

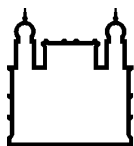
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE APTÂMEROS CONTRA
ANTÍGENOS E ANTICÓRPOS DO VÍRUS ZIKA

LILIANE MONTEIRO DE MORAIS

Rio de Janeiro
Setembro de 2022



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

Liliane Monteiro de Moraes

Obtenção e caracterização de aptâmeros contra antígenos e anticorpos do vírus zika

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como
parte dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Medicina Tropical

Orientadores: Profa. Dra. Ana Bispo de Filippis
Prof. Dr. Sotiris Missailidis

RIO DE JANEIRO
Setembro de 2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Monteiro de Moraes , Liliane .

Obtenção e caracterização de aptâmeros contra antígenos e anticorpos do vírus zika / Liliane Monteiro de Moraes . - Rio de Janeiro, 2022.

180 f.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2022.

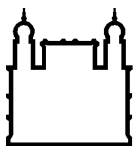
Orientadora: Ana Bispo de Filippis.

Co-orientador: Sotiris Missailidis.

Bibliografia: f. 115-132

1. Aptâmeros de DNA. 2. Vírus Zika. 3. Proteína NS1. 4. SELEX. 5. Diagnóstico . I. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/Icict/Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Igor Falce Dias de Lima - CRB-7/6930.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTOR: LILIANE MONTEIRO DE MORAIS

Obtenção e caracterização de aptâmeros contra antígenos e anticorpos do vírus zika

ORIENTADORES: Prof^a. Dra. Ana Bispo de Filippis
Prof. Dr. Sotiris Missailidis

Aprovada em: 29/11/2022

EXAMINADORES:

Prof^a. Dra. Renata Carvalho de Oliveira Pires dos Santos - Presidente (IOC/Fiocruz)

Prof^a. Dra. Ygara da Silva Mendes – Revisora (Bio-Manguinhos/Fiocruz)

Prof. Dr. Dilson Silva (UERJ)

Prof^a. Dra. Aline dos Santos Moreira (IOC/Fiocruz)

Prof. Dr. Haroldo Cid da Silva Junior (Bio-Manguinhos/Fiocruz)

Rio de Janeiro, 29 de setembro de 2022



Ministério da Saúde


Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de tese de doutorado acadêmico em Medicina Tropical de **Liliane Monteiro de Moraes**, sob orientação da Dr^a. Ana Maria Bispo de Filippis e coorientada pelo Dr. Sotiris Missailidis. Ao vigésimo nono dia do mês de setembro de dois mil e vinte e dois, realizou-se às treze horas e trinta minutos, na Sala de Reunião da Diretoria - Prédio Administrativo Vinícius de Fonseca - BioManguinhos, o exame da tese de doutorado acadêmico intitulada: "**Obtenção e caracterização de aptâmeros contra antígenos e anticorpos do vírus Zika**", no programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências - área de concentração: Diagnóstico, Epidemiologia e Controle, na linha de pesquisa: Diagnóstico de Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr^a. Renata Carvalho de Oliveira Pires dos Santos - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Haroldo Cid da Silva Junior - BIO-MANGUINHOS/FIOCRUZ, Dr^a. Ygara da Silva Mendes - BIO-MANGUINHOS/FIOCRUZ e como suplentes: Dr^a. Aline dos Santos Moreira - IOC/FIOCRUZ e Dr. Dilson Silva - UERJ/RJ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela Aprovada da defesa da tese de doutorado acadêmico. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutora em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Coordenadora do Programa, Dr^a. Vanessa Salete de Paula, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 29 de setembro de 2022.


Dr^a. Renata Carvalho de Oliveira Pires dos Santos (Presidente da Banca):


Dr. Haroldo Cid da Silva Junior (Membro da Banca):


Dr^a. Ygara da Silva Mendes (Membro da Banca):

Dr^a. Vanessa Salete de Paula (Coordenadora do Programa): 

Aos meus pais, Ailson e Nilza, e meus filhos, Nicolás e Lucas, pela compreensão e pelo apoio na elaboração deste trabalho, que ocupou preciosas horas de convívio familiar.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu Senhor e Salvador, por me sustentar em todos os momentos de adversidade e me fortalecer para continuar prosseguindo. Com Ele o fardo é leve e a angústia é passageira.

Aos meus pais, Ailson e Nilza, por terem se dedicado à minha formação pessoal e profissional, por serem meus maiores incentivadores, por nunca medirem esforços para me ajudar e pelo imenso auxílio na criação dos meus filhos. Sem vocês não seria possível!

Aos meus filhos, Nicolas e Lucas, que são minha fonte de alegria e meu aconchego. Amo vocês mil milhões!!!

Aos meus irmãos, Claudio e Leonardo, e minhas cunhadas, Juliana e Márcia, que sempre acreditaram e torceram pelo meu sucesso profissional e pessoal. Vocês me ajudam a querer ser melhor!

