



CPqRR - Fiocruz Minas

Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto René Rachou

Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

IDENTIFICAÇÃO DE ANTÍGENOS ESPECÍFICOS PARA O
DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE DIAGNÓSTICO
SOROLÓGICO DIFERENCIAL PARA ZIKA E DENGUE

por

Stella Garcia Colombarolli

Belo Horizonte

2018

DISSERTAÇÃO	MCS-IRR	S. G. COLOMBAROLLI	2018
-------------	---------	--------------------	------

STELLA GARCIA COLOMBAROLLI

IDENTIFICAÇÃO DE ANTÍGENOS ESPECÍFICOS PARA O
DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE DIAGNÓSTICO
SOROLÓGICO DIFERENCIAL PARA ZIKA E DENGUE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde - área de concentração Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática.

Orientação: Dr. Carlos Eduardo Calzavara Silva

Coorientação: Dr. Rafael Ramiro de Assis

Belo Horizonte

2018

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do IRR
CRB/6 1975

C718i Colombarolli, Stella Garcia.
2018

Identificação de antígenos específicos para o desenvolvimento de um sistema de diagnóstico sorológico diferencial para zika e dengue / Colombarolli, Stella Garcia. – Belo Horizonte, 2018.

XV, 89 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 72 - 75

Dissertação – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós – Graduação do Instituto René Rachou. Área de concentração: Biologia celular e molecular, genética e bioinformática

1. Zika virus 2. Diagnóstico sorológico/métodos 3. Sistema Imune I. Título. II. Calzavara-Silva, Carlos Eduardo (orientação). III. Assis, Rafael Ramiro (coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.936

"O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa,
sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem."

Guimarães Rosa

Agradecimentos

Neste momento de conclusão do meu trabalho de mestrado, gostaria de agradecer em primeiro lugar aos meus orientadores Dr. Carlos Eduardo Calzavara Silva e Dr. Rafael Ramiro de Assis. Ao Dr. Carlos Eduardo pela oportunidade de aprender Ciência com um grande professor, que se tornou amigo e confidente. Ao Dr. Rafael, pelos ensinamentos, principalmente em Bioinformática, Estatísticas e pela paciência e companheirismo nos momentos de maior dificuldade.

À Fundação Oswaldo Cruz, Instituto René Rachou e ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde pela oportunidade de cursar o mestrado.

Aos colaboradores Dr. Jerônimo Conceição Ruiz e Dra. Daniela de Melo Resende, pelos ensinamentos em Bioinformática.

Ao colaborador Dr. Philip Felgner por tornar possível a realização do Microrranjo na Universidade da Califórnia.

Ao colaborador Dr. Jeffrey Bethony pelas amostras gentilmente cedidas.

Aos colaboradores e queridos colegas M^a Eneida de Oliveira Santos e M.e Emerson de Castro Basbosa pela caracterização das amostras utilizadas.

À médica colaboradora Dr^a Lais Oliveira de Sousa Tiradentes da Santa Casa de Misericórdia de Santo Antônio do Monte - MG.

Obrigada ao Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, lugar onde concretizo os meus sonhos profissionais. Compartilho este sonho com os melhores professores e colegas, que se tornaram grandes amigos, que levarei por todo o caminho acadêmico. Vocês fazem dos meus dias mais alegres!

Agradeço à minha família, em especial aos meus pais Marcos e Anna Elisa. Gostaria de dizer-lhes o quanto sou feliz por ter vocês ao meu lado em todos os momentos. Meus pais, que tornaram a conclusão deste trabalho possível proporcionando os alicerces construídos com amor para a minha formação. Aos meus irmãos Bruno e Tulio por serem meus exemplos, assim como à Marcela e Raquel por fazerem crescer o nosso lar. Aos meus avós por me cuidarem com carinho e orações. Ao meu afilhado Davi e ao Nicola, por representarem um pedacinho do céu em minha vida.

Enfim, a Deus, que é Luz e Força em minha caminhada!

Resumo

A zika é uma arbovirose causada pelo Zika virus, gênero Flavivirus. A infecção por ZIKV está relacionada com complicações neurológicas graves, como a microcefalia e danos no SNC em recém-nascidos, que acontecem através da transmissão do vertical da gestante para o feto. Este fato, aliado a co-circulação de outros arbovirus e a dificuldade de diferenciar infecções baseada em sintomas clínicos, especialmente nos momentos iniciais da doença reflete a necessidade de se desenvolver um teste diagnóstico diferencial específico para a zika. Os objetivos deste projeto foram: realizar a predição de epítopos para células B a partir das sequências de ZIKV; identificar epítopos antigênicos específicos do ZIKV com o potencial de reação específica e diferencial entre DENV e ZIKV; desenhar peptídeos compostos pelos epítopos selecionados e testar o reconhecimento diferencial dos peptídeos produzidos. Para isso, foi feito o download de sequências sul-americanas e africanas do ZIKV, e as sequências de referência do DENV 1, 2, 3 e 4. Utilizando o preditor de epítopos para células B, foram identificadas 37 regiões para ZIKV e 37 correspondentes para a sequência polivalente de DENV. No intuito de identificar epítopos que pudessem ser reconhecidos preferencialmente por soros de pacientes infectados por ZIKV, foi feita uma análise *in silico* comparativa entre a composição destes epítopos em relação aos seus aminoácidos e as suas propriedades bioquímicas, além de estudos conformacionais. Desta forma, foram selecionados 20 epítopos. Esses epítopos foram base para a construção de 20 peptídeos, que foram comercialmente sintetizados e utilizados em experimentos de microarranjo proteico utilizando 41 amostras de soros de pacientes infectados pelo ZIKV ou pelo DENV, além de 10 soros de voluntários saudáveis. Foi encontrado uma padrão de distribuição distintos das amostras quando avaliadas a reatividade dos isotipos IgM e IgG separadamente, que reflete a cinética de soroconversão nas infecções naturais por Flavivirus. Os epítopos de ZIKV não apresentaram reconhecimento específico para o grupo de amostras positivas para zika, apesar de apresentarem reconhecimento diferencial significativo para o grupo de amostras positivas para dengue. Os dados levantados neste trabalho permitem dizer que a metodologia empregada *in silico* para a predição de epítopos para células B, bem como para a seleção destes epítopos para a validação *in vitro* foi executada com sucesso, contudo, não foi possível indentificar um peptídeo capaz de reconhecer diferencialmente amostras de ZIKV e DENV.

Palavras chave: Zika virus, diagnóstico sorológico precoce diferencial, predição de epítopos, microarranjo

Abstract

Zika fever is an arboviral infection caused by ZIKV, a member of the Flavivirus genus. ZIKV infection is associated with severe neurological complications such as microcephaly and CNS damage in newborns, which occurs through the vertical transmission from the pregnant woman to the fetus. This fact, along with the co-circulation of other arboviruses and the difficulty of differentiating infections based on clinical symptoms, especially in the early stages of the disease, reflects the need to develop a specific differential diagnostic test for Zika. The objectives of this project were: to perform the prediction of B-cell epitopes from ZIKV sequences; to identify ZIKV-specific epitopes for differential reaction between DENV and ZIKV samples; to design peptides composed of selected epitopes and test the differential recognition of the ZIKV peptides synthesized. For this, South American and African sequences of ZIKV and the DENV 1, 2, 3 and 4 reference sequences were downloaded. Using a predictor for B-cell epitopes, 37 regions were identified for ZIKV and 37 corresponding for the DENV polyvalent sequence. In order to identify epitopes that could be recognized only by sera from patients infected by ZIKV, a comparative analysis was made between the composition of these epitopes in relation to their amino acids and their physical-chemical properties, as well as conformational studies. Among these 37, 20 were selected. These epitopes were the basis for the construction of 20 peptides, which were commercially synthesized and used in protein microarray experiments using 41 serum samples from patients infected by ZIKV or DENV, in addition 10 sera from healthy volunteers was used. A distinct distribution pattern of the samples was found when evaluating the reactivity of IgM and IgG isotypes separately, which reflects the natural kinetics of seroconversion in natural infections by Flavivirus. The ZIKV epitopes did not show specific recognition for the Zika positive sample group, although they showed significant differential recognition for the group dengue positive samples. The data collected in this work show that, although the methodology used *in silico* for the prediction of epitopes for B cells, as well as for the selection of these epitopes for *in vitro* validation was performed successfully, no differentially recognized peptides were identified.

Key words: Zika virus, differential diagnosis, serological diagnosis, prediction of epitopes, microarray

Lista de Figuras

Figura 1: Plano geral de trabalho.....	17
Figura 2: Representação da organização de um slide do microarranjo proteico.....	27
Figura 3: Gel de agarose representativo da confirmação do isolamento de ZIKV.....	29

Lista de Gráficos

Gráfico 1: Gráfico representativo do perfil de reatividade de anticorpos IgM.....	39
Gráfico 2: Gráfico representativo do perfil de reatividade de anticorpos IgG.....	40
Gráfico 3: Gráfico representativo da reatividade dos peptídeos de ZIKV.....	41
Gráfico 4: Análise de componentes principais (PCA) para os grupos de amostras em IgM e IgG.....	42
Gráfico 5: Reatividade das proteínas recombinantes de DENV em IgM utilizadas controles positivos.....	44
Gráfico 6: Reatividade das proteínas recombinantes de DENV em IgG utilizadas controles positivos.....	45
Gráfico 7: Reatividade dos peptídeos de ZIKV com Qdot-655 (IgM).....	46

Lista de Quadros

Quadro 1: caracterização das amostras dos voluntários com suspeita de dengue e zika atendidos na Santa Casa de Misericórdia de Santo Antônio do Monte – MG.....24

Quadro 2: Epítomos de ZIKV e DENV analisados em nível de aminoácidos.....35

Lista de Tabelas

Tabela 1: Probabilidade de reações cruzadas em testes sorológicos entre Flavivirus e ZIKV devido à vacinação ou circulação endêmica em uma população, por continente..	9
Tabela 2: Sequências baixadas de DENV & ZIKV.....	31
Tabela 3: Epítomos de ZIKV preditos pelo Bepipred e valores de Score.....	32
Tabela 4: Epítomos selecionados para o Microarranjo.....	36

Lista de Siglas e Abreviaturas

C: capsídeo

CDC: Centro de Controle e Prevenção de Doenças

CHIKV: Chikungunya virus

CN: Controle negativo

DENV: Dengue virus

E: Envelope

ELISA: Antibody Capture Enzyme-Linked Immuno Sorbet Assay

FUNED: Fundação Ezequiel Diaz

GWU: Universidade de George Washington

ID: Amostras positivas em testes sorológicos e moleculares para dengue

IFI: Imunofluorescência Indireta

IgG: Imunoglobulina G

IgM: Imunoglobulina M

IZ: Amostras positivas em testes sorológicos e moleculares para zika

JEV: Japanese encephalitis virus

LACEN: Laboratório Central de Saúde Pública

M: Membrana

MVEV: Murray Valley encephalitis virus

NCBI: National Center for Biotechnology Information

NS1: Proteína Não Estrutural 1

NS2-A: Proteína Não Estrutural 2 – A

NS2-B: Proteína Não Estrutural 2 – B

NS3: Proteína Não Estrutural 3

NS4-A: Proteína Não Estrutural 4 – A

NS4-B: Proteína Não Estrutural 4 – B

NS5: Proteína Não Estrutural 5

OMS: Organização Mundial de Saúde

PAHO: Organização Pan-Americana de Saúde

PCA: Análise de Componentes Principais

PRNT: Teste de Neutralização por Redução de Placas

qRT-PCR: Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase
Quantitativo em Tempo Real

RNA: Ácido Ribonucléico

RT-PCR: Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase

SNC: Sistema Nervoso Central

SUS: Sistema Único de Saúde

TA: Temperatura Ambiente

UCI: Universidade da Califórnia – Irvine

WB: Western Blotting

WNV: West Nile virus

YFV: Yellow fever virus

ZIKV: Zika virus

Sumário

1. Introdução.....	16
1.1. Aspectos Gerais das Arboviroses no Brasil.....	16
1.2. Epidemiologia do Zika virus.....	19
1.3. Manifestações Clínicas e Complicações por Zika virus.....	20
1.4. O vírus Zika.....	21
1.5. Tratamento, Prevenção e Controle.....	22
1.6. Diagnóstico.....	23
1.6.1. Métodos Convencionais de Diagnóstico.....	23
1.6.2. Métodos de Screening de Antígenos.....	26
1.6.3. Uso da Bioinformática na Busca por Peptídeos Diferenciais entre ZIKV e DENV.....	27
2. Justificativa.....	29
3. Hipótese.....	30
4. Objetivos.....	31
4.1. Objetivo Geral.....	31
4.2. Objetivos Específicos.....	31
5. Metodologia.....	32
5.1. Plano Geral de Trabalho.....	32
5.2. Predição de Epítomos para ZIKV e DENV in silico.....	33
5.2.1. Seleção, download e organização das sequências.....	33
5.2.2. Predição de Epítomos.....	33
5.2.3. Alinhamentos e Predições Estruturais dos Peptídeos.....	34
5.3. Amostras Biológicas.....	35

5.3.1. Coleta de Voluntários para os Grupos de Estudo.....	35
5.3.2. Detecção molecular de DENV, ZIKV e CHIKV.....	36
5.3.3. Grupos de Estudo.....	40
5.4. Microarranjos proteicos.....	40
5.4.1. Preparo dos Slides.....	41
5.4.2. Incubação e Detecção de Sinal.....	42
5.4.3. Normalização e Análise Estatística.....	43
6. Resultados.....	44
6.1. Caracterização das Amostras Biológicas.....	44
6.2. Estudos in silico.....	45
6.2.1. Sequências Utilizadas no Trabalho.....	46
6.2.2. Predição de Epítopos para Células B.....	48
6.2.3. Análises das Estruturas dos Peptídeos.....	49
6.2.4. Peptídeos Seleccionados para o Microarranjo.....	51
6.3. Microarranjos proteicos.....	53
6.3.1. Reatividade contra os peptídeos.....	61
7. Discussão.....	63
8. Conclusão.....	69
9. Considerações Finais.....	70
10. Referências.....	71
11. Anexo I.....	76
12. Anexo II.....	77

1. Introdução

1.1. Aspectos Gerais das Arboviroses no Brasil

As arboviroses são doenças causadas por vírus de RNA das famílias Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae, Reoviridae e Rhabdoviridae, que são mantidos na natureza em ciclos complexos envolvendo artrópodes como vetores. Os vetores, geralmente mosquitos dos gêneros *Culex* e *Aedes*, transmitem estes microorganismos pela picada de suas fêmeas durante a hematofagia em mamíferos e aves (Figueiredo, 2007).

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

Alterações ecológicas produzidas pelo homem podem aumentar a prevalência de vetores, criar novos reservatórios ou induzir a adaptação de arbovírus em novos ciclos de manutenção. Além disso, os arbovírus podem percorrer longas distâncias por meio de hospedeiros que viajam cruzando fronteiras, e serem introduzidos em novos países ou até mesmo novos continentes, tendo um grande potencial para provocar pandemias (Figueiredo, 2007).

A dengue, causada pelo Dengue virus (DENV), é considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) a arbovirose mais prevalente nos dias de hoje, estimando-se que de 50 a 100 milhões de infecções por dengue ocorram anualmente. Segundo dados do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas, ou seja, aproximadamente 40% da população mundial, vive em áreas de risco de transmissão para a dengue, que é endêmica em pelo menos 100 países na Ásia, no Pacífico, nas Américas, África e no Caribe (CDC, 2018).

Em países nos quais a dengue é endêmica, como o Brasil, a entrada de novos arbovírus possui um grande potencial para causar epidemias, uma vez que as condições para que ocorram as transmissões e a multiplicação dos vírus são ideais

como as condições climáticas favoráveis e o modelo de crescimento urbano (Ministério da Saúde, 2014).

Assim como o DENV, o Yellow Fever virus (YFV) apresenta um grave risco para a saúde pública do país. O YFV chegou ao Brasil com o tráfico negreiro no século XVII e foi responsável pela morte de milhares de pessoas por causar uma doença hepática grave durante os séculos seguintes, denominada febre amarela. Esta doença, caracterizada por se desenvolver em ciclo silvestre, envolvendo primatas não-humanos como hospedeiros e vetores dos gêneros *Haemagogus*, *Sabethes* e *Aedes*, teve o seu ciclo padrão alterado, com a circulação do YFV nas cidades. Desta maneira, estabeleceu-se um ciclo urbano envolvendo primatas humanos como hospedeiros (Marinho et al, 2017).

Em 1930, foi desenvolvida uma vacina de YFV atenuado, e através de extensivas campanhas de vacinação e controle vetorial, o número de ocorrência de casos da doença reduziu significativamente. Porém, a partir 1942 foram relatadas transmissões silvestres e não urbanas com registros de surtos cíclicos em intervalos regulares de cinco a sete anos, conforme observado até 1997. A partir de 1998, houve uma mudança nesse padrão cíclico temporal. A febre amarela apresentou forte tendência sazonal, ocorrendo entre dezembro e maio e essa tendência foi observada tanto na Amazônia brasileira, quanto em outras regiões do país, ocorrendo como casos esporádicos e ocasionais epidemias, exibindo uma periodicidade irregular da doença. Embora a periodicidade irregular da FA não seja totalmente compreendida, fatores climáticos como elevação da temperatura e da chuva, alta densidade vetorial e hospedeiros primários, presença de suscetibilidade, baixa cobertura vacinal, surgimento de novas cepas virais são todos possíveis fatores que favorecem a transmissão e reemergência do YFV no país, além da circulação em áreas endêmicas (Chaves et al, 2018).

Nestes cenários, a situação se complica uma vez que o sistema de saúde pública e de controle epidemiológico normalmente já se encontram sob grande pressão. As epidemias causadas por diferentes agentes e uma população não imune para os novos patógenos, podem levar a um colapso no sistema de serviços de saúde. Recentemente, novos vírus, como o Chikungunya virus (CHIKV), o West Nile virus (WNV) e o Zika virus (ZIKV), foram introduzidos no país. Além do impacto direto no sistema de saúde pública, estas arboviroses apresentam um impacto econômico alarmante, uma vez que essas doenças se manifestam por fortes artralgias, que podem se estender por semanas e até meses, impossibilitando os pacientes de trabalhar e exercer atividades básicas, o que impacta diretamente a saúde financeira

das famílias e exercendo ainda mais pressão sobre o sistema de saúde e previdenciário, tornando-se pessoas dependentes de cuidados (Brasil et al, 2016).

Neste contexto, a zika representa um grande desafio para os centros de saúde e pesquisa, visto que é uma doença que está relacionada com complicações neurológicas graves, como a microcefalia e danos no sistema nervoso central nos bebês recém-nascidos através da transmissão vertical entre a gestante e o feto (Lima-Camara, 2016).

1.2. Epidemiologia do Zika virus

O ZIKV, originado na Floresta Zika em Uganda, foi isolado de primatas em 1947 durante um estudo em áreas de alta incidência de febre amarela (Dick et al, 1952). O primeiro caso humano de infecção pelo ZIKV foi detectado em 1952. Entre os anos 1960 e 1980, ocorreram casos isolados na Ásia e África, que apresentavam os sintomas típicos. O primeiro surto de zika ocorreu em 2007 na Micronésia e, nos anos 2013 e 2014, foi feita pela primeira vez a correlação entre desordens neurológicas e a infecção pelo vírus na Polinésia Francesa (Kelley & Richards, 2016).

