4.1.3.2.

4.1.3.5 PCR de colônia

Para confirmação da transformação das colônias com o plasmídeo de interesse foi realizada uma PCR de colônia. Para cada reação foram adicionados 0,25 µL da enzima Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), 5 µL de tampão 10 X, 1,5 µL de MgSO₄, 1 µL de dNTP (10 µM), 1 µL do primer T7 promoter (TAATACGACTCACTATAGGG - IDT) e o primer T7 terminador (GCTAGTTATTGCTCAGCGG - IDT), 1 µL da amostra e 39,3 µL de H₂O nuclease free (Promega). As amostras foram adicionadas no termociclador (Bio-rad) por 5 minutos a 95 °C, seguidos de 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 55 °C por 1 minutos, 72° por 2 minutos, e por fim 6 minutos a 72 °C. Os amplificados foram analisados em gel de agarose 1 % com SYBR Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher) e comparado com o padrão Quick-Load 1kb DNA ladder (New England Biolabs).

4.1.3.6 Expressão das proteínas recombinantes

Inicialmente, clones bacterianos da linhagem BL21 (DE3) (item 4.1.3.4) foram selecionados e crescidos em 5 mL de meio LB com adição de ampicilina (100 µg/mL – Sigma Aldrich) a 37 °C e 200 rpm até atingir uma DO₆₀₀ de 0,4. Após atingir a DO desejada foi adicionado IPTG (1 mM - Promega) e incubou-se por 3 h a 37 °C. As culturas celulares foram centrifugadas 20 minutos a 8000 x g a 4 °C e armazenados a -20 °C. Para confirmação da expressão das proteínas de interesse, as culturas celulares foram avaliadas por SDS-PAGE (item 4.1.4) e Western Blot (item 4.1.5).

Para determinar a melhor condição de expressão das proteínas de interesse, os clones bacterianos também foram crescidos por 16 horas a 25 °C. O rendimento foi avaliado por SDS-PAGE.

Com as padronizações realizadas, os clones bacterianos foram induzidos em 250 mL de meio LB. As culturas celulares foram centrifugadas por 20 minutos a 8000 x g a 4°C e os *pellets* armazenados a -20 °C. Os *pellets* foram ressuspensos em 10 % do volume total de tampão de lise [20 mM Tris HCl; 100 mM NaCl; 1M DDT; 100 mM PMSF; 1M Benzamidina, pH 7,4]. Então, as células foram lisadas utilizando o homogeneizador Emulsiflex (Paralab). As colônias foram passadas por três vezes no ciclo da bomba com uma pressão entre 15.000 a 20.000 psi. Após a lise, as amostras foram clarificadas por ultracentrifugação a 40.000 x g por 30 minutos a 4 °C. A fração solúvel (sobrenadante) foi separada e a fração insolúvel (*pellets*) foi ressuspensa em 25 mL de H₂O milli-Q.

As frações solúveis e insolúveis foram analisadas em SDS-PAGE para verificação da solubilidade das proteínas recombinantes.

4.1.3.7 Teste de solubilidade em ureia das proteínas recombinantes

Após análise por SDS-PAGE, detectou-se que as proteínas expressas estavam em sua maior parte nas frações insolúveis, com isso, 1 mL de cada amostra foi centrifugada a 15.000 g por 10 minutos e os *pellets* dos extratos celulares foram ressuspensos em tampão Tris-HCl [20 mM, pH 7,4] com adição de ureia em diferentes concentrações (2 M, 4 M, 6 M e 8 M). Logo após, as amostras foram avaliadas por SDS-PAGE para determinar a concentração de ureia a ser utilizada.

4.1.3.8 Purificação das proteínas recombinantes

Os lisados bacterianos foram purificados por cromatografia de afinidade. Para isso, a fração insolúvel foi novamente centrifugada a 40.000 x g por 45 minutos a 4 °C e os *pellets* foram ressuspensos em tampão de solubilidade [20 mM Tris HCl, 100 mM NaCl, 30 mM Imidazol, 4 M ou 8 M Ureia, pH 7,4].

As amostras foram purificadas no aparelho ÄKTA start (GE Healthcare Life Sciences) de acordo com as instruções do fabricante. O sistema utilizado foi o HisTrap HP System (GE Healthcare Life Sciences), através do comando “*Method Run*”, opção “*Template*” e “*Affinity step gradient*”. Primeiramente, a coluna foi lavada com água milli-Q por cinco vezes o volume da coluna. Logo após, a coluna foi novamente lavada com o tampão de ligação [20 mM Tris HCl, 100 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 4 M ou 8 M Ureia, pH 7,4] por cinco vezes o volume

da coluna. A amostra foi injetada na coluna e após foi realizada mais uma lavagem com o tampão de ligação. A amostra foi eluída por gradiente do tampão de eluição [20 mM Tris HCl, 100 mM NaCl, 500 mM Imidazol, 4 M ou 8 M Ureia, pH 7,4] de 0 a 100 %, sendo coletados 2 mL por tubo e armazenadas a -20 °C. Os eluatos foram avaliados por SDS-PAGE.

4.1.4 SDS-PAGE

As amostras resultantes da expressão e purificação foram analisadas em gel desnaturante de poliacrilamida a 15 %. O gel de empilhamento foi preparado com 10% de SDS, 10% de APS, TEMED e tampão Tris-HCl [1,0 M pH 6,8] e o gel de separação foi preparado com a adição de acrilamida/bisabrilamida 30 %, SDS 10 %, APS 10 %, TEMED e tampão Tris-HCl [1,5 M pH 8,8].

As amostras foram adicionadas a de tampão de proteína 5 x [Tris-HCl 250 mM pH 6,8, SDS 10 %, Azul de bromofenol 0,05 %, Glicerol 40 %, β -mercaptoetanol 10 %] e desnaturadas por aquecimento a 95 °C por 10 minutos. As amostras foram aplicadas no gel juntamente com padrão de peso molecular Sigma MW-SDS-70.

O fracionamento foi realizado utilizando o equipamento Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-rad), aplicando a voltagem de 60 V até as bandas se alinharem no limite do gel de empilhamento, quando então, a voltagem foi aumentada para 120 V durante a corrida no gel de separação. O gel foi corado com uma solução de Comassie Blue por 30 minutos e descorada *overnight* com solução descorante [Metanol 10 %, Ácido acético 7 % e H₂O 83 %]. Logo após, os géis foram visualizados no fotodocumentador ChemiDoc MP Imaging System (Bio-rad).

4.1.5 Western blot

Inicialmente, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de SDS-PAGE (conforme item 4.1.4). Após o fracionamento eletroforético, as amostras foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Cytiva) com uma amperagem de 350 mA por 2 horas com a utilização do equipamento Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) e adição de tampão de transferência [Tris-Glicina 10 x 10 %, Metanol 10 % e ddH₂O q.s.p]

Logo após, a membrana foi incubada com solução de bloqueio [TBS 1 x, Tween-20 0,05 %, 5 % de leite em pó desnatado (Molico – Nestlé)] *overnight* a 4 °C. Posteriormente, a membrana foi lavada por três vezes por 5 minutos com tampão de lavagem [50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl e Tween-20 a 0,5%]. A membrana foi incubada por 2 horas com o

anticorpo primário anti-histidina (1:1000, Invitrogen) ou pool de soro (1:50). Posteriormente, a membrana foi novamente lavada com tampão de lavagem por três vezes e incubada com anticorpo secundário anti-mouse IgG para a reação com anti-histidina (1:40.000, Sigma Aldrich) e anti-humano IgG para a reação com pool de soro (1:25.000, Sigma Aldrich). A membrana foi lavada com tampão de lavagem novamente por três vezes, revelada utilizando o kit *Clarity Western ECL Substrate* (Bio-rad) e visualizada no fotodocumentador ChemiDoc MP Imaging System (Bio-rad).

4.1.6 Quantificação proteica pelo método de Bradford

A quantificação das proteínas purificadas foi realizada a partir de uma curva padrão de BSA (1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL e 0,12 mg/mL - Promega). Para isso, em um microtubo foi adicionado 200 µL de ddH₂O, 790 µL de reagente de Bradford (Bio-rad) e 10 µL de amostra ou padrão e incubado por 5 minutos. Posteriormente, em uma placa de 96 poços foi adicionado 100 µL de cada preparação, em triplicata, e absorbância foi medida a 595 nm no leitor de microplacas Multiskan (Thermo Fisher). A concentração das proteínas foi obtida em função da curva padrão de BSA. Para conferência, a concentração também foi mensurada pelo kit “*Randox Total Protein (Biuret)*”.

4.1.7 Obtenção e caracterização da soroteca humana

Soros de pacientes positivos para Zika (ZIKV+), positivos para dengue (DENV+) e negativos para Zika e dengue (ZIKV-/DENV-) foram gentilmente cedidos pelo Doutor Glauco de Carvalho Pereira do Laboratório de Virologia e Riquetsioses da Fundação Ezequiel Dias (FUNED). Esses soros foram caracterizados por kit comercial ZIKV IgG e IgM, DENV IgM ou PCR e, posteriormente caracterizados no CT Vacinas pelo kit ZIKV IgM (Euroimmun) e DENV IgM (Panbio). Além disso, os soros ZIKV+ e DENV+ foram novamente caracterizados por ensaio de soroneutralização (PRNT) (item 4.1.7)

Soros de pacientes ZIKV+/DENV-, DENV+/ZIKV- e ZIKV-/DENV- foram gentilmente cedidos pelo Doutor Maurício Lacerda Nogueira do Laboratório de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP). Esses soros foram obtidos de um estudo de coorte e caracterizados por kit comercial IgG e IgM para ZIKV e DENV e por ensaio de soroneutralização (PRNT).

O soro humano de plasma masculino, de origem dos EUA, filtrado e estéril (Sigma Aldrich) foi utilizado como controle negativo.

4.1.8 Ensaio de soroneutralização

Inicialmente foram confeccionadas placas de 24 poços com $1,5 \times 10^5$ células Vero por poço com 24 horas de antecedência. O soro dos pacientes foi inativado por 30 minutos a 56°C , posteriormente foram diluídos (1:20, 1:40, 1:80 e 1:160) e incubados com 50 unidades formadoras de placas (UFP) de vírus por 60 minutos a 37°C a atmosfera de 5 % de CO_2 .

Para infecção das placas, inicialmente foi realizada a lavagem dos poços com PBS 1 x e, logo após, foi adicionada as diluições dos soros preparadas, sendo que dois poços foram destinados para o controle de células, onde foi adicionado somente meio de cultura e dois poços destinados para o controle de vírus. As placas foram incubadas por 60 minutos a 37°C e atmosfera de 5 % de CO_2 , sendo a placa agitada delicadamente a cada 10 minutos para que ocorresse melhor adsorção viral. Após o tempo de incubação, o inóculo viral foi retirado e foi adicionado 1 mL de meio DMEM (Sigma Aldrich) semissólido contendo 1,25 % de soro fetal bovino (Sigma Aldrich) e 1,25 % de carboximetilcelulose (CMC) (Synth). Posteriormente, as placas foram incubadas nas mesmas condições por 5 dias.

A revelação ocorreu a partir da fixação das células com formol 10 % por 60 minutos e posterior adição de cristal violeta 1 % por 15 minutos. As placas de lise geradas foram contadas e o percentual de soroneutralização foi calculado a partir da comparação com controle de vírus.

4.1.9 Ensaio Imunoenzimático indireto (ELISA)

Inicialmente, placas de 96 poços (*High Binding*, Sarstedt, Cat. 82.1581.200) foram sensibilizadas com diferentes concentrações das proteínas recombinantes em tampão carbonato [Na_2CO_3 85 mM, NaHCO_3 15 mM, pH 9,5] e incubadas *overnight* a 4°C . Posteriormente, foi adicionado a cada poço 250 μL de solução de bloqueio (leite em pó desnatado 5 % (Molico – Nestlé), dissolvido em solução de lavagem), a placa foi incubada por 2 horas. Logo após, as placas foram lavadas com 250 μL de solução de lavagem (PBS 1 x, Tween 20 0,1 % e leite em pó desnatado 0,1 % (Molico – Nestlé) por três vezes e foi adicionado o pool de soro/soro individual (1:100 e 1:50) diluído em solução de lavagem por 30 minutos a 37°C . As placas foram novamente lavadas e foi adicionado o anticorpo secundário anti-humano IgG conjugado a peroxidase (1:10.000, 1:15.000 e 1:20.000, Sigma Aldrich) por 30 minutos a 37°C . Após a

incubação, as placas foram novamente lavadas e foi adicionado 100 µL de TMB (Sigma Aldrich) por 30 minutos. A reação foi paralisada com adição de 100 µL de ácido sulfúrico. A absorvância foi medida a 450 nm no leitor de placas Multiskan (Thermo Fisher).

4.1.8.1 Protocolo otimizado para ELISA anti-ZIKV

Placas de 96 poços (*High Binding*, Sarstedt, Cat. 82.1581.200) foram sensibilizadas com 400 ng de proteínas recombinantes em tampão carbonato (Na₂CO₃ 85 mM, NaHCO₃ 15 mM, pH 9,5) e incubadas *overnight* a 4 °C. Posteriormente, foi adicionado a cada poço 250 µL de solução de bloqueio (leite em pó desnatado 5 % (Molico – Nestlé), dissolvido em solução de lavagem), a placa foi incubada por 2 horas a 37 °C. Logo após, as placas foram lavadas por três vezes com 250 µL de solução de lavagem (Na₂HPO₄ 100 mM, KH₂PO₄ 18 mM, NaCl 1500 mM, KCl 28 mM, Sacarose 2 %, Tween 20 1 %, Tween 80 0,1 %, Proclin 0,1 %, leite em pó desnatado 5 % (Molico – Nestlé)) e foi adicionado a amostra de soro humano (1:100) diluído em solução de lavagem por 30 minutos a 37 °C. As placas foram lavadas por duas vezes com solução de lavagem e logo após foi aplicado 100 µL de ureia 6 M por 5 minutos a 25 °C e lavadas novamente por mais duas vezes com a solução de lavagem, foi adicionado o anticorpo secundário anti-humano IgG (1:70.000, Sigma Aldrich) por 30 minutos a 37 °C. Após a incubação, as placas foram novamente lavadas por cinco vezes e foi adicionado 100 µL de TMB (Scienco Biotech) por 15 minutos. A reação foi paralisada com adição de 100 µL de ácido sulfúrico. A absorvância foi medida a 450 nm no leitor de placas Multiskan (Thermo Fisher).

4.1.8.2 Análise dos resultados de ELISA

A interpretação foi feita calculando o *cut-off* a partir da Equação 1:

$$Cut - off = média das absorvâncias negativas + 2 x desvio padrão$$

O índice foi calculado pela Equação 2:

$$Índice = \frac{absorvância das positivas}{cut - off}$$

A interpretação do índice foi feita a partir dos dados da Tabela 1:

Tabela 1: Interpretação do índice do ensaio de Elisa.

Resultado	Índice
Reagente	<1,1
Indeterminado	0,8 – 1,1
Não reagente	>0,8

4.1.8.3 Avaliação do desempenho do ELISA

Para a determinação da eficiência da ferramenta desenvolvida, os resultados encontrados foram comparados com os resultados já conhecidos, em: verdadeiro positivo, falso positivo, falso negativo e verdadeiro negativo, conforme o Quadro 1:

Quadro 1: Referência para classificação dos resultados.

Classificação dos soros	Resultados obtidos pelos testes desenvolvidos		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	Verdadeiro positivo (A)	Falso negativo (C)	A + C
Negativo	Falso positivo (B)	Verdadeiro negativo (D)	B + D
Total	A + B	C + D	A + B + C + D

Os resultados que indicam erros nos testes são o falso negativo e o falso positivo. O resultado falso negativo ocorre quando o teste apresenta um resultado negativo para um paciente que possui a infecção. Já um resultado falso positivo ocorre quando o teste apresenta resultado positivo, porém o paciente não possui a infecção. Os resultados assertivos são os verdadeiros positivos e os verdadeiros negativos. O resultado verdadeiro positivo indica que o teste deu positivo e o paciente estava com a infecção. O resultado verdadeiro negativo ocorre quando o teste deu negativo e o paciente não possuía infecção (CAMPBELL et al., 2007).

Além disso, as ferramentas desenvolvidas foram avaliadas pelos parâmetros de sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia (AC), como mostrado na Tabela 2:

Tabela 2: Parâmetros de avaliação de desempenho dos testes desenvolvidos.

Parâmetro	Equação
Especificidade	$E = \frac{D}{(B + D)}$
Sensibilidade	$S = \frac{A}{(A + C)}$
Valor preditivo negativo	$VNP = \frac{D}{(C + D)}$
Valor preditivo positivo	$VPP = \frac{A}{(A + B)}$
Acurácia	$AC = \frac{(A + D)}{(A + B + C + D)}$

A especificidade indica a frequência com que as amostras verdadeiramente negativas recebem o resultado negativo pelo teste. A sensibilidade mostra a frequência com que o teste diagnóstico detecta as amostras verdadeiramente positivas. O valor preditivo negativo informa a chance de um paciente com um resultado de teste negativo ser um verdadeiro negativo (ou seja, não ter sido infectado), relacionando-se, portanto, à especificidade, já o valor preditivo positivo refere-se à probabilidade de um paciente com um resultado de teste positivo ser verdadeiro positivo (ou seja, ter sido infectado), relacionando-se à sensibilidade. Finalmente, a acurácia indica a probabilidade de o teste fornecer resultados corretos, ou seja, ser positivo nos pacientes infectados e negativo nos não infectados (CAMPBELL et al., 2007).

4.1.8.4 Análise estatística

Os gráficos e análises estatísticas foram realizadas pelo programa GraphPad Prism 9 utilizando o teste Two-way ANOVA com múltiplas comparações. A análise estatística do ensaio de ELISA padronizado foi realizada por curva ROC, no qual é demonstrado a relação entre a sensibilidade (verdadeiros positivos) e a especificidade (falsos positivos). A partir da curva ROC foi possível analisar a área sob a curva (AUC), que representa o desempenho geral do teste, levando em consideração os valores de sensibilidade de cada ponto de corte. Quanto maior o poder do teste em discriminar entre soropositivos e soronegativos, mais a curva se aproxima do canto superior esquerdo. Com isso, quanto mais a AUC se aproxima de 1, melhor o teste

(HOSMER JR.; LEMESHOW; STURDIVANT, 2013). Os valores de AUC podem ser observados na Tabela 3:

Tabela 3: Valores de AUC para avaliação do desempenho do teste.

$0,5 \leq AUC < 0,7$	Sem discriminação
$0,7 \leq AUC < 0,8$	Discriminação aceitável
$0,8 \leq AUC < 0,9$	Discriminação muito boa
$AUC \geq 0,9$	Discriminação excelente

4.2 Identificação de potenciais epítomos para diagnóstico de DENV

4.2.1 Predição de epítomos lineares de célula B para DENV

A predição de epítomos foi realizada em colaboração com a professora Daniella Bartholomeu do Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos (LIGP -UFMG). Inicialmente, foram selecionadas cinco sequências brasileiras de cada um dos quatro sorotipos do vírus da Dengue depositadas no GenBank (Tabela 4).

Tabela 4: Sequências brasileiras de DENV obtidas no GenBank.

Vírus	Amostra	Número de acesso
DENV1	BR/SJRP/709/2013	KP188545.1
	BR/SJRP/2271/2014	KP188568.1
	BR/SJRP/509/2012	KP188544.1
	BR/SJRP/807/2013	KP188547.1
	2_BE_H_584526	OK605754.1
DENV2	Isolado 175	MW577822.1
	Isolado 184	MW577830.1
	BeAr849487	MK517773.1
	5_SP194589	OK605761.1
	BR/BID-V3580/2008	JN819404.1
DENV3	BR/BID-V2383/2002	KF955473.1
	D3PY/AS10/03	JF808129.1
	D3BR/MR9/03	JF808124.1

	424/BR-PE/06	JX669508.1
	283/BR-PE/05	JX669502.1
	2_BE_H_403714	OK605768.1
	DKE-121	OK605599.1
DENV4	MT/BR27_TVP17913/2012 isolate serum_27	KJ579247.1
	BR/SJRP/850/2013	KP188566.1
	BR/SJRP/733/2013	KP188565.1

Os epítomos lineares de célula B foram preditos separadamente entre os sorotipos, utilizando o programa Bepipred versão 2.0. Foi utilizada a abordagem de janela deslizante selecionando epítomos com tamanho de 15 aminoácidos. Os dados obtidos foram tratados localmente, os epítomos que possuíam um *score* menor que 0,5 foram excluídos. Foi utilizado um *cut-off* de 0,6 para média e mediana. Foi estabelecido que os epítomos deveriam possuir ao menos quatro aminoácidos diferentes por sequência e foram excluídos os que possuíam mais de oito aminoácidos repetidos. Além disso, os epítomos precisavam ser conservados entre as sequências iniciais e os redundantes foram eliminados. Os peptídeos foram alinhados utilizando o programa Blastp com os comandos padrões, os epítomos preditos foram alinhados contra a sequência RefSeq de ZIKV, os epítomos que possuíam similaridade foram excluídos.

4.2.2 *Screening* de peptídeos em membrana spot

Os peptídeos encontrados na predição de epítomos foram sintetizados e imobilizados de forma covalente em uma membrana de nitrocelulose derivatizada (membrana spot), gentilmente produzida e cedida pelo Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos do departamento de Parasitologia do ICB/UFMG.

Após a produção da membrana spot foi realizado um imunoblot. Inicialmente foi adicionada à membrana 50 mL de solução de bloqueio [BSA 5 %, Sacarose 4 %, PBS 1 x] *overnight* sob agitação moderada. Após esse período, a membrana foi lavada por três vezes com 100 mL da solução de lavagem [Tween 20 0,01 %, PBS 1 x] sob agitação rápida por 10 minutos cada. A membrana foi incubada com o pool de soro de paciente negativo (1:1000, Sigma Aldrich) diluído em 20 mL de solução de lavagem por 2 horas sob agitação rápida. Logo após a membrana foi novamente lavada por três vezes. A membrana foi incubada com 20 mL anticorpo secundário anti-humano IgG (1:10.000, *Fab specific*, Sigma Aldrich). Novamente a membrana foi lavada por três vezes. Foi adicionada à membrana luminata forte em quantidade

suficiente para cobrir a membrana e a leitura foi realizada no equipamento ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare). A membrana foi lavada uma vez com 100 mL de solução de lavagem.

Para regeneração da membrana, foi realizada a lavagem por três vezes com 30 mL de N-N' dimetilformamida (DMF) por 10 minutos cada em um recipiente de polipropileno. Logo após, foi adicionado 100 mL de solução desnaturante [Ureia 8 M, SDS 1 %] sob agitação moderada *overnight*. Após a incubação, foi realizada mais uma lavagem com solução desnaturante por 30 minutos. A membrana foi lavada por duas vezes com 150 mL de água mili-Q por 2 minutos sob agitação rápida e em seguida lavada por três vezes com 100 mL de solução ácida [55 % de etanol, 35 % de água mili-Q e 10% de ácido acético glacial] por 10 minutos cada. Novamente a membrana foi lavada com água mili-Q e lavada por duas vezes com 50 mL de etanol sob agitação rápida por 5 minutos cada. Após os procedimentos de lavagem a membrana foi seca em temperatura ambiente e armazenada a 4°C.

O procedimento foi repetido utilizando soro de paciente ZIKV+ (1:1.000) e depois com soro de paciente DENV+ (1:1000).

4.3.2.1 Análises densiométricas em imunoblot do tipo dot blot utilizando o ImageJ

Para a análise dos dados gerados no dot blot foi utilizado o software ImageJ (NIH) com a extensão “*Protein Array Analyzer*”. Inicialmente foi gerado um grid para cada um dos soros (DENV-/ZIKV-, DENV+ e ZIKV+) onde é realizado o ajuste de coordenadas, linhas e colunas da membrana. Após a geração do grid é gerado uma tabela com os dados de densitometria por spot e uma membrana modelada com as cores atribuídas a cada spot. Após a geração desses dados foi realizado uma análise conjunta das membranas onde os dados gerados são normalizados e novas tabelas com os dados de densitometria são gerados. Após a obtenção desses dados, eles foram analisados utilizando o software RStudio para obtenção do *cut-off* das amostras negativas e posteriormente o cálculo razão entre as densitometrias obtidas para as amostras positivas e o *cut-off*.

5. Resultados e Discussão

5.1 Construção das proteínas quiméricas

Para produção das proteínas quiméricas foi realizada uma busca na literatura a fim de selecionar epítomos diferenciais já descritos e testados em ensaios sorológicos. Os epítomos encontrados para ZIKV foram alinhados com as sequências Refseq do NCBI de DENV (1-4) e YFV, os epítomos encontrados para DENV foram alinhados com as sequências Refseq de ZIKV e YFV. Os percentuais de identidade entre os epítomos e as Refseq foram analisados e utilizados como ponto de corte para a escolha das sequências mais promissoras para diferenciação entre esses vírus.

Nas primeiras análises, os epítomos que possuíam mais de cerca de 60% de identidade foram excluídos. Após, foram selecionados três epítomos para ZIKV descritos por Lee et al. (2018) que foram testados por ELISA indireto e diferenciaram ZIKV de DENV e CHIKV, e quatro epítomos descritos por Kam et al. (2019) que foram analisados por ensaio de ELISA indireto para diferenciação de soros de paciente infectados por ZIKV e DENV. Os epítomos estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5: Epítomos lineares de células B selecionados para ZIKV.

Nº	Sequência	Referência	Proteína	Percentual de identidade				
				YFV	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4
1	SVEGELNAILEENGV		NS1	72,73%	0%	0%	0%	0%
2	WGKSYFVRAAKTNS FVVDGDTLKECPLKH	(LEE et al., 2018)	NS1	40,00%	40,74%	37,04%	48,15%	37,04%
3	PAVIGTAVKKGKEAVH		NS1	0%	0%	0%	0%	0%
4	TGVFVYNDVEAWDRYKY		NS1	35,29%	44,44%	33,33%	44,44%	38,69%
5	HMCDATMSYECPLDEGV	(KAM et al., 2019)	prM	42,86%	46,67%	40,00%	53,33%	53,85%
6	HKKGEARRSRAVTLPSH		prM	0%	0%	0%	0%	0%
7	TVNMAEVRSYCYEASIS		E	53,85%	0%	46,15%	0%	64,29%

Foram construídas três proteínas quiméricas a partir dos epítomos da Tabela 5. A proteína ZIKV-1 foi construída a partir dos epítomos que possuíam percentual de identidade menor que 50% com os outros flavivírus, com a junção dos epítomos 2, 3, 4 e 6. A proteína ZIKV-2 foi construída com os mesmos epítomos com a adição do epítomo 5 e a proteína ZIKV-3 foi construída com os todos os epítomos selecionados (1 a 7).

Para DENV foram selecionados dois epítomos descritos por Nguyen et al. (2019), testados por ELISA indireto com alta especificidade e sensibilidade, e um epítomo descrito por

Rai et al. (2017), também avaliado por ELISA indireto. Os epítomos selecionados para DENV eram conservados entre os quatro sorotipos. As sequências selecionadas estão descritas na Tabela 6.

Tabela 6: Epítomos lineares de células B selecionados para DENV.

Nº	Sequência	Referência	Proteína	Percentual de identidade	
				YFV	ZIKV
1	PVNIEAEPPFG	(NGUYEN et al., 2019)	E	0%	0%
2	VVTKKEEPVNIEAEP		E	0%	0%
3	AIKDNRAVHA	(RAI et al., 2017)	NS1	0%	57,14%

A partir dos epítomos selecionados foi construída a proteína quimérica DENV-1.

Os epítomos foram posicionados nas proteínas quiméricas de ZIKV e DENV de acordo com a posição na poliproteína viral (C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5). Para junção dos epítomos foram adicionados os ligantes GPGPG (HERRERA, 2020) que são comumente utilizados em proteínas multi-epítomos por possuir flexibilidade, promover separação de domínios funcionais e tornar a proteína mais estável (NEZAFAT et al., 2014). As sequências de aminoácidos das proteínas quiméricas construídas estão descritas na Tabela 7.

Tabela 7: Proteínas quiméricas para ZIKV e DENV. Em vermelho estão destacados os ligantes GPGPG.

Proteína	Sequência
ZIKV-1	HKKGEARRSRRAVTLPSH GPGPG TGVFVYNDVEAWRDYKY GPGPG WGKSYFVRAAKTNSFVVDGDTLKECPLKH GPGPG PAVIGTAVKGKEAVH
ZIKV-2	HMCDATMSYECPLDEGV GPGPG HKKGEARRSRRAVTLPSH GPGPG TGVFVYNDVEAWRDYKY GPGPG WGKSYFVRAAKTNSFVVDGDTLKECPLKH GPGPG PAVIGTAVKGKEAVH
ZIKV-3	HMCDATMSYECPLDEGV GPGPG HKKGEARRSRRAVTLPSH GPGPG TVNMAEVRSYCYEASIS GP GPG TGVFVYNDVEAWRDYKY GPGPG SVEGELNAILEENG VGPGPG WGKSYFVRAAKTNSFVVDGDTLKECPLKH GPGPG PAVIGTAVKGKEAVH
DENV-1	VTKKEEPVNIEAEP GPGPG PVNIEAEPPFG GPGPG AIKDNRAVHA

As proteínas quiméricas possuem em sua maioria epítomos das proteínas E e NS1. A proteína E, a principal proteína do envelope viral, é uma potente indutora de anticorpos neutralizantes, sendo o principal determinante antigênico dentre os flavivírus (GIRALDO et al., 2020). A proteína NS1 é secretada e estimula a resposta imunológica protetora (MULLER; YOUNG, 2013). Ambas as proteínas são utilizadas para desenvolvimento de testes diagnósticos, no entanto, quando utilizadas em sua totalidade apresentam grande semelhança entre os flavivírus, propiciando reação cruzada.

As proteínas quiméricas desenhadas foram clonadas em vetor de expressão pET21a e otimizados para produção em *E. coli*, foi adicionada uma cauda de histidina ao final das sequências para facilitar a purificação. A utilização da *E. coli* para expressão de proteínas recombinantes se torna atraente uma vez que as células já foram bem caracterizadas, possuem crescimento rápido e a expressão do gene heterólogo ocorre usualmente de forma muito produtiva e com custos relativamente baixos. A linhagem BL21 (DE3) foi projetada para que genes de proteases não fossem expressos, além disso, a expressão proteica é induzida a partir da T7 polimerase controlada pelo promotor lacUV5.

5.1.1 Análise conformacional de ZIKV-1, ZIKV-2 e ZIKV-3

A predição da estrutura tridimensional é de grande importância para melhor compreensão da função biológica das proteínas. Inicialmente, as três sequências quiméricas de ZIKV foram submetidas a um alinhamento usando MUSCLE (Figura 13). A sequência de ZIKV-1 apresenta 96 resíduos, enquanto ZIKV-2 tem 119 resíduos e ZIKV-3 tem 191. Um ligante de cinco resíduos (GPGPG) separa cada fragmento quimérico, no qual ZIKV-1 e ZIKV-2 diferem apenas com a adição de **HMCDATMSYECPLDEGV_GPGPG** no início da segunda sequência. Já o ZIKV-3 é equivalente ao ZIKV-2, apresentando a inserção **TVNMAEVRSYCYEASIS_GPGPG** após o segundo ligante e **SVEGELNAILEENGV_GPGPG** após o quarto ligante. Assim, apesar das diferenças de tamanho e das inserções dos dois fragmentos, o restante das três sequências quiméricas é idêntico.

Figura 13: Alinhamento das proteínas quiméricas.

CLUSTAL multiple sequence alignment by MUSCLE (3.8)

```

ZIKV-1      -----HKKGEARRSRAVTLPSHGPGG-----
ZIKV-2      HMC DATMSYEC PMLDEGVGPGPGHKKGEARRSRAVTLPSHGPGG-----
ZIKV-3      HMC DATMSYEC PMLDEGVGPGPGHKKGEARRSRAVTLPSHGPGPGTVNMAEVR SYCYEA
                *****

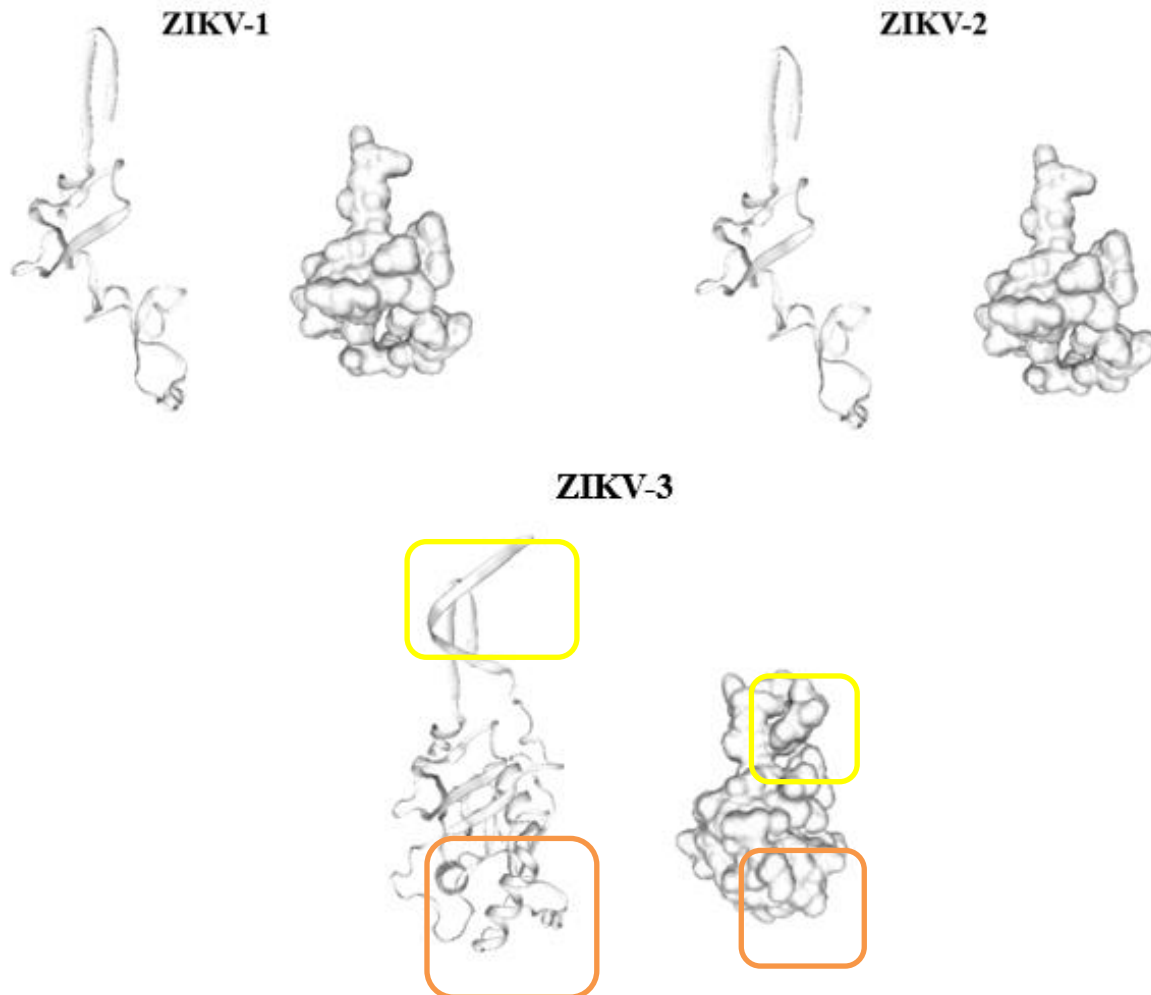
ZIKV-1      -----TG V FVYNDVEAWRDRYKYGPG-----PGWGKSYFVRA
ZIKV-2      -----TG V FVYNDVEAWRDRYKYGPG-----PGWGKSYFVRA
ZIKV-3      S I S G P G P G T G V F V Y N D V E A W R D R Y K Y G P G P G S V E G E L N A I L E E N G V G P G P G W G K S Y F V R A
                *****
                *****

ZIKV-1      AKTNNSFVVDGDTLKECPLKHGPGGPAVIGTAVKGKEAVH
ZIKV-2      AKTNNSFVVDGDTLKECPLKHGPGGPAVIGTAVKGKEAVH
ZIKV-3      AKTNNSFVVDGDTLKECPLKHGPGGPAVIGTAVKGKEAVH
                *****

```

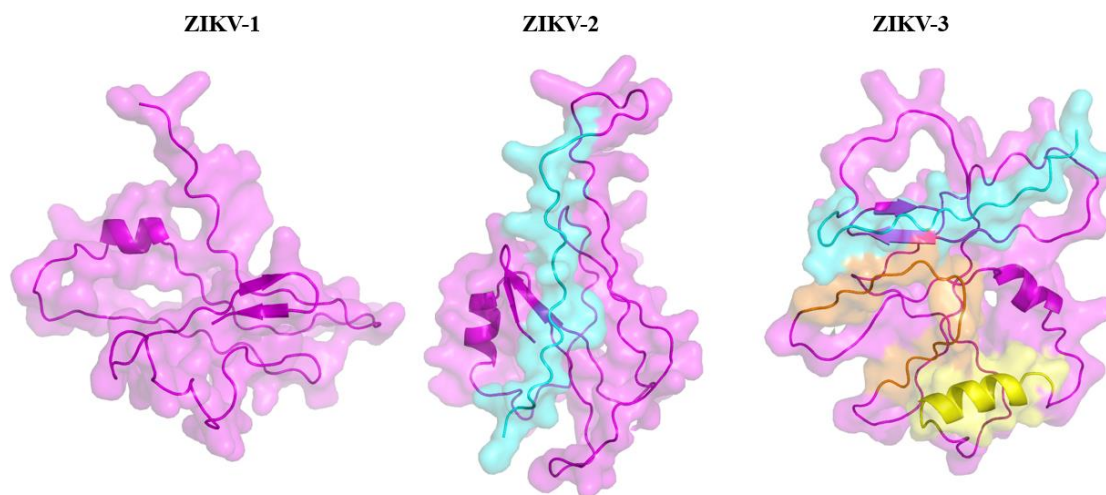
Os programas de bioinformática para predição de estruturas 3D podem ser divididos em duas categorias, *template-based modelling* (TBM) que utiliza como molde a semelhança entre sequências já conhecidas e *template-free modelling* (TFM) que independe da semelhança com uma estrutura já conhecida e é aplicado a partir da sequência de aminoácidos. Neste trabalho foram aplicadas as duas abordagens, para o TBM foi utilizado o programa SWISS MODEL, um servidor utilizado rotineiramente para geração de estruturas tridimensionais que permite a modelagem a partir de sequências de aminoácidos da proteína desejada ou pelo código de acesso do UniProt. A TFM foi realizada a partir do AlphaFold2 (DeepMind), este software prevê a estrutura tridimensional de proteínas com alta precisão a partir da sua sequência de aminoácidos, gerando um produto mais refinado. Os modelos gerados pelo SWISS MODEL podem ser observados na Figura 14 e os modelos gerados pelo AlphaFold2 podem ser observados na Figura 15.

Figura 14: Estruturas alvos modeladas e obtidas pelo SWISS-MODEL representadas pelo desenho foram comparadas lado a lado com suas estruturas de superfície de (e) em vista lateral, evidenciando as diferenças estruturais entre elas. Em amarelo, destaca-se a influência do quarto epítipo de NS1 e, em laranja, a influência do segundo epítipo de E.



A modelagem das sequências com SWISS-MODEL mostrou a proteína NS1 equivalente para todas as estruturas quiméricas (Figura 14), com uma diferença evidente destacada pelo quarto fragmento de NS1 (**SVEGELNAILEENGV**) para ZIKV-3. Além disso, estruturas de superfície corroboram essas observações, destacando um sítio de epítipo diferente e maior para ZIKV-3, ocasionado pela fração da proteína E (**TVNMAEVRSYCYEASIS**). Ao observar a proteína ZIKV-2, pode-se notar que não existe diferença na modelagem para a proteína ZIKV-1, no entanto, a proteína ZIKV-2 possui um epítipo a mais (**HMCDATMSYECPLDEGV**), isso ocorreu por uma limitação do software utilizado, que não conseguiu modelar adequadamente este fragmento. Limitações do usuário também não podem ser descartadas.

Figura 15: Estruturas alvos modeladas e obtidas pelo AlphaFold2 representadas pelas estruturas em *cartoon* e superfície em vista lateral, evidenciando as diferenças estruturais entre elas. Em ciano, destaca-se a influência do epítipo de prM (HMCDATMSYECPLDEGV), em laranja a influência do epítipo de E (TVNMAEVRSYCYEASIS) e em amarelo a influência do epítipo de NS1 (SVEGELNAILEENGV). As figuras foram geradas usando o software PyMOL.



A modelagem das sequências com AlphaFold2 foi superior a modelagem com SWISS-MODEL, um fato já esperado, uma vez que o programa possui um maior refinamento e por se tratar de quimeras conseguem gerar estruturas mais próximas a realidade. A modelagem mostrou que a estrutura das proteínas ZIKV-1 e ZIKV-2 são similares, no entanto, como já citado anteriormente ZIKV-2 possui um epítipo a mais (HMCDATMSYECPLDEGV) que modifica sua estrutura e que pode influenciar em seu desempenho. Uma diferença é observada para a proteína ZIKV-3, onde os dois fragmentos a mais que essa proteína possui a torna mais globular, o que pode modificar ou dificultar interações desta estrutura com outra proteína (ou seja, anticorpos).

Algumas técnicas são utilizadas para estudar os possíveis sítios de ligação de proteínas de interesse e para identificar regiões favoráveis à interação com grupos funcionais específicos, por exemplo, resíduos de aminoácidos. Dentre elas, os chamados *hot-spots* são definidos como pequenas regiões ou pontos em sítios de ligação que apresentam alguma relevância energética em interações moleculares, como de proteínas-proteínas. A capacidade destas regiões interagirem a uma variedade de moléculas-sonda pode ser predita por servidores, como FTMap e FTSite, desenvolvidos para estudos de sítios de ligação. Essas sondas variam em forma, tamanho e características físico-químicas, como descrito na Tabela 8. O FTMap busca as conformações de menor energia dessas sondas, agrupando-as de acordo com sua energia média.

Baseado nesses grupos (*clusters*) é possível definir e caracterizar as interações entre as sondas e as regiões da proteína onde estão situadas. Já no FTSite, regiões para possíveis ligações são pesquisadas de acordo com a localização de sondas em uma caixa tridimensional ao redor da proteína, também agrupadas de acordo com a energia média, sendo as sobreposições de sondas consideradas como os potenciais sítios de ligação. Desse modo, o FTSite identifica sítios de ligação, enquanto FTMap caracteriza tais sítios (KOZAKOV et al., 2015). Com isso, para comparar os potenciais sítios de ligação das estruturas, foram avaliadas algumas previsões empregando FTMap e FTSite (Figura 16). As previsões forem realizadas apenas com os modelos gerados pela AlphaFold2.

Tabela 8: Moléculas-sonda e suas respectivas características físico-químicas utilizadas nos servidores FTMap e FTSite.

Molécula-sonda	Características físico-químicas
acetamida (ACD)	polar, doadora e acceptora de ligação de hidrogênio
acetonitrila (ACN)	polar, acceptora de ligação de hidrogênio
acetona (ACT)	polar, acceptora de ligação de hidrogênio
acetaldeído (ADY)	polar, acceptora de ligação de hidrogênio
metanamina (AMN)	polar, positiva, doadora e acceptora de ligação de hidrogênio
benzaldeído (BDY)	polar, aromática, acceptora de ligação de hidrogênio
benzeno (©)	hidrofóbica, aromática
tert-butanol (BUT)	hidrofóbica, aromática
ciclohexano (CHX)	polar, doadora e acceptora de ligação de hidrogênio
<i>N,N</i> -dimetilformamida (DFO)	polar, acceptora de ligação de hidrogênio
dimetil éter (DME)	polar, acceptora de ligação de hidrogênio
etanol (EOL)	polar, doadora e acceptora de ligação de hidrogênio
etano (ETH)	hidrofóbica
fenol (PHN)	polar, aromática, doadora e acceptora de ligação de hidrogênio
isopropanol (THS)	polar, acceptora de ligação de hidrogênio
ureia (URE)	polar, positiva, doadora e acceptora de ligação de hidrogênio

Fonte: adaptado de KOZAKOV et al., 2015.

Figura 16: Potenciais sítios de ligações para as estruturas quiméricas de ZIKV. As figuras foram geradas usando o software PyMOL. (a) Estruturas em *cartoon* evidenciando os pontos de ligação gerados por FTMap. (b) Estruturas em *cartoon* evidenciando os sítios de ligação gerados pelo FTSite, o sítio 1 destacado de rosa, o sítio 2 destacado de verde e o sítio 3 destacado de azul.

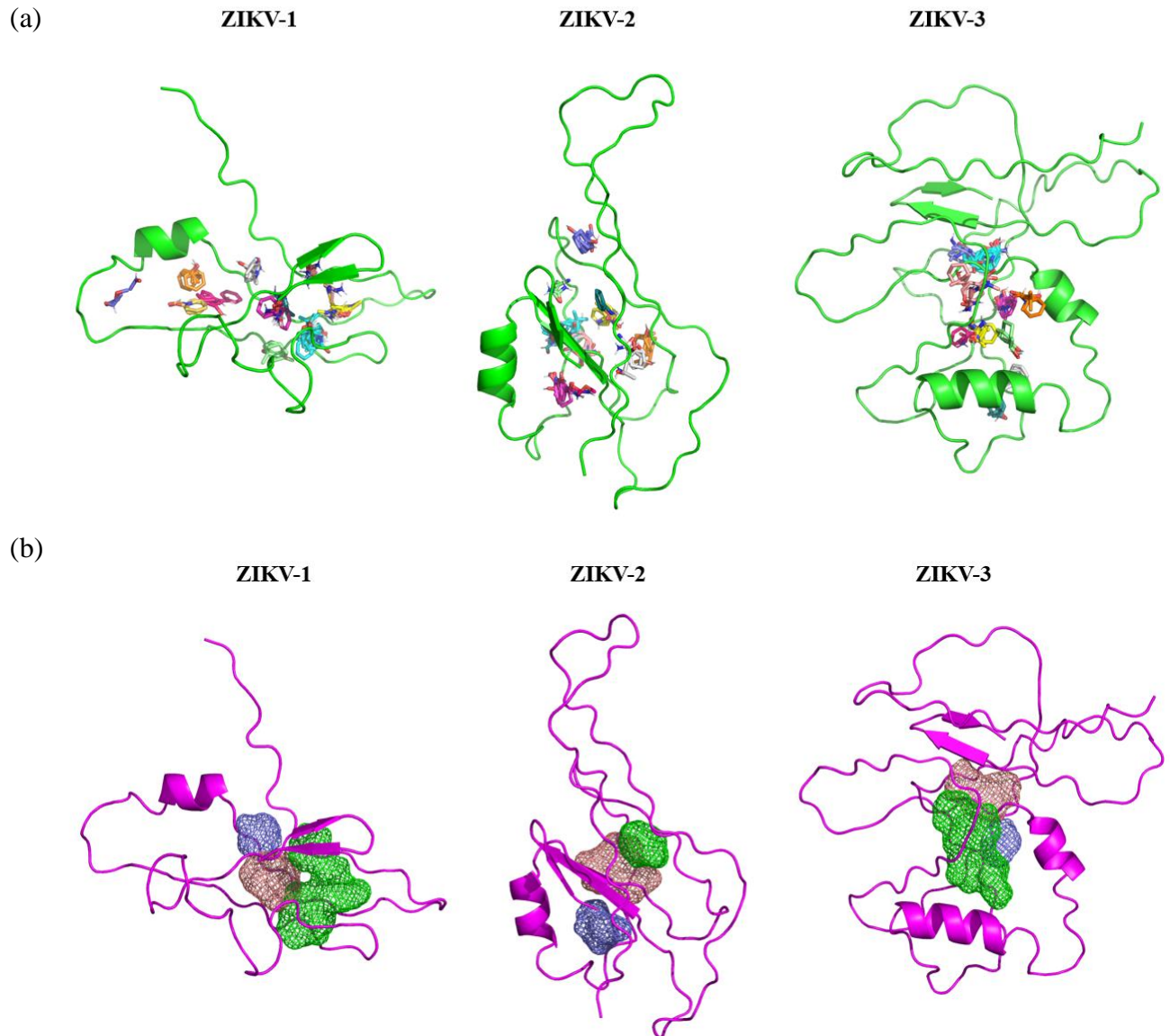
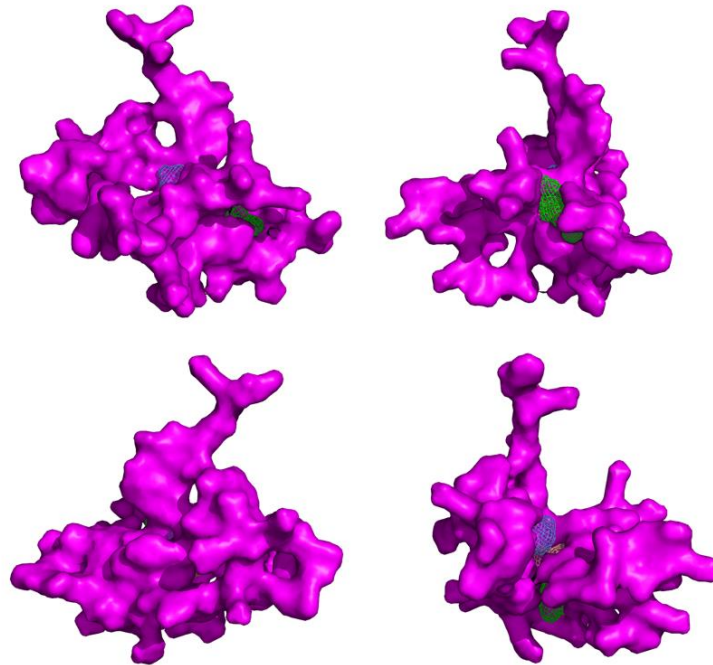
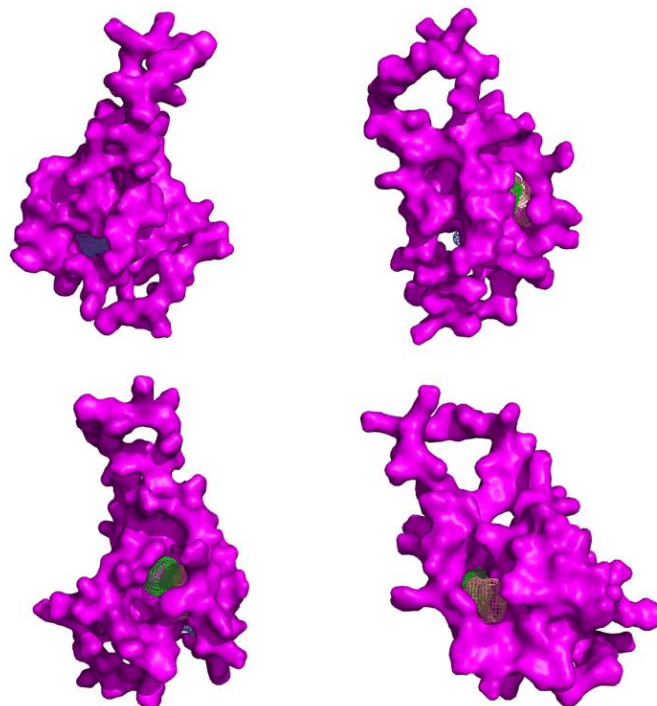


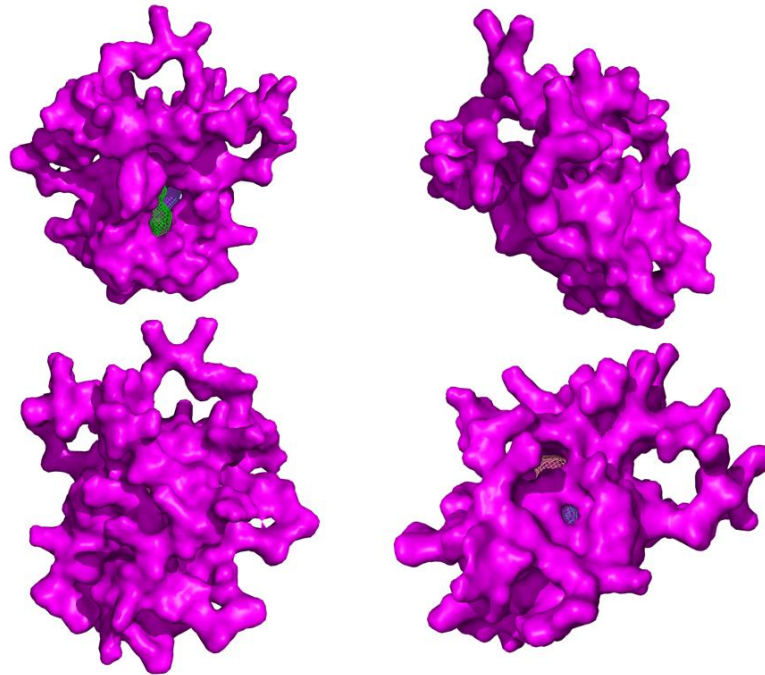
Figura 17: Painéis das superfícies das proteínas quiméricas de ZIKV, evidenciando os sítios de ligação, em vista lateral com rotação de 90°. (a) Painel de ZIKV-1. (b) Painel de ZIKV-2. (c) Painel de ZIKV-3. As figuras foram geradas usando o software PyMOL.

(a) ZIKV-1



(b) ZIKV-2



(c) ZIKV-3

Na Figura 16 é possível observar os hot-spots que foram gerados para as proteínas. As sondas são capazes de identificar os pontos com maior capacidade de interação com os ligantes. Os pontos de ligação encontrados em FTMap servem como base para o servidor FTSite para previsão dos sítios de ligação (KOZAKOV et al., 2015). O FTSite gerou três sítios para cada proteína, sendo o sítio 1 evidenciado de rosa, onde pode-se observar que ele possui mais resíduos para ZIKV-2 e ZIKV-3 quando comparado a ZIKV-1, o sítio 2 evidenciado de verde possui mais resíduos em ZIKV-1 e ZIKV-3 e o sítio 3 evidenciado de azul possui tamanhos semelhantes para as três proteínas. As sondas previstas por FTMap corroboram com essas observações.

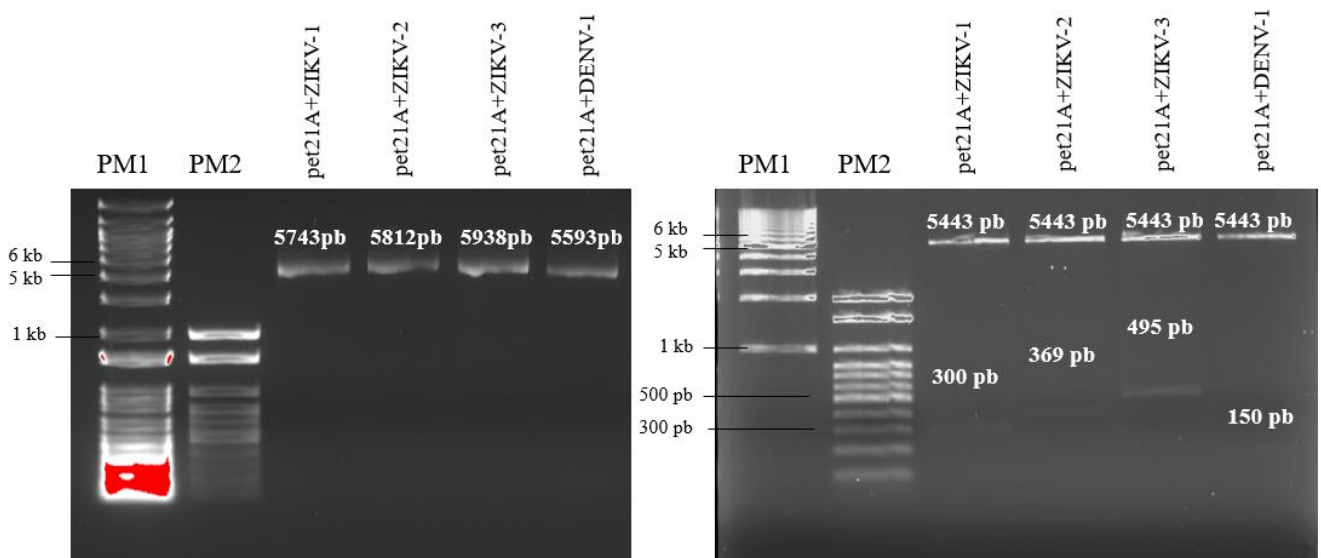
Ao analisar os painéis da Figura 17, onde é possível observar as estruturas de superfície, nota-se que a proteína ZIKV-3, por possuir uma estrutura mais globular apresenta menos pontos de acesso aos sítios de ligação quando comparadas as estruturas de superfície de ZIKV-1 e ZIKV-2.

5.2 Produção das proteínas recombinantes

5.2.1 Estoque plasmidial e digestão enzimática

Bactérias *E. coli* da linhagem DH5 α foram transformadas com os plasmídeos sintetizados comercialmente. Foi realizada uma miniprep para extração plasmidial e os plasmídeos foram avaliados em gel de agarose 1 % para verificação da integridade e checagem do tamanho (Figura 18a). Em seguida, realizou-se uma digestão dupla com as enzimas *Xba*I e *Xho*I para a liberação dos fragmentos lineares (Figura 18b). O tamanho do plasmídeo e seus fragmentos obtidos corresponderam ao tamanho esperado (plasmídeo pET21a 5443 pb, ZIKV-1 300 pb, ZIKV-2 369 pb, ZIKV-3 495 pb, DENV-1 150 pb).

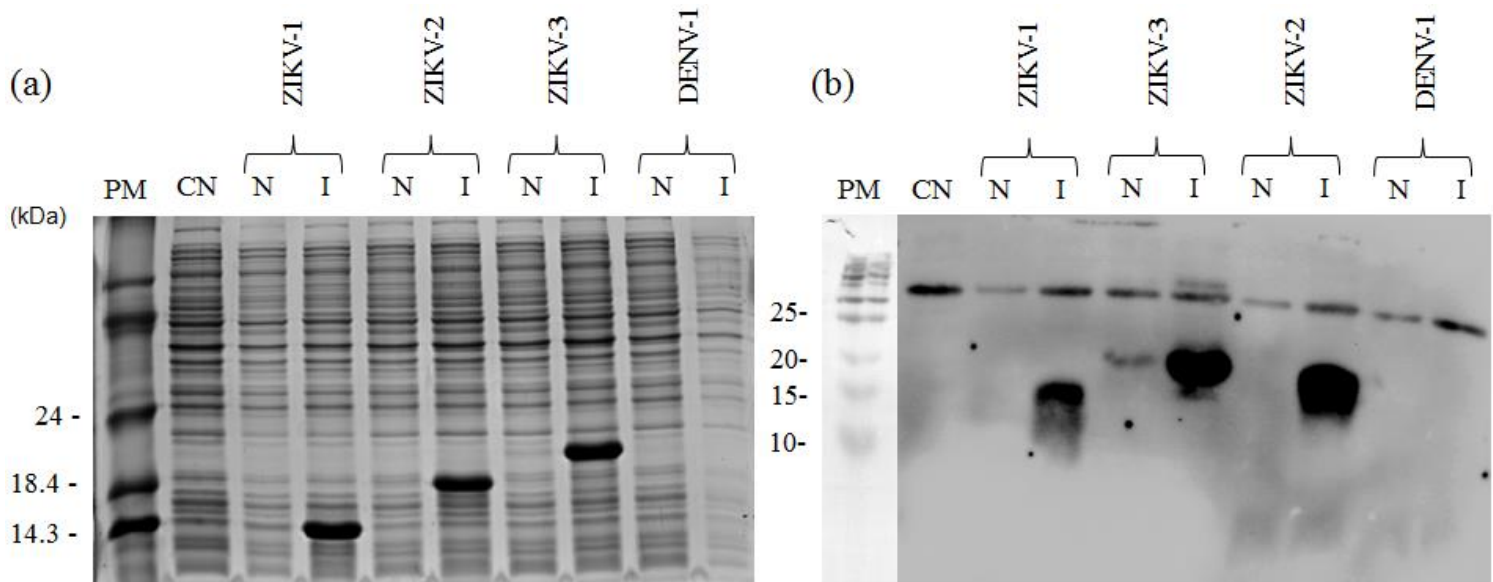
Figura 18: Análise eletroforética em gel de agarose 1 %. (a) Plasmídeos pET21a contendo os insertos dos genes das proteínas quiméricas após transformação em *E. coli* DH5 α e miniprep. (b) Produtos da digestão enzimática por *Xba*I e *Xho*I. PM1 = marcador molecular 1 kb (Invitrogen); PM2 = marcador molecular 100 pb (Invitrogen).



5.2.2 Padronização da expressão das proteínas

Inicialmente as bactérias BL21 (DE3) transformadas com os plasmídeos de interesse foram cultivadas a 37°C e induzidas com IPTG 1 mM por 3 horas. Foi coletado uma amostra de cada clone e foram analisadas por SDS-PAGE para avaliar se as proteínas estavam sendo expressas (Figura 19a). Além disso, para confirmação da expressão foi realizado Western blot utilizando anticorpos comerciais anti-histidina, uma vez que as proteínas possuem HisTag (Figura 19b).

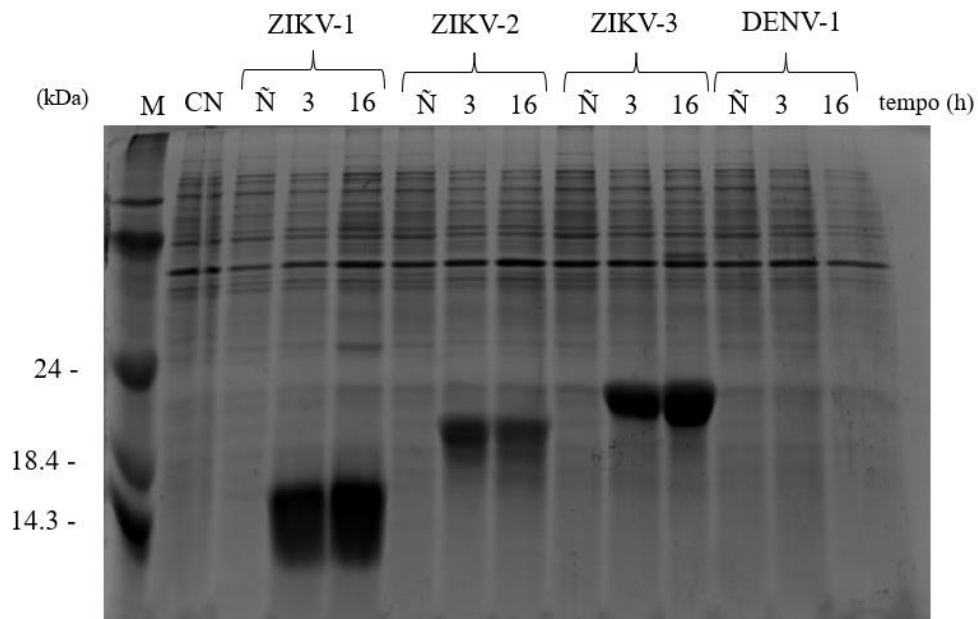
Figura 19: Análise da produção das proteínas após indução com IPTG 1 mM por 3 horas a 37 °C. (a) Análise eletroforética por SDS-PAGE das proteínas ZIKV-1, ZIKV-2, ZIKV-3 e DENV-1. (b) Western blot anti-histidina das proteínas ZIKV-1, ZIKV-3, ZIKV-2 e DENV-1. PM = marcador de peso molecular 70 kDa (Sigma Aldrich); CN = controle negativo não transformado; N = controle não induzido; I = controle induzido com IPTG.