A primeira detecção do ZIKV no Brasil ocorreu pela Universidade Federal da Bahia, associada a um recente surto em Camaçari - Bahia, de uma doença caracterizada por erupção maculopapular, febre, mialgias / artralgia e conjuntivite. Os indivíduos apresentavam estes sintomas clínicos semelhantes aos da dengue, porém, ao realizar os exames para a confirmação do diagnóstico, foi detectado o RNA de ZIKV no sangue de pacientes através da técnica Transcrição reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) (Campos et al, 2015).

Estudos filogenéticos do ZIKV, combinados com a data de eventos esportivos realizados no Brasil, sugerem que o ZIKV tenha sido introduzido no país em 2013, durante a Copa das Confederações, trazido por visitantes da Polinésia Francesa. (Faria et al, 2016).

Seguindo a introdução do vírus no território nacional, em outubro de 2015, foi reportado o nascimento de 2700 bebês com microcefalia possivelmente relacionada com a infecção por ZIKV. Este fato marcou um avanço no número de recém-nascidos com o perímetro cefálico inferior ao considerado normal, uma vez que em 2014 foram notificados 150 casos. A partir de então, no Brasil foi declarado estado de emergência pela Organização Pan-Americana de Saúde (PAHO) e tornou-se o epicentro de surtos deste vírus (Silva & Souza, 2016; Al- Qahtani et al, 2016).

Atualmente, a zika é uma doença de notificação compulsória no Brasil. De acordo com o Ministério da Saúde, até a Semana Epidemiológica 50 de 2017, foram relatados 17338 casos prováveis de febre pelo vírus Zika no país. As regiões que apresentam as maiores taxas de incidência são Centro-Oeste e Norte com 38,8 casos por 100 mil habitantes e 12,5 casos a cada 100 mil habitantes, respectivamente. Até 4 de novembro de 2017, Semana Epidemiológica 44, foram confirmados 3014 casos de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionados à infecção congênita pelo ZIKV, mais de 61% destes casos estão localizados na região nordeste.

1.3. Manifestações Clínicas e Complicações por Zika virus

A zika é caracterizada por exantema, conjuntivite, febre baixa, artralgia moderada, cefaléia, dor muscular, vômito e hipertrofia ganglionar. O diagnóstico clínico é difícil de ser realizado, já que os sintomas desta doença se assemelham com os sintomas de outras arboviroses, principalmente com a dengue. Apesar de surgirem com os mesmos sinais clínicos, são doenças diferentes que podem evoluir para complicações distintas. (Brasil et al, 2016; Boletim Epidemiológico nº 46, 2015).

Apesar da infecção por ZIKV não ter registros de morte, e ser baixa a taxa de hospitalização, está relacionada com severas complicações neurológicas, principalmente àquelas relacionadas às transmissões verticais, em que mulheres gestantes passam o vírus para os fetos via placenta, e esta consequente infecção pode causar microcefalia, abortos, insuficiência placentária, restrição do crescimento fetal, calcificações intracranianas, lesões oculares e lesão do sistema nervoso central dos neonatos (Al-Qahtani et al, 2016; Brasil et al, 2016a; Silva & Souza, 2016).

A principal complicação fetal é a microcefalia, caracterizada pelo perímetro do crânio do recém-nascido apresentar-se inferior a 32 cm, causando o desenvolvimento inapropriado e/ou destruição das células neuronais. Esta doença pode ser detectada por ultrassom, tomografia ou pela medição do perímetro cefálico (Silva & Souza, 2016).

Outra grave complicação relacionada com a infecção por ZIKV é a síndrome de Guillain-Barré, uma doença autoimune caracterizada por fraqueza muscular consequente de danos no sistema nervoso. O recente aumento da doença no Brasil coincide com o surto de zika, levando às investigações sobre a correlação entre as duas (Cox et al, 2015).

1.4. O vírus Zika

O ZIKV é um membro da família Flaviviridae e do gênero Flavivirus. Outros vírus pertencentes a este mesmo gênero são: o DENV, o YFV, o WNV, o Japanese encephalitis virus (JEV), o Saint Louis encephalitis virus (SLV) e o Murray Valley encephalitis virus (MVEV) (Cox et al, 2015).

O ZIKV é transmitido para os humanos principalmente pela picada de mosquitos da espécie *Aedes aegypti*, porém, apesar de ter sua importância epidemiológica ainda pouco compreendida, outras formas de transmissão já foram relatadas como a viabilidade da transmissão do vírus através da saliva, da urina e de fluidos sexuais. Estas formas alternativas de transmissão de ZIKV, o diferenciam dos outros Flavivirus, transmitidos unicamente via vetor, além de demonstrar uma capacidade ampliada de disseminação (Silva & Souza, 2016; Atif et al, 2016).

O genoma dos Flavivirus é composto por uma molécula de RNA de fita simples e senso-positivo com cerca de 11000 bases que codificam em torno de 3500 aminoácidos (Cox et al, 2015). A fita de RNA têm início na região 5' UTR, seguido por um gene que é traduzido em uma poliproteína, e termina na região 3' UTR. Esta poliproteína é então clivada e processada por proteases do hospedeiro e do próprio vírus originando três proteínas estruturais: a proteína do capsídeo (C), a proteína do precursor de membrana (prM/M) e a proteína do envelope (E); e sete proteínas não estruturais: NS1, NS2A e NS2B, NS3, NS4A e NS4B, e NS5. (Rastogi et al, 2016; Lindenbach et al, 2007).

Assim como os outros Flavivirus, estruturalmente, o ZIKV é esférico e envelopado, medindo de 42 a 52nm de diâmetro. O envelope viral é formado por uma bicamada lipídica com 180 unidades de glicoproteínas E e M incorporadas, necessárias para realizar a interação com os receptores celulares. O nucleocapsídeo é formado pela proteína C associada à molécula de RNA (Silva & Souza, 2016).

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

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

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

1.5. Tratamento, Prevenção e Controle

Os regimes de tratamento para zika, assim como para a dengue e outras arboviroses, são baseados nas manifestações clínicas e sintomas. Ainda não existe nenhum tratamento antiviral efetivo para flavivírus, com a abordagem restrita a medidas de suporte, descanso, fluidoterapia, analgésicos, anti-piréticos e anti-inflamatórios não esteroidais (Parashar & Cherian, 2014).

Uma vez que ainda não há uma vacina segura e efetiva desenvolvida para zika, as medidas de prevenção estão focadas no controle do vetor, o que requer a participação da população. Medidas preventivas devem ser aplicadas para evitar as picadas do vetor responsável pela transmissão do vírus. Essas medidas simples incluem a utilização de repelentes contra insetos, a minimização da área cutânea exposta à picada dos mosquitos, a eliminação de água parada onde o mosquito pode ovipor e a instalação de telas em janelas e portas. Medidas rigorosas devem ser implementadas pelos governos, sob forma de vigilância e programas de conscientização entre a população e profissionais da saúde, para melhor controle da doença (Albuquerque et al, 2012; Parashar & Cherian, 2014).

Por este motivo, o Ministério da Saúde possui um conjunto de programas e políticas para a intensificação de atividades de vigilância, no preparo de resposta da rede de saúde pública, no treinamento de profissionais, divulgação de medidas às

secretarias e preparo de laboratórios de referência, para o diagnóstico da doença. Houve um fortalecimento nas medidas de prevenção e identificação de casos. Nas regiões com registro da zika, foram constituídas equipes, orientando a busca ativa de casos suspeitos, para emitir alertas às unidades de saúde e às comunidades. Para o controle dos mosquitos transmissores da doença, vêm sendo realizadas ações de bloqueio de casos suspeitos e eliminação de criadouros. Além de investimentos em pesquisa para erradicação da doença e combate ao vetor (Ministério da Saúde, 2015).

1.6. Diagnóstico

1.6.1. Métodos Convencionais de Diagnóstico

Como descrito anteriormente, as semelhanças antigênicas entre os flavivirus se destacam como uma das maiores barreiras no desenvolvimento de testes sorológicos. Por este motivo, o diagnóstico comumente realizado para zika é o clínico e epidemiológico, laboratorial, sorológico e molecular.

Na prática, o diagnóstico clínico e epidemiológico é realizado pelo médico baseado nos sintomas relatados pelo paciente e na região do país em que a infecção pelo patógeno deve ter ocorrido, levando em consideração a situação epidemiológica da região. No Brasil este é o método que apresenta maior número de possíveis falhas, já que a dengue, a chikungunya e a zika estão presentes em quase todo o território nacional e se manifestam com sinais similares, que não seguem um padrão para todos os indivíduos doentes, podendo ser facilmente confundidos pelos médicos (Brasil et al, 2016).

Os aspectos laboratoriais observados durante o curso da zika nos exames realizados são: discretas a moderadas leucopenia e trombocitopenia, ligeiras elevações nos valores de desidrogenase láctica sérica, gama glutamiltransferase e marcadores de atividade inflamatória, como a proteína C reativa, fibrinogênio e ferritina. Contudo, estes parâmetros laboratoriais, apesar de marcantes, não constituem informações específicas para a infecção por ZIKV (Ministério da saúde, 2015).

Outra técnica possível para a identificação da zika é o isolamento viral. É feita a cultura dos vírus, a partir de soros de pacientes, em placas contendo células C636 ou por inoculação em cérebros de camundongos. Esta técnica indica a evidência direta do vírus. Entretanto, apresenta desvantagens para a coleta do soro, que deve ser

imediatamente armazenado em temperatura -70°C e sua utilização está restrita na fase de viremia, durante a fase aguda da doença, enquanto o nível dos anticorpos ainda é baixo (Goebel et al, 2016).

Apesar de estarem disponíveis testes sorológicos comerciais para zika, nenhum deles confere a confiabilidade de um resultado sensível e específico diferencial para outra flavivirose. Os testes ELISA (Antibody Capture Enzyme-Linked Immuno Sorbet Assay) e testes rápidos disponíveis atualmente são montados baseados na proteína do Envelope e NS1 do vírus. Nestes testes espera-se detectar anticorpos IgM e IgG específicos para ZIKV. O que acontece na prática é que, devido à homologia entre as proteínas dos flavivírus, observa-se reação cruzada inviabilizando o diagnóstico diferencial. Isto é um problema grave retratado nos centros de saúde, visto que a população brasileira está exposta ao DENV, ao ZIKV, ao WNV, ao JEV, entre outros arbovírus, ao mesmo tempo, além de grande parte ser vacinada para a febre amarela. Desta maneira, é visto como um desafio para a ciência encontrar uma região antigênica específica do ZIKV que gere um teste diagnóstico capaz de suprir às necessidades da rede pública de saúde (Boeuf et al, 2016; Speer & Pierson, 2016; Stetter et al, 2016).

Atualmente, considerado o padrão-ouro para o diagnóstico de zika, o teste de neutralização por redução de placas (PRNT), é usado para quantificar o título de anticorpo neutralizante para um vírus. O ensaio é realizado a partir de uma camada de células cultivadas que são infectadas pelo vírus e, após a incubação com o soro do paciente em diluições seriadas por alguns dias, ocorre a formação de placas (regiões de células infectadas) na monocamada celular. As unidades formadoras de placa são contadas por observação em microscópio e realiza-se a quantificação dos anticorpos neutralizantes. Embora, normalmente, o PRNT apresente a maior especificidade, os ensaios sorológicos estão sujeitos à reatividade cruzada, especialmente em doentes com infecção anterior por flavivírus ou história de imunização (OMS, 2016).

O PRNT, apesar de ser considerado o ensaio sorológico padrão-ouro para arboviroses, depois da introdução do ZIKV nas Américas, devido à endemicidade do DENV na América tropical e às conseqüentes reações cruzadas entre ZIKV e DENV, o ensaio perdeu acurácia para distinguir a infecção por um desses dois vírus. Apesar disso, em casos em que indivíduos que apresentam um título muito baixo de anticorpos para um dos vírus e um título muito alto para o outro vírus, o PRNT poderia ser valioso como diagnóstico sugestivo de que a infecção se desenvolveu por infecção daquele que apresentou títulos maiores de anticorpos neutralizantes (Lee et al, 2017).

A sorologia para os Flavivirus é complexa devido à intensa reatividade cruzada entre anticorpos desencadeados por diferentes infecções por Flavivirus ou por vacinação. Além disso, uma infecção aguda por ZIKV pode aumentar a reação cruzada de anticorpos devido à infecção anterior por outro Flavivirus, devido à circulação endêmica destes vírus no país (Charrel et al, 2016), assim como pode ser visto na tabela 1 a seguir.

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

Vírus	África	Ásia	América Central e Caribe	Europa	América do Norte	Oceania	América do Sul
Relacionado à Vacinas							
Vírus da Febre Amarela	+	-	-	-	-	-	+
Vírus da Encefalite Japonesa	-	+	-	-	-	+	-
Vírus da Dengue	-	-	+	-	-	-	-
Circulação Endêmica							
Vírus da Febre Amarela	+	-	-	-	-	-	+
Vírus da Dengue	+	+	+	-	-	+	+
Vírus do Oeste do Nilo	+	+	+	+	+	+	+
Vírus da Encefalite Japonesa	-	+	-	-	-	+	-

Vírus da Encefalite de Saint Louis	-	-	+	-	+	-	+
Vírus Rocio	-	-	-	-	-	-	+

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

Fonte: adaptado de Charrel et al., 2016.

Visto a dificuldade de se realizar um teste sorológico para zika, devido às constantes reações cruzadas apresentadas, é preconizado pelo Ministério da Saúde que o exame para a confirmação de zika deve ser a RT-PCR (convencional ou quantitativa), em que se detecta o genoma viral, realizada em laboratórios de referência da rede do Sistema Único de Saúde (SUS) (Ministério da saúde, 2015). Porém, estes métodos de diagnósticos precisam de altos investimentos financeiros para serem executados, também de uma plataforma de instrumentação e alta habilidade técnica, fazendo-se pouco viável para atender toda a necessidade de diagnóstico em uma condição de epidemia de zika como vivemos atualmente. Outro fator que complica a sua realização é a necessidade da presença de vírus circulante para detecção do RNA viral, o que restringe sua aplicação apenas na fase virêmica (inicial) da doença. O período de viremia de ZIKV ainda não foi estabelecido, entretanto, baseado em estudos realizados em modelos animais, com macacos rhesus, acredita-se que este compreenda do 5º ao 10º dia após a infecção, limitando a técnica por este intervalo de tempo (Li et al, 2016).

1.6.2. Métodos de Screening de Antígenos

Os métodos de screening de antígenos mais frequentemente utilizados são o ELISA, Western Blotting (WB), Imunofluorescência Indireta (IFI) e os Microarranjos.

Comumente utilizado na rotina dos laboratórios para se detectar pequenas quantidades de um determinado antígeno na presença de muitas outras proteínas, tal como um antígeno viral no sangue, é o imunoensaio WB. É uma alternativa simples e econômica, mas que não permite o screening de muitos peptídeos e em larga escala (Berg et al, 2004, p.107). Já a IFI pode ser aplicada como uma técnica de screening de múltiplos antígenos e também para o diagnóstico em laboratórios, pois permite a

avaliação do reconhecimento de anticorpos do soro contra antígenos de agentes infecciosos, como os peptídeos de ZIKV, por exemplo, e com a possibilidade de correlação clínico-laboratorial com os pacientes suspeitos, assim como o método ELISA, que já descrito no tópico anterior (Aoki et al, 2010).

Por sua vez, os microarranjos de proteína fornecem uma plataforma ideal para revelar antígenos candidatos para o diagnóstico diferencial de zika, pois a técnica permite a alta processividade das amostras e a possibilidade de se testar muitos alvos ao mesmo tempo (Nelson & Cox, 2014, p. 337-339). E, por ser um método eficiente, utilizar pequenas quantidades de soro/plasma, permitir a triagem de um número grande de antígenos e gerar resultados confiáveis, o microarranjo proteico foi a técnica escolhida para a determinação do repertório de antígenos capazes de serem reconhecidos diferencialmente por soros de indivíduos infectados somente por ZIKV, utilizado neste trabalho.

1.6.3. Uso da Bioinformática na Busca por Peptídeos Diferenciais entre ZIKV e DENV

Devido à necessidade de se realizar a análise de grandes quantidades de dados e da possibilidade de se realizar previsões matemáticas aplicadas aos sistemas biológicos, a bioinformática se apresenta como ampla vantagem estratégica na previsão de novos antígenos com potencial para o uso no diagnóstico diferencial.

Portanto, a área de concentração da bioinformática aplicada neste projeto é a Imunoinformática, que tem como foco a estrutura, função e a interação de moléculas envolvidas na imunidade. Um dos seus principais objetivos é a previsão *in silico* de epítopos imunogênicos. Assim, ferramentas de previsão *in silico* desenvolvidas para a imunologia podem ser utilizadas para identificar, qualificar e prever epítopos antigênicos reconhecidos por células B e T, as quais possuem papéis significativos na infecção e na imunidade protetora. Para este presente estudo foi utilizado, por exemplo, um preditor de epítopos para células B – o Bepipred (Korber et al, 2006).

A previsão de epítopos lineares pelo Bepipred é realizada a partir de valores que são atribuídos para cada aminoácido de uma sequência, baseado na sua afinidade de interação com a molécula de anticorpo. Esta afinidade é conferida aos aminoácidos de acordo com as suas propriedades físico-químicas. O valor então atribuído ao aminoácido é nomeado score. Uma região da proteína para ser

considerada um epítipo linear pelo preditor precisa ter um mínimo de aminoácidos em sequência com valor de score acima do escolhido pelo pesquisador (Larsen et al, 2006).

Outra área muito importante da bioinformática e que foi utilizada neste trabalho, é a modelagem molecular. O conhecimento das estruturas de uma proteína constitui uma informação valiosa para determinação de sua função. Desta forma, a predição estrutural de peptídeos é um método que permite, com base nos conhecimentos da estereoquímica dos aminoácidos e nas informações adquiridas das estruturas terciárias já resolvidas, prever a conformação de proteínas a partir da sequência primária dos aminoácidos. Uma das formas de se realizar a modelagem de proteínas é utilizar como referência uma ou mais proteínas homólogas e de estrutura terciária já conhecida. Este tipo de modelagem é conhecido como modelagem por homologia (Prosdociimi et al, 2002).

2. Justificativa

As complicações neurológicas relacionadas ao ZIKV são muito graves, causando temor na população. As transmissões verticais via placenta e as consequentes doenças no SNC nos neonatos, causam um dramático problema de saúde pública. As crianças que sobreviverem a estas doenças terão a necessidade de assistência e apoio governamental. A síndrome de Guillan-Barré apresenta um quadro crítico de perda dos movimentos musculares, muitas vezes também do sistema respiratório, e apesar de na maioria das vezes regredir para a normalidade, pode tornar-se crônico. Os indivíduos que sofrerem desta complicação autoimune relacionada ao ZIKV permanecerão sem exercer as suas funções na sociedade durante o período da fase aguda da doença, trazendo prejuízos para o Estado, além de frustrações pessoais.

Sabendo-se da gravidade da zika e do seu potencial de expansão, juntamente com a co-circulação de outras arboviroses, como a dengue e a chikungunya, a Organização Mundial de Saúde coloca como prioridade o desenvolvimento de testes diagnósticos diferenciais para zika, considerada uma doença em estado de emergência (WHO, 2016).

O panorama observado atualmente no Brasil é de diagnósticos clínicos e laboratoriais muitas vezes equivocados, devido às semelhanças dos sintomas das doenças. Em relação ao número de casos suspeitos para zika, uma minoria chega a ser submetido a RT-PCR, como preconizado pelo Ministério da Saúde. As amostras dos pacientes devem ser encaminhadas para os laboratórios centrais (LACEN) de referência da FUNED. Porém, em casos ocorridos em pequenos municípios no interior do país, quando são enviadas as amostras para o LACEN mais próximo, o transporte não pode apresentar falhas, pois as amostras devem ser mantidas à -70°C , caso contrário tornarão inviáveis para a detecção do RNA viral. Por outro lado, mesmo nas grandes metrópoles o número de pacientes infectados é enorme, e a capacidade para atender a toda demanda é ilusória, não há plataformas de instrumentação, nem técnicos hábeis suficientes para a execução das técnicas complexas de RT-PCR e qRT-PCR. Estes problemas também são encontrados para a cultura dos vírus circulantes para a realização da técnica de isolamento viral.

Os testes sorológicos disponíveis atualmente não conferem confiabilidade, porque apresentam respostas cruzadas entre as arboviroses. Os testes detectam anticorpos com regiões comuns para os flavivirus, levando a resultados imprecisos. Estes falso-resultados podem levar a graves consequências para o paciente, que

precisa ser atendido com o tratamento ideal, vistas as complicações que podem surgir no decorrer da infecção, principalmente em relação às gestantes.

Portanto, a conclusão é que o teste diagnóstico ideal para o paciente com zika, é um teste point of care, que possa ser realizado na hora e no local da necessidade do paciente. Este teste deve ser desenvolvido com alta tecnologia e inovação, e proporcionar resultados diferenciais de zika e outras arboviroses, além de ser sensível, específico, rápido e barato para o SUS.

Este trabalho propõem a obtenção de peptídeos que possam ser utilizados em testes sorológicos para zika baseado em análises dos epítomos antigênicos da sequência genômica do ZIKV. Estes epítomos foram detalhadamente estudados e comparados aos epítomos do DENV, e em seguida, otimizados e produzidos para a realização da validação in vitro em ensaio de imunorreatividade para avaliar o reconhecimento dos peptídeos por soros humanos. Considerando todas estas etapas, a busca por um teste de diagnóstico diferencial para zika que possa ser feito no primeiro atendimento médico e que não apresente riscos de reações cruzadas, é contínua e promissora.

3. Hipótese

Peptídeos antigênicos específicos do ZIKV são capazes de serem reconhecidos de forma diferencial por soros de pacientes infectados pelo ZIKV ou pelo DENV e compõem um sistema de diagnóstico sorológico eficiente para zika, que minimize o risco de respostas cruzadas.

4. Objetivos

4.1. Objetivo Geral

Identificar epítomos antigênicos específicos para o ZIKV para potencial composição de um sistema de diagnóstico sorológico diferencial, sensível e específico para zika.

4.2. Objetivos Específicos

1. Realizar a predição de epítomos para células B a partir das sequências de ZIKV;
2. Identificar epítomos antigênicos específicos do ZIKV, com baixo potencial de reação cruzada com epítomos do DENV, e desenhar peptídeos compostos pelos antígenos selecionados;
3. Testar o reconhecimento diferencial dos peptídeos produzidos.

5. Metodologia

5.1. Plano Geral de Trabalho

Para atingir os objetivos traçados neste projeto foi desenvolvido um plano geral de trabalho que é dividido em duas etapas principais: a primeira, uma análise *in silico* de seqüências de aminoácidos das proteínas de ZIKV e DENV, para a predição de epítomos para células B, de seqüências determinadas de ZIKV e DENV, seguida pela seleção dos epítomos que possam ser reconhecidos diferencialmente por soros humanos de pacientes infectados por ZIKV ou DENV e a segunda etapa realizada *in vitro*, composta pela validação das análises realizadas computacionalmente em um teste de imunorreatividade por microarranjo.

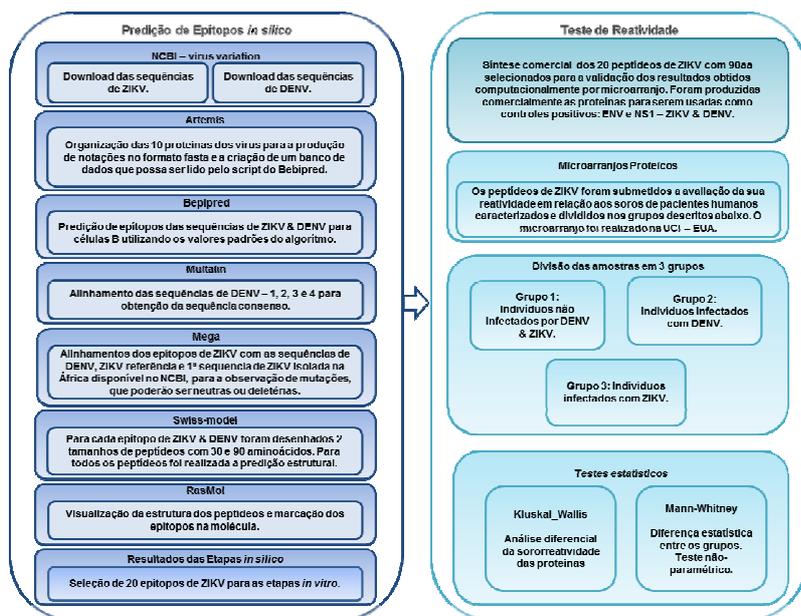


Figura 1: Plano geral de trabalho. Este projeto é dividido em duas etapas principais que envolvem atividades utilizando ferramentas de bioinformática e experimentos *in vitro*: (I) predição dos epítomos de ZIKV e DENV e seleção dos epítomos potencialmente capazes de reconhecimento diferencial por soros de pacientes infectados por ZIKV e DENV, *in silico*; (II) teste de reconhecimento por amostras de soros e plasmas humanos de pacientes que foram infectados unicamente por DENV ou unicamente por ZIKV ou negativos para DENV & ZIKV, dos epítomos selecionados *in silico* e produzidos comercialmente. Em azul escuro estão representadas as etapas *in silico* e em azul claro as etapas executadas *in vitro*.

5.2. Predição de Epítomos para ZIKV e DENV in silico

5.2.1. Seleção, download e organização das sequências

Utilizando o National Center for Biotechnology Information (NCBI) – plataforma Virus Variation (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/viruses/variation/>) foi realizado o download das sequências de nucleotídeos de ZIKV e DENV para a predição de epítomos para células B. Foram escolhidas para este trabalho a sequência de referência de ZIKV, de origem africana; a primeira sequência isolada do vírus de um humano, em 1968 na Nigéria, e disponível para download; assim como todas as sequências de ZIKV isolados na América do Sul e disponibilizadas até julho de 2016, data em que esta etapa do projeto foi concluída. O download de sequência de DENV foi realizado concomitantemente, de forma que foram escolhidas para o presente trabalho, as sequências de referência de DENV dos sorotipos 1, 2, 3 e 4. Desta forma, foram utilizadas 22 sequências de ZIKV e 4 sequências de DENV, totalizando 26 sequências utilizadas para a predição de epítomos para células B, conforme descrito na tabela 2, item 6.2.3.

As 26 sequências baixadas no NCBI foram organizadas no programa Artemis (versão 16.0.0), que permitiu a criação de um banco de dados para a automatização da predição de epítomos de células B. Este banco de dados consiste em notações das 10 proteínas estruturais e não estruturais do genoma viral de ZIKV e DENV.

Para a predição dos epítomos de DENV, foi necessário gerar uma sequência consenso tetravalente referente aos quatro sorotipos de DENV, já que os sorotipos são distintos geneticamente apesar de apresentarem epidemiologia similar. A sequência consenso foi gerada utilizando o programa Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) e está disponibilizada como anexo 1 ao final do presente trabalho.

5.2.2. Predição de Epítomos

A predição de epítomos para células B das sequências de ZIKV e DENV foi realizada em colaboração com o Dr. Jerônimo Conceição Ruiz e a Dr.^a Daniela de Melo Resende – Plataforma de Bioinformática do Instituto René Rachou.

Para a predição de epítomos para células B foi utilizado o preditor Bepipred, e os parâmetros utilizados foram o padrão do algoritmo: threshold 0,35; sensibilidade

0,49 e especificidade 0,75. A análise foi realizada utilizando um script personalizado escrito na linguagem PERL. Para tal, o programa utilizou o banco de dados das sequências de proteínas de ZIKV e DENV, contruídos como descrito no item 5.2.1. De acordo com os comandos descritos no script utilizado no Bepipred, as regiões preditas como possíveis epítomos foram automaticamente tabuladas e, as análises posteriores foram realizadas no editor de planilhas Excel (Microsoft). Devido à presença de mutações entre as sequências de ZIKV, foi utilizada, como referência, a sequência ZIKV: NC_012532.

5.2.3. Alinhamentos e Predições Estruturais dos Peptídeos

Os epítomos preditos para ZIKV foram alinhados à sequência consenso de DENV utilizando o programa ClustalW disponível no software Mega (versão 7.0.18).

Nos alinhamentos foi observada a identidade das sequências e as diferenças de aminoácidos entre elas. As diferenças de aminoácidos entre os epítomos de ZIKV os epítomos preditos para a sequência consenso de DENV foram analisadas e caracterizadas pelas possíveis alterações físico-químicas que poderiam promover nos peptídeos completos. Estas análises foram realizadas baseadas nas características dos aminoácidos, considerando apenas as estruturas primárias destas sequências.

Posteriormente às análises das estruturas primárias dos peptídeos, foram realizadas as predições de modelagens dos peptídeos. Para isso, os epítomos de ZIKV e DENV, que apresentavam inicialmente tamanho mínimo de 10 aminoácidos, foram estendidos para dois tamanhos diferentes a serem testados, com 30 e 90 aminoácidos. O objetivo desta etapa foi a modelagem de peptídeos que pudessem apresentar maior fidelidade às estruturas naturais das proteínas dos vírus ZIKV e DENV. Para tal, foram incluídos os aminoácidos a montante e a jusante da região do epítomo, utilizando para isso a própria sequência de referência de ZIKV e a sequência consenso de DENV. Para a modelagem dos peptídeos foi utilizado o software Swiss-model (<https://swissmodel.expasy.org/>). As estruturas geradas foram submetidas ao programa RasMol (versão 2.7.5.2), que possibilitou a visualização detalhada e destaque de regiões de interesse nos peptídeos para melhorar a análise.

Os peptídeos construídos in silico de ZIKV e DENV que pertenciam a regiões correspondentes das sequências avaliadas destes vírus foram comparados em relação às suas estruturas, o que resultou a escolha de peptídeos de ZIKV que

foram considerados potencialmente capazes de reconhecimento diferencial por soros ou plasmas de pacientes que foram infectados somente por ZIKV e não por pacientes que foram infectados por DENV, em um teste in vitro de microarranjo.

5.3. Amostras Biológicas

5.3.1. Coleta de Amostras Biológicas de Voluntários para os Grupos de Estudo

Durante os períodos de março a maio de 2015 e março a maio de 2016, pacientes atendidos na Santa Casa de Misericórdia em Santo Antônio do Monte – MG com suspeita clínica de dengue ou zika foram triados pela Dra. Laís O. S. Tiradentes e convidados a participar deste estudo. Para tanto, responderam à um questionário contendo todas as informações clínicas. Em relação aos sintomas apresentados pelo paciente, foi relatado a presença de: febre alta, cefaleia, dor retroocular, mialgia, artralgia, manchas pelo corpo, prostração e hemorragias.

Posteriormente, ainda na Santa Casa de Misericórdia de Santo Antônio do Monte, os pacientes foram encaminhados para a coleta de 20mL de sangue total em tubos de EDTA. O sangue foi transportado em isopor com gelo para o Laboratório de Imunologia Celular e Molecular (LICM) no Instituto René Rachou (IRR) (Belo Horizonte – MG - Brasil), onde o sangue total foi centrifugado a 350 x μ g por 7 minutos para a obtenção de plasma. Em seguida, o plasma foi transferido para tubos Eppendorf de 1,5 mL e armazenados em freezer -80°C. Os plasmas utilizados neste estudo foram caracterizados a partir de testes sorológicos comerciais e testes moleculares, com os resultados apresentados na tabela 2.

Amostras 1 a 17, referentes ao período de março a maio de 2015:

- I. ELISA NS1 para dengue (Euroimmun, Seekamp, Luebeck, Alemanha);
- II. Imunocromatográfico rápido IgM para dengue (Eco diagnóstica, Nova Lima, Minas Gerais, Brasil);
- III. Imunocromatográfico rápido IgG para dengue (Eco diagnóstica, Nova Lima, Minas Gerais, Brasil).

Amostras 18 a 36, referentes ao período de março a maio de 2016:

- IV. ELISA IgM para dengue (Euroimmun, Seekamp, Luebeck, Alemanha);
- V. ELISA IgG para dengue (Euroimmun, Seekamp, Luebeck, Alemanha);

- VI. Imunocromatográfico rápido IgM para zika (Eco diagnóstica, Nova Lima, Minas Gerais, Brasil);
- VII. Imunocromatográfico rápido IgG para zika (Eco diagnóstica, Nova Lima, Minas Gerais, Brasil);
- VIII. PCR para zika;
- IX. qRT-PCR TRIOPLEX para dengue, zika e chikungunya (Eco diagnóstica, Nova Lima, Minas Gerais, Brasil).

As normas éticas para a pesquisa científica em seres humanos estabelecidas pela Declaração de Helsinki (AMM, 2013) e pelo Ministério da Saúde Brasileiro, resolução 466/12 (MS, 2012) foram rigorosamente observadas. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas envolvendo Seres Humanos do Centro de Pesquisas René Rachou com parecer favorável de número 1.685.090.

Adicionalmente, em colaboração com o Dr. Philip Felgner, pesquisador na Universidade da Califórnia – Irvine/EUA, foram incluídos 10 soros DENV e ZIKV negativos, pertencentes a um banco de soros coletados de alunos da Universidade da Califórnia, que compuseram o grupo controle negativo. Adicionalmente, foram incluídos 6 soros IgM positivos para DENV e 6 soros IgG positivos para ZIKV cedidos gentilmente cedidos pelo Dr. Jeffrey Bethony da Universidade de George Washington - EUA (GWU).

5.3.2. Detecção molecular de DENV, ZIKV e CHIKV

A detecção molecular de DENV, ZIKV e CHIKV foi executada em colaboração com o Me. Emerson de Castro Barbosa e M^a Eneida Santos de Oliveira no LICM - IRR.

Para a detecção do RNA viral das amostras dos pacientes com suspeita de dengue e zika foi realizada, primeiramente, a extração dos ácidos nucleicos totais utilizando 240 μ l de plasma, que foi centrifugado a 20.000 x g durante 1,5 h a 4 ° C para concentrar as partículas virais. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 50 μ l de tampão contendo Tris Base (Inlab, São Paulo, Brasil), EDTA (Synth, São Paulo, Brasil), NaCl (Synth) e proteinase K (Qiagen, Hilden, Alemanha). Todas as amostras foram subsequentemente processadas no termociclador (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA), sob 56°C durante 5 min e 98°C durante 15 min. Em seguida, os cDNAs obtidos foram utilizados para a

detecção de DENV, ZIKV e CHIKV com o kit de qRT-PCR TRIOPLEX da Eco diagnóstica, usando o LightCycler® 96 (Roche, Mannheim, Alemanha). As reações foram realizadas em duplicata e seguindo as instruções do fabricante.

As amostras que apresentaram resultados positivos no teste imunocromatográfico IgM e haviam sido coletadas com menos de 6 dias de sintomas e cujo título viral era muito baixo, foram submetidas ao método de isolamento viral.

Para o isolamento de ZIKV (Figueiredo et al, 2006) foi utilizado como controle positivo uma monocamada de células C6/36 infectada com uma diluição 1:10 (50 µL de suspensão viral em 450 µL de L-15, alíquota de ZIKV isolado previamente) e um controle negativo (MOCK) com a adição de 500 µL de meio L-15 (Cultilab, Campinas, São Paulo, Brasil) sem Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco, Massachusetts, EUA) na monocamada de células C6/36. No primeiro dia foram semeadas garrafas de 25cm² com células C6/36 e mantidas em meio L-15 suplementado com 5% de SFB. 24 h após, foi realizada a verificação da confluência da monocamada de células C6/36 em 80-90%; seguido pelas diluições de 1:10 e 1:100 das amostras de interesse. O meio de cultura foi retirado e foram inoculados 500 µL do plasma diluído na monocamada de célula. As garrafas foram incubadas por 1 h a 28 °C sob homogeneização a cada 15 minutos. Após 1 hora de adsorção, foram adicionados 4,5 mL de meio L-15 com 2% de SFB e incubados na estufa a 28 °C durante 10 dias. No 11º dia foram coletados e clarificados os sobrenadantes de cada uma das garrafas. Os sobrenadantes foram centrifugados por 15 minutos a 3.000 rpm a 4 °C (Sorvall RT-6000 B). Em seguida, foram distribuídos em alíquotas de 0,5 ou 0,2 mL e armazenados em freezer -80 °C.

O isolamento de ZIKV das amostras nas diluições 1:10 e 1:100 foi confirmada por RT-PCR para a detecção do RNA de ZIKV. O RNA foi extraído utilizando o QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) para a purificação de RNA viral utilizado em uma transcrição reversa usando o Sistema de Transcrição de Reversa GoScript (Promega, Wisconsin, EUA) usando o Random Primer de acordo com as instruções do fabricante. A PCR para detecção de ZIKV utilizada é nested, desta maneira, na primeira etapa foi utilizado 1 µL de cDNA, 2 pmol dos iniciadores senso F_ZIKns5 <5' CCA TCT GGT ACA TGT GG 3'> e anti-senso R_ZIKns5 <5' CAT GTC CTC AGT RGT CAT CC 3'> [iniciadores específicos para região da proteína NS5 de ZIKV, que amplifica um fragmento de 1013 pares de bases (pb)], o kit de PCR GoTaq (Promega, Wisconsin, EUA) e H₂O q.s.p. para o volume final de 10 µL. A amplificação ocorreu nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, pareamento a 53°C por 30 segundos e

extensão a 72°C por 1 minuto; seguidos de um passo final de extensão a 72°C por 5 minutos. Os produtos desta PCR foram utilizados na segunda etapa da PCR nested para detecção do RNA de ZIKV. Foram utilizados 2 µL de DNA amplificado, 2 pmol dos iniciadores senso nF_ZIK <5' GTG GAG ATG ACT GCG TTG TGA AGCC 3'> e anti-senso nR_ZIK <5' CCA TCA GTC GAA GGT CTC TTC TGT GG 3'> (iniciadores específicos para região da proteína NS5 de ZIKV, que amplificam um fragmento de 345 pb), o kit de PCR GoTaq (Promega, Wisconsin, EUA) e H₂O q.s.p. para o volume final de 20 µL. A amplificação ocorreu nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, pareamento a 53°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto; seguidos de um passo final de extensão a 72°C por 5 minutos. Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose a 1% e visualizados sob luz UV.

5.3.3. Grupos de Estudo

Para a realização do microarranjo e análise da reatividade dos peptídeos desenhados de ZIKV, os plasmas dos pacientes foram divididos em 3 grupos principais:

- (I) Indivíduos não infectados por DENV e ZIKV coletados na UCI-EUA - Grupo controle negativo (10 amostras);
- (II) Indivíduos infectados por DENV – soros IgM positivos cedidos em colaboração com a GWU-EUA. Soros positivos para ELISA NS1, ELISA IgM e IgG, imunocromatográfico rápido IgM e IgG e/ou qRT-PCR para DENV (total de 26 amostras);
- (III) Indivíduos infectados por ZIKV - soros IgM positivos cedidos em colaboração com a GWU-EUA. E soros positivos no teste imunocromatográfico rápido IgM e IgG e/ou PCR para ZIKV (15 amostras).