Como pode ser observado na Figura 19a, foram detectadas bandas proteicas correspondentes ao tamanho das proteínas ZIKV-1 (14 kDa), ZIKV-2 (18 kDa), ZIKV-3 (20 kDa) (estimativa do tamanho das proteínas feita pelo *ProtParam Tool* da plataforma *ExPASy*). O mesmo não ocorreu para a proteína DENV-1, no qual não foi observado aparecimento de banda correspondente. No Western blot também foi verificada a expressão das proteínas quiméricas de ZIKV a partir da marcação da cauda de histidina; já para a proteína DENV-1 houve a confirmação de não ter sido expressa nas condições adotadas.

Foi avaliado se a expressão das proteínas em menor temperatura, por um período maior, poderia ser mais eficiente, para isso os clones foram induzidos por 16 horas a 18 °C (Figura 20).

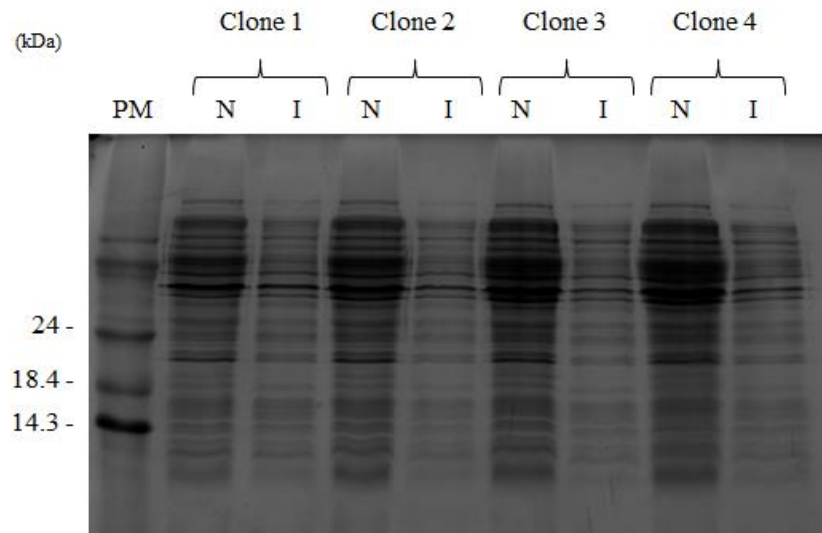
Figura 20: Análise eletroforética dos clones induzidos por 3 horas a 37 °C ou por 16 horas a 18 °C. M = marcador molecular 70 kDa (Sigma); CN = controle não transformado; Ñ = controle não induzido.



A proteína ZIKV-1 apresentou expressão semelhante nas duas condições analisadas. A proteína ZIKV-2 apresentou maior produção na condição de 3 horas de indução a 37 °C. Já a ZIKV-3 apresentou uma maior expressão na indução por 16 horas a 18 °C, no entanto, não foi uma diferença significativamente maior sob análise visual. Quando se pensa em um aumento de escala é interessante que as proteínas sejam produzidas em um menor tempo, sendo assim, optou-se por produzir todas as proteínas no tempo de indução de 3 horas a 37 °C.

Novamente a proteína DENV-1 não foi detectada no gel de eletroforese, com isso, uma nova transformação foi realizada com o plasmídeo pET21a-DENV-1 a fim de se obter novos clones que poderiam expressar a proteína (Figura 21).

Figura 21: Análise eletroforética por SDS-PAGE dos clones contendo o plasmídeo pET21a+DENV-1 após indução com IPTG 1mM por 3 horas a 37 °C. PM = marcador molecular 70 kDa (Sigma); N = controle não induzido; I = clone induzido.



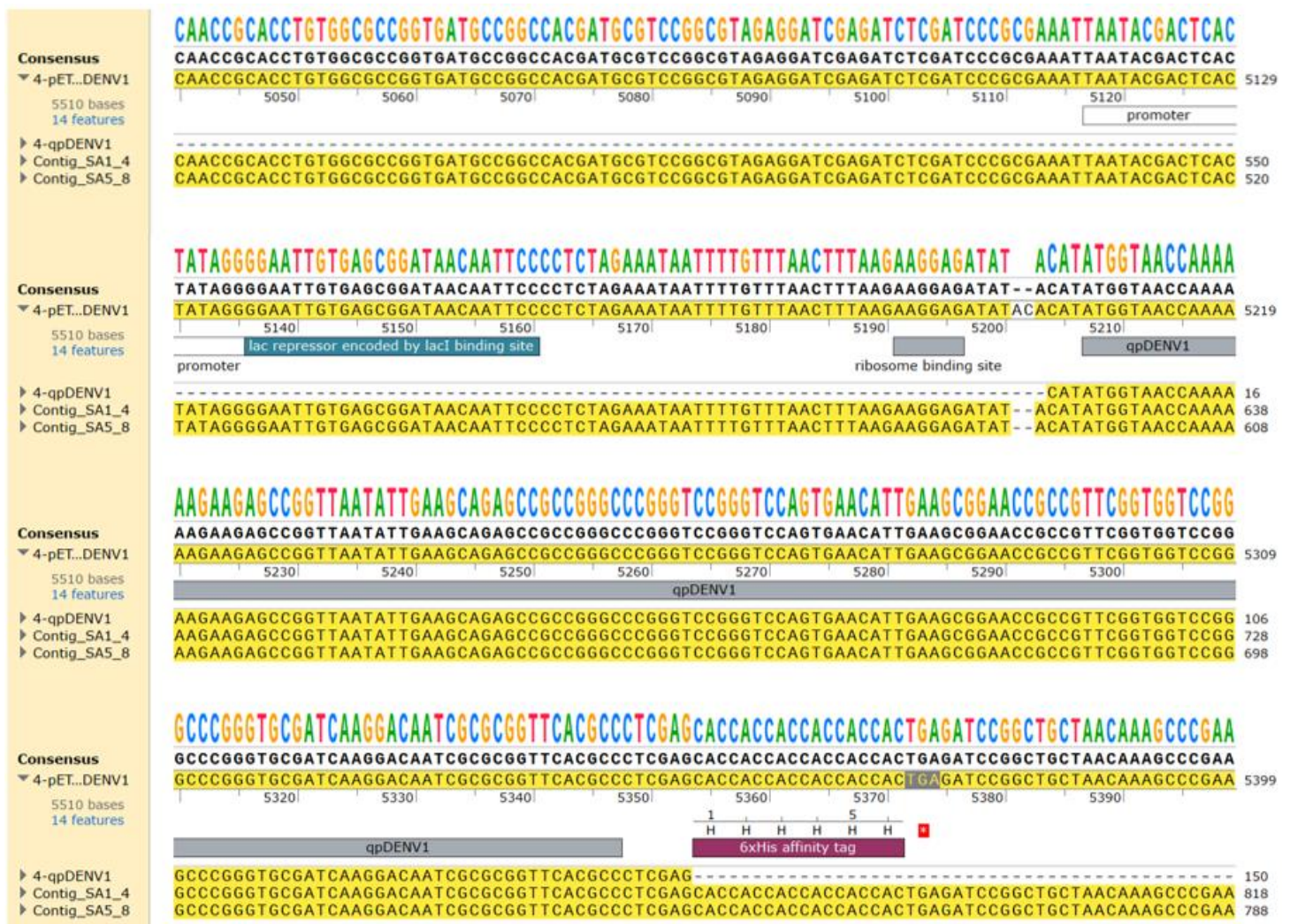
Quatro clones foram selecionados e avaliados por SDS-PAGE após indução com IPTG 1 mM, no entanto, novamente os clones não expressaram a proteína.

Devido a não expressão de DENV-1, foi realizado um sequenciamento do plasmídeo sintetizado para verificar se havia algum erro na sequência do gene codificador da proteína. O sequenciamento foi realizado pelo Doutor Alex Fiorini de Carvalho do Centro de Tecnologia em Vacinas (CT Vacinas) de acordo com o método de sequenciamento dideoxi (SANGER, 1981) no sequenciador capilar automático ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems), utilizando o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems), de acordo com recomendações do fabricante e com o uso dos primers T7 Forward (TAATACGACTCACTATAGGG) e T7 Terminator (GCTAGTTATTGCTCAGCGG).

A montagem e visualização das sequências finais foram obtidas a partir da análise dos cromatogramas, utilizando-se o programa *CAP3 Sequence Assembling Program* (HUANG; MADAN, 1999) através da *home-page* da Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária do Brasil) (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). As sequências obtidas foram comparadas com a sequência comercial do plasmídeo (GenOne), utilizando-se o programa SnapGene 5.1.7 software (www.snapgene.com). Os alinhamentos das sequências de nucleotídeos foram realizados com o auxílio do programa SnapGene 5.1.7 software (www.snapgene.com), utilizando-se a ferramenta MUSCLE. O resultado do alinhamento pode

ser observado na Figura 22, e mostra que a sequência nucleotídica adquirida comercialmente estava correta e de acordo com o esperado.

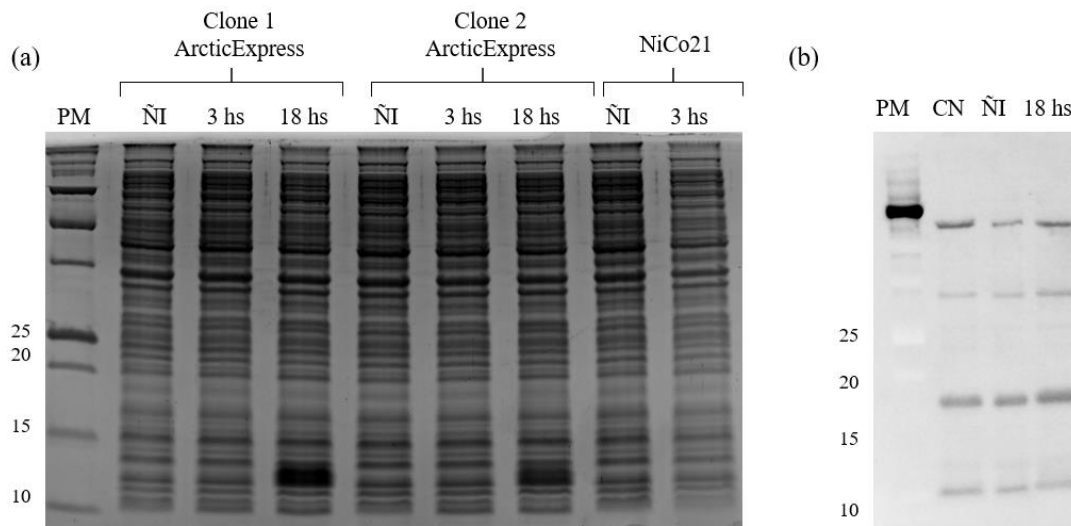
Figura 22: Sequenciamento do plasmídeo pET21a+DENV-1 pelo método dideoxi. Sequência total do plasmídeo após a inserção do inserto (pET21aDENV1); Sequência do inserto (qpDENV1); Sequência consenso final do sequenciamento gerado pelo primer T7 Forward (Contig_SA1_4); Sequência consenso final do sequenciamento gerado pelo primer T7 Terminador (Contig_SA5_8). O bloco cinza indica a construção de DENV-1 e o bloco roxo indica a cauda de histidina.



Ao verificar que a sequência do plasmídeo estava correta, foi feita uma nova transformação em duas outras linhagens, a ArcticExpress (DE3) que é uma linhagem projetada para expressão em baixas temperaturas (12 °C) aumentando potencialmente o rendimento de proteínas recombinantes e a linhagem NiCo21 (DE3) que possui maior capacidade de expressão de proteínas recombinantes em relação a BL21 (DE3). Após a transformação, as células foram

induzidas com IPTG 5 mM por 3 e 18 horas (ArcticExpress (DE3)) e por 3 horas (NiCo21 (DE3)).

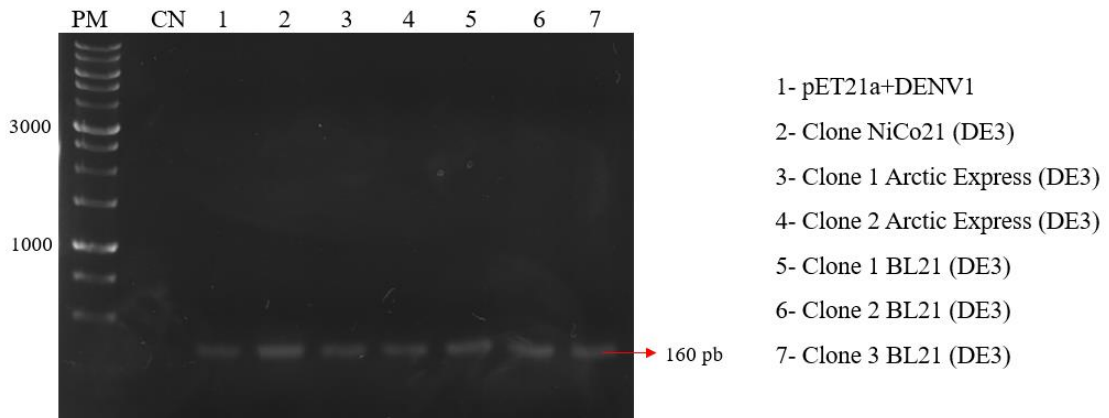
Figura 23: Análise dos clones contendo o plasmídeo pET21a+DENV-1 após indução com IPTG 5 mM. (a) Análise eletroforética dos clones ArcticExpress (DE3) e NiCo21 (DE3). (b) Western blot antihistidina do clone ArcticExpress + pET21a+DENV-1. PM = marcador de peso molecular (Bio-rad); ÑI = controle não induzido.



Na Figura 23a é possível observar uma banda de aproximadamente 12 kDa no clone 1 e 2 de ArcticExpress após 18 horas de indução que poderia sugerir a expressão de DENV-1 (tamanho estimado pelo *ProtParam Tool* da plataforma *ExPASy*), contudo ao realizar o Western blot antihistidina (Figura 23b) nota-se que a banda é correspondente a uma proteína celular, pois também está presente no controle negativo e no clone não induzido.

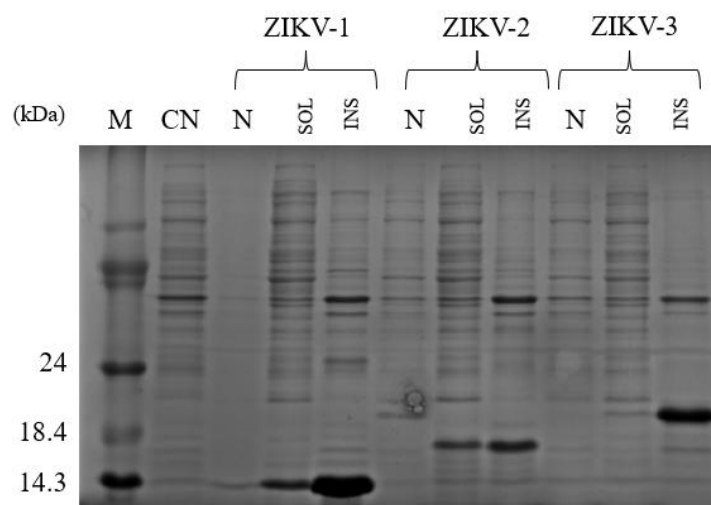
Apesar da confirmação da síntese correta do plasmídeo e da transformação eficiente dos clones com pET21a+DENV-1 (Figura 24) não foi possível expressar a proteína, portanto DENV-1 deixou de ser um alvo de estudo deste trabalho. Os genes codificadores das proteínas foram códon otimizados para produção em *E. coli*, com isso sabe-se que a sequência não continha viés de códons, o que poderia ser um fator para não expressão (GUSTAFSSON; GOVINDARAJAN; MINSHULL, 2004). Além disso, a proteína não contém resíduos de cisteína, a formação de ligações dissulfeto no citoplasma pode levar à inativação, dobramento e agregação de proteínas (DERMAN et al., 1993). A não expressão desta proteína pode ter ocorrido em razão de possível toxicidade do produto recombinante, quando a proteína exerce função prejudicial à célula, levando a uma taxa de crescimento mais lenta. Este fenômeno está bem descrito na literatura (ROSANO; CECCARELLI, 2014).

Figura 24: PCR de colônia dos clones transformados com o plasmídeo pET21a+DENV-1.



A *E. coli* é a bactéria mais utilizada para expressão de proteínas recombinantes. Esse sistema é amplamente utilizado para expressão de proteínas de flavivírus como WNV, YFV, DENV e ZIKV (ARAUJO et al., 2020). No entanto, o acúmulo de agregados proteicos em corpos de inclusão se torna um limitante dessa ferramenta, gerando produtos insolúveis (ROSANO; CECCARELLI, 2014). Com isso, após o crescimento das culturas e rompimento celular, foi avaliado se as proteínas expressas se encontravam na fração solúvel ou insolúvel das amostras (Figura 25). As proteínas ZIKV-1 e ZIKV-2 estavam em maior parte da fração insolúvel e a proteína ZIKV-3 estava praticamente em sua totalidade na fração insolúvel.

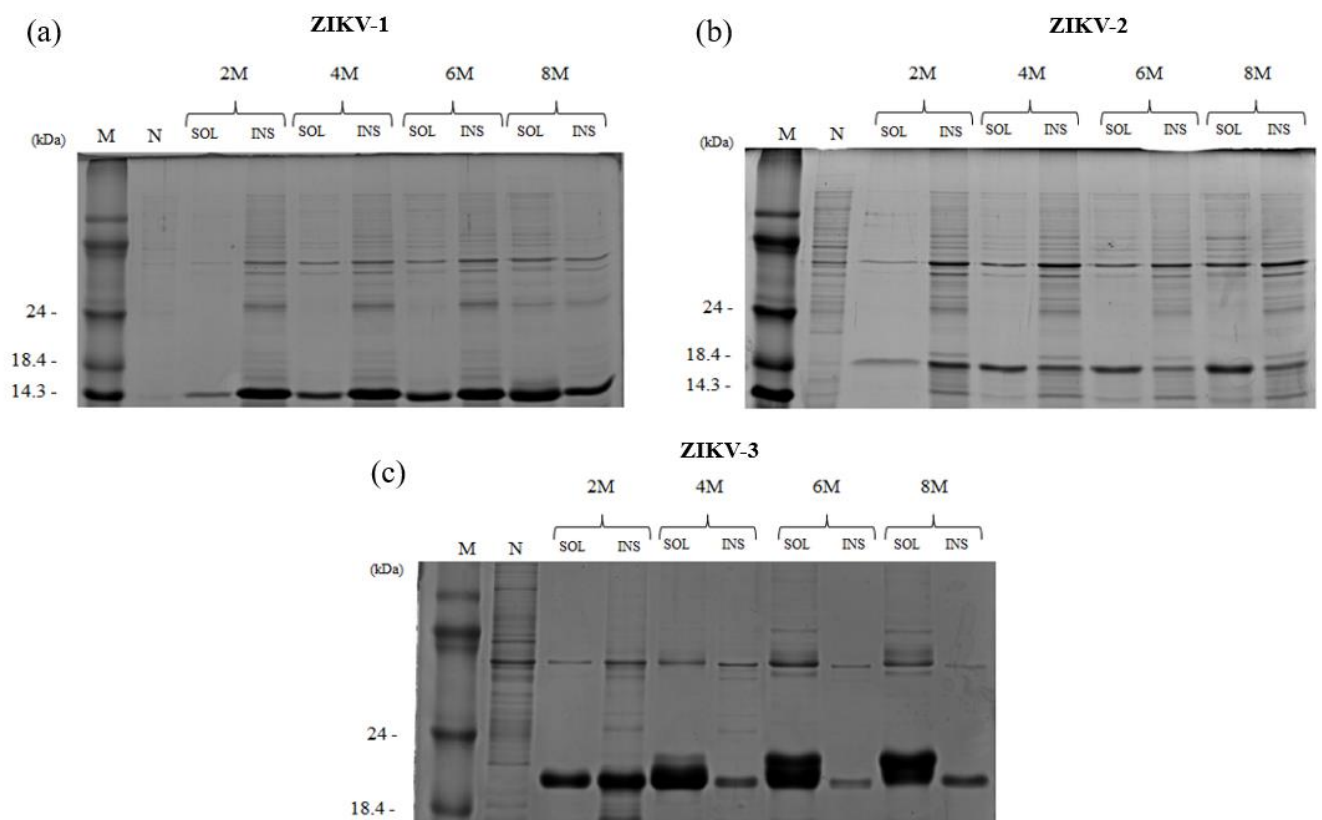
Figura 25: Avaliação da solubilidade das proteínas ZIKV-1, ZIKV-2 e ZIKV-3 após rompimento celular no Emulsifex. PM = marcador de peso molecular 70 kDa (Sigma); CN = controle não transformado; N = controle não induzido; SOL = solúvel, INS = insolúvel.



Foi realizado um teste de solubilidade em ureia variando as concentrações de 2, 4, 6 e 8 M. Na Figura 26a, observa-se que o aumento da concentração de ureia para 6 e 8 M não

resultou em aumento significativo na quantidade de ZIKV-1 na fração solúvel, quando comparado a concentração de 4 M. O mesmo pode ser observado para a proteína ZIKV-2 (Figura 26b), sendo assim, a concentração escolhida para seguir os experimentos foi a de 4 M. Já para proteína ZIKV-3 (Figura 26c), a concentração escolhida foi a de 8 M, uma vez que essa concentração apresentou uma maior quantidade da proteína na fração solúvel. A ureia é um agente desnaturante caotrópico, que permite a solubilização e desagregação de proteínas. Entretanto, a presença da ureia pode atrapalhar o enovelamento da proteína, o que pode impactar na qualidade da proteína produzida. Adicionalmente, a ureia influencia no desenvolvimento de testes imunocromatográficos de fluxo lateral, uma vez que dificulta a ligação com ouro coloidal. Após a solubilização é possível realizar diálise para retirada da ureia, porém durante esse processo ocorre exposição das regiões hidrofóbicas facilitando agregação proteica e precipitação (PATRA et al., 2000; SINGH; PANDA, 2005). Neste trabalho optou-se por não retirar o agente desnaturante.

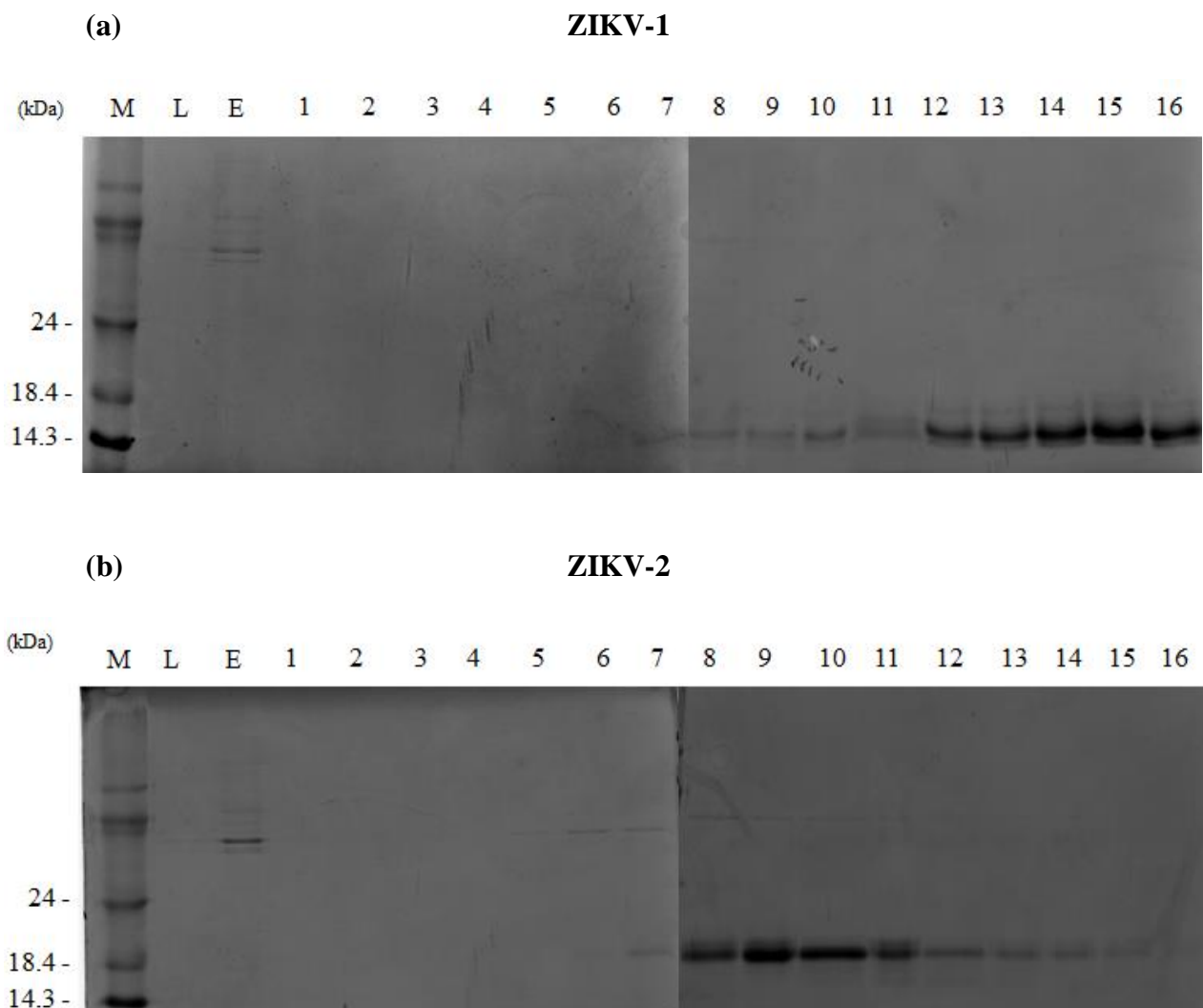
Figura 26: Teste de solubilidade das proteínas ZIKV-1, ZIKV-2 e ZIKV-3 em ureia 2, 4, 6 e 8 M. (a) Proteína ZIKV-1. (b) Proteína ZIKV-2. (c) Proteína ZIKV-3. M = marcador molecular 70 kDa (Sigma); N= controle negativo não transformado; SOL = fração solúvel; INS = fração insolúvel; 2 M, 4 M, 6 M e 8 M = concentração de ureia.



5.2.3 Purificação das proteínas

Após as análises de expressão proteica, as culturas foram cultivadas em maior escala, induzidas com IPTG 1 mM e as células rompidas no homogeneizador Emulsiflex. Após a centrifugação do extrato celular, os pellets foram ressuspensos em tampão ureia (4 M para ZIKV-1 e ZIKV-2 e 8 M para ZIKV-3) e então as proteínas foram purificadas por cromatografia de afinidade em coluna HisTrap, utilizando o equipamento ÄKTA start (GE Healthcare Life Sciences). As frações purificadas podem ser observadas na Figura 27.

Figura 27: Frações da purificação das proteínas após eluição da coluna de cromatografia de afinidade. (a) Eluatos da proteína ZIKV-1. (b) Eluatos da proteína ZIKV-2. (c) Eluatos da proteína ZIKV-3. M = marcador de peso molecular 70 kDa (Sigma Aldrich); L = Lavagem; E = extrato celular após purificação; 1 a 16 = frações da eluição da purificação.





As frações 12 a 16 da proteína ZIKV-1, frações 8 a 12 da proteína ZIKV-2 e frações 6 a 10 da proteína ZIKV-3 foram unidas em um tubo para realizar a quantificação de cada proteína. Após a purificação as proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford e os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 9:

Tabela 9: Concentração e rendimento das proteínas após a purificação.

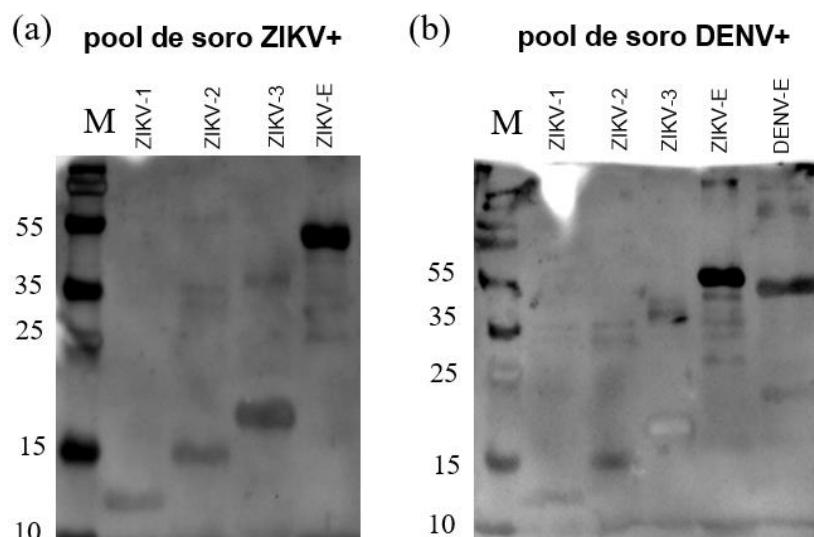
Proteína	Concentração	Rendimento (500 mL de cultura)
ZIKV-1	257 ng/ μ L	2,75 mg
ZIKV-2	267 ng/ μ L	2,67 mg
ZIKV-3	2028 ng/ μ L	20,28 mg

As proteínas ZIKV-1 e ZIKV-2 apresentaram menores rendimentos o que pode estar relacionado com uma menor solubilização das proteínas em ureia quando comparado à solubilização da proteína ZIKV-3. Além disso, já é conhecido que as proteínas podem apresentar níveis diferentes de expressão utilizando o mesmo sistema de expressão (ROSANO; CECCARELLI, 2014). O rendimento obtido para as três proteínas foi satisfatório, uma vez que proteínas insolúveis podem apresentar baixo rendimento.

5.3 Verificação da antigenicidade das proteínas produzidas

Como não se sabia o perfil imunogênico das proteínas quiméricas produzidas, foi feita a verificação a partir do ensaio de Western blot utilizando um pool de soro humano ZIKV+, além disso foi avaliado a reação das proteínas com pool de soro humano do interferente DENV+ (Figura 28).

Figura 28: Análise de antigenicidade das proteínas ZIKV-1, ZIKV-2 e ZIKV-3 com pool de soros humanos. (a) Western blot com pool de soro humano ZIKV+. (b) Western blot com pool de soro humano DENV+. ZIKV-E = proteína E de ZIKV recombinante utilizada como controle positivo. DENV-E = proteína E de DENV-2 recombinante utilizada como controle positivo. M = Marcador de peso molecular (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder – Thermo Fisher).



As três proteínas reagiram com os anticorpos do pool de soro ZIKV+ (Figura 28a). Ao analisar a reação com os anticorpos DENV+ (Figura 28b) é possível notar que as quimeras possuem atividade muito menor que quando comparado com a reação com a proteína de envelope (ZIKV-E). Ressalta-se que a qualidade do resultado obtido neste ensaio de western-blot não elimina a possibilidade de reações cruzadas importantes com soros de pacientes acometidos por outros flavivírus. Ainda assim, os dados obtidos para essas proteínas sugerem que elas apresentaram boa antigenicidade, característica fundamental para a aplicação em um ensaio sorológico.

Para este ensaio foram utilizados soros que já compunham a soroteca do LVBA, esses soros foram cedidos de uma parceria estabelecida com a FUNED. Os soros foram caracterizados pela FUNED por ELISA comercial, conhecidos por apresentar reatividade cruzada entre os flavivírus, com isso foi realizado um ensaio de soroneutralização para melhor

caracterização desses soros (dados não mostrados). Os soros que não foram devidamente caracterizados foram excluídos dos ensaios.

5.4 ELISA indireto para detecção de anticorpos anti-ZIKV

Com o objetivo de avaliar o potencial das proteínas produzidas como antígenos, foi realizado em ensaio de ELISA, a fim de analisar a reatividade frente a amostras de soros de pacientes positivos. Além disso, também foi analisada a reatividade cruzada contra os soros de pacientes DENV+. Este ensaio foi baseado na detecção de anticorpos IgG, visto o seu potencial para aplicação na detecção de exposição prévia ao ZIKV.

Inicialmente, os antígenos foram testados em duas concentrações (100 e 200 ng/poço), também foi testado a melhor concentração de diluição dos soros (1:100 e 1:50 – pool) e a diluição do anticorpo secundário conjugado a peroxidase (1:10.000, 1:15.000 e 1:20.000 – concentrações comumente utilizadas no LVBA). Os resultados podem ser observados na Figura 29, 30 e 31. Para avaliação do desempenho dos antígenos produzidos, calculou-se a razão entre as amostras a partir da média das absorbâncias (Tabelas 10, 11 e 12).

Figura 29: Avaliação do antígeno ZIKV-1 com soros negativos e positivos. (a) Concentração da proteína 100 ng/poço. (b) Concentração da proteína 200 ng/poço. (CN) = controle de soro negativo comercial; (ZIKV-/DENV-) = soros negativos para Zika e dengue; (DENV+) = soros positivos para dengue; (ZIKV +) = soros positivos para Zika; (*) $p>0,5$; (**) $p>0,01$; (***) $p>0,001$; (****) $p>0,0001$.

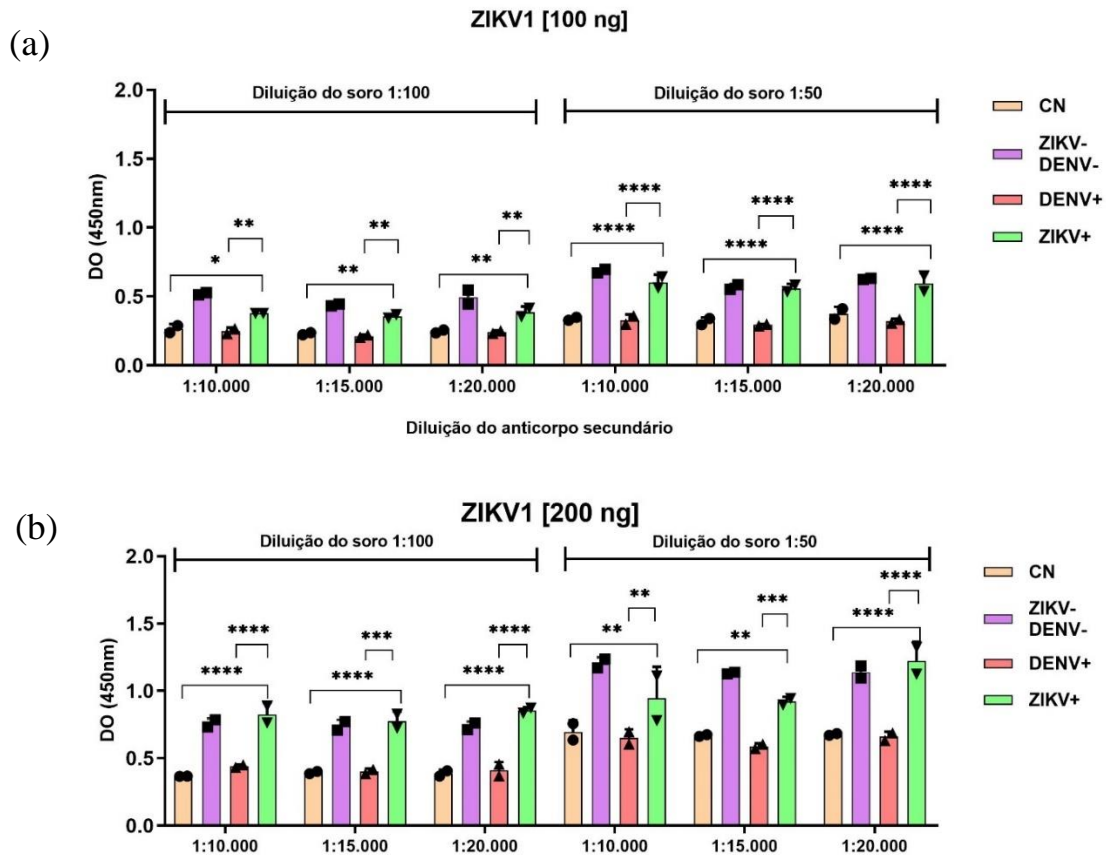


Tabela 10: Avaliação do desempenho do antígeno ZIKV-1.

		Diluição do soro 1:100			Diluição do soro 1:50		
		Diluição do conjugado					
[ZIKV-1]	Razão	1:10.000	1:15.000	1:20.000	1:10.000	1:15.000	1:20.000
100 ng	ZIKV+/DENV+	1,52	1,71	1,59	1,83	1,9	1,85
	ZIKV+/ZIKV-DENV-	0,75	0,8	0,77	0,88	0,98	0,94
	ZIKV+/CN	1,43	1,53	1,55	1,78	1,75	1,58
200 ng	ZIKV+/DENV+	1,87	1,93	2,07	1,45	1,56	1,85
	ZIKV+/ZIKV-DENV-	1,08	1,04	1,15	0,78	0,81	1,07
	ZIKV+/CN	2,24	1,96	2,2	1,35	1,37	1,80

Figura 30: Avaliação do antígeno ZIKV-2 com soros negativos e positivos. (a) Concentração da proteína 100 ng/poço. (b) Concentração da proteína 200 ng/poço. (CN) = controle de soro negativo comercial; (ZIKV-/DENV-) = soros negativos para Zika e dengue; (DENV+) = soros positivos para dengue; (ZIKV+) = soros positivos para Zika; (*) $p>0,5$; (**) $p>0,01$; (***) $p>0,001$; (****) $p>0,0001$.

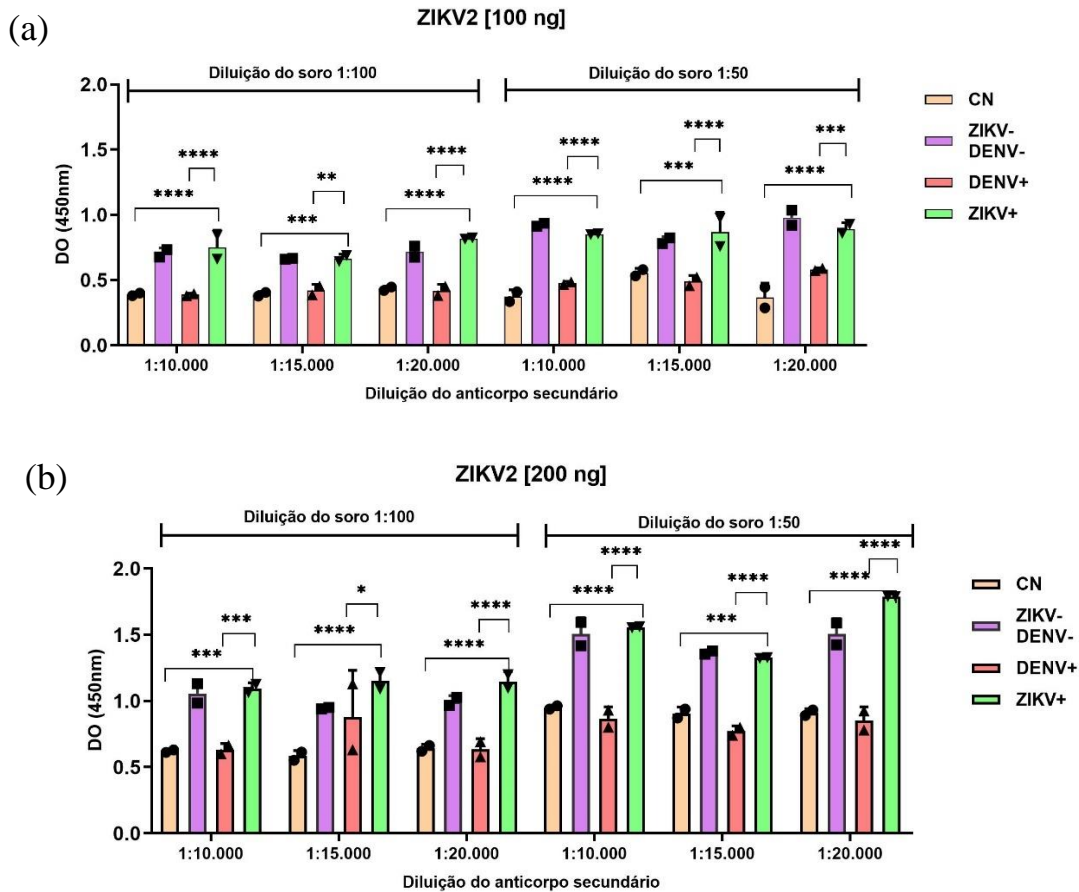


Tabela 11: Avaliação do desempenho do antígeno ZIKV-2.

[ZIKV-2]	Razão	Diluição do soro 1:100			Diluição do soro 1:50		
		Diluição do conjugado					
		1:10.000	1:15.000	1:20.000	1:10.000	1:15.000	1:20.000
100 ng	ZIKV+/DENV+	1,93	1,58	1,96	1,79	1,76	1,54
	ZIKV+/ZIKV- DENV-	1,00	0,93	1,05	0,87	0,85	0,82
	ZIKV+/CN	1,92	1,69	1,88	2,28	1,55	2,43
200 ng	ZIKV+/DENV+	2,21	1,97	1,8	1,63	1,71	2,09
	ZIKV+/ZIKV- DENV-	0,69	0,70	0,76	0,62	0,60	0,61
	ZIKV+/CN	2,26	1,97	1,78	1,63	1,10	1,96

Figura 31: Avaliação do antígeno ZIKV-3 com soros negativos e positivos. (a) Concentração da proteína 100 ng/poço. (b) Concentração da proteína 200 ng/poço. (CN) = controle de soro negativo comercial; ZIKV-/DENV- = soros negativos para Zika e dengue; (DENV+) = soros positivos para dengue; (ZIKV +) = soros positivos para Zika; (*) $p>0,5$; (**) $p>0,01$; (***) $p>0,001$; (****) $p>0,0001$.

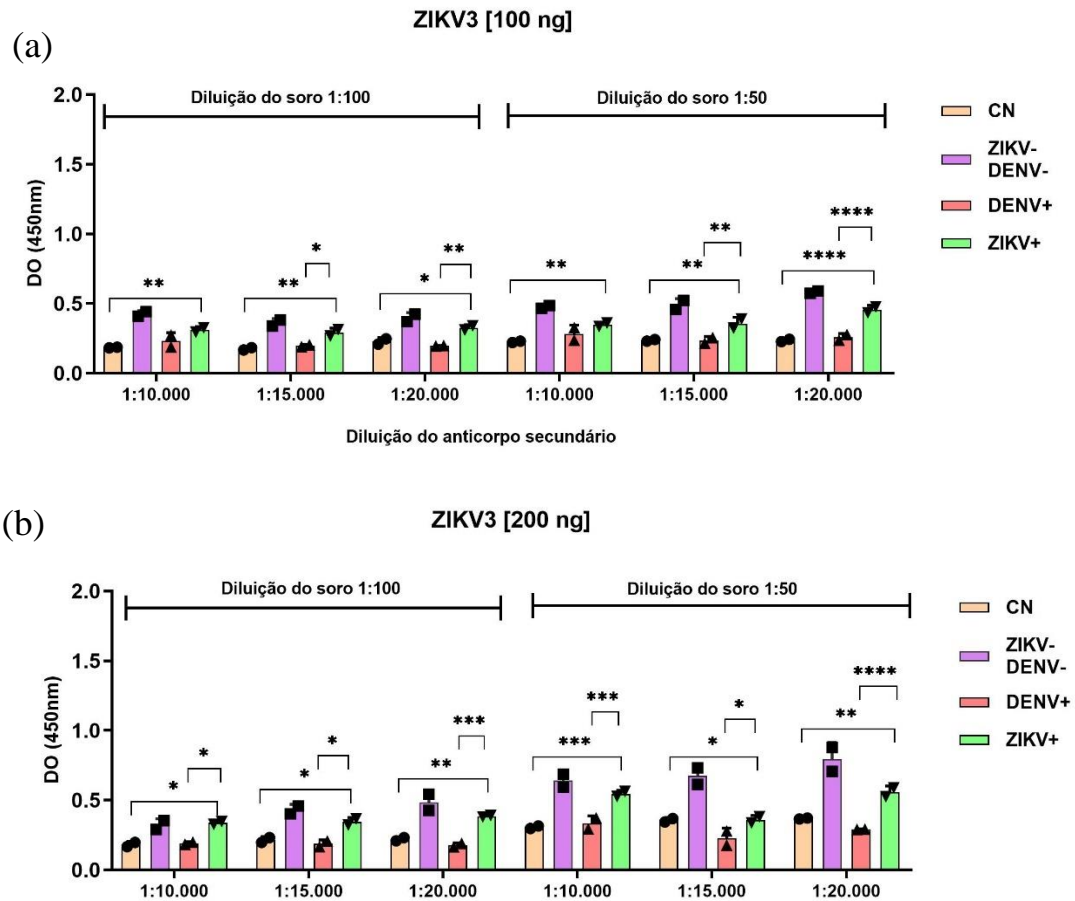


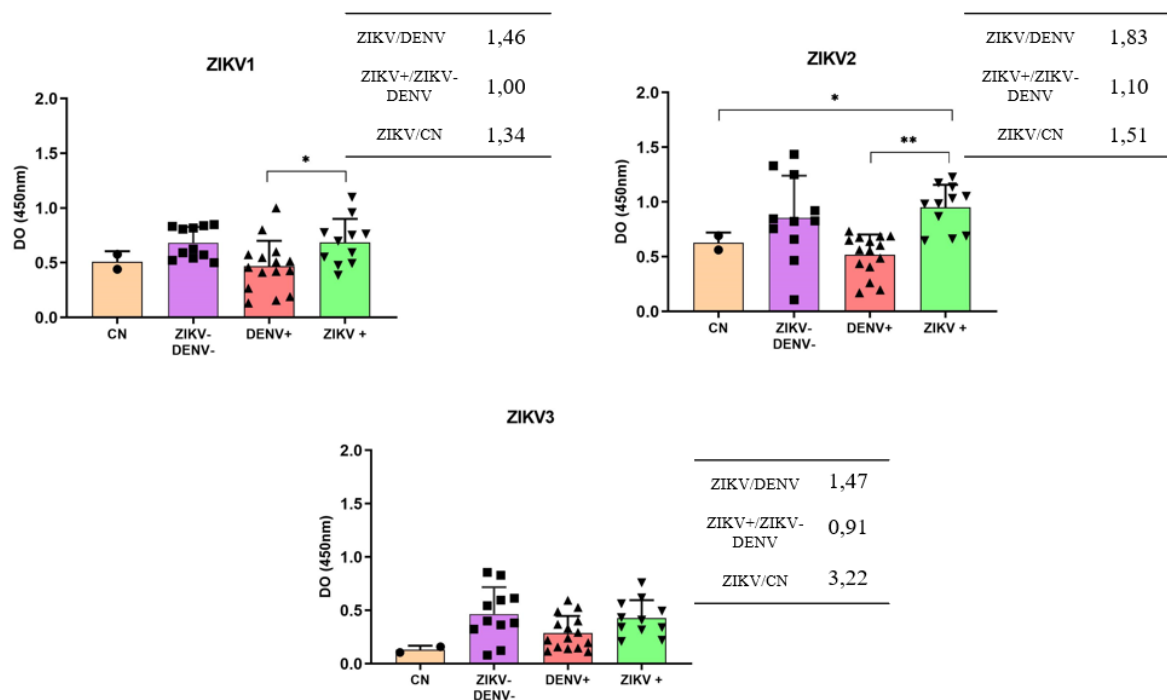
Tabela 12: Avaliação do desempenho do antígeno ZIKV-3.

		Diluição do soro 1:100			Diluição do soro 1:50		
		Diluição do conjugado					
[ZIKV-3]	Razão	1:10.000	1:15.000	1:20.000	1:10.000	1:15.000	1:20.000
100 ng	ZIKV+/DENV+	1,34	1,46	1,64	1,23	1,51	1,77
	ZIKV+/ZIKV- DENV-	0,58	0,54	0,52	0,50	0,59	0,63
	ZIKV+/CN	1,68	1,64	1,42	1,53	1,50	1,93
200 ng	ZIKV+/DENV+	1,75	1,84	2,16	1,63	1,57	1,90
	ZIKV+/ZIKV- DENV-	0,43	0,64	0,63	0,68	0,81	0,86
	ZIKV+/CN	1,84	1,60	1,74	1,78	1,00	1,50

Ao analisar as razões obtidas é possível notar que os três antígenos se comportaram de maneira semelhante. Ao comparar os resultados encontrados para o pool de soro ZIKV+ com o pool de DENV+ e CN- é possível observar que houve diferença estatística, além disso, as razões entre eles ficaram acima de 1, mostrando que o antígeno foi capaz de diferenciar os pools de soro. Porém, as razões entre ZIKV+ e ZIKV-/DENV- ficaram menores ou muito próximas a 1, mostrando que neste caso os antígenos não foram capazes de diferenciar as amostras.

Um teste com soros individuais foi realizado para observar se as amostras iriam se comportar de maneira semelhante ao que ocorreram com os pools. Dessa maneira, optou-se por utilizar a concentração de 200 ng, diluição do soro 1:100 e diluição do anticorpo secundário 1:20.000, condições em que foram obtidos os melhores resultados. Foram testadas 11 amostras negativas (DENV- e ZIKV-), 15 amostras DENV+ e 11 amostras ZIKV+. Na Figura 32 é possível observar os resultados obtidos para as amostras individuais.

Figura 32: Avaliação do antígeno com soros negativos e positivos. (a) Proteína ZIKV-1 [200ng]. (b) Proteína ZIKV-2 [200ng]. (c) Proteína ZIKV-3 [200ng]. (-) = controle de soro negativo comercial; (ZIKV-/DENV-) = soros negativos para Zika e dengue; (DENV+) = soros positivos para dengue; (ZIKV +) = soros positivos para Zika; (*) $p > 0,5$; (**) $p > 0,01$; (***) $p > 0,001$.



Os resultados foram semelhantes aos observados com os pools. Para ambos os ensaios, os resultados apresentaram altos valores de absorvância para as amostras negativas, apresentando baixa especificidade. Nessas condições as proteínas não apresentam potencial

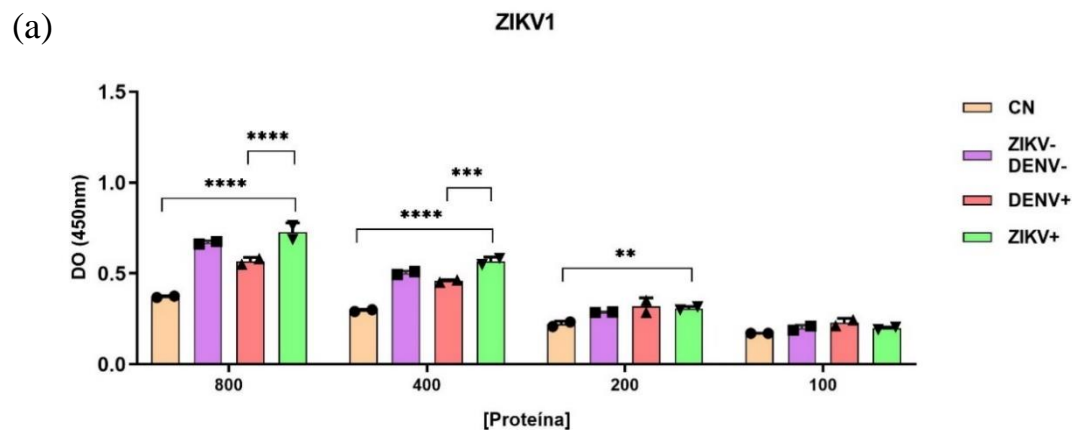
para o desenvolvimento de um teste sorológico em plataforma ELISA. No entanto, quando se compara estatisticamente as amostras ZIKV+ e DENV+, observa-se que houve separação das amostras. Esse ponto se torna relevante, uma vez que o principal desafio deste trabalho é obter um ensaio que não apresente reatividade cruzada entre esses dois vírus. Portanto, foram realizadas tentativas de diminuição do *background* gerado pelas amostras negativas a partir da otimização do ensaio.

5.4.1 Otimização do ELISA anti-ZIKV

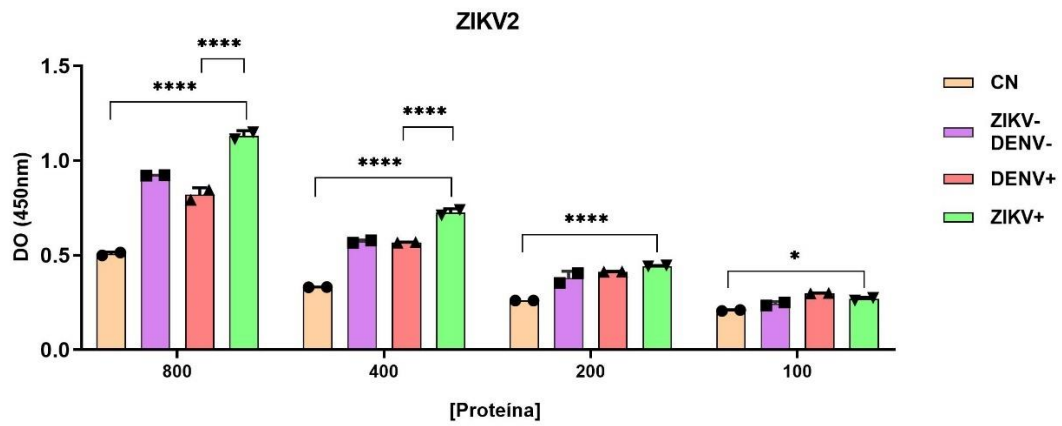
De acordo com experiências prévias do grupo no desenvolvimento de testes sorológicos para diversos alvos, as duas principais razões para *backgrounds* elevados estão no bloqueio e na lavagem, além disso, baixa concentração de antígeno sensibilizado na placa pode gerar “ruídos”. Os passos para otimização se basearam nessas três etapas.

A primeira tentativa consistiu na mudança do bloqueio para BSA e uso das formulações padronizadas pelo CT Vacinas (solução de bloqueio e solução de lavagem). Também foram testadas concentrações maiores dos antígenos (800, 400, 200 e 100 ng), a diluição do anticorpo secundário conjugado a peroxidase foi definida em 1:70.000 (conforme indicação do fabricante) e inicialmente os soros foram testados em pools contendo 10 amostras cada. Os resultados obtidos estão na Figura 33 e os desempenhos dos ensaios estão na Tabela 13.

Figura 33: Avaliação dos antígenos nas concentrações 800, 400, 200 e 100 ng e utilização de bloqueio de BSA. (a) Proteína ZIKV-1. (b) Proteína ZIKV-2. (c) Proteína ZIKV3. (CN) = controle de soro negativo comercial; (ZIKV-/DENV-) = soros negativos para Zika e dengue; (DENV+) = soros positivos para dengue; (ZIKV+) = soros positivos para Zika; (*) $p > 0,5$; (**) $p > 0,01$; (***) $p > 0,001$; (****) $p > 0,0001$.



(b)



(c)

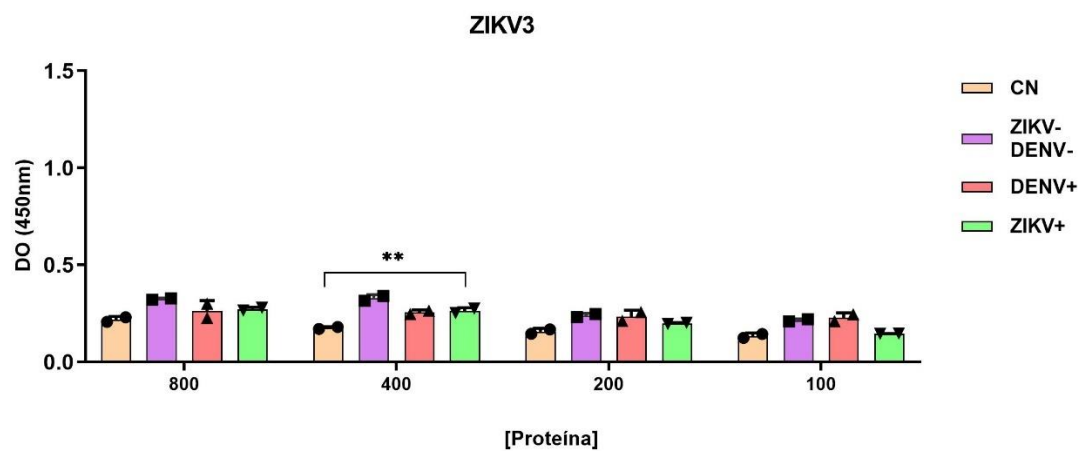


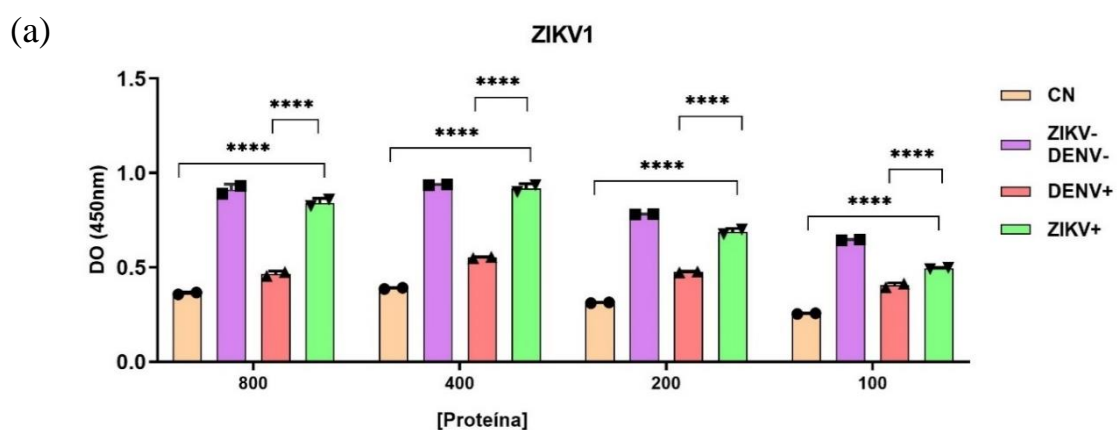
Tabela 13: Avaliação do desempenho dos antígenos utilizando bloqueio de BSA.

Antígeno	Razão	Concentração do antígeno			
		800	400	200	100
ZIKV-1	ZIKV+/DENV+	1,95	1,91	1,39	1,15
	ZIKV+/ZIKV- DENV-	1,08	1,12	1,06	0,98
	ZIKV+/CN	1,28	1,23	0,96	0,86
ZIKV-2	ZIKV+/DENV+	2,23	2,18	1,7	1,28
	ZIKV+/ZIKV- DENV-	1,22	1,26	1,16	1,1
	ZIKV+/CN	1,38	1,27	1,07	0,89
ZIKV-3	ZIKV+/DENV+	1,24	1,5	1,26	1,08
	ZIKV+/ZIKV- DENV-	0,84	0,8	0,83	0,68
	ZIKV+/CN	1,03	1,03	0,84	0,65

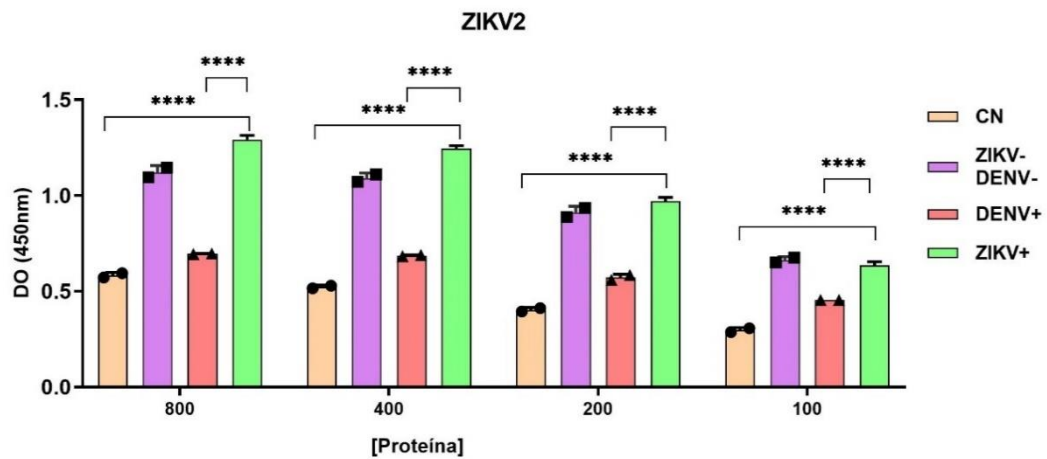
Os resultados mostram que em concentrações maiores as razões ficaram maiores. No entanto, a separação entre amostras positivas e negativas não ocorreu, sendo que as razões ficaram muito próximas ou menores que 1. Ao comparar os resultados obtidos para essa modificação no protocolo com os dados anteriores, observou-se que não houve mudanças relevantes, e em alguns pontos as razões ficaram ainda menores. O bloqueio com leite em pó trouxe melhores resultados, e desta forma optou-se por continuar com esse tipo de bloqueio. Isso pode ser explicado pelo fato do BSA ser composto apenas por uma proteína com 60 kda, enquanto o leite em pó possui proteínas com diversos tamanhos, aumentando as chances de reduzir o sinal de fundo (XIAO; ISAACS, 2012). O leite é estável a temperatura ambiente e muito simples de ser preparado, sendo comumente utilizado para este fim, porém possui algumas desvantagens, como o prazo de validade curto após a sua diluição e necessita de condições de armazenamento adequado, não podendo ter contato com umidade antes da diluição.

Um novo ensaio foi realizado empregando as mesmas concentrações de proteína (800, 400, 200 e 100 ng), bloqueio de leite em pó desnatado 5 % e aplicação de uma lavagem com ureia 6 M por 5 minutos, entre as lavagens, após a incubação com o soro. Os resultados estão expressos na Figura 34 e as razões na Tabela 14.

Figura 34: Avaliação dos antígenos nas concentrações 800, 400, 200 e 100 ng e utilização de bloqueio de leite em pó desnatado 5 % e lavagem com ureia 6 M. (a) Proteína ZIKV1. (b) Proteína ZIKV-2. (c) Proteína ZIKV3. (CN) = controle de soro negativo comercial; (ZIKV-/DENV-) = soros negativos para Zika e dengue; (DENV+) = soros positivos para dengue; (ZIKV+) = soros positivos para Zika; (*) $p > 0,5$; (****) $p > 0,0001$.