As amostras dos pacientes coletadas em Santo Antônio do Monte, MG, que apresentaram reatividade positiva simultaneamente para dengue IgG e zika IgG nos testes realizados foram excluídas do painel de amostras que foram utilizadas no microarranjo.

5.4. Microarranjos proteicos

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

A técnica emprega a imobilização dos antígenos, estabilização e caracterização, juntamente com os controles, em triplicata, em um pad plano de nitrocelulose. O soro humano diluído é aplicado aos pads, onde diferentes tipos de anticorpos (IgM e IgG) presentes na amostra se ligam especificamente ao antígeno cognato correspondente. Os pads são lavados e incubados com anticorpos secundários contra cada isotipo a ser testado conjugados com biotina. Após subsequentes lavagens, os antígenos são detectados com uma sonda fluorescente conjugada com streptavidina, proporcionando um sinal relacionado à quantidade de isotipo de anticorpo humano ligado a cada peptídeo. As imagens dos microarranjos são obtidas usando o instrumento ArrayCam® e os resultados para cada marcador

individual são gerados automaticamente usando o software de análise ScanArray Express (Perkin Elmer).

O método empregado foi o de detecção em dois passos para cada isotipo de anticorpo, em que ocorre a detecção de IgM ou IgG ligado ao antígeno utilizando anticorpos anti-IgM ou anti-IgG biotinilados como anticorpos secundários e conjugado Qdot® fluoróforo (Thermo) streptavidina (SA) como terciário. Para detecção de IgM foi utilizado o Q655 (leitura realizada a 655nm) e para detecção de IgG o Q800 (leitura realizada a 800nm).

5.4.1. Preparo dos Slides

Os peptídeos selecionados durante a etapa *in silico* foram sintetizados comercialmente pela empresa BioMatik (Wilmington, Delaware, EUA),

Como controles positivos foram utilizadas as seguintes proteínas, produzidas comercialmente por ProSpec-Tany TechnoGene (Rehovot, Israel):

1. NS1 recombinante das regiões imunodominantes de DENV-2, unida a uma calda de 6 histidinas na porção C-terminal, expressa em *E. coli* e purificada por cromatografia de afinidade;
2. Envelope recombinante polivalente para os 4 sorotipos de DENV, unida a uma calda de 6 histidinas na porção C-terminal, expressa em *E. coli* e purificada por cromatografia de afinidade. Apresentou 93% de sensibilidade e 96% de especificidade em ensaio ELISA IgM e IgG;
3. NS1 recombinante de ZIKV, unida a uma calda de 6 histidinas na porção C-terminal, expressa em *E. coli* e purificada por cromatografia de afinidade;
4. Envelope recombinante de ZIKV, unida a uma calda de 6 histidinas na porção C-terminal, expressa em *E. coli* e purificada por cromatografia de afinidade.

Cada arranjo foi composto por cada um dos peptídeos identificados *in vitro* bem como controles negativos (spots vazios sem peptídeo), controles de isotipo (anticorpos purificados e anticorpos contra cada isotipo) e controles positivos supracitados.

A figura 2 representa a organização de um slide utilizado no microarranjo proteico. Cada arranjo foi composto por cada um dos peptídeos identificados *in vitro*, bem como os controles negativos (spots vazios sem peptídeo), controles de isotipo (anticorpos purificados e anticorpos contra cada isotipo) e controles positivos

supracitados. Cada um destes arranjos é submetido à incubação com uma das amostras dos pacientes organizados nos grupos de estudo.

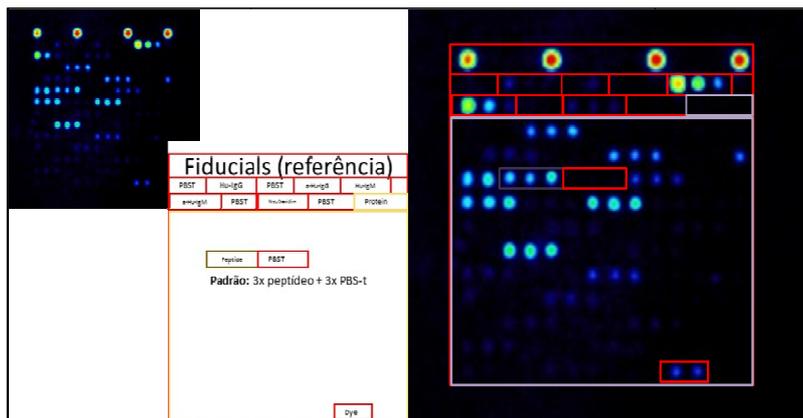


Figura 2: Representação da organização de um slide do microarranjo proteico. Imagem gerada dos fluoróforos Qdot® emitidos durante a reatividade dos peptídeos, após a leitura no scanner ArrayCam®. O quadro representa um arranjo composto por Fiducials: referências de sinal positivo do microarranjo; PBST: controles negativos, spot preenchedo com PBST; Hu-IgG: anticorpo IgG; a-Hu-IgG: controle de anticorpos IgG; Hu-IgM: anticorpo IgM; a-Hu-IgM: controle de anticorpos IgM; Proteínas: proteínas dos vírus ZIKV e DENV utilizadas como controles positivos, em triplicata e, enfim, os peptídeos, em triplicata. Cada pad é submetido à interação com uma amostra de soro/plasma.

5.4.2. Incubação e Detecção de Sinal

Os soros dos pacientes foram aleatorizados e diluídos (1:50) em solução de bloqueio – Protein Array Blocking Buffer (GVS Filter Technology, Sanford, Maine, EUA) por 1h a temperatura ambiente (TA) sob leve agitação. Concomitantemente, os microarranjos foram reidratados com solução de bloqueio por 1h a TA sob leve agitação.

Os microarranjos foram então incubados por 18h a 4°C sob leve agitação. Em seguida, os microarranjos foram lavados com TBS-T 5 vezes e incubados com anticorpos secundários conjugados com biotina anti porção Fc de Imunoglobulinas humanas (1:200 em solução de bloqueio).

Para a detecção, os microarranjos foram lavados com TBS-T 5X e incubados por 30 minutos com uma solução de estreptavidina conjugada com nanocristais

fluorescentes (Qdot®, Thermo). IgG humana foi o Q800 (800nm) e IgM Q655 (655nm). Os microarranjos foram escaneados para aquisição de imagem com o scanner ArrayCam® (Grace-Biolabs). E a Quantificação foi realizada utilizando o software ScanArray Express (Perkin Elmer) versão 3.0 utilizando a subtração automática do ruído de fundo (método Lowess).

5.4.3. Normalização e Análise Estatística

Normalização: Eliminação do ruído de fundo pelo método lowess, em seguida foi subtraída a média do sinal dos spots controle negativo interno de cada microarranjo. Para determinação dos sinais positivos, foi considerado um cut-off de 1 desvio padrão acima da média dos controles negativos internos de cada arranjo.

A análise dos dados foi realizada por meio do pacote estatístico Bioconductor no ambiente de programação R (<https://www.bioconductor.org/>). Inicialmente, para a eliminação da heterocedasticidade, os dados foram normalizados pelo método de estabilização da variância (vsn). Para determinação dos sinais positivos, foi considerado um cut-off de 1 desvio padrão acima da média dos controles negativos de cada arranjo.

Em seguida, as amostras foram combinadas em uma matriz composta por vetores n-dimensionais (uma dimensão para cada spot) e ranqueadas pela intensidade média de sinal (IMS). Para visualização dos dados de cada isotipo, foram gerados mapas de calor em conjunto com aglomeração baseados no centro geométrico (centróides) de cada grupo. Para tal foi utilizado o pacote pheatmap (versão 1.0.8) no ambiente de programação R.

Para avaliação da distribuição dos dados, foram gerados gráficos de caixa (Boxplots) sobrepostos ao gráfico beeswarm para possibilitar a visualização da distribuição de cada amostra individualmente. Para tal, foram utilizados o pacote beeswarm (versão 0.2.3) bem como análise de componentes principais (PCA) no ambiente de programação R.

Após avaliação da imunorreatividade dos peptídeos, foi realizada a comparação entre os grupos clínicos definidos. Para tal, foi utilizado o teste Kluskal-Wallis. O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para a comparação de cada proteína/peptídeo entre 2 grupos. Ambos os testes foram realizados no programa

GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad software incorporated). Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

6. Resultados

6.1. Caracterização das Amostras Biológicas

As amostras 22, 24 e 30, por terem apresentado resultados positivos no teste imunocromatográfico IgM e terem sido coletadas com menos de 6 dias de sintoma, foram submetidas ao método de isolamento viral. O isolamento de ZIKV das três amostras nas diluições 1:10 e 1:100 foi confirmada por RT-PCR para a detecção do RNA de ZIKV, e o resultado pode ser observado na figura 3 do gel de agarose mostrada a seguir (Figura 3).

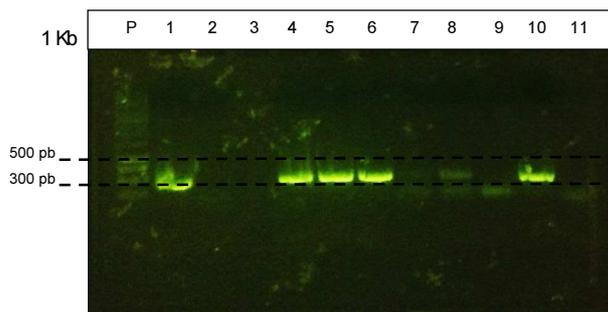


Figura 3: Gel de agarose representativo da confirmação do isolamento de ZIKV. São 11 canaletas, sendo (P) para o padrão de peso molecular de 1 Kb (Thermo Scientific); (1) controle positivo da reação de PCR; (2-3) canaletas vazias; (4) isolamento de ZIKV da amostra 30 na diluição 1:10; (5) isolamento de ZIKV da amostra 30 na diluição 1:100; (6) isolamento de ZIKV da amostra 23 na diluição 1:10; (7) isolamento de ZIKV da amostra 23 na diluição 1:100; (8) isolamento de ZIKV da amostra 21 na diluição 1:10; (9) isolamento de ZIKV da amostra 21 na diluição 1:100; (10) controle positivo do isolamento de ZIKV; (11) controle negativo da reação de PCR.

A canaleta P é referente ao padrão de peso molecular de 1 Kb (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA); a canaleta 1 é referente ao cDNA de ZIKV, que é o controle positivo da reação de PCR, que apresentou banda no tamanho esperado de 345 pb; as canaletas 2 e 3 estão vazias; a canaleta 4 é referente ao isolamento de ZIKV do plasma número 30 na diluição 1:10, que apresentou banda no tamanho esperado de 345 pb; a canaleta 5 é referente à amostra número 30, da qual foi realizado o isolamento de ZIKV do plasma na diluição 1:100 e apresentou amplificação

do fragmento de 345 pb, como esperado; a canaleta 6 é referente ao isolamento de ZIKV do plasma número 23 na diluição 1:10, que apresentou banda no tamanho de 345 pb; a canaleta 7 é referente à amostra número 23, da qual foi realizado o isolamento de ZIKV do plasma na diluição 1:100 e não houve amplificação, como mostrado pelo gel; a canaleta 8 é referente ao isolamento de ZIKV do plasma número 21 na diluição 1:10, que apresentou banda no tamanho de 345 pb; a canaleta 9 é referente à amostra número 21, da qual foi realizado o isolamento de ZIKV do plasma na diluição 1:100 e não houve amplificação, como mostrado pelo gel; a canaleta 10 é referente ao controle positivo do isolamento de ZIKV, que apresentou banda de 345 pb e, enfim, a canaleta 11 é referente ao controle negativo da reação de PCR.

Desta maneira, o gel demonstrou a confirmação por isolamento viral para infecção por ZIKV das amostras 21, 23 e 30 e, assim, elas foram incluídas ao grupo positivo para ZIKV para serem utilizadas nas avaliações de reatividade dos peptídeos por microarranjo.

6.2. Estudos in silico

6.2.1. Sequências Utilizadas no Trabalho

Neste trabalho foram utilizadas no total 26 sequências, sendo 4 delas as sequências de referência para os quatro sorotipos de DENV e 22 sequências de ZIKV. Dentre as sequências de ZIKV, duas foram isoladas na África: a primeira sequência isolada de humano disponibilizada no NCBI, de 1968; e a sequência de referência, que foi isolada de primata não-humano. As outras 20 sequências foram isoladas na América do Sul de hospedeiros humanos. As sequências baixadas na plataforma Virus Variation do NCBI estão apresentadas na tabela 3 abaixo:

Tabela 2: Sequências baixadas de DENV & ZIKV

Vírus	Código da Sequência	Origem do isolamento	Hospedeiro
Dengue virus 1	NC_001477	República de Nauru	Humano
Dengue virus 2	NC_001474	Tailândia	Humano
Dengue virus 3	NC_001475	Sri Lanka	Humano
Dengue virus 4	NC_002640	-	-
Zika virus	NC_012532	Uganda	Macaco
Zika virus	KU963574	Nigéria	Humano
Zika virus	KU820897	Colômbia	Humano
Zika virus	KX087102	Colômbia	Humano
Zika virus	KX247646	Colômbia	Humano
Zika virus	KX548902	Colômbia	Humano
Zika virus	KU758877	Guiana Francesa	Humano
Zika virus	KU937936	Suriname	Humano
Zika virus	KU312312	Suriname	Humano
Zika virus	KU527068	Brasil	Humano
Zika virus	KU707826	Brasil	Humano
Zika virus	KX197192	Brasil	Humano
Zika virus	KX280026	Brasil	Humano
Zika virus	KX520666	Brasil	Humano
Zika virus	KU365777	Brasil	Humano
Zika virus	KU365778	Brasil	Humano
Zika virus	KU365779	Brasil	Humano
Zika virus	KU365780	Brasil	Humano
Zika virus	KU729217	Brasil	Humano
Zika virus	KU729218	Brasil	Humano
Zika virus	KU321639	Brasil	Humano
Zika virus	KU497555	Brasil	Humano

Após o download das sequências, estas foram organizadas para compor um banco de notações que pudesse ser lido pelo script do preditor de epítomos Bepipred. Em seguida, foi realizada a predição de epítomos para células B, que serão mostrados no próximo item.

6.2.2. Predição de Epítomos para Células B

Após a obtenção das sequências na plataforma Virus Variation – NCBI e da construção do banco de dados, utilizando o programa Bepipred para a predição de epítomos foram obtidos 37 epítomos para células B das sequências analisadas de ZIKV e correspondentes 37 epítomos de DENV consensus. Destes 37 epítomos, foram preditos: 0 para a proteína do capsídeo; 1 para a proteína da membrana; 5 para a proteína do envelope; 6 para a proteína NS1; 0 para a proteína NS2-A; 1 para a proteína NS2-B; 8 para a proteína NS3; 0 para as proteínas NS4-A e NS4-B; e 16 para a proteína NS5.

O script utilizado para a predição dos epítomos, inicialmente, utilizou como o valor de threshold 0.35 (default do programa), em seguida, os epítomos preditos foram ranqueados e apenas os epítomos cujo score avaliado maior que 0.9 foram selecionados. Os epítomos de ZIKV estão listados na tabela 4 abaixo, com o código que receberam durante a predição, a sequência de aminoácidos dos epítomos e os valores de score.

Tabela 3: Epítomos de ZIKV preditos pelo Bepipred e valores de Score

Epítomos	Sequência dos epítomos	Score
ZIKV_0020.M_ep_1	LDEGVPEPDDVDC	0.99
ZIKV_0030.E_ep_1	SDMASDSRCPTQGEAYLDKQSDTQ	0.99
ZIKV_0030.E_ep_2	KMTGKSIQPEN	0.99
ZIKV_0030.E_ep_3	GHETDENRAKVEITPNSPRAEATLGG	0.99
ZIKV_0030.E_ep_4	DIPLPWHAGADTGTPHWNN	0.99
ZIKV_0030.E_ep_5	QYAGTDGPCKVP	0.99
ZIKV_0040.NS1_ep_1	YKYHPDSPRR	0.99
ZIKV_0040.NS1_ep_2	NPMWRGPQRLPVPVNELPHGWKAW	0.99
ZIKV_0040.NS1_ep_3	AVKGKEAAHS	0.99
ZIKV_0040.NS1_ep_4	AGPLSHHNTREGYRTQVKGPWHS	0.99

ZIKV_0040.NS1_ep_5	TCGTRGPSLRSTTASGR	0.99
ZIKV_0040.NS1_ep_6	IRPRKEPESN	0.99
ZIKV_0060.NS2B_ep_1	FSLVEEDGPPMR	0.99
ZIKV_0070.NS3_ep_1	LWDVPAPKEVKKGETTDG	0.99
ZIKV_0070.NS3_ep_2	SALRSGEGRLDPYWGDV	0.99
ZIKV_0070.NS3_ep_3	DYPAGTSGSPIL	0.99
ZIKV_0070.NS3_ep_4	TQGKREETPVEC	0.99
ZIKV_0070.NS3_ep_5	ATPPGTRDAFPDSNSPIMDTEVEVPERAW SS	0.99
ZIKV_0070.NS3_ep_6	TEFQKTKNQE	0.99
ZIKV_0070.NS3_ep_7	GCAETDEGHA	0.99
ZIKV_0070.NS3_ep_8	GTTNNTIMEDSVPAEVWTKY	0.99
ZIKV_0110.NS5_ep_1	GGGTGETLGEK	0.99
ZIKV_0110.NS5_ep_2	DGVATGGHAVSR	0.99
ZIKV_0110.NS5_ep_3	VRGYTKGGPGHEEPM	0.99
ZIKV_0110.NS5_ep_4	GESSSSPEVEET	0.99
ZIKV_0110.NS5_ep_5	GAKSNIKSVS	0.99
ZIKV_0110.NS5_ep_6	DGPRRPVKYEEDVNLGSGTRAVASCAEA	0.99
ZIKV_0110.NS5_ep_7	AYHGSYEAPTQGSASS	0.99
ZIKV_0110.NS5_ep_8	AMTDTPYQQQRV	0.99
ZIKV_0110.NS5_ep_9	VDTRVPDPQEGTR	0.99
ZIKV_0110.NS5_ep_10	KREKKQGEFGKAKG	0.99
ZIKV_0110.NS5_ep_11	WMGRENSGGGVE	0.99
ZIKV_0110.NS5_ep_12	NRAPGGKMYADDTAGWDT	0.99
ZIKV_0110.NS5_ep_13	KVRKDTQEWKPKSTGWSNW	0.99

ZIKV_0110.NS5_ep_14	FVDWVPTGRITTSIH	0.99
ZIKV_0110.NS5_ep_15	DHMEDKTEPVTKWT	0.99
ZIKV_0110.NS5_ep_16	LGEEGSTPGVL	0.99

Os 37 epítomos obtiveram valores de score semelhantes e, desta forma, este não pôde ser um critério para a avaliação de inclusão ou exclusão dos epítomos para a avaliação de antigenicidade *in vitro*. Portanto, as próximas análises foram fundamentais para o desenvolvimento de uma previsão crítica daqueles epítomos de ZIKV capazes de serem reconhecidos diferencialmente por amostras positivas para zika e dengue.

6.2.3. Análises das Estruturas dos Peptídeos

Com o objetivo de investigar as mutações nos aminoácidos que compõem os 37 epítomos preditos de ZIKV em relação a sequência consenso de DENV foram realizados alinhamentos lineares utilizando o ClustalW no software Mega e estruturas dos peptídeos foram geradas através do programas Swiss-Model e RasMol.