(b)



(c)

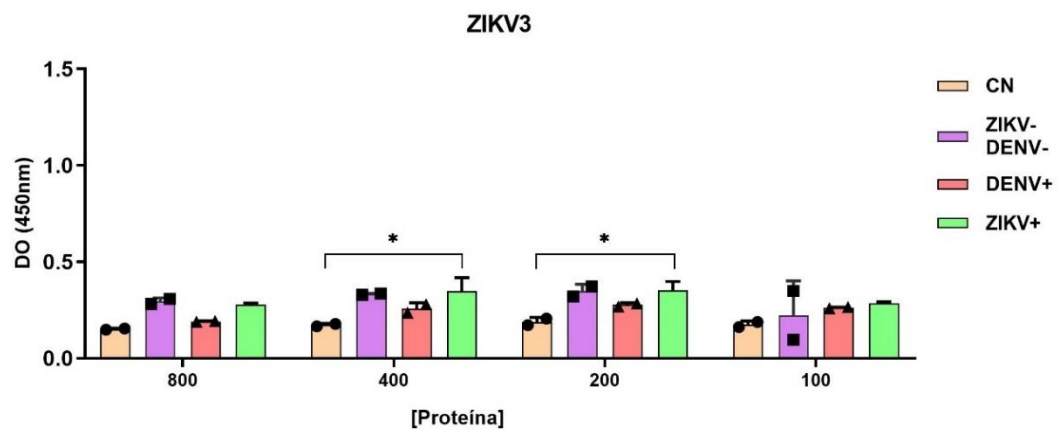


Tabela 14: Avaliação do desempenho dos antígenos com a utilização de bloqueio de leite em pó 5 % e lavagem com ureia 6 M.

Antígeno	Razão	Concentração do antígeno			
		800	400	200	100
ZIKV-1	ZIKV+/DENV+	2,32	2,35	2,2	1,93
	ZIKV+/ZIKV- DENV-	0,92	0,97	1,44	0,76
	ZIKV+/CN -	1,80	1,66	1,44	1,28
ZIKV-2	ZIKV+/DENV+	2,21	2,36	2,4	2,13
	ZIKV+/ZIKV- DENV-	1,15	1,14	1,06	0,95
	ZIKV+/CN -	1,85	1,81	1,69	1,39
ZIKV-3	ZIKV+/DENV+	1,84	2,02	1,87	1,62
	ZIKV+/ZIKV- DENV-	0,94	1,04	1,01	1,28
	ZIKV+/CN -	1,45	1,35	1,27	1,09

Foi observado que os antígenos em concentrações maiores (800 e 400 ng) apresentavam melhor desempenho e, com isso, a concentração de 400 ng foi escolhida para continuar os testes, esse passo resulta numa diminuição de locais disponíveis na placa para ligações inespecíficas. No bloqueio com leite em pó também foi adicionado detergente tween 20 a 0,05 %, e este surfactante pode ter ajudado a diminuir interações inespecíficas fracas com a superfície da placa, além de realizar o bloqueio na temperatura de 37 °C, o que aumenta a eficiência de ligação das proteínas do leite na superfície da placa.

O uso da lavagem com ureia 6 M favoreceu o aumento nas razões entre ZIKV+/DENV+, esse resultado pode ser observado quando se compara os resultados da Tabela 13 (concentrações 200 e 100 ng) com as Tabelas 9, 10 e 11. Tsai et al. (2018) descreveram que uma lavagem com ureia 6M por 5 minutos, a temperatura ambiente, após incubação com o soro diminuiu a reação cruzada entre ZIKV+ e DENV+ em ensaio ELISA IgG. Wang et al. (2019) também utilizaram a lavagem de ureia em ELISA para detecção de *Treponema pallidum* e conseguiram diminuir os resultados falso-positivos. Conzentino et al. (2022) utilizaram ureia no tampão de lavagem para diminuição de *background*. A ureia é um agente dissociante, com isso pode dissociar reações inespecíficas, não prejudicando as reações específicas, uma vez que reações específicas possuem maior afinidade que as inespecíficas (BOBIĆ et al., 2009; WANG et al., 2019).

Foi realizada uma nova tentativa de otimização do ensaio com a adição de tween 80 0,1% no tampão de lavagem. Foram testadas 6 amostras negativas (DENV-/ZIKV-), 8 amostras ZIKV+ e 8 amostras DENV+.

Na Figura 28 estão apresentados os resultados de soros individuais com os comparativos das lavagens convencionais e com adição de tween 80 0,1%. A avaliação do desempenho do ensaio está apresentada na Tabela 14.

Figura 35: Avaliação dos antígenos na concentração de 400 ng comparando a lavagem convencional com a lavagem com adição de tween 80 0,1%. (a) Proteína ZIKV-1. (b) Proteína ZIKV-2. (c) Proteína ZIKV3. (-) = controle de soro negativo comercial; (ZIKV-/DENV-) = soros negativos para Zika e dengue; (DENV+) = soros positivos para dengue; (ZIKV +) = soros positivos para Zika; (*) $p > 0,5$.

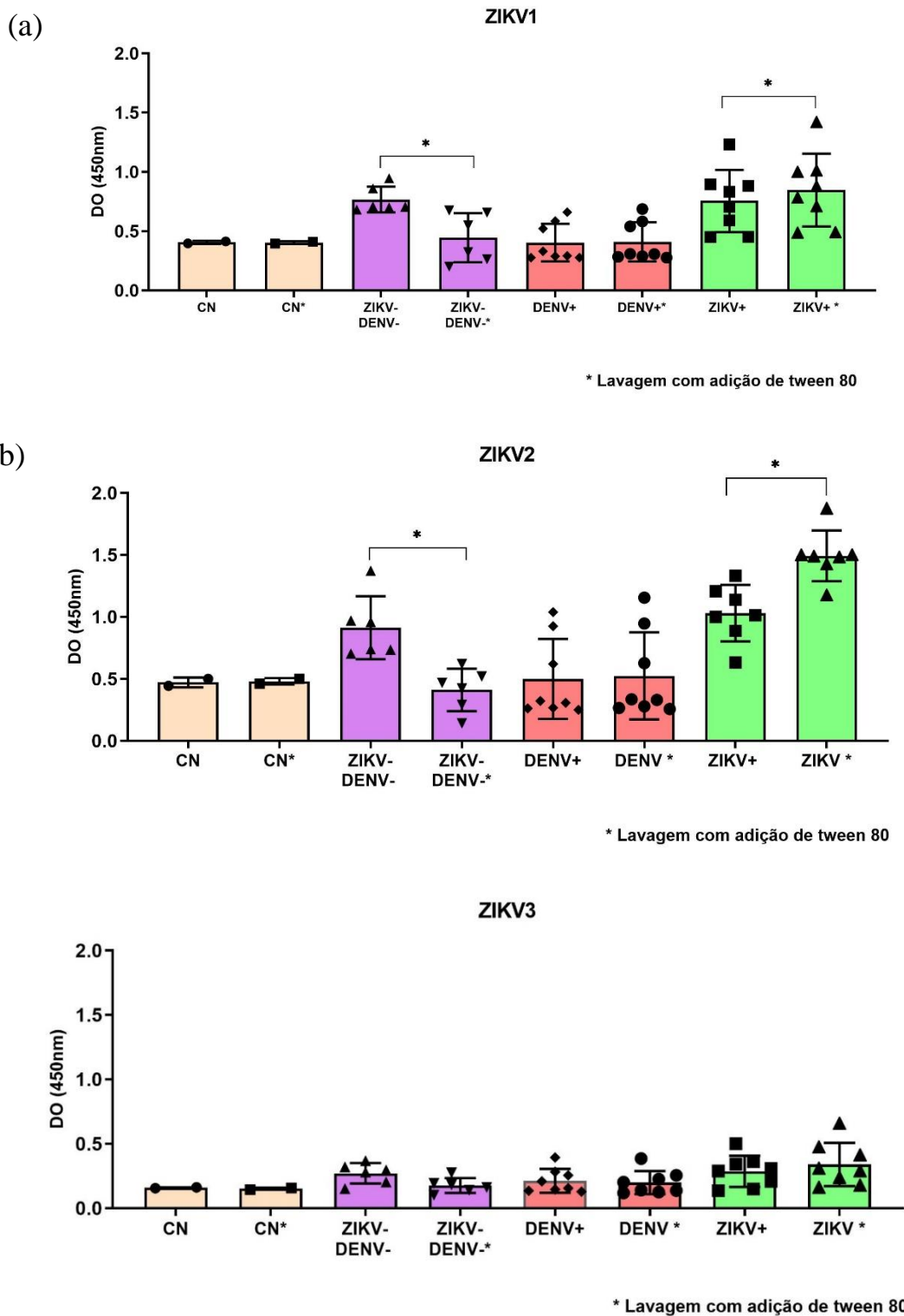


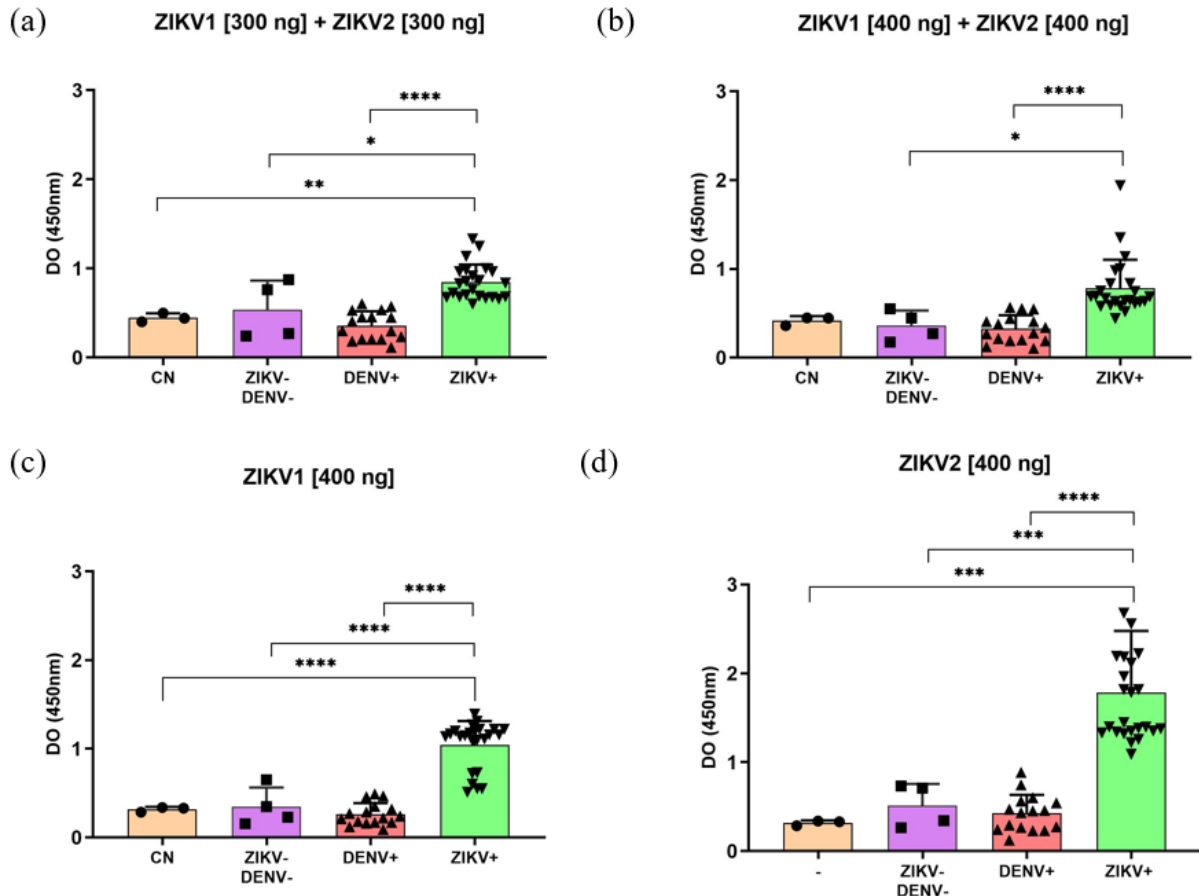
Tabela 15: Avaliação do desempenho dos antígenos ZIKV-1 ZIKV-2 e ZIKV-3 comparando a lavagem convencional com a lavagem com adição de Tween-80 0,1 %.

Antígeno	Razão	Lavagem convencional	Lavagem com tween 80
ZIKV-1	ZIKV+/DENV+	1,86	2,09
	ZIKV+/ZIKV- DENV-	1,06	1,71
	ZIKV+/CN	1,85	2,06
ZIKV-2	ZIKV+/DENV+	2,12	2,76
	ZIKV+/ZIKV- DENV-	1,22	1,95
	ZIKV+/CN	2,24	2,54
ZIKV-3	ZIKV+/DENV+	1,34	2,26
	ZIKV+/ZIKV- DENV-	1,05	1,92
	ZIKV+/CN	1,8	1,7

O uso do Tween-80 na solução de lavagem foi o ponto crucial na otimização do ensaio. O uso do surfactante conseguiu diminuir o *background* consideravelmente. Além disso, melhorou a reação dos soros ZIKV+ com o antígeno. Os detergentes não iônicos são adicionados ao tampão de lavagem, pois inibem a adsorção de anticorpos não específicos por bloquear locais vagos na superfície da placa (STEINITZ, 2000). O Tween-20 é o mais utilizado nos ensaios de ELISA, porém o Tween-80 possui caudas hidrofóbicas maiores, sendo provável que as interações hidrofóbicas tenham aumentado, diminuindo assim as ligações inespecíficas.

Uma vez definido a formulação do bloqueio e lavagem, foi avaliado se a combinação dos antígenos ZIKV-1 e ZIKV-2 poderiam apresentar uma melhora no desempenho do teste. Foi testada a combinação nas concentrações de 300 ng e 400 ng. Os soros foram avaliados de forma individuais, sendo que foram utilizados 4 soros negativos, 16 soros DENV+ e 24 soros ZIKV+. Os resultados deste ensaio estão apresentados na Figura 36.

Figura 36: Avaliação dos antígenos com junção das proteínas ZIKV-1 e ZIKV-2. (a) Proteína ZIKV-1 [300 ng] + ZIKV-2 [300 ng]. (b) Proteína ZIKV-1 [400 ng] + ZIKV-2 [400 ng]. (c) Proteína ZIKV-1 [400 ng]. (d) Proteína ZIKV-2 [400 ng]. (CN) = controle de soro negativo comercial; (ZIKV-/DENV-) = soros negativos para Zika e dengue; (DENV+) = soros positivos para dengue; (ZIKV +) = soros positivos para Zika; (*) $p > 0,5$; (**) $p > 0,01$; (***) $p > 0,001$; (****) $p > 0,0001$.



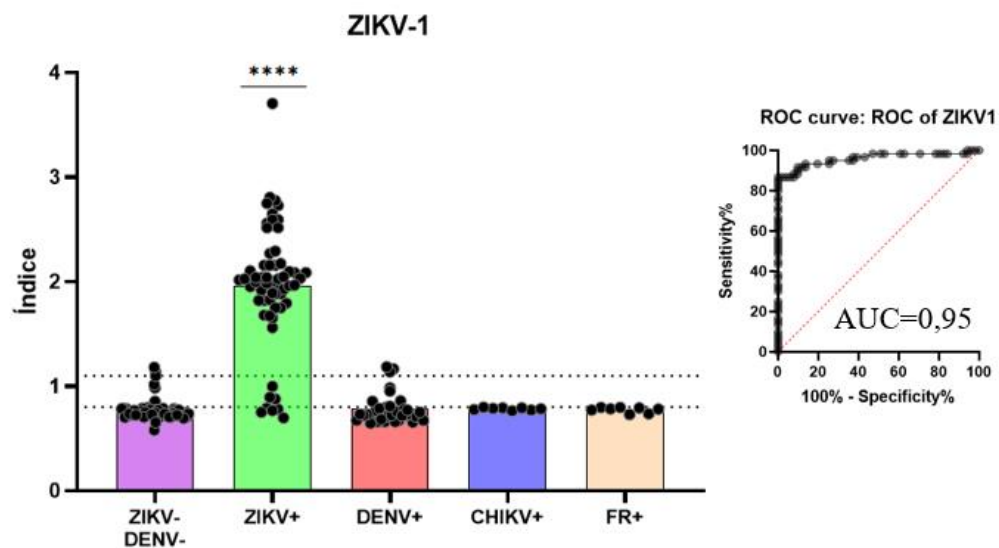
Ao avaliar as combinações dos antígenos, não foi possível observar melhora significativa em relação aos antígenos ZIKV-1 e ZIKV-2 testados separadamente, com isso a opção de junção foi descartada. Além disso, foram avaliados outros parâmetros, como o tempo de incubação do substrato TMB, temperatura de incubação da lavagem de ureia e a variação da concentração de Tween-80 no tampão de lavagem, para esses ensaios foi utilizado a proteína ZIKV-2 (os resultados estão apresentados no material suplementar).

Após a otimização do ELISA foi definido o protocolo final (item 4.1.8.2) e os três antígenos foram avaliados. Foram analisados 51 soros negativos (ZIKV-/DENV-) e 60 soros ZIKV+, além disso, foram avaliados três interferentes, 36 soros DENV+, 8 soros CHIKV+ e 8 soros FR+ (Fator reumatoide). Os resultados expressos em índice, assim como a curva ROC

podem ser visualizados na Figura 37. A avaliação de desempenho do teste encontra-se na Tabela 16.

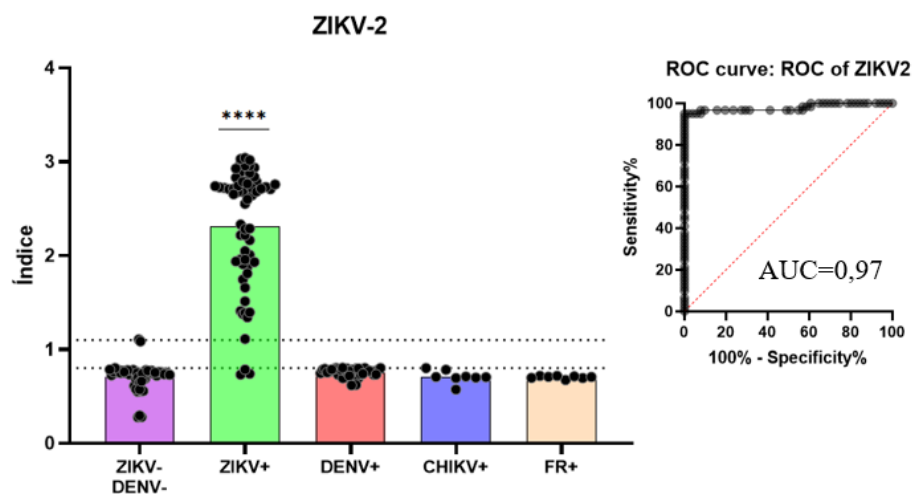
Figura 37: Avaliação dos três antígenos após otimização do protocolo. (a) Proteína ZIKV-1 [400 ng] e curva ROC. (b) Proteína ZIKV-2 [400 ng] e curva ROC.; (ZIKV-/DENV-) = soros negativos para Zika e dengue; (DENV+) = soros positivos para dengue; (ZIKV+) = soros positivos para Zika; (CHIKV+) = soros positivos para Chikungunya; (FR+) = soros fator reumatoide elevados; (*) $p>0,5$; (**) $p>0,01$; (***) $p>0,001$; (****) $p>0,0001$. A linha tracejada indica a faixa de indeterminação ($>0,8$ negativo; $<0,8$ e $>1,1$ indeterminado, $<1,1$ positivo).

(a)



Todos os grupos apresentaram diferença estatística de $p>0,0001$ para o grupo ZIKV+.

(b)



Todos os grupos apresentaram diferença estatística de $p>0,0001$ para o grupo ZIKV+.

(c)

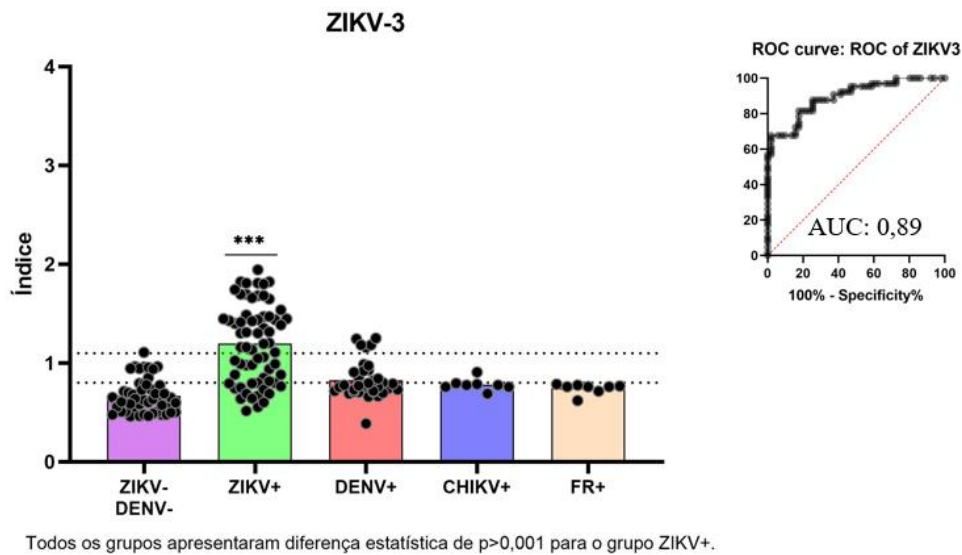


Tabela 16: Avaliação do desempenho dos antígenos ZIKV-1, ZIKV-2 e ZIKV-3 após otimização. (ZIKV+) = soros positivos para Zika; (DENV+) = soros positivos para dengue. (CHIKV+) = soros positivos para Chikungunya; (FR+) = soros fator reumatoide elevados.

		ZIKV-1	ZIKV-2	ZIKV-3
ZIKV+	Indeterminadas	3	0	16
	Não reagentes	5	3	12
	Reagentes	52	57	32
	Testadas	60	60	60
	Positividade	86%	95%	53%
	Sensibilidade	91%	95%	66%
	VPP	98%	96%	96%
Amostras negativas	Indeterminadas	4	1	8
	Não reagentes	46	48	42
	Reagentes	1	2	1
	Testadas	51	51	51
	Especificidade	97%	96%	84%
	VPN	100%	100%	77%
	AC	99%	98%	85%
DENV+	Indeterminadas	5	1	9
	Não reagentes	28	35	22
	Reagentes	3	0	5
	Testadas	36	36	36
	Especificidade	90%	100%	81%

CHIKV+	Indeterminadas	0	0	1
	Não reagentes	8	8	7
	Reagentes	0	0	0
	Testadas	8	8	8
	Especificidade	100%	100%	100%
FR+	Indeterminadas	0	0	0
	Não reagentes	8	8	8
	Reagentes	0	0	0
	Testadas	8	8	8
	Especificidade	100%	100%	100%

Para o cálculo do índice, as absorbâncias obtidas para cada amostra foram divididas pelo *cut-off* (= *média das absorbâncias + 2 x desvio padrão*).

A proteína ZIKV-1 reconheceu 52 das 60 amostras ZIKV+ testadas sendo que três amostras apresentaram resultado indeterminado, tendo assim 96 % de positividade e 91 % de sensibilidade, apenas uma amostra negativa apresentou resultado falso-positivo, mostrando 97 % de especificidade. Além disso, apresentou 96 % de especificidade em relação ao interferente DENV, sendo que apenas 3 amostras reagiram e 5 ficaram indeterminadas, em relação a CHIKV e FR apresentou 100 % de especificidade. O valor de AUC foi de 0,95.

A proteína ZIKV-2 reconheceu 57 das 60 amostras ZIKV+, apresentando 95 % de positividade e sensibilidade, apresentou 96 % de especificidade nas amostras negativas, tendo duas amostras resultado falso-positivo. Em relação aos interferentes, apresentou 100 % de especificidade para DENV, CHIKV e FR, tendo apenas uma amostra DENV+ na zona de indeterminação. O valor de AUC foi de 0,97.

A proteína ZIKV-3 teve um menor desempenho, apresentando apenas 66 % de sensibilidade, reagindo com 32 dos 60 soros ZIKV+ testados, sendo que um número considerável de soros ficou na zona de indeterminação (n=12), além disso apresentou menor especificidade em relação ao interferente DENV, 81 %, sendo que 9 amostras das 36 testadas ficaram na zona de indeterminação, para os interferentes CHIKV e FR apresentou 100 % de especificidade, sendo que apenas um soro CHIKV+ ficou na zona de indeterminação. O valor de AUC foi de 0,89.

As proteínas ZIKV-1 e ZIKV-2 foram as que apresentaram um melhor desempenho, no entanto, quando se avalia a especificidade do ensaio em relação ao interferente (DENV+) a proteína ZIKV-2 apresentou melhores resultados.

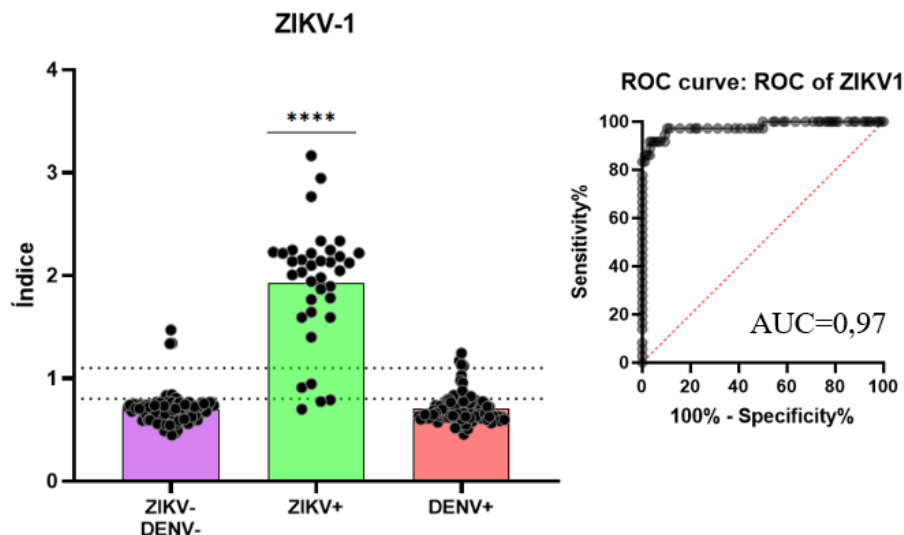
5.4.2 Avaliação do ELISA anti-ZIKV no Laboratório de Pesquisa em Virologia (LPV) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP)

Com o intuito de confirmar os resultados obtidos no desenvolvimento do ELISA anti-ZIKV IgG, uma nova avaliação foi realizada no LPV-FAMERP. Além disso, foi avaliado um número maior de soros negativos, que se faz importante pois quanto maior o número de amostras negativas analisadas, melhor é para a determinação do valor de corte do teste desenvolvido, para que se possa alcançar a melhor sensibilidade e especificidade.

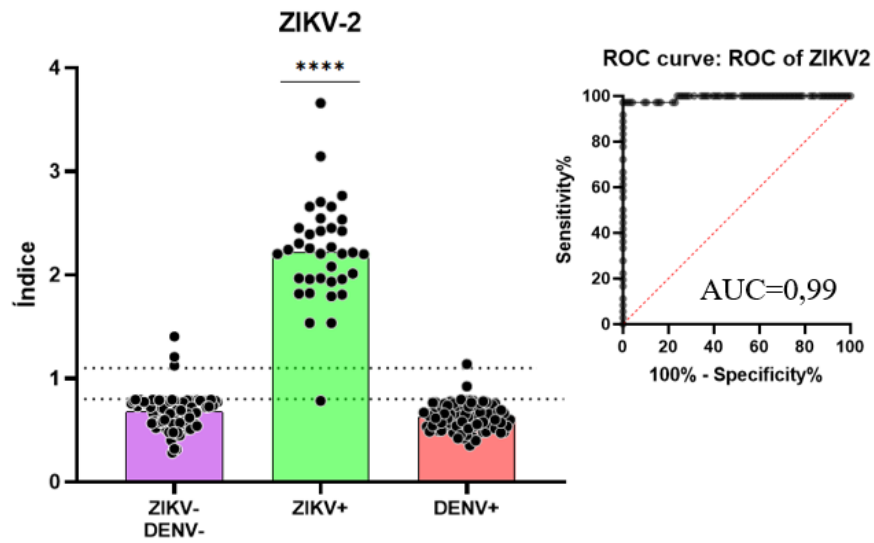
O ensaio foi realizado utilizando as mesmas condições que foram padronizadas, no entanto, novas amostras foram avaliadas. Os testes foram realizados utilizando 36 amostras ZIKV+, 96 amostras DENV+ e 96 amostras ZIKV-/DENV-. Os resultados expressos em índice estão apresentados na Figura 38. A avaliação de desempenho do teste encontra-se na Tabela 17.

Figura 38: Avaliação do ELISA desenvolvido no LPV – FAMERP. (a) Proteína ZIKV-1 [400 ng] e curva ROC. (b) Proteína ZIKV-2 [400 ng] e curva ROC. (c) Proteína ZIKV-3 [400 ng] e curva ROC.; (ZIKV-/DENV-) = soros negativos para Zika e dengue; (DENV+) = soros positivos para dengue; (ZIKV +) = soros positivos para Zika; (****) $p > 0,0001$. A linha tracejada indica a faixa de indeterminação ($>0,8$ negativo; $<0,8$ e $>1,1$ indeterminado, $<1,1$ positivo). Todos os grupos apresentaram diferença estatística de $p > 0,0000,1$ para ZIKV-1.

(a)



(b)



(c)

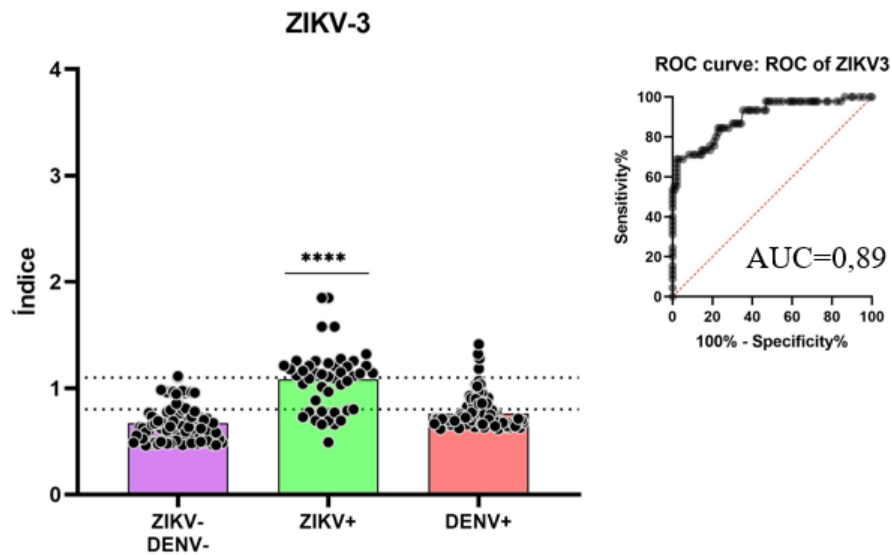


Tabela 17: Avaliação do desempenho dos antígenos ZIKV-1, ZIKV-2 e ZIKV-3 após otimização. (ZIKV+) = soros positivos para Zika; (DENV+) = soros positivos para dengue.

		ZIKV-1	ZIKV-2	ZIKV-3
ZIKV+	Indeterminadas	1	0	6
	Não reagentes	3	1	11
	Reagentes	32	35	19
	Testadas	36	36	36
	Positividade	88%	97%	52%
	Sensibilidade	91%	97%	63%
	VPP	92%	92%	95%

Amostras negativas	Indeterminadas	3	0	17
	Não reagentes	90	93	78
	Reagentes	3	3	1
	Testadas	96	96	96
	Especificidade	96%	96%	82%
	VPN	98%	100%	87%
	AC	96%	97%	88%
DENV+	Indeterminadas	8	1	17
	Não reagentes	84	94	75
	Reagentes	4	1	4
	Testadas	96	96	96
	Especificidade	95%	98%	94%

Para o teste externo realizado a proteína ZIKV-1 reagiu com 32 das 36 amostras ZIKV+, sendo que uma amostra ficou na zona de indeterminação e uma amostra apresentou resultado falso-negativo, sendo assim obteve-se 88 % de positividade e 91 % de especificidade. Para as amostras negativas obteve-se 96 % de especificidade, apenas três amostras das 96 testadas apresentaram resultado falso-positivo e três ficaram na zona de indeterminação. Para o interferente DENV o teste apresentou 96 % de especificidade. O valor de AUC foi de 0,98.

A proteína ZIKV-2 apresentou 97 % de positividade e sensibilidade reagindo com as 35 amostras testadas. Das 96 amostras negativas testadas apenas três tiveram resultados falso-positivos, apresentando 96 % de especificidade. Em relação ao interferente DENV reagiu com apenas uma amostra e uma ficou na zona de indeterminação apresentando 98 % de sensibilidade. O valor de AUC de 0,99.

A proteína ZIKV-3 reagiu com 19 amostras das 36 testadas para ZIKV+, sendo que 11 ficaram na zona de indeterminação, apresentando 52 % de positividade e 63 % de sensibilidade. Das 96 amostras DENV+ testadas apenas quatro apresentaram resultado falso-positivo (especificidade de 94 %), no entanto um número considerável de amostras ficou na zona de indeterminação (n=17). O valor de AUC foi de 0,89.

Os resultados obtidos no ensaio anterior com os dados obtidos no ensaio externo foram semelhantes. Para isso foi comparado os valores de positividade, sensibilidade e especificidade utilizando o teste qui-quadrado (GraphPad Prism 9) e não houve diferença estatística. Além disso, os valores de AUC ficaram muito próximos entre os dois ensaios, 0,95 e 0,97 para ZIKV-1, 0,97 e 0,99 para ZIKV-2 e 0,89 nos dois ensaios para ZIKV-3, quanto mais próximo de 1, maior o poder do teste em discriminar soropositivos e soronegativos (HOSMER JR.;

LEMESHOW; STURDIVANT, 2013), destacando que o AUC foi avaliado entre as amostras ZIKV+ e ZIKV-/DENV. A semelhança entre os valores obtidos para os dois ensaios demonstra que o teste conseguiu apresentar boa reprodutividade, não sendo necessário ajuste dos parâmetros previamente definidos.

Nos dois testes realizados as proteínas ZIKV-1 e ZIKV-2 apresentaram um melhor desempenho. O reconhecimento de amostras ZIKV+ e ZIKV- foi satisfatório para as duas proteínas. O desempenho do teste para o interferente DENV foi excelente, visto que foi relatado durante todo esse trabalho a dificuldade da separação de amostras positivas entre esses dois flavivírus. A proteína ZIKV-3 apresentou um menor desempenho, esse fato poderia ser justificado pela sua conformação, no entanto, como a proteína foi solubilizada em ureia não pode-se afirmar que a proteína enovelou.

Os arbovírus que pertencem a família dos flavivírus apresentam elevada semelhança antigênica por estarem relacionados filogeneticamente, especialmente ZIKV e DENV. Com isso, a busca por antígenos que permitem detecção específica de anticorpos direcionada a esses vírus é desafiadora. Embora a infecção por ZIKV seja autolimitada, é importante o acompanhamento e monitoramento dos casos por sua associação com a síndrome de Guillain Barré, sequelas em gestantes e, principalmente, defeitos congênitos. Na infecção por DENV pode-se encontrar quadros de vazamento vascular, sendo necessária reposição de fluídos, além disso, a infecção grave pode levar a doenças debilitantes, principalmente na infecção secundária, podendo levar a morte (YAN et al., 2018).

Assim, este trabalho desenvolveu um ELISA baseado em proteínas recombinantes quiméricas visando a detecção de anticorpos IgG anti-ZIKV. Os resultados foram satisfatórios, ao comparar os dados obtidos com os dados disponíveis na literatura, o ensaio desenvolvido neste trabalho apresentou resultados superiores aos kits comerciais disponíveis, uma vez que foi possível manter a sensibilidade e especificidade alta e, principalmente, a baixa reatividade cruzada com soros DENV+. Vários artigos publicados avaliaram kits comerciais ELISA anti-ZIKV, Low et al. (2021) avaliaram dois ELISA comerciais ZIKA IgG, ambos utilizam a proteína NS1 como antígeno. O teste Diapro ZIKV IgG apresentou especificidade de 76,7 % e sensibilidade de 84,2 %, ao avaliar o teste com pacientes DENV+, houve 8,3 % de positividade para infecções primárias e 55,6 % para infecções secundárias. O teste da Euroimmun ZIKV IgG apresentou especificidade de 90 %, no entanto, sensibilidade de 52,6 %, ao avaliar o teste com pacientes DENV+, não houve positividade para infecções primárias e 22,2 % para infecções secundárias. Morales et al. (2021) também avaliaram o teste da Euroimmun ZIKV

IgG e observaram baixa sensibilidade, 41,4 % para amostras agudas e 72 % para amostras convalescentes. Para as amostras negativas, obteve-se 9,4 % de positividade, enquanto as DENV+ reagiram 33,3 %. L'Huillier et al. (2017) também avaliaram o teste da Euroimmun e obtiveram sensibilidade de 23,7 % e especificidade de 95,2 %. Balmaseda desenvolveu um teste ZIKV IgG NS1 com sensibilidade de 100 %, porém o teste apresentou 40 % de reação cruzada (BALMASEDA et al., 2017).

A proteína NS1 em sua totalidade é comumente utilizada em kits comerciais de ELISA anti-ZIKV e anti-DENV. Testes diagnósticos também utilizam a proteína E em sua totalidade ou truncada na região transmembrana como antígeno. ZIKV e DENV possuem cerca de 60 % de identidade de sequência de aminoácidos, sendo que as proteínas E e NS1, possuem 61,4 % e 62,5 % de identidade respectivamente (KERKHOF et al., 2020), a elevada identidade dessas proteínas impacta na especificidade desses testes. Neste trabalho, destaca-se a relevância do uso de proteínas quiméricas. A opção de unir epítomos de várias proteínas viriais com baixa reatividade entre os flavivírus torna-se uma alternativa vantajosa quando comparado ao uso de proteínas em sua totalidade. Existem diversos trabalhos na literatura utilizando proteínas quiméricas para diagnóstico, como para *Trypanosoma cruzi* (FREITAS et al., 2022), *Burkholderia pseudomallei* (WAJANAROGANA; TAYLOR; KRITSIRIWUTHINAN, 2022), HTLV-1 (MOSADEGHI; HEYDARI-ZARNAGH, 2018), *Brucella* (BULASHEV et al., 2021), *Leishmania braziliensis* (GARCIA et al., 2021), entre outros.

Nesse trabalho não foi possível realizar o ELISA anti-ZIKV IgM devido a não disponibilidade de soros de pacientes agudos.

Tendo em vista os argumentos apresentados, destaca-se a importância desse estudo e de outros voltados para o diagnóstico de flavivírus, objetivando aumentar a eficiência dos testes disponíveis.

5.4 Identificação de potenciais epítomos para diagnóstico de DENV

Como não foi possível expressar a proteína quimérica de DENV, foi realizada uma nova abordagem para a identificação de potenciais epítomos para o diagnóstico sorológico. Como já discutido nesse trabalho, a dificuldade na utilização de ensaios sorológicos para DENV e ZIKV consiste na elevada reatividade cruzada entre esses vírus, principalmente em regiões onde existe cocirculação ou imunidade prévia. A utilização de ferramentas de bioinformática pode auxiliar na busca por antígenos com reduzida identidade com os patógenos relacionados.

Dessa forma, foi feita a predição de epítomos a partir de cinco sequências de cada sorotipo de DENV brasileiras selecionadas. Após excluir os epítomos que possuíam score menor que 0,5, média e mediana menor que 0,6 e as redundâncias, foram obtidos 59 peptídeos para DENV1, 49 para DENV2, 38 DENV3 e 87 para DENV4. A avaliação da conservação das sequências entre os sorotipos, resultou em 42 peptídeos para DENV1, 35 para DENV2, 38 DENV3 e 10 para DENV4. Após o alinhamento com a sequência do vírus da Zika, foram obtidos 15 epítomos para DENV1, 22 para DENV2, 13 DENV3 e 7 para DENV4. Os epítomos obtidos podem ser observados na Tabela 18.

Tabela 18: Epítomos lineares de célula B de DENV preditos pelo software BepiPred 2.0 conservados entres os quatro sorotipos de DENV e diferenciais para ZIKV.

Sorotipo	Peptídeo
DENV1	S-R-S-T-S-L-S-M-T-C-I-A-V-G-M
	N-S-R-S-T-S-L-S-M-T-C-I-A-V-G
	L-G-L-N-S-R-S-T-S-L-S-M-T-C-I
	T-A-L-T-G-A-T-E-I-Q-T-S-G-T-T
	H-T-A-L-T-G-A-T-E-I-Q-T-S-G-T
	M-H-T-A-L-T-G-A-T-E-I-Q-T-S-G
	N-T-T-A-N-I-S-L-T-A-I-A-N-Q-A
	E-N-T-T-A-N-I-S-L-T-A-I-A-N-Q
	I-E-N-T-T-A-N-I-S-L-T-A-I-A-N
	T-I-E-N-T-T-A-N-I-S-L-T-A-I-A
	H-T-I-E-N-T-T-A-N-I-S-L-T-A-I
	R-H-T-I-E-N-T-T-A-N-I-S-L-T-A
	M-R-H-T-I-E-N-T-T-A-N-I-S-L-T
	M-M-R-H-T-I-E-N-T-T-A-N-I-S-L
	P-M-M-R-H-T-I-E-N-T-T-A-N-I-S
DENV2	M-N-S-R-S-T-S-L-S-V-S-L-V-L-V
	G-M-N-S-R-S-T-S-L-S-V-S-L-V-L
	E-N-S-S-V-N-V-S-L-T-A-I-A-N-Q

I-E-N-S-S-V-N-V-S-L-T-A-I-A-N
 S-I-E-N-S-S-V-N-V-S-L-T-A-I-A
 H-S-I-E-N-S-S-V-N-V-S-L-T-A-I
 R-H-S-I-E-N-S-S-V-N-V-S-L-T-A
 L-R-H-S-I-E-N-S-S-V-N-V-S-L-T
 P-M-L-R-H-S-I-E-N-S-S-V-N-V-S
 T-A-L-T-G-A-T-E-I-Q-M-S-S-G-N
 H-T-A-L-T-G-A-T-E-I-Q-M-S-S-G
 M-H-T-A-L-T-G-A-T-E-I-Q-M-S-S
 S-V-N-V-S-L-T-A-I-A-N-Q-A-T-V
 S-S-V-N-V-S-L-T-A-I-A-N-Q-A-T
 N-S-S-V-N-V-S-L-T-A-I-A-N-Q-A
 T-G-A-T-E-I-Q-M-S-S-G-N-L-L-F
 L-T-G-A-T-E-I-Q-M-S-S-G-N-L-L
 A-L-T-G-A-T-E-I-Q-M-S-S-G-N-L
 V-N-V-S-L-T-A-I-A-N-Q-A-T-V-L
 S-I-M-K-N-T-T-N-T-R-R-G-T-G-N
 M-L-R-H-S-I-E-N-S-S-V-N-V-S-L
 F-S-I-M-K-N-T-T-N-T-R-R-G-T-G

DENV3

A-L-T-G-A-T-E-I-Q-N-S-G-G-T-S
 T-A-L-T-G-A-T-E-I-Q-N-S-G-G-T
 H-T-A-L-T-G-A-T-E-I-Q-N-S-G-G
 M-H-T-A-L-T-G-A-T-E-I-Q-N-S-G
 S-T-A-N-V-S-L-A-A-I-A-N-Q-A-V
 N-S-T-A-N-V-S-L-A-A-I-A-N-Q-A
 E-N-S-T-A-N-V-S-L-A-A-I-A-N-Q
 I-E-N-S-T-A-N-V-S-L-A-A-I-A-N
 T-I-E-N-S-T-A-N-V-S-L-A-A-I-A

	R-H-T-I-E-N-S-T-A-N-V-S-L-A-A
	L-R-H-T-I-E-N-S-T-A-N-V-S-L-A
	M-L-R-H-T-I-E-N-S-T-A-N-V-S-L
	H-T-I-E-N-S-T-A-N-V-S-L-A-A-I
	N-T-S-A-N-L-S-L-A-A-I-A-N-Q-A
	E-N-T-S-A-N-L-S-L-A-A-I-A-N-Q
	I-E-N-T-S-A-N-L-S-L-A-A-I-A-N
DENV4	T-I-E-N-T-S-A-N-L-S-L-A-A-I-A
	H-T-I-E-N-T-S-A-N-L-S-L-A-A-I
	R-H-T-I-E-N-T-S-A-N-L-S-L-A-A
	L-R-H-T-I-E-N-T-S-A-N-L-S-L-A

Após a seleção dos epítomos, os 57 peptídeos foram sintetizados e imobilizados covalentemente em uma membrana de celulose derivada (membrana spot) e realizado um imunoblot. O imunoblot foi realizado com soro ZIKV/DENV-, DENV+ e ZIKV+. Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 39a.

Para interpretação dos resultados foram realizadas análises densitométricas utilizando o software ImageJ (NIH). Inicialmente foram geradas imagens dos spots em escalas de cores de acordo com a reatividade de cada spot (Figura 39b). Logo após foi realizada a análise conjunta de DENV+ e DENV-/ZIKV-, depois foram analisados ZIKV+ e DENV-/ZIKV-. Em seguida, os dados obtidos foram novamente analisados de forma conjunta a fim de obter os epítomos que reagem somente com DENV. Após o *screening* realizado foram encontrados vinte epítomos promissores (Tabela 20).

Figura 39: *Screening* dos epítomos lineares de célula B preditos para DENV. (a) Imunoblot da membrana spot com os pools de soro DENV-/ZIKV-, DENV+ e ZIKV+. (b) Histogramas gerados de acordo com a reatividade de cada spot pelo software ImageJ utilizando a extensão “*Protein Array Analyzer*”.

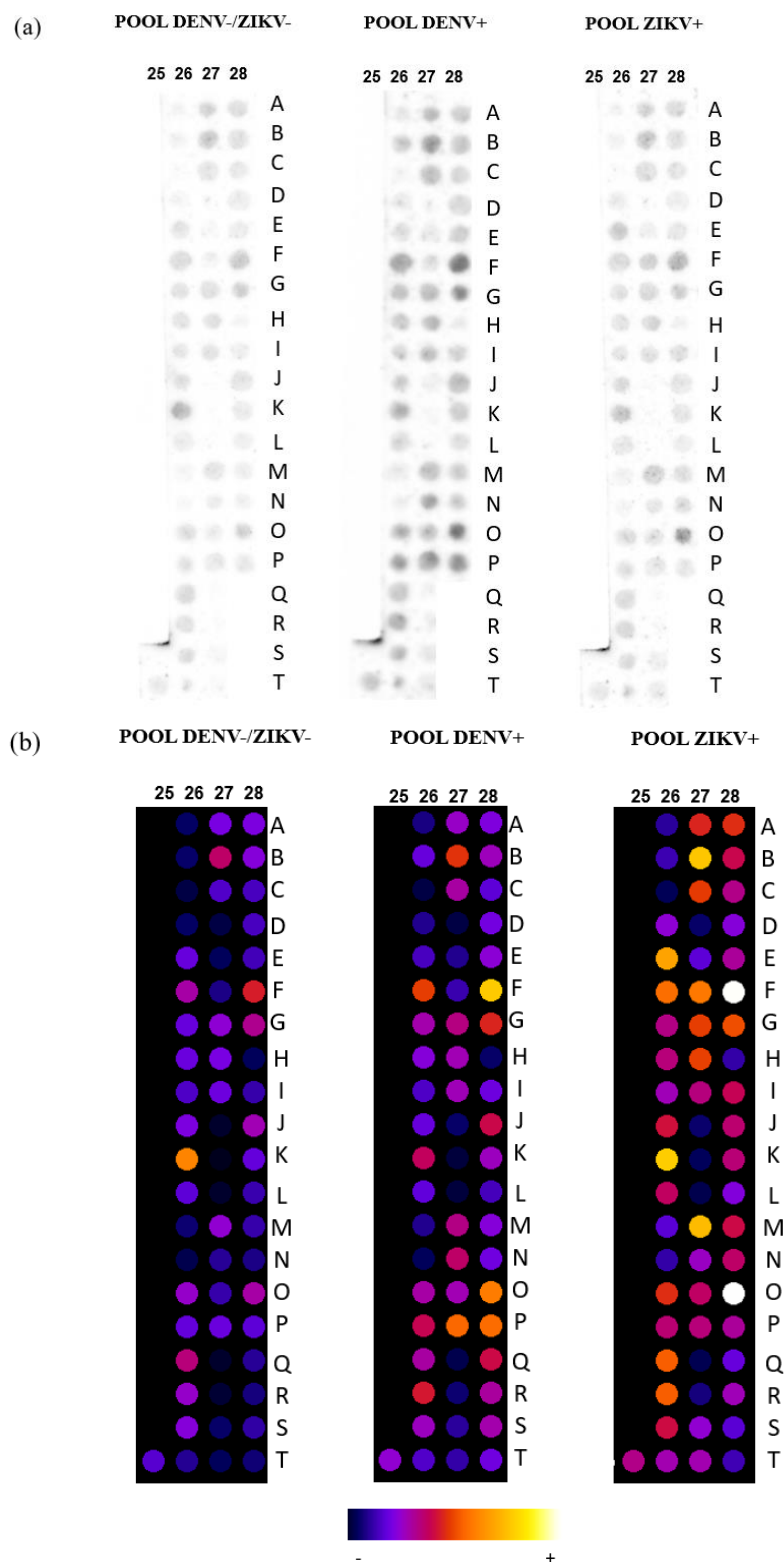


Tabela 19: Potenciais epítomos para diagnóstico diferencial de DENV após análise em membrana spot.

Posição	Sequência	Score	Proteína de origem
N27	S-I-M-K-N-T-T-N-T-R-R-G-T-G-N	5,49	NS5
P28	L-R-H-T-I-E-N-T-S-A-N-L-S-L-A	5,10	NS4B
P27	F-S-I-M-K-N-T-T-N-T-R-R-G-T-G	4,62	NS5
O27	M-L-R-H-S-I-E-N-S-S-V-N-V-S-L	3,64	NS4B
P26	G-M-N-S-R-S-T-S-L-S-V-S-L-V-L	3,47	E
C27	P-M-L-R-H-S-I-E-N-S-S-V-N-V-S	3,03	NS4B
F28	R-H-T-I-E-N-S-T-A-N-V-S-L-A-A	2,99	NS4B
R26	I-E-N-S-S-V-N-V-S-L-T-A-I-A-N	2,81	NS4B
F26	N-T-T-A-N-I-S-L-T-A-I-A-N-Q-A	2,76	NS4B
G26	E-N-T-T-A-N-I-S-L-T-A-I-A-N-Q	2,57	NS4B
J28	N-T-S-A-N-L-S-L-A-A-I-A-N-Q-A	2,41	NS4B
K28	E-N-T-S-A-N-L-S-L-A-A-I-A-N-Q	2,40	NS4B
G28	L-R-H-T-I-E-N-S-T-A-N-V-S-L-A	2,36	NS4B
G27	S-V-N-V-S-L-T-A-I-A-N-Q-A-T-V	2,36	NS4B
I27	N-S-S-V-N-V-S-L-T-A-I-A-N-Q-A	2,36	NS4B
H27	S-S-V-N-V-S-L-T-A-I-A-N-Q-A-T	2,22	NS4B
O26	M-N-S-R-S-T-S-L-S-V-S-L-V-L-V	2,00	E
B28	N-S-T-A-N-V-S-L-A-A-I-A-N-Q-A	1,99	NS4B
S26	S-I-E-N-S-S-V-N-V-S-L-T-A-I-A	1,96	NS4B
Q26	E-N-S-S-V-N-V-S-L-T-A-I-A-N-Q	1,50	NS4B

A estratégia de triagem de peptídeos utilizando membrana spot é extremamente útil para seleção de peptídeos, uma vez que é possível avaliar um grande número de epítomos (WINKLER, 2020). Na Figura 39A é possível observar o resultado encontrado nos 106 imunoblot realizados. Para o pool de soro DENV-/ZIKV- é observado uma menor reatividade com os peptídeos, enquanto para os pools de soro DENV+ e ZIKV+ como esperado é visto uma maior reatividade entre os anticorpos presentes no soro e os peptídeos sintetizados.

Apesar da reatividade cruzada observada entre alguns epítomos, foi possível rastrear peptídeos com baixa reatividade. Todos os peptídeos são conservados entre os quatro sorotipos de DENV, sendo que a maioria estão presentes na proteína NS4B, no entanto, alguns dos epítomos possui grande similaridade entre si pois a predição foi realizada por janela deslizante. A identificação sorológica desses peptídeos é intrigante uma vez que não se trata de uma

proteína não estrutural secretada, como a NS1, entretanto, diversos estudos já demonstraram epítomos em proteínas não estruturais de DENV com o objetivo de diagnóstico ou vacina (NARAYAN et al., 2016; WEN et al., 2017). O uso de peptídeos de proteínas virais não comumente utilizados em teste diagnósticos pode se tornar uma alternativa interessante uma vez que as proteínas E e NS1 são as que geralmente apresentam maior reatividade cruzada entre os flavivírus.

Os epítomos identificados possuem potencial para serem possíveis alvos de testes diagnósticos sorológicos, no entanto é necessário a síntese desses peptídeos solúveis e posterior análise por pepELISA para melhor investigação.

6 Conclusões

No presente trabalho foi avaliada a produção de proteínas quiméricas e o potencial para o uso como antígenos em teste sorológicos.

As proteínas quiméricas de ZIKV foram expressas em sistema procarioto e purificadas de forma eficiente, com baixo nível de contaminantes e com um bom rendimento. Apesar das várias tentativas, não foi possível expressar a proteína DENV-1.

Um protocolo de ELISA para as proteínas de ZIKV produzidas foi estabelecido para detecção de anticorpos IgG anti-ZIKV. O método apresentou elevada sensibilidade e especificidade para as proteínas ZIKV-1 e ZIKV-2. A proteína ZIKV-3 se mostrou menos eficiente. As proteínas ZIKV-1 e ZIKV-2 possuem potencial para serem utilizadas como ferramenta de detecção de anticorpos para ZIKV. As proteínas geradas nesse trabalho geraram uma patente que foi depositada no INPI pelo número de processo BR 10 2022 026807 0.

Além disso, foi possível avaliar potenciais epítomos para diagnóstico diferencial de DENV.

7 Referências

- AGARWAL, A.; PARIDA, M.; DASH, P. K. Impact of transmission cycles and vector competence on global expansion and emergence of arboviruses. **Reviews in medical virology**, ago. 2017.
- ANVISA. Dengvaxia (vacina dengue 1, 2, 3 e 4) – Atualização de bula. Sanofi Medley Farmacêutica Ltda, 23 de setembro de 2019. 2019.
- ANVISA. **RESOLUÇÃO-RE Nº 661, DE 2 DE MARÇO DE 2023**. [s.l: s.n.].
- ARAUJO, S. C. et al. Anti-Flavivirus Vaccines: Review of the Present Situation and Perspectives of Subunit Vaccines Produced in Escherichia coli. **Vaccines**, v. 8, n. 3, ago. 2020.
- Arboviruses and human disease. Report of a WHO Scientific Group. **World Health Organization technical report series**, v. 369, p. 1–84, 1967.
- AUBRY, F. et al. Recent African strains of Zika virus display higher transmissibility and fetal pathogenicity than Asian strains. **Nature communications**, v. 12, n. 1, p. 916, fev. 2021.
- AVIRUTNAN, P. et al. Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1. **The Journal of experimental medicine**, v. 207, n. 4, p. 793–806, abr. 2010.
- BAGNO, F. F. et al. Undetected Chikungunya virus co-infections in a Brazilian region presenting hyper-endemic circulation of Dengue and Zika. **Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 113, p. 27–30, abr. 2019.
- BALMASEDA, A. et al. Antibody-based assay discriminates Zika virus infection from other flaviviruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 31, p. 8384–8389, ago. 2017.
- BEAVER, J. T. et al. Evolution of two major Zika virus lineages: Implications for pathology, immune response, and vaccine development. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. JUL, 2018.
- BOBIĆ, B. et al. Comparative evaluation of three commercial Toxoplasma-specific IgG antibody avidity tests and significance in different clinical settings. **Journal of medical microbiology**, v. 58, n. Pt 3, p. 358–364, mar. 2009.
- BRASIL, P.; NIELSEN-SAINES, K. More pieces to the microcephaly-Zika virus puzzle in Brazil. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 16, n. 12, p. 1307–1309, dez. 2016.
- BULASHEV, A. K. et al. Evaluation of chimeric proteins for serological diagnosis of brucellosis in cattle. **Veterinary world**, v. 14, n. 8, p. 2187–2196, ago. 2021.
- CAI, Y. et al. Evaluation of an indirect ELISA using recombinant granule antigen Gra7 for serodiagnosis of Toxoplasma gondii infection in cats. **The Journal of parasitology**, v. 101, n. 1, p. 37–40, fev. 2015.

CALVET, G. et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 16, n. 6, p. 653–660, jun. 2016.

CAMPOS, T. D. L. et al. Revisiting Key Entry Routes of Human Epidemic Arboviruses into the Mainland Americas through Large-Scale Phylogenomics. **International journal of genomics**, v. 2018, p. 6941735, 2018.

CAO-LORMEAU, V.-M. et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. **Lancet (London, England)**, v. 387, n. 10027, p. 1531–1539, abr. 2016.

CDC. **Centers for Disease Control and Prevention**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/>>.

CHAKRABARTTY, I. et al. Comparative overview of emerging RNA viruses: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis and current treatment. **Annals of medicine and surgery (2012)**, v. 79, p. 103985, jul. 2022.

CHAN, J. F. W. et al. Zika fever and congenital Zika syndrome: An unexpected emerging arboviral disease. **The Journal of infection**, v. 72, n. 5, p. 507–524, maio 2016.

CHEN, X.; ZARO, J. L.; SHEN, W.-C. Fusion protein linkers: property, design and functionality. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65, n. 10, p. 1357–1369, out. 2013.

CHONG, H. Y. et al. Flavivirus infection-A review of immunopathogenesis, immunological response, and immunodiagnosis. **Virus research**, v. 274, p. 197770, dez. 2019.

CHONG, L. C.; KHAN, A. M. Identification of highly conserved, serotype-specific dengue virus sequences: implications for vaccine design. **BMC genomics**, v. 20, n. Suppl 9, p. 921, dez. 2019.

COMBE, M. et al. Expression, refolding and bio-structural analysis of a tetravalent recombinant dengue envelope domain III protein for serological diagnosis. **Protein expression and purification**, v. 133, p. 57–65, maio 2017.

CONZENTINO, M. S. et al. A magnetic bead immunoassay to detect high affinity human IgG reactive to SARS-CoV-2 Spike S1 RBD produced in Escherichia coli. **Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, p. 1–7, abr. 2022.

CORZO-GÓMEZ, J. et al. Expression and purification of domain III proteins from Dengue and Zika viruses. **Protein expression and purification**, v. 162, p. 38–43, out. 2019.

CROWTHER, J. R. The ELISA guidebook. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 149, p. III–IV, 1–413, 2000.

DE SOUZA, M. Q. et al. A recombinant multiepitope protein for hepatitis B diagnosis. **BioMed research international**, v. 2013, p. 148317, 2013.

DELANO, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System. **Scientific LLC**, 2006.

Dengue vaccine: WHO position paper, September 2018 – Recommendations. **Vaccine**, v. 37, n. 35, p. 4848–4849, 2019.

DERMAN, A. I. et al. Mutations that Allow Disulfide Bond Formation in the Cytoplasm of *Escherichia coli*. **Science**, v. 262, n. 5140, p. 1744–1747, 10 dez. 1993.

DIPTI, C. A.; JAIN, S. K.; NAVIN, K. A novel recombinant multiepitope protein as a hepatitis C diagnostic intermediate of high sensitivity and specificity. **Protein expression and purification**, v. 47, n. 1, p. 319–328, maio 2006.

DUTRA, H. L. C.; CARAGATA, E. P.; MOREIRA, L. A. The re-emerging arboviral threat: Hidden enemies: The emergence of obscure arboviral diseases, and the potential use of *Wolbachia* in their control. **BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 39, n. 2, fev. 2017.

FARIA, A. R. et al. Novel recombinant multiepitope proteins for the diagnosis of asymptomatic leishmania infantum-infected dogs. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 1, p. e3429, jan. 2015.

FAYE, O. et al. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20(th) century. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 1, p. e2636, 2014.

FERGUSON, N. M. et al. EPIDEMIOLOGY. Countering the Zika epidemic in Latin America. **Science (New York, N.Y.)**, v. 353, n. 6297, p. 353–354, jul. 2016.

FERRARIS, P.; YSSEL, H.; MISSÉ, D. Zika virus infection: an update. **Microbes and Infection**, v. 21, n. 8–9, p. 353–360, 2019.

FREITAS, N. E. M. et al. Double-antigen sandwich ELISA based on chimeric antigens for detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in human sera. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 16, n. 3, p. e0010290, mar. 2022.

GALDINO, A. S. et al. A Novel Structurally Stable Multiepitope Protein for Detection of HCV. **Hepatitis research and treatment**, v. 2016, p. 6592143, 2016.

GAO, J.; ZHAO, D. [Preparation of multi-epitope recombinant diagnostic antigen of *Mycobacterium tuberculosis*]. **Sheng wu gong cheng xue bao = Chinese journal of biotechnology**, v. 35, n. 4, p. 718–725, abr. 2019.

GARCIA, G. C. et al. Development of a chimeric protein based on a proteomic approach for the serological diagnosis of human tegumentary leishmaniasis. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 105, n. 18, p. 6805–6817, set. 2021.

GIRALDO, M. I. et al. Envelope protein ubiquitination drives entry and pathogenesis of Zika virus. **Nature**, v. 585, n. 7825, p. 414–419, set. 2020.

GONCALVES, A. et al. **Innovative and New Approaches to Laboratory Diagnosis of Zika and Dengue: A Meeting Report. The Journal of infectious diseases**, mar. 2018.

GUARNER, J.; HALE, G. L. Four human diseases with significant public health impact caused by mosquito-borne flaviviruses: West Nile, Zika, dengue and yellow fever. **Seminars in diagnostic pathology**, v. 36, n. 3, p. 170–176, maio 2019.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical microbiology reviews**, v. 11,

n. 3, p. 480–496, jul. 1998.

GUSTAFSSON, C.; GOVINDARAJAN, S.; MINSHULL, J. Codon bias and heterologous protein expression. **Trends in biotechnology**, v. 22, n. 7, p. 346–353, jul. 2004.

HASAN, S. et al. Zika Virus: A Global Public Health Menace: A Comprehensive Update. **Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry**, v. 9, n. 4, p. 316–327, 2019.