Inicialmente, os peptídeos foram desenhados com um tamanho de 30 aminoácidos. Posteriormente, com o intuito de se obter uma estrutura mais próxima da conformação natural, os peptídeos foram estendidos para um tamanho final de 90 aminoácidos.

Em seguida, foram realizadas as análises estruturais considerando as propriedades físico-químicas dos aminoácidos e as conformações modeladas. Os epítomos de ZIKV e DENV foram comparados e pôde-se observar as similaridades e as diferenças entre estes epítomos. Foram consideradas as propriedades dos aminoácidos que compõem os peptídeos, e principalmente, foram avaliadas as diferenças de aminoácidos entres os epítomos de ZIKV e DENV correspondentes. Em relação às estruturas modeladas, foram avaliadas a localização do epítomo em relação à na molécula, bem como a conformação tridimensional do peptídeo, que poderia sugerir disponibilidade ou indisponibilidade estérica para interação com outras proteínas. Aqueles peptídeos que foram considerados potencialmente diferenciais entre ZIKV e DENV, foram selecionados para a validação *in vitro* por microarranjo.

Os epítomos preditos para ZIKV e DENV modelados no Swiss-Model estão disponíveis no Anexo II ao final deste trabalho.

O quadro a seguir apresenta os epítomos analisados de ZIKV e DENV. Estão descritos o nome da proteína de origem do epítomo e as sequências de aminoácidos abaixo. Os aminoácidos destacados em vermelho em ZIKV e DENV são as diferenças de aminoácidos encontradas. Dos 37 epítomos, 9 estão coloridos em amarelo e apresentaram de uma a três diferenças de aminoácidos entre as sequências de ZIKV e DENV, enquanto que em azul, 15 epítomos apresentaram de 4 a 6 diferenças de aminoácidos e coloridos em verde, 13 epítomos que apresentaram mais de 7 aminoácidos diferentes quando comparados entre ZIKV e DENV.

Quadro 2: Epítomos de ZIKV e DENV analisados em nível de aminoácidos.		
Epítomos	Sequência dos epítomos de ZIKV	Sequência dos epítomos de DENV
Epítomo único - Membrana	LDEGVPEDDVDC	LLTETEPEDIIC
Epítomo 1 - Envelope	SDMASDSRCPTQGEAYLDKQSDTQ	TNTTTDSRCPTQGEFYLKEEQDQN
Epítomo 2 - Envelope	KMTGKSIQFEN	KIEGKIVQYENL
Epítomo 3 - Envelope	IGYETDEDRAKVEVTPNSPRAEATLGG	GNDTSNHGVTAKITPQSPTTEVELP
Epítomo 4 - Envelope	DIPLPWHAGADTGTPHWNN	DLPLPWTSGADTSEPNWNR
Epítomo 5 - Envelope	QYAGTDGPKKIP	KYEGDGAPCKIP
Epítomo 1 - NS1	YKYHPDSPRR	YKFPDPSPKR
Epítomo 2 - NS1	NPMWRGPQRLVVPVNELPHGWKAW	GILQQGKRSLRPQPMELKYSWKTW
Epítomo 3 - NS1	AVKGREAAHS	AIKDQKAVHA
Epítomo 4 - NS1	AGPLSHNTRREGYRTQVKGPHWS	AGPISQHNRYRPGYHTQTAGPWHL
Epítomo 5 - NS1	TCGTRGPSLRSTASGR	DCGNRGPSLRITTTASGK
Epítomo 6 - NS1	IRPRKEPESN	IRPLKEKEEN
Epítomo único - NS2-B	FSLVEEDGPPMR	MSIKDEEENTL
Epítomo 1 - NS3	LWDVPAKPEVKKGETTDG	LWDVPSPPETEKALEDG
Epítomo 2 - NS3	AALRSGEGRLDPYWGDV	AVLMHEGKRLPESWADV
Epítomo 3 - NS3	DYPAGTSGSPIL	DFKPGTSGSPII
Epítomo 4 - NS3	TQGKREETPVEC	TPAVKSEHTGREI
Epítomo 5 - NS3	ATPPGTRDAFPDSNSPIMDTEVEVPERAWSS	ATPPGSTDPFQSNAPIQDEERDIPERSWNS
Epítomo 6 - NS3	TEFQKTKNQE	TEYQTKLND
Epítomo 7 - NS3	GCAETDEGHA	EPLNNDHHA
Epítomo 8 - NS3	GTTNNTIMEDSVPAEVWTKY	GSTDPPFQSNAPIQDEERDI
Epítomo 1 - NS5	GGGTGETLGEK	GTGSQGETLGEK
Epítomo 2 - NS5	DGVATGGHAVSR	EGLKRGETTHAVSR
Epítomo 3 - NS5	VRGYTKGGPGHEEPM	VKGYTKGGPGHEEPI
Epítomo 4 - NS5	GESSSSPEVEET	GESSPNPTIEEG
Epítomo 5 - NS5	GAKSNIKSVS	NGTGNIVSSVN
Epítomo 6 - NS5	DGPRRPVKYEEDVNLGSGTRAVASCAEA	TMRHRKPTYEKDVLGAGTRHVGVEPEV

Epítoto 7 - NS5	AYHGSYE APT QGSASS	AYHGSYEV KST GSASS
Epítoto 8 - NS5	AMTDTTP Y GQQRV	AMTDTTP F GQQRV
Epítoto 9 - NS5	VDTRV PD Q E GTR	VDTRTP Q P K KGTR
Epítoto 10 - NS5	KREKK Q GEFGKAKG	KREKK L GEFGKAKG
Epítoto 11 - NS5	WMGRENS G GGVE	W F SREN S WGVE
Epítoto 12 - NS5	N RA P GG K MYADDTAGWDT	S KK P GG A MYADDTAGWDT
Epítoto 13 - NS5	FLNDMGKVR KDTQ E W K P STG S NS N	KVR KD I P Q W E P S K G W ND W
Epítoto 14 - NS5	P V D W V P T G R T T W S I H	P T H W V P T S R T T W S I H
Epítoto 15 - NS5	D H M E D K T P V I K W T	P W M E D K T P V H S W E
Epítoto 16 - NS5	L G E E G S T P G V L	F R R E E E S E G V L

Legenda: Aminoácidos em vermelho são aqueles diferentes entre as sequências de ZIKV e DENV. Em amarelo: epítotos que apresentaram de uma a três diferenças de aminoácidos entre as sequências de ZIKV e DENV; em azul: epítotos que apresentaram de quatro a seis diferenças de aminoácidos; em verde: epítotos que apresentaram mais de sete aminoácidos diferentes quando comparados entre ZIKV e DENV.

6.2.4. Peptídeos Seleccionados para o Microarranjo

Para a seleção dos peptídeos foram considerados diversos parâmetros físico-químicos e estruturais, bem como a sequência dos mesmos. Assim, foram seleccionados 20 peptídeos potencialmente capazes de serem reconhecidos diferencialmente pelos grupos de amostras determinados: I - Indivíduos não infectados por DENV e ZIKV – controle negativo; II - Indivíduos infectados por DENV) e III (Indivíduos infectados por ZIKV), durante a avaliação de antigenicidade dos peptídeos por microarranjo. Os epítotos seleccionados estão listados na tabela 5 a seguir, com informações contendo o nome do epítoto, a proteína de origem, o número do epítoto na proteína de origem e a sequência completa de 90 aminoácidos do peptídeo.

Tabela 4: Epítotos seleccionados para o Microarranjo

Nome epítoto	Proteína de Origem	Número do epítoto na proteína	Sequência
Z-1	Membrana	Epítoto único	SDAGKAISFATTLGVNKCHVQIMDLGHMCDATMSYECPLMDEGVE PDDVDCWCNTTSTWVYGTCHHKKEARRSRRAVTLPSHSTRKLQ
Z-2	Envelope	Epítoto 1	VMAQDKPTVDIELVTTVSNMAEVRSYCYEASISDMASDSRCPTQ GEAYLDKQSDTQYVCKRTLVDRGWNGCGLFGKGS�VTCAKFTCS
Z-3	Envelope	Epítoto 3	TCSKMTGKSIQPENLEYRIMLSVHGSQHSGMIGYETDEDRAKVE VTPNSPRAEATLGGFGLGLDCEPRTGLDFSDLYLTMNKHHLV H
Z-4	Envelope	Epítoto 2	QSDTQYVCKRTLVDRGWNGCGLFGKGS�VTCAKFTCSKMTGKS IQPENLEYRIMLSVHGSQHSGMIGYETDEDRAKVEVTPNSPRAEA

Z-5	NS1	Epítoto 2	RMENIMWKSVEGELNAILEENGVLTVVVGSVKNPMWRGPFQRLPV PVNELPHGWKAWGKSYFVRAAKTNNSFVVDGDTLKECPLEHRAWN
Z-6	NS1	Epítoto 6	TRGPSLRSTTASGRVIEEWCCRECTMPLSFRAKDGWCYGMETRP RKEFESNLVRSMTA
Z-7	NS1	Epítoto 4	RAHLIEMKTCEWPKSHTLWTDGVVEESDLIIPKSLAGFLSHHNTRE GYRTQVKGPWHSEELEIRFEECPGTKVYVEETCGTRGPSLRSTTA
Z-8	NS2-B	Epítoto único	VSGKSDVMYIERAGDITWEKDAEVTGNSPRLDVALDESGDFSLVE EDGPPMREIILKVVLMIAICGMNPIAIPFAAGAWVYVYKTKGR
Z-9	NS3	Epítoto 8	KTFVELMKRGDLPVWLAYQVASAGITTYTDRRWCFDGTNTTIMED SVPAEVWTKYGEKRVLKPRWMDARVCSDDHAALKSFKEFAAGKR
Z-10	NS3	Epítoto 1	SGALWDVPAKPEVKKGETTDGVYRVMTRRLLGSTQVGVGMQEGV FHTMWHVTKGAALRS
Z-11	NS3	Epítoto 4	ALDYPAGTSGSPILDKCGRVI GLYNGVVIKNGSYVSAITQGKRE EETPVECFEPSMLKKQLTVLDLHPGAGKTRRVLPEIVREAIKKR
Z-12	NS3	Epítoto 2	TDGVYRVMTRRLLGSTQVGVGMQEGVFHTMWHVTKGAALRS RLDFYWGVDVKQDLVSYCGPWKLDAAWDGLSEVQLLAVPPGERARN
Z-13	NS3	Epítoto 5	MDEAHFTDPSSIAARGYISTRVEMGEAAAI FMTATPPGTRDAFPD SNSFIMDTEVEVPERAWSSGFDWVDHSGKTVWFVSVRNGNEIA ACLTKAG
Z-14	NS5	Epítoto 2	TLGEKWKARLNQMSALEFYYSYKKGITEVCREEARRALDGVATG GHAVSRGSAKIRWLEERGLQPYGKVVLDLGCGRGGWSYAAATIRK
Z-15	NS5	Epítoto 6	CRNSTHEMYWVSGAKSNI IKSVSSTTSQLLGRMDGPRRPVKYEED VNLGSGTRAVASCAEAPNMKI IGRRIERIRNEHAETWFLDENHPY RTWA
Z-16	NS5	Epítoto 9	LVNGVVRLLSKPVDVVTGVTGIAMTDTT PYGQQRVFKKVDTRVP DPQEGTRQVMNIVSSWLWELGKRRKRPVCTKEEFINKVRSNAAL
Z-17	NS5	Epítoto 11	REKKQGEFGKAKGSRAIWYMWLGARFLEFEALGFLNEDHWMGREN SGGGVEGLGLQRLGYI LEEMNRPAGGKMYADDTAGWDTRISKFDL
Z-18	NS5	Epítoto 15	PVDWVPTGRTTWSIHGKGEWMTTEDMLMVWNRVWIEENDHMDKT PVTKWTDI PYLKREDLWCGSLIGHRPRTWAENIKDTVMVRRRI
Z-19	NS5	Epítoto 16	REDLWCGSLIGHRPRTWAENIKDTVMVRRRI GDEEKYMDYLS QVRYLGEESTPGVL
Z-20	NS5	Epítoto 10	WKTAVEAVNDPRFWALVDREREHHLRGECHSCVYNMMGKREKKQG EFGKAKGSRAIWYMWLGARFLEFEALGFLNEDHWMGRENSSGGVE

Os peptídeos selecionados foram ranqueados por previsão de reatividade diferencial no ensaio de microarranjo. Os parâmetros utilizados para determinar esta ordem de previsão de reatividade foram os mesmos descritos no item 6.1.3., foram consideradas as propriedades físico-químicas dos aminoácidos que constituem os epítotos e as estruturas dos peptídeos. A classificação foi realizada entre peptídeos de uma mesma proteína, portanto, seguindo a ordem, o peptídeo Z-1 refere-se ao único peptídeo de membrana e, por isso, não foi ordenado. Porém, os epítotos do ENV foram classificados em epítoto 1 (Z-2), epítoto 3 (Z-3) e epítoto 2 (Z-4), em

ordem decrescente de reatividade, assim a possivelmente a antigenicidade de Z-2 seria maior que de Z-3, que seria maior que a de Z-4, mas Z-1 não faria parte da classificação por não ter sido desenhado a partir da sequência da proteína do ENV. Desta forma, foram estabelecidos os 20 peptídeos sintetizados para compor o ensaio de microarranjo.

6.3. Microarranjos proteicos

Para a avaliação da reatividade dos soros e plasmas de pacientes anteriormente infectados, ou não, com ZIKV ou DENV, em relação aos peptídeos selecionados, foram realizados ensaios de microarranjo. Como controles positivos, foram utilizadas as proteínas: NS1 e ENV Polivalente de DENV, bem como NS1 e ENV de ZIKV. Devido à cinética da resposta de anticorpos à flavivirus, foram testadas as reatividades de IgM e IgG.

Inicialmente, para normalização dos dados, os microarranjos foram quantificados e o ruído de fundo subtraído. Para normalização da intensidade de sinal entre os diferentes chips, foi realizada a normalização pela estabilização da variância (vsn). Para visualização, os dados então foram organizados em matrizes n-dimensionais e foi gerado um mapa de calor com agrupamento pelo método centroid (Gráficos 1 e 2).

Como demonstrado nos gráficos 1 e 2 o padrão de resposta de IgG demonstrou um padrão distinto à resposta de IgM com uma distribuição dos dados, especialmente quando considerados os antígenos de maior intensidade em relação às amostras mais reativas, distinto. Isso se traduz em um padrão de distribuição das amostras diferente entre os dois isotipos testados. Contudo, não foi observado um agrupamento das amostras nos grupos clínicos definidos.

É importante observar que, apesar de não ter sido observado um padrão semelhante de distribuição das amostras entre os isotipos, um agrupamento semelhante foi observado. Em ambos os isotipos, pôde-se observar a formação de dois grandes agrupamentos, aqui chamados de grupos 1 e 2. Como pode ser observado nos Gráficos 1 e 2, estes grupos compartilham ao menos 9 peptídeos quando considerando IgM Grupo 1 comparado a IgG Grupo 1, compartilhando entre si os peptídeos 5, 7, 9, 10, 12, 14, 18, 19 e 20 e IgM Grupo 2 comparado a IgG Grupo 2, compartilhando entre si os peptídeos 1, 2, 3, 4, 6, 8, 11, 13

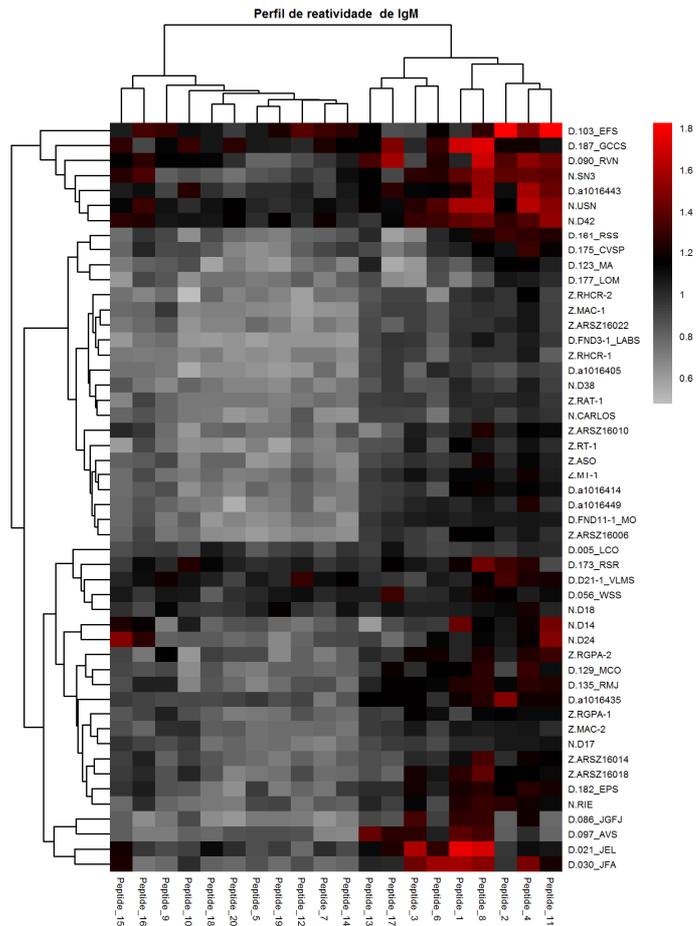


Grafico 1: Gráfico representativo do perfil de reatividade de IgM. Avaliação do padrão de distribuição das amostras, com a observação de dois grandes grupos. A variação das cores se intensifica de cinza claro para vermelho, em ordem crescente de reatividade representada em escala logarítmica em relação aos spots negativos.

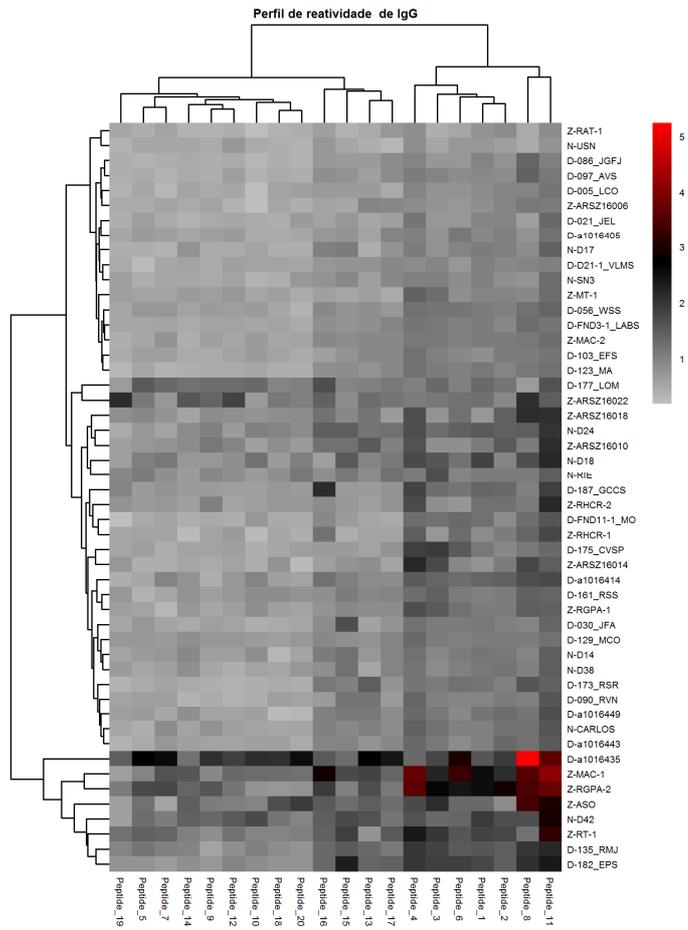


Grafico 2: Gráfico representativo do perfil de reatividade de IgG Avaliação do padrão de distribuição das amostras, com a observação de dois grandes grupos. A variação das cores se intensifica de cinza claro para vermelho, em ordem crescente de reatividade representada em escala logarítmica em relação aos spots negativos.