HENCHAL, E. A.; PUTNAK, J. R. The dengue viruses. **Clinical microbiology reviews**, v. 3, n. 4, p. 376–396, out. 1990.

HERRERA, L. R. Immuno informatics Approach in Designing a Novel Vaccine Using Epitopes from All the Structural Proteins of SARS-CoV-2. **Biomedical and Pharmacology Journal**, v. 13, p. 1845–1862, 31 dez. 2020.

HOSMER JR., D. W.; LEMESHOW, S.; STURDIVANT, R. X. **Applied Logistic Regression**. 3. ed. [s.l: s.n.].

HUANG, C.-J.; LIN, H.; YANG, X. Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 39, n. 3, p. 383–399, mar. 2012.

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome research**, v. 9, n. 9, p. 868–877, set. 1999.

ICTV – INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. **No Title**.

KAM, Y.-W. et al. ZIKV-Specific NS1 Epitopes as Serological Markers of Acute Zika Virus Infection. **The Journal of infectious diseases**, v. 220, n. 2, p. 203–212, jun. 2019.

KERKHOF, K. et al. Reliable Serological Diagnostic Tests for Arboviruses: Feasible or Utopia? **Trends in microbiology**, v. 28, n. 4, p. 276–292, abr. 2020.

KING, A. M. Q. et al. **No Title**. 9. ed. Amsterdã: [s.n.].

KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. **No Title**. [s.l: s.n.].

KOZAKOV, D. et al. The FTMap family of web servers for determining and characterizing ligand-binding hot spots of proteins. **Nature protocols**, v. 10, n. 5, p. 733–755, maio 2015.

KRAEMER, M. U. G. et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. **eLife**, v. 4, p. e08347, jun. 2015.

L'HUILLIER, A. G. et al. Evaluation of Euroimmun Anti-Zika Virus IgM and IgG Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Zika Virus Serologic Testing. **Journal of clinical microbiology**, v. 55, n. 8, p. 2462–2471, ago. 2017.

LAND, K. J. et al. REASSURED diagnostics to inform disease control strategies, strengthen health systems and improve patient outcomes. **Nature microbiology**, v. 4, n. 1, p. 46–54, jan. 2019.

LEE, H.-J. et al. Identification of peptide based B-cell epitopes in Zika virus NS1. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 505, n. 4, p. 1010–1014, nov. 2018.

LETA, S. et al. Global risk mapping for major diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases**, v. 67, p. 25–35, fev. 2018.

LIANG, H. et al. Recombinant Zika virus envelope protein elicited protective immunity against Zika virus in immunocompetent mice. **PLoS one**, v. 13, n. 3, p. e0194860, 2018.

LIBRATY, D. H. et al. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. **The Journal of infectious diseases**, v. 186, n. 8, p. 1165–1168, out. 2002.

LO, D.; PARK, B. Modeling the spread of the Zika virus using topological data analysis. **PLoS ONE**, v. 13, n. 2, p. 1–7, 2018.

LOW, S. L. et al. Evaluation of eight commercial Zika virus IgM and IgG serology assays for diagnostics and research. **PLoS one**, v. 16, n. 1, p. e0244601, 2021.

MEN, R. H.; BRAY, M.; LAI, C. J. Carboxy-terminally truncated dengue virus envelope glycoproteins expressed on the cell surface and secreted extracellularly exhibit increased immunogenicity in mice. **Journal of virology**, v. 65, n. 3, p. 1400–1407, mar. 1991.

MESSINA, J. P. et al. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. **Trends in microbiology**, v. 22, n. 3, p. 138–146, mar. 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **PORTARIA Nº 264, DE 17 DE FEVEREIRO DE 2020**. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2020/prt0264_19_02_2020.html>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico 24**. [s.l: s.n.].

MIRDITA, M. et al. ColabFold: making protein folding accessible to all. **Nature Methods**, v. 19, n. 6, p. 679–682, 2022.

MODIS, Y. et al. Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein. **Journal of virology**, v. 79, n. 2, p. 1223–1231, jan. 2005.

MORALES, I. et al. Diagnostic performance of anti-Zika virus IgM, IgAM and IgG ELISAs during co-circulation of Zika, dengue, and chikungunya viruses in Brazil and Venezuela. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 15, n. 4, p. e0009336, abr. 2021.

MOSADEGHI, P.; HEYDARI-ZARNAGH, H. Development and Evaluation of a Novel ELISA for Detection of Antibodies against HTLV-I Using Chimeric Peptides. **Iranian journal of allergy, asthma, and immunology**, v. 17, n. 2, p. 144–150, abr. 2018.

MULLER, D. A.; DEPELSENAIRE, A. C. I.; YOUNG, P. R. Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection. **The Journal of infectious diseases**, v. 215, n. suppl_2, p. S89–S95, mar. 2017.

MULLER, D. A.; YOUNG, P. R. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology,

immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. **Antiviral research**, v. 98, n. 2, p. 192–208, maio 2013.

MURRAY, N. E. A.; QUAM, M. B.; WILDER-SMITH, A. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. **Clinical epidemiology**, v. 5, p. 299–309, 2013.

MUSSO, D.; GUBLER, D. J. Zika Virus. **Clinical microbiology reviews**, v. 29, n. 3, p. 487–524, jul. 2016.

MUSSO, D.; NILLES, E. J.; CAO-LORMEAU, V.-M. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. **Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 20, n. 10, p. O595–6, out. 2014.

NARAYAN, R. et al. A novel indirect ELISA for diagnosis of dengue fever. **The Indian journal of medical research**, v. 144, n. 1, p. 128–133, jul. 2016.

NASAR, S.; RASHID, N.; IFTIKHAR, S. Dengue proteins with their role in pathogenesis, and strategies for developing an effective anti-dengue treatment: A review. **Journal of medical virology**, v. 92, n. 8, p. 941–955, ago. 2020.

NEUFELDT, C. J. et al. Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 125–142, 2018.

NEZAFAT, N. et al. A novel multi-epitope peptide vaccine against cancer: an in silico approach. **Journal of theoretical biology**, v. 349, p. 121–134, maio 2014.

NGUYEN, N. M. et al. Diagnostic Performance of Dengue Virus Envelope Domain III in Acute Dengue Infection. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 14, jul. 2019.

OHST, C. et al. Reliable Serological Testing for the Diagnosis of Emerging Infectious Diseases. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 1062, p. 19–43, 2018.

PAHO. **Zika - Weekly report**. Disponível em: <<https://www3.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/zika-weekly-en/>>. Acesso em: 16 mar. 2023a.

PAHO. **Reported Cases of Dengue Fever in The Americas**. Disponível em: <<https://www3.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/indicadores-dengue-en/dengue-nacional-en/252-dengue-pais-ano-en.html>>. Acesso em: 16 mar. 2023b.

PATHAK, V. K.; MOHAN, M. A notorious vector-borne disease: Dengue fever, its evolution as public health threat. **Journal of family medicine and primary care**, v. 8, n. 10, p. 3125–3129, out. 2019.

PATRA, A. K. et al. Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from *Escherichia coli*. **Protein expression and purification**, v. 18, n. 2, p. 182–192, mar. 2000.

PRASAD, V. M. et al. Structure of the immature Zika virus at 9 Å resolution. **Nature structural & molecular biology**, v. 24, n. 2, p. 184–186, fev. 2017.

RAI, R. et al. Design and synthesis of multiple antigenic peptides and their application for dengue diagnosis. **Biologicals: journal of the International Association of Biological Standardization**, v. 49, p. 81–85, set. 2017.

ROBINSON, C. R.; SAUER, R. T. Optimizing the stability of single-chain proteins by linker length and composition mutagenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 11, p. 5929–5934, maio 1998.

ROCKSTROH, A. et al. Recombinant Envelope-Proteins with Mutations in the Conserved Fusion Loop Allow Specific Serological Diagnosis of Dengue-Infections. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 11, p. e0004218, nov. 2015.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 172, 2014.

ROSSI, G. et al. The spread of mosquito-borne viruses in modern times: A spatio-temporal analysis of dengue and chikungunya. **Spatial and spatio-temporal epidemiology**, v. 26, p. 113–125, ago. 2018.

SAMISH, I. et al. Theoretical and computational protein design. **Annual review of physical chemistry**, v. 62, p. 129–149, 2011.

SANGER, F. Determination of nucleotide sequences in DNA. **Science**, v. 214, n. 4526, p. 1205–1210, 1981.

SANTOS, F. L. N. et al. Accuracy of chimeric proteins in the serological diagnosis of chronic chagas disease - a Phase II study. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 3, p. e0005433, mar. 2017.

SCATURRO, P. et al. Dengue Virus Non-structural Protein 1 Modulates Infectious Particle Production via Interaction with the Structural Proteins. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 11, p. e1005277, 2015.

SCREATON, G. et al. New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. **Nature reviews. Immunology**, v. 15, n. 12, p. 745–759, dez. 2015.

SIMMONDS, P. et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. **The Journal of general virology**, v. 98, n. 1, p. 2–3, jan. 2017.

SINGH, S. M.; PANDA, A. K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 99, n. 4, p. 303–310, abr. 2005.

STEINITZ, M. Quantitation of the blocking effect of tween 20 and bovine serum albumin in ELISA microwells. **Analytical biochemistry**, v. 282, n. 2, p. 232–238, jul. 2000.

STROHL, W. B. T.-R. M. IN L. S. Chimeric Genes, Proteins☆. In: [s.l.] Elsevier, 2017.

TAHERKHANI, R.; FARSHADPOUR, F.; MAKVANDI, M. Design and production of a multiepitope construct derived from hepatitis E virus capsid protein. **Journal of medical virology**, v. 87, n. 7, p. 1225–1234, jul. 2015.

TAPPE, D. et al. **Acute Zika virus infection after travel to Malaysian Borneo, September 2014. *Emerging infectious diseases***, maio 2015.

TRIPATHI, N. K.; PRIYA, R.; SHRIVASTAVA, A. Production of recombinant Chikungunya virus envelope 2 protein in *Escherichia coli*. ***Applied microbiology and biotechnology***, v. 98, n. 6, p. 2461–2471, mar. 2014.

TSAI, W.-Y. et al. Use of Urea Wash ELISA to Distinguish Zika and Dengue Virus Infections. ***Emerging infectious diseases***, v. 24, n. 7, p. 1355–1359, jul. 2018.

WAJANAROGANA, S.; TAYLOR, W. R. J.; KRITSIRIWUTHINAN, K. Enhanced serodiagnosis of melioidosis by indirect ELISA using the chimeric protein rGroEL-FLAG300 as an antigen. ***BMC infectious diseases***, v. 22, n. 1, p. 387, abr. 2022.

WANG, Q. et al. Urea-mediated dissociation alleviate the false-positive *Treponema pallidum*-specific antibodies detected by ELISA. ***PloS one***, v. 14, n. 3, p. e0212893, 2019.

WATERHOUSE, A. et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. ***Nucleic acids research***, v. 46, n. W1, p. W296–W303, jul. 2018.

WEN, J. et al. Identification of Zika virus epitopes reveals immunodominant and protective roles for dengue virus cross-reactive CD8(+) T cells. ***Nature microbiology***, v. 2, p. 17036, mar. 2017.

WHITEHORN, J.; SIMMONS, C. P. The pathogenesis of dengue. ***Vaccine***, v. 29, n. 42, p. 7221–7228, set. 2011.

WILDER-SMITH, A. et al. Dengue. ***Lancet (London, England)***, v. 393, n. 10169, p. 350–363, jan. 2019.

WINKLER, D. F. H. SPOT Synthesis: The Solid-Phase Peptide Synthesis on Planar Surfaces. ***Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)***, v. 2103, p. 151–173, 2020.

XAVIER, A. R. et al. Clinical and laboratory diagnosis of Zika fever: An update. ***Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial***, v. 53, n. 4, p. 252–257, 2017.

XIAO, Y.; ISAACS, S. N. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and blocking with bovine serum albumin (BSA)--not all BSAs are alike. ***Journal of immunological methods***, v. 384, n. 1–2, p. 148–151, out. 2012.

XU, X. et al. Identifying Candidate Targets of Immune Responses in Zika Virus Based on Homology to Epitopes in Other Flavivirus Species. ***PLoS currents***, v. 8, nov. 2016.

YAN, G. et al. Distinguishing Zika and Dengue Viruses through Simple Clinical Assessment, Singapore. ***Emerging infectious diseases***, v. 24, n. 8, p. 1565–1568, ago. 2018.

ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. ***Memorias do Instituto Oswaldo Cruz***, v. 110, n. 4, p. 569–572, jun. 2015.

ZARA, A. L. DE S. A. et al. [*Aedes aegypti* control strategies: a review]. ***Epidemiologia e servicos de saude : revista do Sistema Unico de Saude do Brasil***, v. 25, n. 2, p. 391–404, 2016.

ZHANG, X. et al. Structures and functions of the envelope glycoprotein in flavivirus infections. **Viruses**, v. 9, n. 11, p. 338, 2017.

MATERIAL SUPLEMENTAR

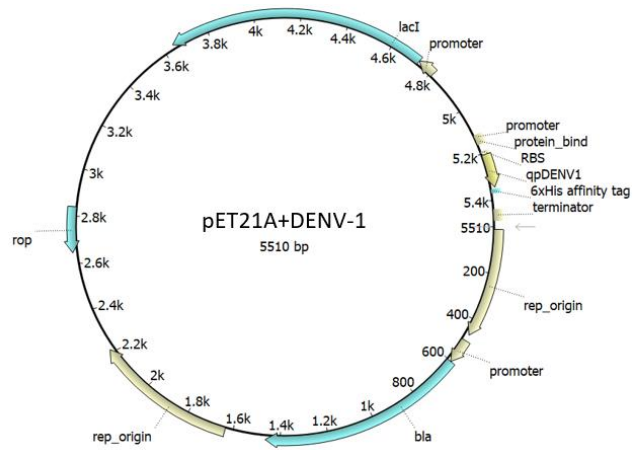
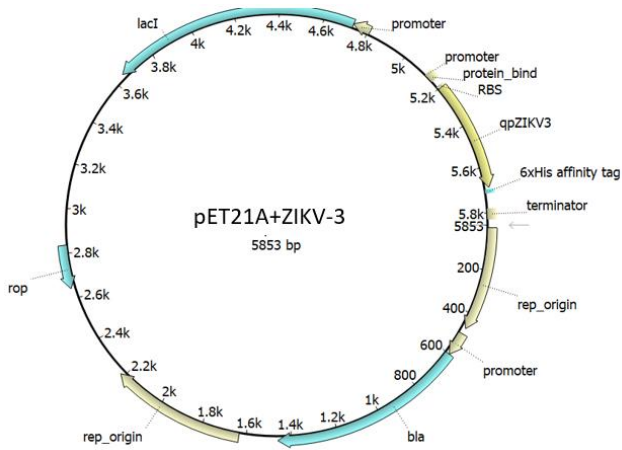
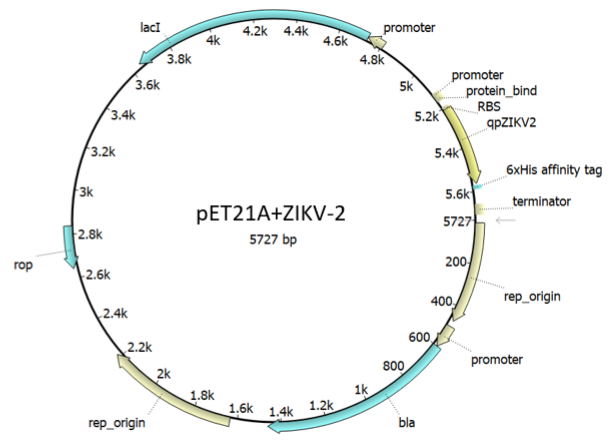
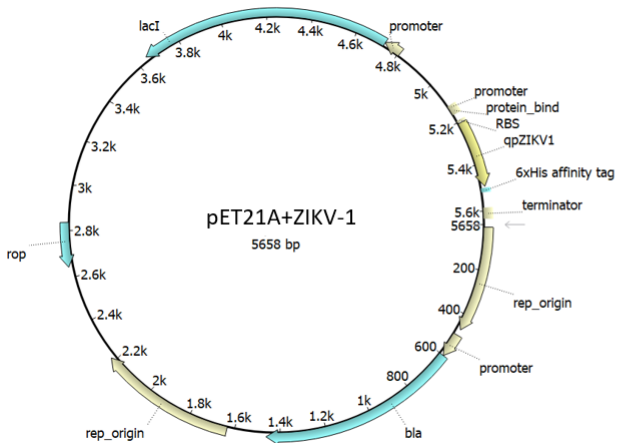
A- Epítópos encontrados na literatura para o vírus da Zika com os respectivos percentuais de identidade com os interferentes.

EPÍTOPOS	PROTEÍNA	REFERÊNCIA	BlastP							
			ZIKV	YFV	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4		
SVEGELNAILEENGV	NS1	Lee et al., 2018	NC 012532.1 100%	NC_002031.1 72,73%	NC 001477.1 N	NC 001474.2 N	NC 001475.2 N	NC 002640.1 N		
WGKSYFVRAAKTNSFVVDGDLKCEPLKH	NS1	Lee et al., 2018	100%	40,00%	40,74%	37,04%	48,15%	37,04%		
LVEDHGFGVFHTSVWLKVRDYSLCEDPA	NS1	Lee et al., 2018	100%	38,46%	57,69%	57,69%	65,38%	57,69%		
PAVIGTAVKGEAVH	NS1	Lee et al., 2018	100%	N	N	N	N	N		
KNDTWRLKRAHLIEM	NS1	Lee et al., 2018	100%	N	60,00%	50,00%	53,33%	53,33%		
IEESDLIPKSLAGP	NS1	Lee et al., 2018	100%	46,67%	61,54%	76,92%	92,31%	69,23%		
SLAGPLSHNTRGYRTQMKGPWHSELEI	NS1	Lee et al., 2018	100%	46,67%	59,26%	60,00%	63,33%	63,33%		
GPWHSELEIRFEEC	NS1	Lee et al., 2018	100%	46,67%	N	N	N	66,67%		
TGVFVYNDVEAWRDYKY	NS1	Kam et al., 2019	100%	35,29%	44,44%	33,33%	44,44%	38,69%		
REGYRTQMKGPWHSELE	NS1	Kam et al., 2019	100%	50,00%	61,11%	61,11%	61,11%	61,11%		
HMCDATMSYECPLDEGV	prM	Kam et al., 2019	100%	42,86%	46,67%	40,00%	53,33%	53,85%		
HKKGEARRSRRAVTLPSH	prM	Kam et al., 2019	100%	N	N	N	N	N		
TVNMAEVRSYCYEASIS	E	Kam et al., 2019	100%	53,85%	N	46,15%	N	64,29%		
ISDMASDSRCPTQGEAYL	E	Kam et al., 2019	100%	N	68,42%	N	63,16%	N		
KRQTVVVLGS	E	Kim et al., 2018	100%	N	80,00%	80,00%	80,00%	80,00%		

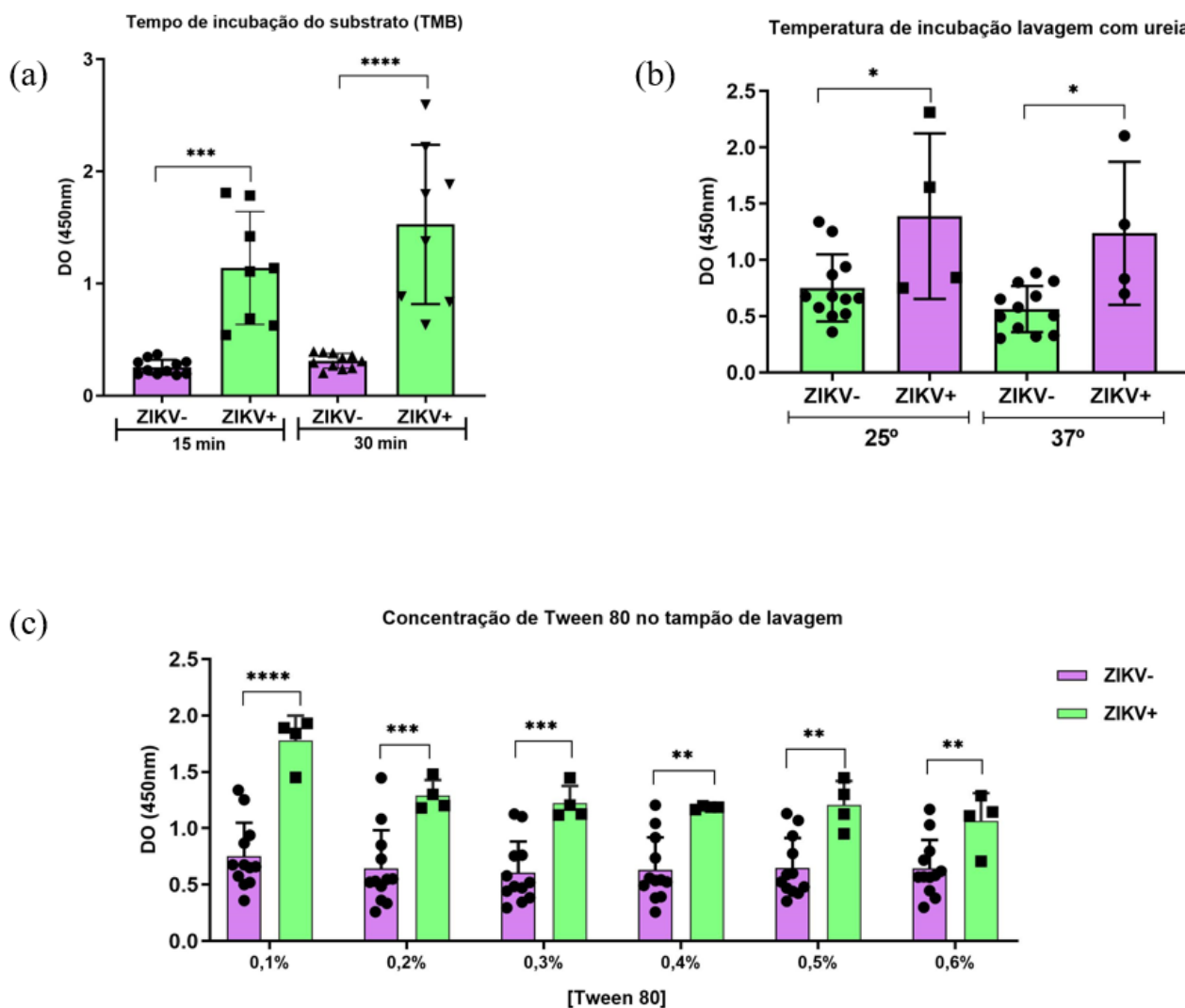
B- Epítópos encontrados na literatura para o vírus da Dengue com os respectivos percentuais de identidade com os interferentes

EPÍTOPOS	PROTEÍNA	REFERÊNCIA	BlastP						
			DENV1	DENV2	DENV3	DENV4	ZIKV	YFV	
RLEPSWAS	NS3	Gandikota et al., 2020	NC_001477.1 100%	NC_001474.2 100%	NC_001475.2 100%	NC_002640.1 100%	NC_012532.1 N	NC_002031.1 62,50%	
GWRLQ	NS3	Gandikota et al., 2020	N	N	N	N	N	N	
SWNTGEE	NS3	Gandikota et al., 2020	100%	N	100%	100%	N	N	
VEPGKNPKNVQITPGTFKTPEGEV	NS3	Gandikota et al., 2020	100%	100%	100%	100%	50,00%	60,00%	
KPGTSGSPIVN	NS3	Gandikota et al., 2020	100%	100%	100%	100%	77,78%	100,00%	
VVTTSGT	NS3	Gandikota et al., 2020	100%	N	N	N	N	N	
DAP	E	Nguyen et al., 2020	100%	N	N	N	N	N	
FSTQDEKGATQ	E	Nguyen et al., 2020	100%	N	N	N	N	N	
PVNIEAEPPFG	E	Nguyen et al., 2020	100%	100%	100%	100%	N	N	
KGEDAP	E	Nguyen et al., 2020	N	N	100%	N	N	N	
VVTKKEEPPVNIEAEPP	E	Nguyen et al., 2020	100%	100%	100%	100%	N	N	
EGAGAP	E	Nguyen et al., 2020	N	N	N	100%	N	N	
EPPFG	E	Nguyen et al., 2020	N	N	N	N	N	N	
RGARRMAIL	E	Rai et al., 2017	100%	100%	100%	100%	77,78%	N	
DFGSVGGVL	E	Rai et al., 2017	100%	100%	100%	100%	88,89%	71,43%	
LRYSWK	NS1	Rai et al., 2017	N	100%	100%	100%	N	66,67%	
PESPSKLASA	NS1	Rai et al., 2017	N	100%	N	100%	83,33%	77,78%	
AIKDNRAVHA	NS1	Rai et al., 2017	100%	100%	100%	100%	57,14%	N	
NNQRKKARN	C	AnandaRao et al., 2015	100%	100%	100%	N	N	N	
RGFR	C	AnandaRao et al., 2015	N	N	N	N	N	N	
MLNILNRRR	C	AnandaRao et al., 2015	100%	100%	N	100%	N	N	

C- Plasmídeos construídos para expressão das proteínas recombinantes em *E. coli*



D- Padronizações do tampão de lavagem e tempo de substrato. (a) Variação do tempo de incubação do substrato TMB. (b) Avaliação da temperatura de incubação da lavagem com ureia. (c) Avaliação da concentração de Tween 80 no tampão de lavagem. (ZIKV+) = soros positivos para Zika; (ZIKV-) = soros negativos para Zika; (*) $p > 0,5$; (**) $p > 0,01$; (***) $p > 0,001$; (****) $p > 0,0001$.



E- Dados do teste de ELISA realizado no CTVacinas após padronizações.
Cut-off (ZIKV-1 = 0,2539), (ZIKV-2 = 0,3613), (ZIKV-3 = 0,2127)

Amostras negativas (ZIKV-/DENV-)			
ID	ZIKV-1	ZIKV-2	ZIKV-3
Carlos	0,729	0,742	0,475
GFLS	0,721	0,755	0,508
8	0,736	0,753	0,461
BDMM	0,725	0,747	0,663
13	0,744	0,753	0,508
33	0,784	0,731	0,733
30/16	0,985	0,750	0,583
R22	0,772	0,753	0,959
EJF	0,855	0,753	0,508
STC24	0,792	0,725	0,465
NM	0,579	0,750	0,681
FGF	0,788	0,731	0,794
PACC	0,709	0,689	0,714
11	0,705	0,744	0,583
24	0,756	0,720	0,625
55	0,752	0,775	0,653
CW	0,756	0,612	0,479
RR	0,784	0,761	0,569
FA	0,788	0,684	0,503
JR	0,772	0,684	0,700
GM	0,788	0,775	0,508
2727	0,717	0,780	0,634
2729	0,784	1,107	0,681
2738	0,736	0,778	0,775
2740	0,705	0,551	0,963
2747	0,701	0,744	0,790
2751	0,729	0,758	0,602
2759	0,740	0,772	0,649
2768	0,729	0,778	0,573
2769	0,764	0,750	0,634
2774	0,732	0,578	0,691
2775	0,772	0,556	0,555
2784	1,016	0,778	0,479
2786	1,134	1,085	0,639
2801	0,776	0,700	0,479
2803	0,752	0,750	0,963
2121	0,772	0,739	1,109
2122	0,725	0,277	0,851
2125	0,768	0,772	0,728
2127	0,744	0,280	0,780
2129	0,705	0,761	0,498
2130	0,736	0,296	0,489
2136	0,729	0,800	0,945
2140	1,099	0,556	0,954

2145	0,736	0,653	0,691
2146	0,693	0,736	0,465
2147	0,705	0,786	0,587
2149	0,725	0,573	0,597
2156	0,654	0,728	0,606
2157	0,725	0,753	0,945
2164	1,181	0,661	0,940

Amostras ZIKV+			
ID	ZIKV-1	ZIKV-2	ZIKV-3
2039	1,793	2,643	1,823
2050	1,961	2,709	1,447
2052	1,821	1,879	1,537
2061	1,561	2,552	1,682
2067	0,998	2,330	0,940
2072	1,954	1,110	1,471
2076	1,919	1,909	0,977
2094	1,997	2,723	1,438
2101	2,538	2,936	1,133
2104	2,559	0,740	0,743
2142	2,004	2,726	0,517
2159	1,884	2,679	1,161
2162	2,018	2,731	0,982
2194	0,780	2,886	1,203
2197	1,926	1,409	1,161
2198	2,158	2,787	0,667
2199	2,728	1,378	0,555
2204	2,271	2,831	1,062
2205	1,751	0,732	1,109
2209	1,652	1,746	0,752
2212	2,088	1,959	0,851
2626	1,828	1,937	1,353
2680	1,961	2,709	1,302
2724	1,884	2,679	0,639
2728	2,025	1,658	0,799
2898	3,705	2,164	0,883
5039	1,751	1,389	1,400
5044	1,983	2,718	0,794
5055	2,088	2,759	1,823
5056	2,158	1,342	1,311
5060	2,292	2,839	0,691
37	0,790	2,878	1,302
86	2,032	2,217	1,429
98	2,039	0,785	0,733
114	2,095	2,009	1,697

127	2,650	2,980	0,794
138	2,102	2,048	1,650
146	2,025	1,932	1,809
147	1,680	2,599	1,485
171	2,594	2,958	0,691
252	1,968	2,712	0,992
270	0,752	1,395	1,809
285	2,594	2,958	1,048
335	2,046	2,742	1,697
339	2,777	3,030	0,644
358	2,172	2,792	0,799
406	1,673	1,959	1,800
417	0,698	1,810	1,386
429	2,039	1,514	1,316
534	2,158	2,787	0,992
539	1,891	2,682	1,024
545	0,767	2,712	1,659
546	2,039	2,740	1,743
553	2,517	2,928	1,682
570	2,805	3,041	0,883
594	2,517	2,217	0,818
410	1,821	2,654	1,447
555	0,879	2,283	1,194
598	0,893	2,289	0,766
599	2,749	3,019	0,602

Amostras DENV+			
ID	ZIKV1	ZIKV2	ZIKV3
24	0,658	0,731	0,710
33	0,756	0,703	0,737
46	0,654	0,767	0,658
50	0,780	0,747	0,664
69	0,669	0,783	1,158
94	0,725	0,778	0,723
97	0,658	0,703	0,691
1389	0,768	0,800	1,184
1445	0,646	0,722	0,717
1477	0,859	0,761	0,730
1493	0,717	0,728	0,987
1547	0,855	0,800	0,789
2031	0,732	0,797	0,927
2034	0,799	0,783	0,697
2038	0,709	0,692	0,802
2042	1,166	0,791	0,710
2045	0,673	0,695	0,388
2046	0,732	0,794	1,243

2047	0,713	0,786	0,704
2048	0,658	0,769	0,756
2049	0,721	0,769	0,855
2053	0,752	0,783	0,756
2054	1,138	0,623	0,921
2055	0,721	0,755	0,776
2056	0,756	0,769	0,717
2057	0,780	0,733	0,908
2059	0,985	0,800	0,710
2060	0,717	0,797	0,730
2063	0,673	0,717	0,822
2069	0,788	0,783	0,796
2073	0,681	0,733	0,973
2077	0,772	0,739	1,250
2078	1,185	0,617	0,776
1282	0,953	0,789	0,842
1319	0,732	0,786	0,770
1332	0,807	0,803	1,184

F- Dados do teste de ELISA realizado no LPV-FAMERP após padronizações.
Cut-off (ZIKV-1 = 0,2539), (ZIKV-2 = 0,3613), (ZIKV-3 = 0,2127)

Amostras negativas (ZIKV-/DENV-)			
ID	ZIKV-1	ZIKV-2	ZIKV-3
3	0,718	0,533	0,488
4	0,731	0,711	0,521
8	0,762	0,662	0,473
64	0,735	0,686	0,677
80	0,660	0,659	0,521
81	0,677	0,646	0,748
109	0,508	0,728	0,597
110	0,660	0,601	0,975
111	0,686	0,651	0,521
126	0,762	0,630	0,478
137	0,468	0,745	0,696
140	0,740	0,769	0,810
154	0,495	0,795	0,729
157	0,486	0,771	0,597
160	1,341	0,533	0,639
179	0,628	0,775	0,668
180	0,744	0,785	0,492
181	0,718	0,786	0,582
184	0,593	0,678	0,488
205	1,471	0,402	0,686
211	0,597	0,758	0,492
212	0,767	0,793	0,620
224	0,642	0,737	0,668
304	0,793	0,773	0,762
312	0,682	0,755	0,952
325	0,495	0,664	0,776
326	0,655	0,672	0,587
329	0,735	0,510	0,634
343	0,655	0,604	0,559
346	0,740	0,522	0,620
351	0,744	0,561	0,677
407	0,798	0,615	0,540
442	0,637	0,753	0,464
443	0,775	0,758	0,625
454	0,588	0,788	0,464
458	0,642	0,789	0,952
474	0,664	0,693	1,098
476	0,660	0,789	0,838
492	0,446	0,769	0,715
515	0,744	0,730	0,767
529	0,793	0,504	0,516

545	0,686	0,786	0,507
546	0,833	0,599	0,966
581	0,593	0,787	0,975
583	0,842	0,665	0,710
602	0,740	0,789	0,483
603	0,807	0,561	0,606
611	0,570	0,786	0,615
614	0,628	0,794	0,625
620	0,731	0,721	0,966
708	0,749	0,737	0,961
709	0,557	0,723	0,473
715	0,722	0,794	0,507
738	0,767	0,786	0,459
741	0,557	0,586	0,663
763	0,646	0,786	0,507
772	0,686	0,574	0,734
788	0,646	0,710	0,582
798	0,619	0,667	0,961
800	0,646	0,661	0,507
802	0,771	0,567	0,464
809	0,677	0,708	0,682
810	0,740	0,758	0,795
824	0,655	0,723	0,734
829	0,588	0,727	0,601
847	0,660	0,581	0,644
848	0,606	0,794	0,672
858	0,655	0,561	0,497
861	0,677	0,481	0,587
888	0,762	0,693	0,521
898	0,722	0,779	0,720
914	0,593	0,783	0,526
917	0,709	0,314	0,653
1036	0,767	0,596	0,701
1069	0,709	0,509	0,795
1082	0,767	0,589	0,985
1084	0,726	0,281	0,810
1108	0,704	0,467	0,620
1119	0,593	0,789	0,668
1123	0,753	1,404	0,592
1132	0,735	1,123	0,634
1134	0,726	0,774	0,691
1142	0,557	0,559	0,554
1151	0,731	0,570	0,478
1161	0,624	0,449	0,639
1170	0,602	0,794	0,478
1182	0,548	0,621	0,966

1188	0,762	0,658	1,113
1196	0,735	0,476	0,852
1246	0,686	0,600	0,729
1248	0,722	0,541	0,781
1254	0,544	1,209	0,497
1256	0,753	0,320	0,488
1270	1,337	0,693	0,947
1275	0,704	0,794	0,956
1279	0,744	0,477	0,691

Amostras ZIKV+			
ID	ZIKV-1	ZIKV-2	ZIKV-3
229	2,767	2,545	1,142
259	2,228	2,257	1,578
296	2,153	1,822	0,776
316	0,699	1,968	1,850
409	2,945	1,808	0,492
433	2,130	2,199	1,209
778	1,766	0,783	1,256
1227	1,894	3,144	0,658
19	2,099	2,203	0,791
115	2,247	1,959	0,966
105	2,335	2,204	1,275
104	2,046	2,423	1,209
51	0,909	2,658	1,034
85	1,979	3,661	0,696
34	2,184	1,934	1,114
21	1,399	1,536	1,091
137	2,335	1,819	1,109
111	0,790	2,080	1,203
519	2,032	2,392	0,696
217	0,945	2,243	1,320
5055	2,219	2,305	1,235
142	2,005	2,423	0,800
140	1,591	2,453	0,885
133	2,216	2,535	1,130
132	1,644	1,536	0,658
152	2,136	2,453	1,148
174	1,943	1,794	0,729
175	0,775	2,013	1,120
5060	1,867	2,215	1,179
177	2,215	1,968	1,137
560	2,248	2,765	0,772
51	3,164	2,703	1,069
519	2,124	2,658	1,213
85	1,783	2,268	0,696

156	1,591	1,959	1,163
761	2,142	2,204	0,781

Amostras DENV+			
ID	ZIKV-1	ZIKV-2	ZIKV-3
1	0,732	0,705	0,873
2	0,788	0,758	0,715
11	0,751	0,762	0,910
21	0,758	0,777	1,184
22	0,570	0,482	0,823
30	0,452	0,483	0,731
36	0,782	0,351	0,748
43	0,669	0,620	0,689
47	0,643	0,649	0,665
57	0,623	0,581	0,672
63	0,631	0,582	0,656
68	0,526	0,432	0,661
83	0,594	0,604	0,657
84	0,631	0,560	1,277
90	0,697	0,643	0,626
93	0,620	0,646	0,837
105	1,119	1,137	1,068
107	0,653	0,787	1,037
108	0,706	0,698	0,797
116	0,660	0,628	0,691
118	0,775	0,738	0,952
119	0,686	0,693	0,971
121	0,694	0,697	1,320
124	0,594	0,533	0,639
127	0,795	0,786	0,713
128	0,557	0,484	0,670
139	0,793	0,617	0,757
141	0,749	0,735	0,668
147	1,029	0,662	0,927
148	0,636	0,531	0,674
150	0,736	0,736	0,727
155	0,609	0,565	1,413
161	0,620	0,552	0,653
162	0,586	0,496	0,628
166	0,664	0,535	0,655
167	0,726	0,718	0,760
170	0,508	0,399	0,634
172	0,553	0,486	0,641
173	0,578	0,476	0,615

174	0,651	0,566	0,679
175	0,688	0,554	0,669
176	0,732	0,745	0,715
182	0,695	0,652	0,745
183	0,636	0,509	0,640
185	0,781	0,788	0,753
187	0,585	0,656	0,767
195	0,659	0,566	0,705
196	0,796	0,768	0,765
199	0,606	0,600	0,642
200	0,978	0,786	1,019
202	0,698	0,641	0,693
213	0,824	0,670	0,656
214	0,721	0,664	0,712
216	0,765	0,766	0,686
218	0,836	0,759	0,685
219	0,956	0,794	0,754
221	0,564	0,421	0,709
225	0,621	0,547	0,675
226	0,632	0,541	0,699
227	0,549	0,454	0,733
230	0,600	0,626	0,661
232	0,631	0,536	0,660
234	0,791	0,677	0,657
236	0,517	0,455	0,616
239	0,837	0,755	0,737
242	0,759	0,652	0,867
243	1,170	0,755	0,791
245	0,655	0,516	0,695
245	0,662	0,559	0,623
249	0,678	0,664	0,704
250	0,641	0,611	0,662
251	0,795	0,769	0,754
252	0,597	0,422	0,701
254	0,879	0,738	0,753
257	0,824	0,724	0,751
260	0,700	0,693	0,866
261	1,244	0,662	0,906
263	0,773	0,539	0,899
265	0,685	0,476	0,630
266	0,725	0,572	0,697
267	0,611	0,495	0,709
269	0,654	0,583	0,664
272	0,613	0,557	0,693
277	0,724	0,637	0,692
279	0,791	0,768	0,734

280	0,771	0,671	0,857
283	0,625	0,599	0,643
291	0,597	0,543	0,772
294	0,660	0,573	0,711
298	1,134	0,924	0,850
301	0,768	0,659	0,858
305	0,648	0,514	0,642
309	0,599	0,577	0,660
311	0,637	0,558	0,725
313	0,648	0,615	0,712
314	0,627	0,778	0,666

ANEXOS

Autorização de uso dos soros cedidos pela FUNED

Participar do fortalecimento do Sistema Único de Saúde,
protegendo e promovendo a saúde

**INSTITUTO OCTÁVIO MAGALHÃES
DIVISÃO DE EPIDEMIOLOGIA E CONTROLE DE DOENÇAS
SERVIÇO DE VIROLOGIA E RIQUETSIOSES**

Eu, Glauco de Carvalho Pereira, chefe do Laboratório de Virologia e Riquetsioses da Fundação Ezequiel Dias – FUNED, autorizo a utilização de amostras de soro humano provenientes desta Instituição no âmbito da realização dos seguintes projetos nos dos quais temos colaboração formalizada nos termos dos respectivos editais e programas:

- 1) PROJETO: “DESENVOLVIMENTO DE TESTES SOROLÓGICOS DIFERENCIAIS PARA ARBOVIROSES BRASILEIRAS BASEADOS NA IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS CONSERVADOS/ NÃO CONSERVADOS NO PROTEOMA DOS DIFERENTES VÍRUS E NA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES OBTIDAS EM SISTEMAS HETERÓLOGOS DE EXPRESSÃO”. MODALIDADE: “EDITAL 007/2017 - PROGRAMA DE PESQUISA PARA O SUS - PPSUS” - PROCESSO N.: CBB- APQ-04295-17. COORDENADOR: PROF. FLAVIO G DA FONSECA
- 2) PROJETO: “DESENVOLVIMENTO DE TESTE SOROLÓGICO DIFERENCIAL PARA DENGUE, CHIKUNGUNYA ZIKA E FEBRE AMARELA - BIOSSENSORES BASEADOS EM NANOBASTÕES DE OURO”. MODALIDADE: “EDITAL 001/2017 - DEMANDA UNIVERSAL”. PROCESSO N.: CBB - APQ-03081-17. COORDENADOR: PROF. FLAVIO G DA FONSECA

As amostras serão utilizadas pelo Dr. Flávio Guimarães da Fonseca - Professor Associado junto ao Depto. de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, CI número M3467468, Siape no. 1 519 530 - para estudos de vigilância epidemiológica e para a pesquisa e desenvolvimento de novas estratégias de diagnósticos.

Atenciosamente,

Glauco Carvalho Pereira
Chefe do Serviço de Virologia e Riquetsioses
DECD-DIOM-FUNED-LACEN/MG
CRBio-04/mº44962/04-D/MASP: 1169906-3
14 de julho de 2018

Autorização de uso dos soros cedidos pelo LPV-FAMERP



FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Autarquia Estadual - Lei n.º 8899 de 27/09/94

São José do Rio Preto, 10 de Agosto de 2022

Autorização para uso de Amostras Sorológicas

Eu, Maurício Lacerda Nogueira, chefe do Laboratório de Pesquisa em Virologia, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, autorizo a utilização de amostras de soro humano provenientes desse laboratório no âmbito da realização do seguinte projeto: **“Desenvolvimento de testes sorológicos diferenciais para os vírus Zika e Dengue baseados em proteínas recombinantes expressas em sistemas procariotos.”**

As amostras serão utilizadas pelo professor Flávio Guimarães da Fonseca – Professor associado ao Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, CI n.º M3467468, Siape n.º 1.519.530, para estudos de vigilância epidemiológica e para pesquisa e desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira – CRM N.º 121.847/SP
Professor Adjunto – Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP
Laboratório de Pesquisa em Virologia – FAMERP

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

1. Patente depositada em 2022



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2022 026807 0

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 17217985000104

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar- sala 2011

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP: 31270-901

País: Brasil

Telefone: (31) 3409-6430

Fax:

Email: patentes@ctit.ufmg.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 27/12/2022 às 20:02, Petição 870220122771

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PROTEÍNAS QUIMÉRICAS, KIT, MÉTODO PARA DIAGNÓSTICO DA ZIKA, E USO

Resumo: A presente tecnologia trata de proteínas quiméricas recombinantes desenhadas a partir da combinação de sete epítomos provenientes das proteínas virais NS1, E e prM. A tecnologia também trata de um kit e método para diagnóstico da Zika baseados nas proteínas quiméricas.

Figura a publicar: 2

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 27/12/2022 às 20:02, Petição 870220122771

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 4**Nome:** FLÁVIO GUIMARÃES DA FONSECA**CPF:** 00231088652**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Professor do ensino superior**Endereço:** Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar- sala 2011**Cidade:** Belo Horizonte**Estado:** MG**CEP:** 31270-901**País:** BRASIL**Telefone:** (31) 340 96430**Fax:****Email:** patentes@ctit.ufmg.br**Inventor 2 de 4****Nome:** SAMILLE HENRIQUES PEREIRA**CPF:** 11569197628**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Pesquisador**Endereço:** Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar- sala 2011**Cidade:** Belo Horizonte**Estado:** MG**CEP:** 31270-901**País:** BRASIL**Telefone:** (31) 340 96430**Fax:****Email:** patentes@ctit.ufmg.br**Inventor 3 de 4**

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 27/12/2022 às 20:02, Petição 870220122771

Nome: FLÁVIA FONSECA BAGNO
 CPF: 11062205600
 Nacionalidade: Brasileira
 Qualificação Física: Pesquisador
 Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar- sala 2011
 Cidade: Belo Horizonte
 Estado: MG
 CEP: 31270-901
 País: BRASIL
 Telefone: (31) 340 96430
 Fax:
 Email: patentes@ctit.ufmg.br

Inventor 4 de 4

Nome: THAIS DE FÁTIMA SILVA MORAES
 CPF: 07385727646
 Nacionalidade: Brasileira
 Qualificação Física: Pesquisador
 Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar- sala 2011
 Cidade: Belo Horizonte
 Estado: MG
 CEP: 31270-901
 País: BRASIL
 Telefone: (31) 340 96430
 Fax:
 Email: patentes@ctit.ufmg.br

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	1 - Depósito PI - 29409161957240023.pdf
Portaria	2 - Portaria 2195-2020 - Prof. Gilberto UFMG (1).pdf
Relatório Descritivo	3 - RELATORIO DESCRITIVO (1).pdf
Reivindicação	4 - REIVINDICAÇÕES.pdf
Desenho	5 - DESENHOS.pdf
Resumo	6 - RESUMO.pdf

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 27/12/2022 às 20:02, Petição 870220122771

2. Artigo original publicado em 2021 (autora)

Acta Tropica 224 (2021) 106135



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Acta Tropica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actatropica



Research Paper

Antioxidant and antiviral activity of fullerol against *Zika virus*

Samille Henriques Pereira^{a,b}, Letícia Trindade Almeida^{a,c}, Ariane Coelho Ferraz^{a,c},
Marina de Souza Ladeira^d, Luiz Orlando Ladeira^e, Cíntia Lopes de Brito Magalhães^{a,c}, Breno de
Mello Silva^{a,b,c,*}

^a Laboratório de Biologia e Tecnologia de Micro-organismos, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Brasil

^b Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Ouro Preto, Brasil

^c Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Brasil

^d Departamento de Física, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil

^e Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil



3. Artigo original publicado em 2022 (co-autora)

frontiers | Frontiers in Immunology

ORIGINAL RESEARCH
published: 03 June 2022
doi: 10.3389/fimmu.2022.903903



Timeline Kinetics of Systemic and Airway Immune Mediator Storm for Comprehensive Analysis of Disease Outcome in Critically Ill COVID-19 Patients

Juan Jonathan Gonçalves¹, Camila Pacheco Silveira Martins da Mata^{2,3},
Alice Aparecida Lourenço³, Ágata Lopes Ribeiro³, Geovane Marques Ferreira³,
Thais Fernanda de Campos Fraga-Silva⁴, Fernanda Mesquita de Souza⁴,
Vanessa Egídio Silveira Almeida³, Iara Antunes Batista³, Carolina D'Ávila-Mesquita⁵,
Ariel E. S. Couto⁵, Lígia C. B. Campos⁵, Adriana Alves Oliveira Paim², Linziane Lopes Ferreira²,
Patrícia de Melo Oliveira², Lorena de Almeida Teixeira², Daisymara Priscila de Almeida Marques²,
Henrique Retes de Moraes², Samille Henriques Pereira², Joaquim Pedro Brito-de-Sousa¹,
Ana Carolina Campi-Azevedo¹, Vanessa Peruhype-Magalhães¹, Márcio Sobreira Silva Araújo¹,
Andréa Teixeira-Carvalho¹, Flávio Guimarães da Fonseca^{2,6}, Vânia Luiza Deperon Bonato⁴,
Christiane Becari^{4,5}, Denise Ferro⁷, Mayra Gonçalves Meneguetti⁷, Amanda Alves Silva Mazzoni⁸,
Maria Auxiliadora-Martins⁸, Jordana Graziela Coelho-dos-Reis^{2†} and Olindo Assis Martins-Filho^{1†}

4. Apresentação de trabalhos no XXXIII Congresso Brasileiro de Virologia (2022)



Certificamos que o trabalho intitulado **PRODUCTION AND EVALUATION OF A CHIMERIC PROTEIN FOR THE DIFFERENTIAL DIAGNOSIS AND SURVEILLANCE OF ZIKA FEVER**, de autoria de *Samille Henriques Pereira; Flávia Fonseca Bagno; Thais de Fátima Silva Moraes; Jordana Coelho dos Reis; Edel Figueiredo Barbosa Stancioli; Flávio Guimarães da Fonseca* foi apresentado durante o XXXIII Congresso Brasileiro de Virologia, evento técnico-científico promovido pela Sociedade Brasileira de Virologia na cidade de Porto Seguro - BA durante o período de 17 a 21 de outubro de 2022.



Flávio Guimarães da Fonseca
Flávio Guimarães da Fonseca
Presidente, SBV



Certificamos que o trabalho intitulado

EVALUATION OF CELL AND HUMORAL IMMUNE RESPONSE GENERATE FOR A SUBUNIT VACCINE AGAINST ZIKA VIRUS, COMPOSED OF GOLD NANORODS FUNCTIONALIZED WITH VIRAL ENVELOPE PROTEIN

, de autoria de *Thais de Fátima Silva Moraes; Raissa Prado Rocha; Alice Freitas Versiani; Flávia Fonseca Bagno; Samille Henriques Pereira; Lidia Maria de Andrade; Jordana Graziela Alves Coelho-dos-Reis; Flávio Guimarães da Fonseca* foi apresentado durante o XXXIII Congresso Brasileiro de Virologia, evento técnico-científico promovido pela Sociedade Brasileira de Virologia na cidade de Porto Seguro - BA durante o período de 17 a 21 de outubro de 2022.



Flávio Guimarães da Fonseca
Flávio Guimarães da Fonseca
Presidente, SBV



Certificamos que o trabalho intitulado **BromAc as therapeutic strategy for severe COVID-19 treatment**, de autoria de Geovane Marques Ferreira; Erik Vinicius de Sousa Reis; Ágata Lopes Ribeiro; Camila Pacheco Silveira Martins da Mata; Franklin Pereira Araujo; Daisymara Priscila de Almeida Marques; Alice Aparecida Lourenço; Linziane Lopes Ferreira; Caio Wilker Teixeira; Laura Correa Dias; Mariella Sousa Coelho Maciel; Lorena Teixeira; Patricia Melo; Felipe Alves Clarindo; Henrique Moraes Retes; Thaiza Aline Pereira Santos; Adriana Alves Oliveira Paim; Samille Henriques Pereira; Flávio Guimarães da Fonseca; Olindo Assis Martins Filho; Marie Gabriele Santiago; Gisele Assis Castro Goulart; Sarah J Valle; Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis foi apresentado durante o XXXIII Congresso Brasileiro de Virologia, evento técnico-científico promovido pela Sociedade Brasileira de Virologia na cidade de Porto Seguro - BA durante o período de 17 a 21 de outubro de 2022.




Flávio Guimarães da Fonseca
Presidente, SBV

5. Apresentação de trabalhos no IX Simpósio de Microbiologia da UFMG (2022)





IX SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG

A Microbiologia no Brasil: A ciência de hoje para soluções dos problemas do amanhã

CERTIFICADO

Certificamos que Thaís de Fátima Silva Moraes, Raissa Prado Rocha, Alice Freitas Versiani, Flavia Fonseca Bagno, Samille Henriques Pereira, LIDIA MARIA DE ANDRADE, Maria Marta Figueiredo, Jordana Coelho dos Reis, Flavio Guimarães da Fonseca tiveram o trabalho “CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR E HUMORAL DE UMA VACINA DE SUBUNIDADE PARA O VIRUS ZIKA COMPOSTA POR NANOBASTÕES DE OURO FUNCIONALIZADOS COM A PROTEÍNA DO ENVELOPE VIRAL” apresentado na CATEGORIA PÔSTER no “IX Simpósio de Microbiologia da UFMG – A Microbiologia no Brasil: A ciência de hoje para soluções dos problemas do amanhã”, promovido pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, nos dias 27 a 29 de setembro de 2022.

Prof. Daniel de Assis Santos

Coordenador do IX Simpósio de Microbiologia da UFMG



IX SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG

A Microbiologia no Brasil: A ciência de hoje para soluções dos problemas do amanhã

CERTIFICADO

Certificamos que Geovane Marques Ferreira, ERIK VINICIUS DE SOUSA REIS, Ágata Lopes Ribeiro, Camila Pacheco Silveira Martins Da Mata, Franklin Pereira Araujo, Daisymara Priscila de Almeida Marques, Alice Aparecida Lourenço, Linziane Lopes Ferreira, Caio Wilker Teixeira, Laura Cardoso Corrêa Dias, Mariella Sousa Coelho Maciel, Lorena De Almeida Teixeira, Patrícia de Melo Oliveira, Felipe Alves Clarindo, Henrique Moraes Retes, Thaiza Aline Pereira Santos, Adriana Alves Oliveira Paim, Samille Henriques Pereira, Flavio Guimarães da Fonseca, Olindo Assis Martins-Filho, Marie Gabriele Santiago, Gisele Assis Castro Goulart, Jordana Coelho dos Reis, Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis tiveram o trabalho “EFEITO MUCOLÍTICO E ANTI-INFLAMATÓRIO ROBUSTO DE BROMAC® EM ASPIRADOS TRAQUEAIS DE PACIENTES COM COVID-19 GRAVE” apresentado na CATEGORIA PÔSTER no “IX Simpósio de Microbiologia da UFMG – A Microbiologia no Brasil: A ciência de hoje para soluções dos problemas do amanhã”, promovido pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, nos dias 27 a 29 de setembro de 2022.

Prof. Daniel de Assis Santos

Coordenador do IX Simpósio de Microbiologia da UFMG

6. Apresentação de trabalhos no XXXII Congresso Brasileiro de Virologia (2021)



CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado **Production of Zika virus heterologous chimeric proteins for use in serological diagnostic platforms** de autoria de Samille Henriques Pereira, Flavia Fonseca Bagno, Thaís de Fátima Silva Moraes, Ágata Lopes Ribeiro e Flavio Guimarães da Fonseca, foi apresentado como E-Pôster no **XXXII Congresso Brasileiro de Virologia - Virologia em Casa**, realizado em 19/10/2021 a 23/10/2021.

Realização



Flavio Guimarães da Fonseca
Flávio Guimarães da Fonseca
 Presidente

Helena Lage Ferreira
Helena Lage Ferreira
 Primeira Secretária

Organização



CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado **Construction and evaluation of the immune response of a subunit vaccine for Zika virus composed of gold nanorods functionalized with recombinant viral envelope protein** de autoria de Thaís de Fátima Silva Moraes, Raissa Prado Rocha, Alice Freitas Versiani, Flavia Fonseca Bagno, Samille Henriques Pereira, LIDIA MARIA DE ANDRADE, Maria Marta Figueiredo, Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis e Flávio Guimarães da Fonseca, foi apresentado como E-Pôster no **XXXII Congresso Brasileiro de Virologia - Virologia em Casa**, realizado em 19/10/2021 a 23/10/2021.

Realização



Flavio Guimarães da Fonseca
Flávio Guimarães da Fonseca
 Presidente

Helena Lage Ferreira
Helena Lage Ferreira
 Primeira Secretária

Organização





CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado **Biological and rheometric characterization of tracheal aspirate samples from COVID-19 patients** de autoria de Geovane Marques Ferreira, Camila Pacheco Silveira Martins Da Mata, Franklin Pereira Araujo, Ágata Lopes Ribeiro, Daisymara Priscila de Almeida Marques, Alice Aparecida Lourenço, Lorena De Almeida Teixeira, Patrícia de Melo Oliveira, Adriana Alves Oliveira Paim, Samille Henriques Pereira, Flavio Guimarães da Fonseca, Andréa Teixeira-Carvalho, Olindo Assis Martins-Filho, Marie Gabriele Santiago, Gisele Assis Castro Goulart e Jordana G. A. Coelho-dos-Reis, foi apresentado como E-Pôster no **XXXII Congresso Brasileiro de Virologia - Virologia em Casa**, realizado em 19/10/2021 a 23/10/2021.




Flávio Guimarães da Fonseca
 Presidente


Helena Lage Ferreira
 Primeira Secretária



7. Apresentação de trabalhos no VIII Simpósio de Microbiologia da UFMG (2021)



Certificamos que o trabalho **AValiação da produção de proteínas quiméricas de Zika virus para uso em testes sorológico** com autoria de Samille Henriques Pereira, Flavia Fonseca Bagno, Thais de Fátima Silva Moraes, Ágata Lopes Ribeiro e Flavio Guimarães da Fonseca foi submetido e aprovado na modalidade de Resumo no "VIII Simpósio de Microbiologia da UFMG – CONECTA SIM 2021", promovido pelo Programa de Pós Graduação em Microbiologia, do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, entre os dias 16 e 19 de novembro de 2021.

Belo Horizonte, 19 de novembro de 2021


Dr. Daniel de Assis Santos
 Coordenador do Conecta SIM 2021


Dra. Danielle da Glória de Souza
 Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia - UFMG

Verifique o código de autenticidade 3309557.3058815.560143.6.30955730588155601436 em <https://www.even3.com.br/documentos>



VIII SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG –

CONECTA SIM 2021

Certificado de Submissão

Certificamos que o trabalho CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E REOMÉTRICA DE AMOSTRAS DE ASPIRADO TRAQUEAL DE PACIENTES COVID-19 com autoria de Geovane Marques Ferreira, Camila Pacheco Silveira Martins Da Mata, Franklin Pereira Araujo, Ágata Lopes Ribeiro, Daisymara Priscila de Almeida Marques, Alice Aparecida Lourenço, Lorena De Almeida Teixeira, Patrícia de Melo Oliveira, Adriana Alves Oliveira Paim, Samille Henriques Pereira, Flavio Guimarães da Fonseca, Andréa Teixeira-Carvalho, Olindo Assis Martins-Filho, Marie Gabriele Santiago, Gisele Assis Castro Goulart e Jordana G. A. Coelho-dos-Reis foi submetido e aprovado na modalidade de Resumo no "VIII Simpósio de Microbiologia da UFMG – CONECTA SIM 2021", promovido pelo Programa de Pós Graduação em Microbiologia, do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, entre os dias 16 e 19 de novembro de 2021.

Belo Horizonte, 19 de novembro de 2021

Dr. Daniel de Assis Santos

Coordenador do Conecta SIM 2021

Dra. Danielle da Glória de Souza

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia - UFMG

Verifique o código de autenticidade 1911227.8198286.266135.3.30955769165645410916 em <https://www.even3.com.br/documentos>



VIII SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG –

CONECTA SIM 2021

Certificado de Submissão

Certificamos que o trabalho CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE DE UMA VACINA DE SUBUNIDADE PARA O Zika virus COMPOSTA POR NANOBASTÕES DE OURO FUNCIONALIZADOS COM A PROTEÍNA DO ENVELOPE VIRAL com autoria de Thaís De Fátima Silva Moraes, Raissa Prado Rocha, Alice Freitas Versiani, Flavia Fonseca Bagno, Samille Henriques Pereira, LIDIA MARIA DE ANDRADE, Maria Marta Figueiredo, Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis e Flávio Guimarães da Fonseca foi submetido e aprovado na modalidade de Resumo no "VIII Simpósio de Microbiologia da UFMG – CONECTA SIM 2021", promovido pelo Programa de Pós Graduação em Microbiologia, do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, entre os dias 16 e 19 de novembro de 2021.

Belo Horizonte, 19 de novembro de 2021

Dr. Daniel de Assis Santos

Coordenador do Conecta SIM 2021

Dra. Danielle da Glória de Souza

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia - UFMG

8. Organização do IX Simpósio de Microbiologia da UFMG (2022)



9. Organização do XXXIII Congresso Brasileiro de Virologia (2022)



Certificamos que **SAMILLE HENRIQUES PEREIRA** participou da comissão organizadora do **XXXIII Congresso Brasileiro de Virologia** e o **XVII Encontro de Virologia do Mercosul**, realizado no período de 17 a 21 de outubro de 2022 em Arraial d'Ajuda Eco Resort, Porto Seguro - BA.

10. Organização do VIII Simpósio de Microbiologia da UFMG (2021)



VIII SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG

CONECTA SIM 2021

Certificado de Organização de Evento

Certificamos que **Samille Henriques Pereira** participou da comissão organizadora do "VIII Simpósio de Microbiologia da UFMG – CONECTA SIM 2021", promovido pelo Programa de Pós Graduação em Microbiologia, do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, realizado entre os dias 16 e 19 de novembro de 2021.

Belo Horizonte – MG, 19 de novembro de 2021.

Dr. Daniel de Assis Santos
Coordenador do Conecta SIM 2021

Dra. Danielle da Glória de Souza
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia - UFMG

11. Organização do VII Simpósio de Microbiologia da UFMG (2020)

VII Simpósio de Microbiologia da UFMG - CONECTA SIM 2020



Certificado

Certificamos que **Samille Henriques Pereira** participou da Comissão Organizadora do "VII Simpósio de Microbiologia da UFMG – CONECTA SIM 2020", promovido pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, realizado *online* de 03 a 6 de novembro de 2020.

Belo Horizonte, Minas Gerais, 06 de novembro de 2020.

Dra. Betânia Paiva Drumond

Dra. Viviane de Souza Alves

Coordenadoras do Conecta SIM 2020

Dr. Flávio Guimarães da Fonseca

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia - UFMG

UFMG

50 ANOS DO PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA!

12. Cursos de curta duração

CERTIFICADO

Atestamos, para os devidos fins, que

SAMILLE HENRIQUES PEREIRA

concluiu o curso:

**Segurança em Laboratórios:
Aspectos Ambientais e Ocupacionais,**

com carga horária de 60 horas, obtendo nota final 8,82 .

São Paulo, 31/08/20 .


Cassio Giovanni
Coordenador


Thaysa Paschoalin
Coordenadora



Código de validação: MNAXsORmDN

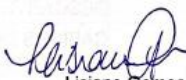
BOAS PRÁTICAS DE CONDUTA LABORATORIAL
03-04 de Maio de 2022



Certificado de Treinamento em Boas Práticas de Conduta Laboratorial

Eu, Lisiane Gomes, como Gerente de Qualidade, certifico que *Samille Henrique Pereira*, colaboradora do Laboratório de Virologia Básica e Aplicada (LVBA) – ICB/UFMG, participou do Treinamento em Boas Práticas de Conduta Laboratorial com carga horária total de 11 horas .

Belo Horizonte, 04 de Maio de 2022.


Lisiane Gomes
Gerente de Qualidade CT Vacinas-UFMG
Bióloga
Bel. Meio Ambiente
Esp. Engenharia de Qualidade
Tec. Segurança do Trabalho