O perfil observado nos mapas de calor, quando se destaca a distribuição da reatividade das amostras em cada um dos peptídeos (Gráfico 3), pode-se observar que os peptídeos tendem a possuir uma reatividade semelhante, considerando mediana, e o primeiro e terceiro quartil, bem como distribuição geral do sinal em torno do cut off.

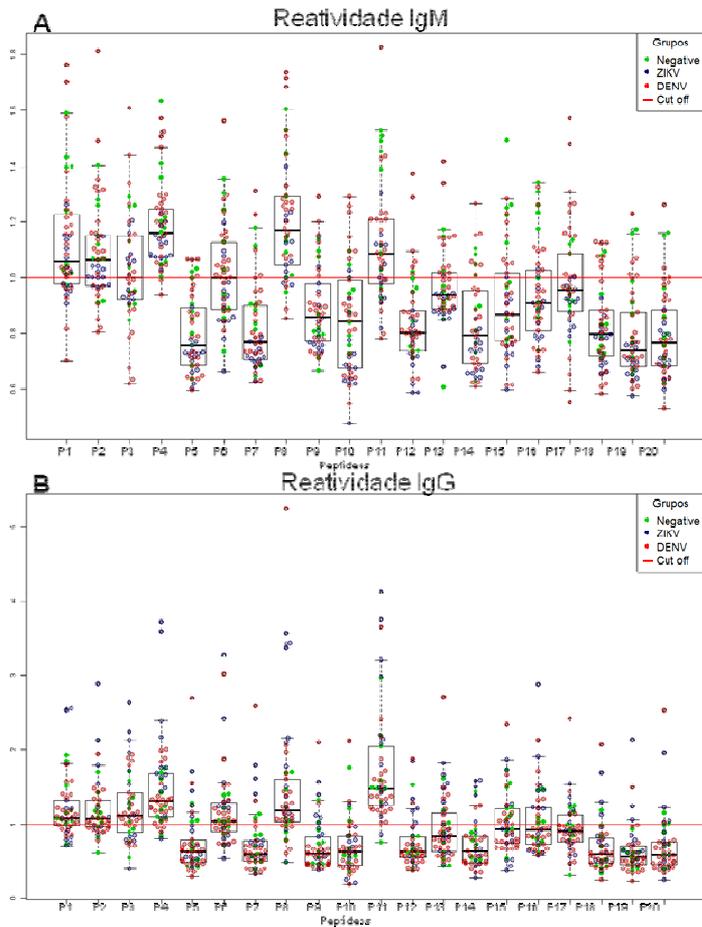


Gráfico 3: Gráfico representativo da reatividade dos peptídeos de ZIKV. Em (A): reatividade dos peptídeos em relação à IgM; em (B): reatividade dos peptídeos em relação à IgG. Em verde: NEGATIVE = amostras pertencentes ao grupo Controle Negativo; em azul: ZIKV = Amostras positivas em testes sorológicos e moleculares de zika em vermelho: DENV = Amostras positivas em testes sorológicos e moleculares de dengue; traço vermelho: ponto de corte.

Contudo, quando se avalia a distribuição das amostras em relação aos grupos clínicos, observa-se um padrão distinto entre os Isotipos. De forma geral, pode-se observar um predomínio de amostras com intensidade média de sinal mais alto no grupo infectado por DENV no isotipo IgM com uma concomitante presença de amostras do grupo controle com sinal também elevado.

Em contrapartida, quando se avalia a distribuição no isotipo IgG. Observa-se um padrão de distribuição mais próximo entre os grupos infectados com DENV e ZIKV com uma maior presença de amostras do grupo ZIKV com maior intensidade de sinal. Para este isotipo, pode-se observar uma frequência menor de amostras do grupo controle com sinal elevado. Contudo, é claro que a distribuição do sinal entre o grupo controle e grupos infectados se confunde, não apresentando uma separação clara de intensidade.

Com o intuito de se explorar este padrão de distribuição de intensidade de sinal observado entre as amostras. Tendo em vista as diferenças e semelhanças nos padrões de distribuição dos dados, foi aplicado o método de análise de componentes principais (PCA) método não supervisionado no gráfico 4 A e B,

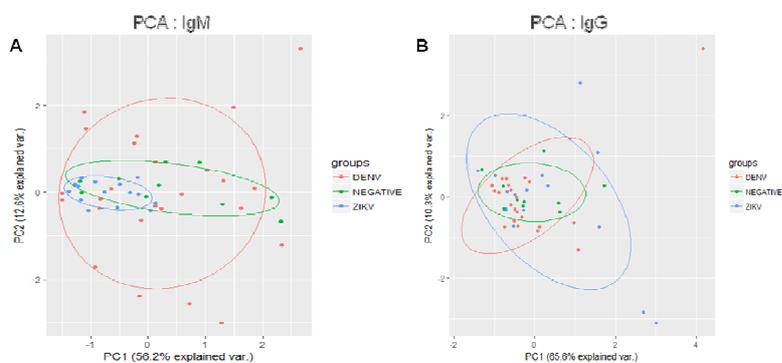


Grafico 4: Análise de componentes principais (PCA) para os grupos de amostras em IgM e IgG. Em (A): distribuição da intensidade de sinal em relação a IgM das amostras pertencentes aos três grupos de estudo; em (B): distribuição da intensidade de sinal em relação a IgG das amostras pertencentes aos três grupos de estudo. Foi aplicado o método de análise de componentes principais (PCA) método não supervisionado. NEGATIVE = Controle negativo. DENV = Amostras positivas em testes sorológicos e moleculares de dengue. ZIKV = Amostras positivas em testes sorológicos e moleculares de zika.

Como pode ser observado no gráfico 4 observa-se o padrão de distribuição semelhante ao observado no gráfico 3 (Boxplots) e, apesar de se observar um agrupamento entre os grupos, os dados não permitem a separação entre os grupos clínicos nos componentes 1 e 2, que representam cerca de 69% e 75% da variância nos isotipos IgM e IgG, respectivamente.

A fim de se analisar a reatividade de cada peptídeo individualmente, foram realizados os testes de normalidade e variância Kolmogorov-Smirnov, com Dallal-Wilkinson-Lilie para a avaliação da distribuição dos dados. De forma geral, os dados mostraram uma distribuição não normal, assim, testes não paramétricos foram escolhidos para as análises estatísticas subsequentes. Para a comparação dos três grupos, foi utilizado o teste Kluskal-Wallis com correção de Dunn

As análises do perfil de reatividade de IgM das proteínas de controle positivo demonstraram diferenças significativas para a proteína DENV Polivalente - ENV ($p = 0,0052$) entre os grupos ID e IZ, para a qual foi observada uma reatividade maior no grupo ID, sugerindo uma reatividade diferencial para essa proteína (Gráfico 5 A). Já para a proteína NS1 de DENV, não foi observada diferença significativa de reatividade ($p = 0,4361$) entre os grupos como pode ser observado no Gráfico 5B.

Por sua vez, quando analisadas as proteínas de ZIKV, como demonstrado no gráfico 5 C e D, não foram observadas diferenças significativas em nenhuma das comparações. Os valores de p encontrados foram $p = 0,0703$ e $p = 0,5324$, para NS1 e ENV, respectivamente. No geral, a reatividade das amostras dos três grupos de estudo em relação à proteína NS1 de ZIKV foi baixa. Enquanto que para a proteína recombinante do envelope de ZIKV, a reatividade das amostras de todos os grupos foi mais elevada, quando comparada com NS1 de ZIKV.

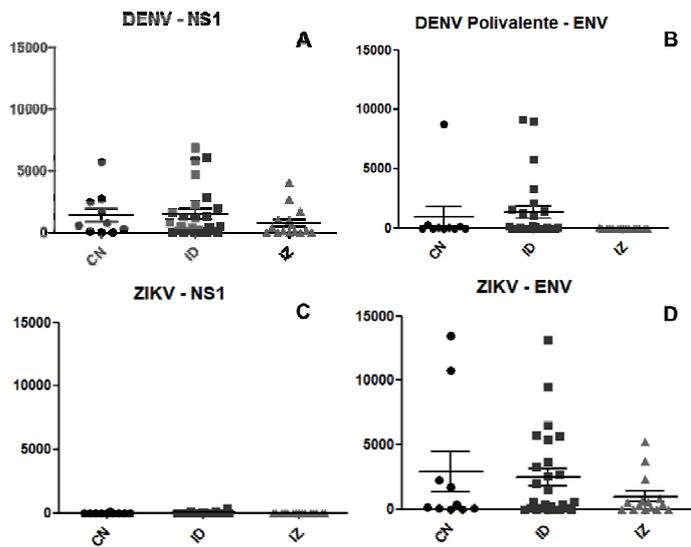


Gráfico 5: Reatividade das proteínas recombinantes de DENV em IgM utilizadas controles positivos. Em (A): proteína NS1 recombinante das regiões imunodominantes de DENV-2. Em (B): proteína do envelope recombinante polivalente dos 4 sorotipos de DENV. Em (C): proteína NS1 recombinante de ZIKV. Em (D): proteína do envelope recombinante de ZIKV. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média. Foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, que compara os os grupos definidos entre si, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. $P < 0,05$. CN = Controle negativo. ID = Amostras positivas em testes sorológicos e moleculares de dengue. IZ = Amostras positivas em testes sorológicos e moleculares de zika.

É importante salientar que nas proteínas avaliadas, o sinal médio do grupo IZ foi mais baixo do que o grupo ID, demonstrando uma reatividade geral mais baixa em relação ao grupo ID. Este padrão foi ainda mais aparente nos casos das proteínas Polivalente de DENV e a ZIKV NS1.

Assim como nas análises da reatividade em relação à IgM, a reatividade de IgG também foi avaliada. Dentre as quatro proteínas utilizadas, tanto de DENV, quanto de ZIKV, somente a proteína do envelope de ZIKV apresentou diferença significativa para a reatividade dos grupos CN e IZ.

A proteína NS1 de DENV apresentou reatividade em todos os grupos analisados, como mostrado no gráfico 6, em A. O valor das médias de reatividade dos grupos é próximo entre eles, para CN (3004,70), para ID (3015,20) e para IZ ($p =$

2815,69). Já para a proteína polivalente do envelope de DENV ($p = 0,2143$) a reatividade para os grupos CN e IZ foi inferior à ID..

As análises com a proteína NS1 de ZIKV ($p = 0,1233$) não demonstraram diferença de reatividade significativa na comparação entre os três grupos de amostras. No entanto, como visto em C, gráfico 6, a maior reatividade foi encontrada no grupo IZ em relação ao grupo ID, enquanto que no grupo CN a reatividade foi próxima de zero. Já para a proteína ENV de ZIKV, foi observada uma reatividade maior no grupo CN em relação ao grupo IZ ($p=0,0192$). Assim como o grupo CN, para o grupo ID também foi observada uma reatividade média mais elevada do que para o grupo IZ.

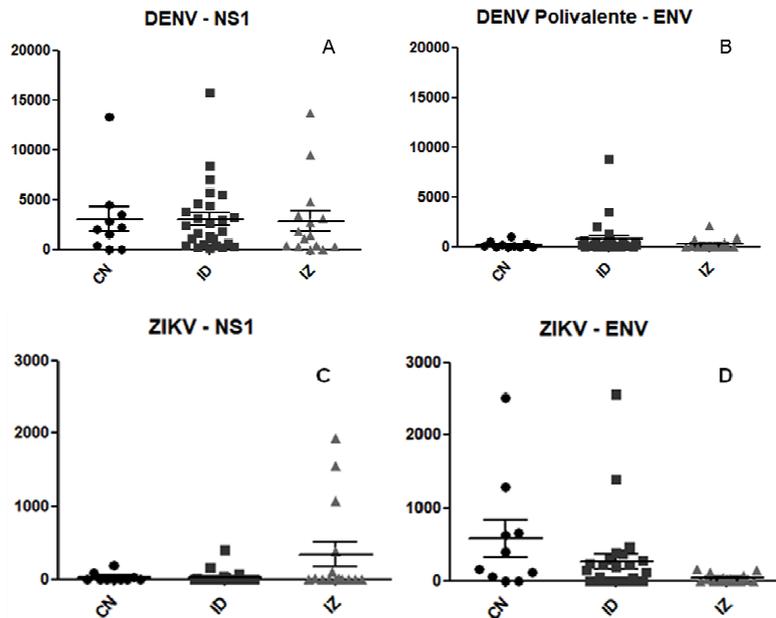


Gráfico 6: Reatividade das proteínas recombinantes de DENV em IgG utilizadas controles positivos. Em (A): proteína NS1 recombinante das regiões imunodominantes de DENV-2. Em (B): proteína do envelope recombinante polivalente dos 4 sorotipos de DENV. (C): proteína NS1 recombinante de ZIKV. Em (D): proteína do envelope recombinante de ZIKV. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média. Foi realizado o teste não paramétrico de Kluskal-Wallis, que compara os os grupos definidos entre si, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. $P < 0,05$. CN = Controle negativo. ID = Amostras positivas em testes sorológicos e moleculares de dengue. IZ = Amostras positivas em testes sorológicos e moleculares de zika.

6.3.1. Reatividade contra os peptídeos

Inicialmente, como demonstrado no gráfico 7, foi avaliada a reatividade dos peptídeos derivados da proteína NS5. Os dados obtidos para estes peptídeos, Z-13, Z-15 e Z-16, demonstram, de forma geral, um baixo reconhecimento pelas amostras do grupo IZ. Contudo, é possível observar uma reatividade no grupo ID, com reconhecimento diferencial em relação ao grupo IZ ($p= 0.0014$) no peptídeo Z-13. Já os peptídeos Z-15 e Z-16 demonstraram uma reatividade média maior do grupo controle em relação aos grupos ID e IZ.

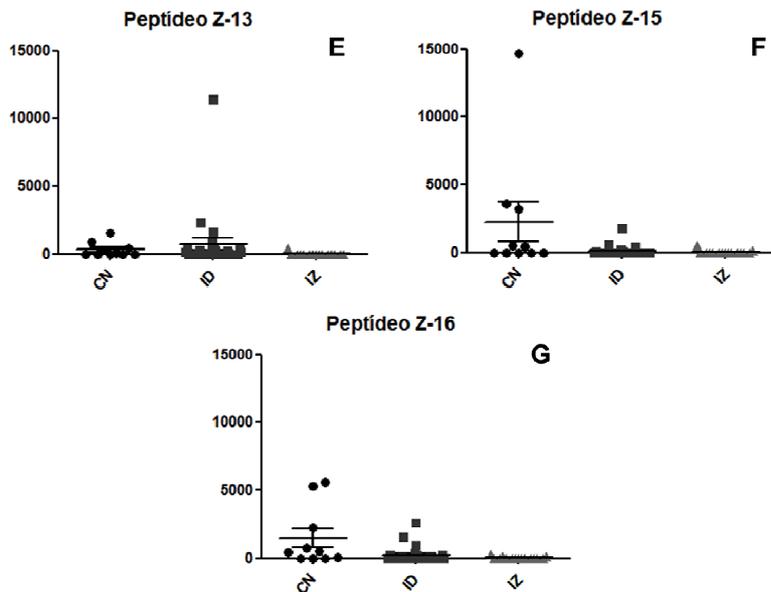


Gráfico 7: Reatividade dos peptídeos de ZIKV com Qdot-655 (IgM). Em (A): peptídeo Z-13 da proteína da NS3 de ZIKV. Em (B): peptídeo Z-15 da proteína NS5 de ZIKV. Em (C): peptídeo Z-16 da proteína NS5 de ZIKV. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média. Foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, que compara os os grupos definidos entre si, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. $P < 0,05$. CN = Controle negativo. ID = Amostras positivas em testes sorológicos e moleculares de dengue. IZ = Amostras positivas em testes sorológicos e moleculares de zika.

No geral, foi observado, tanto no isotipo IgM quanto no Isotipo IgG, um sinal médio mais elevado para os peptídeos 1, 2, 3, 4, 8 e 11 com sinal consistentemente negativo (abaixo do cut off) para os peptídeos 5, 7, 9, 10, 12, 18, 19 e 20. Como

descrito anteriormente, houve uma predominância de maior reatividade para as amostras ID em relação aos outros grupos para IgM e um sinal mais homogêneo, quando comparados os grupos ID e IZ para IgG. Contudo, em nenhuma situação foi detectado um peptídeo capaz de diferenciar as infecções de DENV e ZIKV que ao mesmo tempo demonstrasse um sinal negativo ou significativamente inferior para os controles negativos. Adicionalmente, não foi observada diferença significativa no conjunto de amostras avaliado para nenhum outro peptídeo.

7. Discussão

Neste trabalho foi explorado o potencial antigênico de peptídeos derivados das proteínas de ZIKV. Um dos objetivos principais foi realizar a predição de epítomos para células B aliada à comparação com sequências análogas em DENV com o intuito, de identificar epítomos antigênicos específicos do ZIKV com o potencial de reconhecimento diferencial em relação à DENV. Para isso, foram determinadas as sequências de ZIKV e DENV utilizadas para compor um banco de dados que pudesse ser operado pelo preditor de epítomos Bepipred.

Inicialmente, com o intuito de se obter o maior número possível de epítomos preditos, as sequências de ZIKV e DENV foram submetidas ao Bepipred, onde foram utilizados os parâmetros padrão do algoritmo: threshold 0,35, sensibilidade 0,49 e especificidade 0,75. Como demonstrado por Nadugala e colaboradores, foram comparadas as predições para as proteínas do envelope e membrana de DENV utilizando o Bepipred com dois critérios de predição, o primeiro com valor de threshold 0,2, que implica em uma sensibilidade maior de 75% e especificidade menor de 50% e o segundo valor de threshold de 0,35, que resulta em uma sensibilidade mais baixa e especificidade maior, como descrito acima. Quando as predições foram realizadas com 0,2, foram preditos 17 epítomos para a proteína E e 5 epítomos para a proteína M de DENV, no entanto, utilizando o threshold de 0,35, foram preditos os mesmos epítomos, porém houve a seleção daqueles mais específicos, e foram obtidos então um número menor de epítomos: 8 epítomos para a proteína E e 4 epítomos para M. (Nadugala et al, 2016). Da mesma forma, buscando aumentar ainda mais a especificidade dos epítomos neste trabalho, a predição foi realizada com threshold de 0,35, mas posteriormente foram selecionados os epítomos com valores de score acima de 0,9 para as análises das sequências e estruturas in silico.

Portanto, foram obtidos 37 epítomos para ZIKV, que foram pesquisados na sequência consenso de DENV através de alinhamentos, buscando correlações entre as sequências. A identidade entre as sequências é muito alta e, por isso, todos os epítomos preditos para ZIKV foram associados a peptídeos em DENV, de maneira que três apresentaram apenas uma mutação, epítomos 3, 8 e 10 da proteína NS5, a maioria dos epítomos relacionados apresentou entre três e seis mutações e apenas o epítomo 3 da proteína do envelope apresentou uma sequência completamente diferente entre ZIKV e DENV.

Desta forma, para a seleção dos melhores candidatos para a reatividade diferencial entre ZIKV e DENV, foi realizada a comparação estrutural entre os

peptídeos selecionados de ZIKV com as sequências correspondentes de DENV. Para tal, foi realizada a modelagem por homologia dos peptídeos de ZIKV e DENV, através do software Swiss-Model. De forma similar, Gangwar e colaboradores fizeram a modelagem de um segmento da proteína do ENV de JEV, para avaliar a especificidade do epítipo de ENV e verificar a possibilidade de reação cruzada com epítipos de ENV de WNV. Para tanto, após as estruturas resolvidas, avaliaram *in silico* as propriedades físico-químicas dos peptídeos, bem como as mutações que poderiam estar presentes em JEV e as suas possíveis consequências para o encaixe com anticorpos específicos. Após esta etapa, os peptídeos de JEV e WNV foram submetidos a experimentos *in vitro*, como IF, ELISA e WB, para a validação dos métodos realizados computacionalmente. Contudo, os resultados revelaram que no WB os peptídeos não apresentaram nenhum reconhecimento por anticorpos e os autores hipotetizaram que a ausência de reatividade poderia ser atribuída à perda de conformação dos peptídeos, devido a condições experimentais (Gangwar et al., 2015). De forma análoga, como demonstrado neste trabalho, também foi observada uma baixa reatividade tanto das proteínas controle, quanto dos peptídeos sintéticos. Esta baixa reatividade geral pode ser atribuída à perda de conformação natural dos antígenos, mas, no caso específico dos peptídeos, também por questões estéricas, uma vez que a disponibilidade dos epítipos em estruturas pequenas ligadas a um substrato pode ser prejudicada.

Outro desafio a ser enfrentado, é a identificação e caracterização definitiva das amostras a serem utilizadas no processo de screening e validação. Este é um problema que se apresenta como um desafio para a maioria das propostas que buscam a identificação de novos alvos para diagnóstico diferencial em Flavivirus. Isso se dá, tanto pela semelhança sorológica entre os vírus mas também, de forma mais impactante, pelas características epidemiológicas e clínicas dos mesmos.

É comum, como no caso do Brasil, a co-circulação de diferentes espécies de Flavivirus em regiões de grande incidência. Aliado a isso, os sinais clínicos são muito parecidos, o que resulta em diagnóstico frequentemente errado na identificação do agente etiológico. Aliado a isso, existe a questão da vacinação contra febre amarela. Questão ainda pouco explorada cujo impacto na procura por novos antígenos é pouco compreendido.

Para tentar mitigar o impacto desta questão de seleção de amostras, aqui foram aplicados múltiplos métodos para a classificação dos soros e plasmas. Para o grupo positivo para dengue coletados em 2015, foram realizados os testes

combinados ELISA NS1 (Euroimmun), que apresenta 99% de sensibilidade e 98% de especificidade para dengue, conforme fabricante, e imunocromatográfico para IgM e IgG (Eco diagnóstica), que apresenta 99% de sensibilidade e 99% de especificidade, conforme fabricante. Enquanto que para as amostras coletadas em 2016, foram realizados os seguintes testes sorológicos para dengue: ELISA IgM e IgG (Euroimmun), em que o teste para IgM apresentou 100% de sensibilidade e 98% de especificidade e para IgG, a sensibilidade e a especificidade informadas pelo fabricante é de 100%. Para zika, foram realizados os testes sorológicos imunocromatográficos para zika IgM e IgG. Juntamente aos testes sorológicos para as amostras coletadas em 2016, foi realizado os ensaios moleculares RT-PCR e isolamento viral para ZIKV, bem como a qRT-PCR TRIOPLEX para DENV, ZIKV e CHIKV. O diagnóstico molecular, apesar de apresentar uma especificidade maior aos testes sorológicos para os arbovírus, não funcionam para amostras coletadas pós o período de viremia. Além disso, para a realização do microarranjo, eram necessárias amostras que apresentassem anticorpos dos Isotipos IgM e IgG tanto para o grupo positivo para zika, quanto para o grupo positivo para dengue. Desta forma, o uso de testes sorológicos comerciais foi importante para a classificação das amostras.

Quando avaliadas a reatividade dos isotipos IgM e IgG separadamente, observou-se um padrão distinto. Isso reflete a cinética natural de soroconversão nas infecções naturais por Flavivirus que apresentam uma fase inicial com alta produção de IgM e produção inicial baixa de IgG e com o decorrer da infecção, os títulos de IgM tendem a baixar e os títulos de IgG tendem a aumentar e se tornar dominantes (Rockstroh et al., 2017). Esta cinética se apresenta como uma vantagem estratégica importante a ser explorada, uma vez que identificados os epítomos, pode-se desenvolver um teste capaz de reconhecer infecções recentes e infecções passadas.

Quando avaliada em relação ao isotipo IgM, a proteína recombinante do envelope dos quatro sorotipos de DENV apresentou diferença significativa de reatividade entre os grupos ID e IZ, para a qual foi observada uma reatividade maior no grupo ID, sugerindo que esta proteína poderia ser usada para o diagnóstico diferencial entre DENV e ZIKV.

Contudo, nos peptídeos Z-2, Z-3 e Z-4, preditos para a proteína do envelope de ZIKV, não foi observada a diferença de reatividade significativa entre os grupos de estudo, embora o grupo positivo para dengue tenha apresentado um alto índice de reatividade para os peptídeos do envelope de ZIKV. Para DENV Polivalente ENV, o grupo IZ apresentou reatividade próxima a zero. Contudo quando explorados os

peptídeos preditos do envelope de ZIKV, observou-se que as amostras de zika foram bastante reativas para o peptídeo Z-4.

Ao avaliar a proteína recombinante do envelope de ZIKV, também utilizada como controle positivo, obteve-se alta reatividade das amostras de todos os grupos, principalmente do grupo ID, porém, não houve reatividade diferencial significativa entre os grupos. Portanto, pode-se constatar que a proteína do envelope de ZIKV é composta por regiões muito importantes para o reconhecimento de anticorpos, porém apresenta forte reação cruzada com as amostras de dengue.

Premkumar e colaboradores, também com o objetivo de encontrar epítopos potencialmente diferenciais de ZIKV em relação aos quatro sorotipos de DENV, investigaram a proteína do envelope dos cinco vírus. Utilizando o método de predição de epítopos conformacionais para células B e posterior análises comparativas entre as estruturas, encontraram três regiões teoricamente capazes de serem reconhecidas de forma diferencial por soros de pacientes ao menos uma vez infectados por ZIKV ou DENV. Contudo, utilizando o método de ELISA para detecção de IgG para um dos antígenos de ZIKV, revelou-se uma alta reatividade cruzada para os soros de zika e dengue (Premkumar et al., 2017). De forma semelhante, neste trabalho, utilizando epítopos lineares, também foram selecionados três epítopos do envelope como potencialmente diferenciais, porém, como descrito anteriormente, a reatividade dos peptídeos foi alta principalmente para o grupo ID, apesar de ter apresentado reatividade para o grupo IZ.

Já para a proteína NS1 de DENV, não foi observada diferença significativa de reatividade dentre os grupos e isto se deve ao intenso índice de reatividade de todos os grupos, embora o grupo ID tenha apresentado o maior índice de reatividade. Enquanto que para a proteína NS1 de ZIKV, foi observada reatividade extremamente baixa para os três grupos. O mesmo foi observado para os peptídeos Z-5, Z-6 e Z-7, desenhados a partir da sequência da proteína NS1. A reatividade do grupo IZ aos peptídeos foi próxima a zero, enquanto que os grupos CN e ID apresentaram baixas reatividades, com exceção de uma amostra por grupo. A alta reatividade apresentada por apenas uma amostra dos grupos CN e ID para os três peptídeos de NS1 analisados não é a mesma, demonstrando a variação de reação de cada soro/plasma por antígeno.

Em geral, as proteínas de DENV expostas aos grupos de soros e plasmas neste trabalho, apresentaram maior reconhecimento para o grupo ID e as proteínas de

ZIKV, expostas aos grupos de amostras, também apresentaram maior reconhecimento pelo grupo ID.

De forma distinta à reatividade de IgG, Rockstroh e colaboradores demonstraram que os anticorpos IgM apresentam uma reatividade cruzada reduzida. Esta observação está de acordo com os dados apresentados neste trabalho, uma vez que foram observadas diferenças de reatividade significativas entre grupos apenas para os peptídeos em relação à IgM. As respostas de IgM contra flavivírus se mostraram mais específicas do que IgG, embora a reatividade cruzada também tenha sido descrita, e aqui demonstrada. No entanto, IgM é frequentemente produzida em baixas quantidades, especialmente em infecções secundárias por Flavivírus ou após uma vacinação, além de serem de curta duração, o que torna sua utilização um pouco mais complexa. Portanto, torna-se necessário o desenvolvimento de testes diagnósticos que utilizam preferencialmente IgG. (Rockstroh et al., 2017).

Aqui, levantamos a hipótese, assim como descrito no trabalho de Gangwar e colaboradores (2011), de que os peptídeos de ZIKV avaliados no microarranjo, poderiam ter apresentado reatividade a diversas espécies de anticorpos comuns a ZIKV e DENV, presentes nos soros e plasmas dos grupos de amostras testados. Em consequência, a diferença de reatividade dos peptídeos dentre os grupos não foi significativa. Da mesma forma, Tsai e colaboradores, ao avaliarem a antigenicidade da proteína NS1 recombinante de ZIKV em ensaios ELISA IgM e IgG, observaram que, mesmo combinando a técnica para IgM seguido para IgG, não foi possível distinguir soros de pacientes infectados somente com ZIKV ou soros de pacientes infectados com ZIKV após terem sido infectados primariamente com DENV (Tsai et al., 2017).

De forma geral, os dados aqui apresentados, demonstram o predomínio de amostras com intensidade média de sinal mais alto no grupo infectado por DENV em relação à IgM e uma presença de amostras do grupo controle com sinal também elevado, o que corrobora com o estudo de Rockstroh e colaboradores. Da mesma maneira que quando foi avaliada a distribuição da reatividade em relação ao isotipo IgG, observou-se um padrão de distribuição mais próximo entre os grupos infectados com DENV e ZIKV com uma maior presença de amostras do grupo ZIKV com maior intensidade de sinal.

Outro ponto importante a ser considerado é o índice relevante de reatividade das amostras negativas. Para a proteína NS1 de DENV, por exemplo, assim como para a proteína do envelope de ZIKV e os peptídeos Z-1, Z-4, Z-8, Z-11 e Z-16, o grupo CN apresentou valores de reatividade algumas vezes semelhantes ao grupo ID

e invariavelmente superiores ao grupo IZ. Esta observação só reforça o desafio em se caracterizar fielmente amostras em relação às arboviroses. Os soros que contemplam o grupo CN foram gentilmente cedidas pelo Dr. Philip Felgner e fazem parte de um banco de amostras da UCI – EUA. Em princípio, os pacientes dos quais as amostras foram coletadas na Califórnia, não entraram em contato com o DENV e o ZIKV, portanto não deveriam apresentar positividade em testes de reconhecimento de antígenos destes vírus. Contudo, ocorre a circulação de WNV por todo o território dos Estados Unidos, com exceção do estado de Maine, no extremo norte do país. Portanto, a hipótese da alta reatividade do CN demonstrada aos peptídeos de ZIKV no microarranjo é de reações cruzadas por anticorpos desenvolvidos contra WNV (Patterson et al., 2016 & CDC, 2017)

8. Conclusão

A metodologia realizada in silico para a predição de epítomos para células B, bem como para a seleção destes epítomos para a validação in vitro foi executada com sucesso. Foi possível a identificação de 37 epítomos lineares de células B e, entre eles, 20 se apresentaram com potencial de reconhecimento diferencial. Assim, é possível concluir que o pipeline de análise in silico pôde ser estabelecido com sucesso e poderá ser aproveitado em trabalhos futuros do grupo.

O microarranjo proteico se mostrou eficiente em determinar a reatividade dos peptídeos de ZIKV. Contudo, não foi possível identificar peptídeos com reconhecimento diferencial entre ZIKV e DENV. Os dados de microarranjo, apesar de mostrarem uma clara diferença de reconhecimento entre os isotipos IgM e IgG, mostraram intensa reação cruzada tanto entre ZIKV e DENV quanto para amostras do grupo controle. Indicando possível reação cruzada com outros antígenos não identificados como de outros patógenos, como outros Flavivirus, ou possivelmente, uma falha na caracterização sorológica das amostras.

Os resultados obtidos neste trabalho confirmam a necessidade de se desenvolver um teste diagnóstico eficiente em caracterizar e diferenciar amostras de zika e dengue. Apesar da similaridade de ZIKV e os outros Flavivirus, notavelmente com o DENV, este desafio pode ser conquistado a partir da associação de trabalhos anteriores com outros flavivirus, particularmente com o DENV, bem como o desenvolvimento metodológico do grupo de pesquisa para se obter uma solução precisa para o diagnóstico de zika.

9. Considerações Finais

O desafio de se desenvolver um teste diagnóstico sorológico para zika que seja diferencial para as demais flaviviruses e, principalmente, para a dengue é árduo e deve ser constante, até que se obtenha um teste de diagnóstico para zika sensível, específico, rápido e barato para o SUS, de maneira que os pacientes poderão ser encaminhados para um tratamento ideal, dando as atenções necessárias às mulheres em idade fértil e gestantes, prevenindo as possíveis complicações neurológicas dos fetos e neonatos. Além disto, sabendo-se da variada capacidade de transmissão do ZIKV, medidas de controle poderão ser tomadas e estudos epidemiológicos poderão ser fielmente executados, diminuindo o grave problema de saúde pública que esta doença trouxe para o país.

Para dar continuidade a este trabalho e expandir os nossos conhecimentos em busca de um objetivo maior, o projeto de doutorado propõe a seleção de epítopos para compor um teste de diagnóstico sorológico diferencial para dengue, zika, febre amarela, chikungunya e mayaro, baseado em análises conformacionais dos epítopos antigênicos das proteínas virais. Para isso, será feita a modelagem das proteínas dos vírus por homologia, a predição de epítopos descontínuos, a comparação destas regiões imunogênicas entre os arbovírus estudados e, em seguida, os peptídeos serão comercialmente produzidos em células de mamíferos para diminuir as chances de modificações nas estruturas naturais das proteínas. Os peptídeos serão triados por microarranjos proteicos. Serão produzidas, enfim, proteínas quiméricas contendo aqueles epítopos que obtiverem reconhecimento específico. A partir destes produtos, serão realizados ensaios de imunorreatividade para avaliar o reconhecimento destas proteínas. Considerando todas estas etapas, será desenvolvido um teste de diagnóstico diferencial para as arboviroses de maior relevância na saúde pública do país, que possa ser feito imediatamente à procura do paciente pelo atendimento médico e que não apresente reações cruzadas.

10. Referências

1. Albuquerque, I. G. C.; Marandino, R.; Mendonça, A. P.; Nogueira, R. M. R.; Vasconcelos, P. F. da C.; Guerra, L. R.; Brandão, B. C.; Mendonça, A. P. P.; Aguiar, G. R.; Bacco, P. A. M de. Chikungunya vírus infection: report of the first case diagnosed in Rio de Janeiro, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 45, n. 1, p. 128-129, 2012.
2. Al-Qahtani, A.; Nazir, N.; Al-Anazi, M. R.; Rubino, S.; Al-Ahdal, M. N. Zika virus: a new pandemic threat. *The Journal of Infection in Developing Countries*, v. 10, n. 3, p. 201-207, 2016.
3. Aoki, V.; Sousa-Jr, J. X.; Fukumori, L. M. I.; Périgo, A. M.; Freitas, E. L.; Oliveira, Z. N. P. Imunofluorescência direta e indireta. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 85, n. 4, p. 490-500, 2010.
4. Assis, R. R.; Ludolf, F.; Nakajima, R.; Jasinskis, A.; Oliveira, G. C.; Felgner, P. L.; Gaze, S. T.; Loukas, A.; LoVerde, P. T.; Bethony, J. M.; Correa-Oliveira, R.; Calzavara-Silva, C. E. A next-generation proteome array for *Schistosoma mansoni*. *International Journal for Parasitology*, v. 46, n. 7, p. 411-415, 2016.
5. Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L. *Bioquímica*. 5ª Edição. Estados Unidos: W. H. Freeman and Company, 2004.
6. Brasil, P.; Calvet, G. A.; Siqueira, A. M.; Wakimoto, M.; Sequeira, P. C.; Nobre, A.; Quintana, M. S. B.; Mendonça, M. C. L.; Lupi, O.; Souza, R. V.; Romero, C.; ogbi, H.; Bressan, C. S.; Alves, S. S.; Lourenço-de-Oliveira, R.; Nogueira, R. M. R.; Carvalho, M. S.; Filippis, M. B.; Jaenisch, T. Zika Virus Outbreak in Rio de Janeiro, Brazil: Clinical Characterizations, Epidemiological and Virological Aspects. *Neglected tropical Diseases*, v. 10, n. 4, p. 1-13, 2016.
7. Boeuf, P.; Drummer, H. E.; Rishards, J. S.; Scoullar, M. J. L.; Beeson, J. G. The global threat of Zika virus to pregnancy: epidemiology, clinical perspectives, mechanisms and impact. *BioMed Central Medicine*, v. 14, n. 112, DOI: 10.1186/s12916-016-0660-0, 2016.
8. Boletim Epidemiológico, Febre pelo vírus Zika: uma revisão narrativa sobre a doença, v. 46, n 26, p. 1-7, 2015. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da saúde.
9. Boletim Epidemiológico, Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika, v. 48, n 45, p. 1-13, 2017. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde.
10. Boletim Epidemiológico, Monitoramento integrado de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionadas à infecção pelo vírus Zika e

- outras etiologias infecciosas, v. 48, n 41, p. 1-10, 2017. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde.
11. Campos, G. S.; Bandeira, A. C.; Sardi, S. I. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v. 21, n. 10, p. 1885-1886. 2015.
 12. Centro de Controle e Prevenção de Doenças, <<https://www.cdc.gov/dengue/epidemiology/index.html>>, acesso em: 17 de jan. 2018.
 13. Centro de Controle e Prevenção de Doenças, <<https://www.cdc.gov/westnile/statsmaps/preliminarymapsdata2017/index.htm>>, acesso em: 11 de fev. 2018.
 14. Charrel, R. N.; Leparç-Goffart, I.; Pas, S.; Lamballerie, X.; Koopmansc, M; Reuskenc, C. Background review for diagnostic test development for Zika virus infection. *Bull World Health Organ*, v. 94, p. 574–584, 2016.
 15. Chaves, T. S. S.; Orduna, T.; Lepetic, A.; Macchi, A.; Verbanaz, S.; Risquez, A.; Perret, C.; Echazarreta, S.; Rodríguez-Morales, A. J.; Lloveras, S. C. Yellow fever in Brazil: Epidemiological aspects and implications for travelers. *Travel Medicine and Infectious Disease*, DOI: 10.1016/j.tmaid.2018.05.001, 2018.
 16. Coffey, L. L.; Forrester, N.; Tsetsarkin, K.; Vasilakis, N.; Weaver, S. C. Factors shaping the adaptative landscape for arboviruses: implications for the emergence of disease. *Future Microbiol*, v. 8, n. 2, p. 155-176, 2013.
 17. Cox, B. D.; Stanton, R. A.; Shinazi, R. F. Predicting Zika virus structural biology: Challenges and opportunities for intervention. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, v. 24, n. 3-4, p. 118-126, 2015.
 18. Dick, G. W. A.; Kitchen S. F.; Haddow, A. J. Zika Virus Isolations and Serological Specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. V. 46, p. 509-520, 1952.
 19. Faria, N. R.; Azevedo, R. S. S. Kraemer, Souza, R.; Cunha, M. S.; Hill, S. C.; Thézé, J.; Bonsall, M. B.; Bowden, T. A.; Rissanen, I.; Rocco, I. M.; Nogueira, J. S.; Maeda, A. Y.; Vasami, F. G. S.; Macedo, F. L. L.; Suzuki, A.; Rodrigues, S. G.; Cruz, A. C. R.; Nunes, B. T.; Medeiros, D. B. A.; Rodrigues, D. S. G.; Queiroz, A. L. N.; Silva, E. V. P.; Henriques, D. F.; Rosa, E. S. T.; Oliveira, C. S.; Martins, L. C.; Vasconcelos, H. B.; Casseb, L. M. N.; Simith, D. B.; Messina, J. P.; Abade, L.; Lourenço, J.; Alcantara, L. C. J.; Lima, M. M.; Giovanetti, M.; Hay, S. I.; Oliveira, R. S.; Lemos, P. S.; Oliveira, L. F.; Lima, C. P. S.; Silva, S. P.; Vasconcelos, J. M.; Franco, L.; Cardoso, J. F.; VianezJúnior, J. L. S. G.; Mir, D.; Bello, G.; Delatorre, E.; Khan, K.; Creatore, M.; Coelho, G. E.; Oliveira, W. L.; Tesh, R.; Pybus, O. G.; Nunes, M. R. T.; Vasconcelos, P. F. C. Zika virus in

- the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science*, DOI: 10.1126/science.aaf5036, 2016.
20. Figueiredo, L. T. M. Emergent arboviruses in Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40, n. 2, p. 224-229, 2007.
 21. Gangwar, R. S.; Shil, P.; Cherianb, S. S.; Gore, M. M. Delineation of an epitope on domain I of Japanese Encephalitis Virus envelope glycoprotein using monoclonal antibodies. *Virus Research*, v. 158, p. 179–187, 2011.
 22. Goebel, S.; Snyder, B.; Sellati, T.; Saeed, M.; Ptak, R.; Murray, M.; Bostwick, R.; Rayner, J.; Koide, F.; Kalkeri, R. A sensitive virus yield assay for evaluation of Antivirals against Zika Virus. *Journal of Virological Methods*, v. 238, p. 13-20, 2016.
 23. Keasey, S. L.; Pugh, C. L.; Jensen, S. M. R.; Smith, J. L.; Hontz, R. D.; Durbin, A. P.; Dudley, D. M.; O'Connor, D. H.; Ulrichb, R. G. Antibody Responses to Zika virus Infections in Environments of Flavivirus Endemicity. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 24, n. 4, p. 1-16, 2017.
 24. Kelley, T. & Richards, S. Insights into Zika Virus History, Human health Effects, and Control Measures. *Environmental Health Insights*, v.10, p. 173-174, 2016.
 25. Korber, B.; Labute, M.; Yusim, K. Immunoinformatics comes of age. *PLoS Computational Biology*, v. 2, n. 6, p. 71, 2006.
 26. Larsen, J. E. P.; Lund, O.; Nielsen, M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome Research*, v. 2, n. 2, 2006.
 27. Lee, W. T.; Wong, S. J.; Kulas, K. E.; Dupuis, A. P.; Payne, A. F.; Kramer, L. D.; Dean, A. B.; George, K. S.; White, J. L.; Sommer, J. N.; Ledizet, M.; Limberger, R. J. Development of Zika virus Serologic Testing Strategies in New York State. *Journal of Clinical Microbiology*, DOI: 10.1128/JCM.01591-17, 2017.
 28. Li, X.; Dong, H.; Huang, X.; Qiu, Y.; Wang, H.; Deng, Y.; Zhang, N.; Ye, Q.; Zhao, H.; Liu, Z.; Fan, H.; An, X.; Sun, S.; Gao, B.; Fa, Y.; Tong, Y.; Zhang, F.; Gao, G. F.; Cao, W.; Shi, P.; Qin, C. Characterization of a 2016 Clinical Isolate of Zika Virus in Non-human Primates. *EBioMedicine*, v. 12, p. 170-177, 2016.
 29. Lindenbach, B. D.; Thiel, H. J.; Rice, C. M. *Flaviviridae: the viruses and their replication*. In: *Fields Virology*. Knipe, D. M.; Howley, P. M. (Ed.). Virology. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, p. 1101-1154, 2007.
 30. Lima-Camara, T. N. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. *Revista de Saúde Pública*. 50:36; 2016.
 31. Marinho, P. S.; Cunha, A. J.; Amim-Junior, J.; Prata-Barbosa, A. A review of selected Arboviruses during pregnancy. *Maternal Health, Neonatology, and Perinatology*, v. 3, n. 17, DOI10.1186/s40748-017-0054-0, 2017.

32. Ministério da Saúde. Plano de Contingência para a Introdução do Vírus Chikungunya. Brasília, 2014.
33. Nadugala, M. N.; Premaratne, P. H; Goonasekara, C. L. Systematic Bioinformatic Approach for Prediction of Linear B-Cell Epitopes on Dengue E and prM Protein. *Advances in Bioinformatics*. DOI:10.1155/2016/1373157, 2016.
34. Nelson, D. L. & Cox, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 6ª Edição. Estados Unidos: W. H. Freeman & Company, 2014.
35. Organização Mundial de Saúde, Testes de laboratório para a infecção pelo vírus Zika, 2016.
36. Parashar, D.; Cherian, S. Antiviral perspectives for Chikungunya virus. *BioMed Research International*, v. 2014, n. 631642, p. 1-11, 2014.
37. Patterson, J.; Sammon, M; Garg, M. Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. *Western Journal of Emergency Medicine*, v. 17, n. 6, p. 671-679, 2016.
38. Premkumar, L; Collins, M.; Stephen Graham, S.; Liou, G. A.; Lopez, C. A; Jadi, R.; Balmaseda, A; Brackbill, J. A.; Dietze, R.; Camacho, E.; Silva, A. D.; Giuberti, C.; Reis, H. L.; Singh, T.; Heimsath, H.; Weiskopf, D.; Sette, A.; Osorio, J. E.; Permar, S. R.; Miley, M. J.; Lazear, H. M.; Harris, E.; Silva, A. M. Development of envelope protein antigens to serologically differentiate Zika from dengue virus infection. *Journal of Clinical Microbiology*, DOI: 10.1128/JCM.01504-17, 2017.
39. Prosdocimi, F.; Cerqueira, G. C.; Binneck, E; Fernandes-Silva, A.; Neves-dos-Reis, A.; Junqueira, A. C. M; Feio-dos-Santos, A. C.; Nhani-Júnior, A.; Wust, C. I.; Camargo-Filho, F.; Kessedjian, J. L.; Petretski, J. H.; Camargo, L. P.; Ferreira, R. G. M.; Lima, R. P.; Pereira, R. M.; Jardim, S.; Sampaio, V. S.; Folgueras-Flatschart, A. V. *Bioninformática: Manual do Usuário, Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, n. 29, p. 12-25, 2002.
40. Rastogi, M.; Sharma, N.; Singh, S. K. Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein. *Virology Journal*, v. 13, n. 131, p. 1-10, 2016.
41. Rockstroh, A.; Moges, B.; Barzon, L.; Sinigaglia, A.; Palù, G.; Kumbukgolla, W.; Schmidt-Chanasit, J.; Sarno, M.; Brites, C.; Moreira-Soto, A.; Drexler, J. F.; Ferreira, O. C.; Ulbert, S. Specific detection of dengue and Zika virus antibodies using envelope proteins with mutations in the conserved fusion loop. *Emerging Microbes & Infections*, v. 6, n. 11, DOI: 10.1038/emi.2017.87, 2017.

42. Silva, L. R. C. & Souza, A. M. Zika virus: what do we know about the viral structure, mechanisms of transmission, and neurological outcomes? *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 49, n. 3, p. 267-273, 2016.
43. Sironi, M.; Forni, D.; Cagliani, R. Nonstructural Proteins Are Preferential Positive Selection Targets in Zika Virus and Related Flaviviruses. *Neglected Tropical Diseases*, DOI: 10.1371/journal.pntd.0004978, 2016.
44. Speer, S. D. & Pierson, T. C. Diagnostics for Zika virus on the horizon. *Science*, v. 353, n. 6301, p. 750-451, 2016.
45. Stetter, K.; Beltramello, M.; Espinosa, D. A.; Graham, V.; Cassotta, A.; Bianchi, S.; Vanzetta, F.; Minola, A.; Jaconi, S.; Mele, F.; Foglierini, M.; Pedotti, M.; Simonelli, L.; Dowall, S.; Atkinson, B.; Percivalle, E.; Simmons, C. P.; varani, L.; Blum, J.; Baldanti, F.; Cameroni, E.; Hewson, R.; Harris, E.; Lanzavecchia, A.; Sallusto, F.; Corti, Davide. Specificity, cross-reactivity and function of antibodies elicited by Zika virus infection. *Science*, DOI: 10.1126/science.aaf8505, 2016.
46. Tsai, W.; Youn, H. H.; Brites, C.; Tsai, J.; Tyson, J.; Pedroso, C.; Drexler, J. F.; Stone, M.; Simmons, G.; Busch, M. P.; Lanteri, M.; Stramer, S. L.; Balmaseda, A.; Harris, E.; Wang, W. Distinguishing secondary dengue virus infection from Zika virus infection with previous dengue by a combination of three simple serological tests. *Clinical Infectious Diseases*, v. 65, n. 11, p. 1829–1836, 2017.
47. Weaver, S. C. Arrival of Chikungunya Virus in the New World: Prospects for Spread and Impact on Public Health. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 6, p. 2921-2925, 2012.
48. World Health Organization. Who and Experts Prioritize Vaccines, Diagnostics and Innovative Vector Control Tools for Zika R&D, 2016.
49. Xu, X.; Vaughan, K.; Weiskopf, D.; Grifoni, A.; Diamond, M. S.; Sette, A.; Peters, B. Identifying Candidate Targets of Immune Responses in Zika virus Based on Homology to Epitopes in Other Flavivirus Species. *PLOS Currents Outbreaks*, DOI:10.1371/currents.outbreaks.9aa2e1fb61b0f632f58a098773008c4b, 2016.

ANEXO I

Sequência consenso tetraivalente de DENV

Sequência consenso dos sorotipos de DENV 1, 2, 3 e 4, utilizando as sequências de referência descritas na tabela 2 e o programa Multalin.

>DENV_CONSENSO

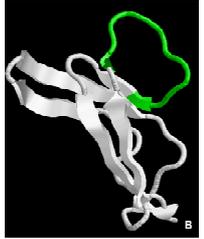
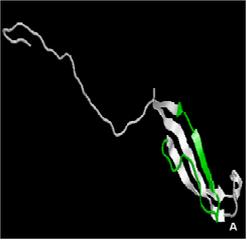
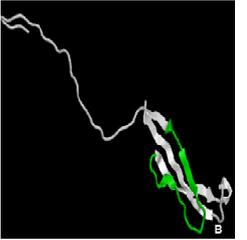
MNNQRKKKTGRPPFNMLKRERNRVSTVQQLAKRFSKGLLSGQGPMLVMAFIAFLRFLAIPPTAG
 ILKRWGTFFKKNKAIVLGRFRKEIGNMLNINRRKRSTIMLLMLIPTVMAFHLTTRDGEPHMIV
 SKQERKGSLLFKTSEGINMCTLIAMD LGEMCEDTVTYKCPLLTETEPEDIDCWCNLTSTWVTYG
 TCTQSGEHRDRKRSVALAPHVGMGLETRTETWMSSEGAWKHVQRVETWILRHPGFTILAAFLAH
 MIGTTHTQRAVIFILLMLVTPSMTMRCVGVGNRDFVEGVSGGTWVDIVLEHGGCVTTMAKNKPT
 LDFELKTEAKQPATLRKYCIEAKITNTTDSRCPTQGEPTLKKEEQDQNYVCRHTFVDRGWGNG
 CGLFGKGGIVTCAKFKCKKIEGKIVQYENLEYTVVVTVHTGDQHVGNDTSNHGVTAKITPQS
 PTEVELPFDYGLTLTDCSPRTGLDFNEMILLTMKNKAWLVHKQWFLDLPLPWTSGADTSEPNN
 RKELLVTFKNPHAKKQDVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQSSGGNHI FAGHLKCRLRMDKLQKLG
 MSYTMCTGKFKIEKEVAETQHGTVVVKVYEGDGAPCKIPFEIQDVEKHHVNGRLITANPIVTB
 KESPVNIEAEPFGDSYIVIGVDNALKNWFKKGSSIGKMF EATYRGAKRMAILGDTAWDFGS
 VGVVFTSLGKAVHQVFGSVYGALFSGVSWTMKIGIGILITWIGLNSRNTSMSMTCIAVGIITLY
 LGVMVQADMGCVVNWKGKELKCGSGIFVTDNVHTWTEQYKFPD SPKRLASAIKAWEEGVCGI
 RSTRLENIMWKQITNELNHILWENDMKLTVVVG DVKGLVQQGKRS LTPQPMELKYSWKTWGKA
 KIITAEAQNSTFLIDGPNTPECPNTRAWNSWEVEDYGFVFTTNIWLKLRRESYTVCDHRLMS
 AAIKDQKAVHADMGYWI ESSKNETWKIEKAS FIEVKTCLWPKSHTLWSNGVLESEMIIPKSYAG
 PISQHNYPGYHTQTAGPWHLGKLELDFDYCEGTTVVITEDCGNRGPSLRTTTASGKLIHEWCC
 RSCTLPPLRYMGEDGCWYGM EIRPLKEEENMVKSMVTAGHGQVDNFSMGLLCLALFIEECLRS
 RWGRKHMILGVVITFVLLIMGQLTWRDLARVLMIGANMSDRMGVTYLALMATFKMRPMFAL
 GLFLRKLTSRETLTLLTIGLAMVTTLSIPHDLME LADGIALGLMMLKLVTFENYQLWTTLLSLT
 CVKTTFTLHMAWRTMCMILAVVSLIPLCLTSSMQKQTDWIPITLAILGCQPLPIFLMTLNKTKW
 RRSWPLNEGIMAVGLV SILASSLLKNDVPMAGPLVAGGLLIACYVITGSSADLSLEKAADVQWE
 EZAEITGSSPNIMVTVDDGTMSIKDEEEENTLTILIKTALLVVSGLYPMSIPVTLTVVYMWQV
 KTQRSGVLWDVPSPPETEKA ELEDGVYRIKQ RGLFGKTQVGVGVYKEGVFHTMWHVTRGAVLMH
 EGKRLEPSWADVKKDLISYGGWRLEGEWBKGEEVQVLAIEPGKNPKNVQTKPGTFKTTTGEIG
 AVALDFKPGTSGSPIINRKGKVVGLYNGVVTKSGDYVSAIAQTERSP EGPNEIEDDIFRKRN
 LTIMDLHPGAGTKRYLPAIVREAIKRLRLTLILAPTRVVAEMEEALRGLPIRYQTPAVKSEH
 TGREIVDLMCHATFTMRLLSVVRVPNYNLIIMDEAHFTDPASIAARGYISTRVEMGEEAAIFMT

ATPPGSTDFPQSNAPIQDEERDIPERSWNSGYDWITDFQGKTWVWFVPSIKAGNDIANCLRKNG
KKVIQLSRKTFDTEYQKTKLNDWDFVVTDDISEMGANFRADRVIDPRRCLKPVILTDGPERVIL
AGPMPVTPASAAQRRGRIGRNPKKENDQYIYMGQPLNNDHHAHWTEAKMLLDNINTPEGIIPA
LFEPEREKTAIDGEYRLRGEARKTFVELMRRGDLPVWLSYKVASEGINSRRWCDFGERNNQ
ILEENMDVEIWTKEGEEKKLRPRWLDARTYSDPLALKEFKEFAAGRKSITLDELITEIGRLPHTL
TQRARNALDNVLMHTSEQGGRAYRHALEELPETLETMLLALLAVLTGGIFLFFMSGKGIGKT
SIGLICIIAASGLLWMAEIQPHWIAASIILEFFLMVLLIPEPEKQRTPODNQLAYVVIGILTII
ATTIAANEMGLEKTKKDLGGLHSPAQVQPETSILDVDLHPASAWTLYAVATTIITPMLRHTIEN
TTANISLTAIANQAAVLMGLGKGWPLSKMDLGVLLALGCYSQVNPPLTAALLMLIAHYAIIIG
PGLQAKATREAQKRTAAGIMKNPTVDGITVIDLDEIVYDPKFEKQLGQVMLLVLCATQLLLMRT
TUALCEALTLAGPITTLWEGNPGRFWNTTIAVSMANIFRGSYLAGAGLAFSLMKNVGTGRRT
GSQGETLGEKWKRLNQLSRKEFETYKRSGILEVDRTEAKEGLKRGETHHAVSRGSAKLRWFV
ERNMVKPEGKVVDLGCGRGWSYACAGLKNVTEVKGYTKGGPGHEEPIPMATYGWNLVKLSGV
DVFYLPPEKCDTLLCDIGESSNPNTIEEGRTLRLVKMVEPWLNNNPQFCIKVLNPLYMPTVIEEL
EKLQRKHGGMLVRNPLSRNSTHEMYWVSNGTGNIVSSVNMTSRMLLNRFMRHRKPTYEKDVDL
GAGTRHVSVEPEVPNMDIIGKRIERIKEEHKSTWHYDQDNPYKTWAYHGSYEVKSTGSASSMVN
GVVKKLLTKPWDVIMVMTQMAMTDTTFFGQQRVFKKVDTRTPQPKPGTRKVMETAEWLKFLG
KNKNPRLCTREEFTRKVRSNAAIGAVFTDENQWNSAKEAVEDERFWELVDKERELHKEGCETC
VYNMMGKREKKLGEFGKAKGSRAIWYMWLGARFLEFEALGFLNEDHWFSRENSWSGVEGGLHK
LGYILRDISKKPGGAMYADDTAGWDTRITEDDLQNEEKITEQMEPEHKLAKAIFKLTYNKVV
KVQRPTPRGTVMDIISRKQDRGSGQVGTYGLNTFTNMEAQLIRQMEGEGVFTKSDMENPHLLEK
RVQNWLKCGVERLKRMAISGDDCVVKPLDDRFATALTALNDMGKVRKDI PQWEPKGNWQWQ
VPFCSHHFHELIMKDGRELVPFCRNQDELIGRARISQGAGWSLRETACLKAYAQMWSLMYFHR
RDLRLASNAICSAVPTHWVPTSRTTWSIHAAHQWMTTEDMLTVWNRVWIEENPWEDKTPVHSW
EDIPYLGKREDQWCGSLIGLTSRATWAKNIQTAINQVRNLIGNEEYLDYMPMSMKRFRREEESE
VLW

ANEXO II

Epítomos de ZIKV e DENV

São apresentados a seguir os 74 peptídeos de ZIKV e DENV. Em (A) são observados os peptídeos de ZIKV e em (B) são observados os peptídeos de DENV. Os peptídeos são apresentados com as conformações de 90 aminoácidos. A região do epítipo está destacada em verde. Estão descritos o nome da proteína de origem do epítipo e as sequências de aminoácidos abaixo. Os aminoácidos destacados em vermelho em ZIKV e DENV são as diferenças de aminoácidos encontradas.

<p>Epítipo único - Membrana ZIKV</p>  <p>LDEGVEPDDVDC</p>	<p>Epítipo único - Membrana DENV</p>  <p>LLTETEPEDIDC</p>
<p>Epítipo 1 - Envelope ZIKV</p>  <p>SDMASDSRCPTQGEAYLDKQSDTQ</p>	<p>Epítipo 1 - Envelope DENV</p>  <p>TNTTDSRCPTQGEPYLKEEQDQN</p>