À minha orientadora Dra. Ana Bispo de Filippis, pelo exemplo de dedicação ao trabalho, por aceitar esse desafio com os aptâmeros, pela atenção dispensada nas orientações e pela ajuda nas sugestões e correções da escrita.

Ao meu orientador Dr. Sotiris Missailidis, por todo conhecimento compartilhado, pelo valioso auxílio na bancada, por sempre procurar ou criar (rs) um buraco na agenda para me ouvir e pela convivência agradável e inspiradora.

À minha amiga e gestora Dra. Sheila Maria Barbosa de Lima, que sempre me apoiou, me motivou, me aconselhou e torceu pelo meu sucesso. Você tornou tudo menos pesado. Você é minha inspiração profissional!

Às minhas amigas e colegas de trabalhos, Dra. Gisela Freitas Trindade e Dra. Marta Cristina de Oliveira Souza, que sempre me apoiaram e me deram força para continuar.

A toda equipe do LATEV (Bio-Manguinhos/Fiocruz), em especial à plataforma PPCR e minha amiga e coordenadora, Dra. Renata Tourinho, pelo apoio e compreensão das ausências em reuniões e atividades. Tô voltando...

Aos amigos e companheiros de bancada que os aptâmeros me proporcionaram, Dra. Alessandra Abalo, Dra. Laís Nascimento, Dra. Diana Dalzy, doutoranda Ethel Valdez, doutoranda Nathália Cristina Silva e mestrando Henrique Francisco Rocha. Obrigada pelas horas de convívio e trocas de experiência. Foram momentos de sofrimento e alegria compartilhados, sem vocês seria mais difícil! Vocês agregaram valor ao meu crescimento profissional!

A toda equipe do LATER (Bio-Manguinhos/Fiocruz), especialmente a Dra. Ana Paula Argondizzo, pelo acolhimento e valioso auxílio na execução dos experimentos.

A toda equipe do LATAM (Bio-Manguinhos/Fiocruz), em especial à Mestre Milena Mouta Verdan França Carvalho, pela colaboração e auxílio direto ou indireto nos experimentos.

A toda equipe do LAMAM, principalmente à Dra. Patrícia Barbosa Jurgilas, Mestre Kaique Alves Brayner Pereira e Mestre Vinicius de Lima Gonçalves, pela imensa colaboração e suporte nos experimentos de MST e nano-ITC.

A Plataforma de Sequenciamento de Ácidos Nucléicos de Nova Geração (IOC), em especial a Dra. Aline Moreira, por todo suporte no sequenciamento dos aptâmeros.

Ao querido Doutor Dilson Silva, pelo grande auxílio nos experimentos de fluorimetria e pela valiosa convivência.

Ao estatístico Thiago Goes Pimentel, pela ajuda com as análises estatísticas.

Ao amigo Jorge Augusto da Costa Cunha, que me incentivou em momentos difíceis com palavras de otimismo e perseverança e deu aqueles “puxões de orelha” necessários (rs).

À minha grande amiga, de longas datas, Renata Silva de Mattos, por todo apoio emocional, por estar sempre presente mesmo na ausência, por ser um porto seguro para as adversidades e por todas as horas de descontração. “Amizade é igual casamento, para vida toda!!!” E lá se vão quase 40 anos...

A toda minha família espiritual, principalmente meus pastores, Daniel Lucas e Aline Belhassof, pelo incentivo, ajuda em orações e compreensão das ausências. A gente luta de pé, mas é de joelhos que temos certeza da vitória!

À Dra. Ygara da Silva Mendes, pela revisão criteriosa e sugestões pertinentes da escrita, e aos demais membros da banca examinadora, Dra. Renata Carvalho de Oliveira Pires dos Santos, Dr. Dilson Silva, Dra. Aline dos Santos Moreira e Dr. Haroldo Cid da Silva Junior, por aceitarem o convite e contribuírem na finalização deste trabalho.

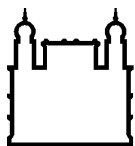
Ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical (IOC/Fiocruz) e à coordenadora e amiga, Dra. Vanessa Salete de Paula, pela oportunidade e acolhimento e pelo empenho em elevar o nível da pesquisa no Brasil.

À Fiocruz, ao Instituto Oswaldo Cruz e ao Instituto de Tecnologia de Imunobiológicos, pela oportunidade de crescimento profissional, interpessoal e pelo suporte técnico científico.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ, pelo auxílio financeiro.

“Investigando a criação incrível e majestosa de Deus, a ciência pode na verdade ser uma forma de louvor”.

Francis Collins, diretor do Projeto Genoma Humano



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

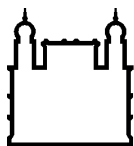
OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE APTÂMEROS CONTRA ANTÍGENOS E ANTICORPOS DO VÍRUS ZIKA

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM MEDICINA TROPICAL

Liliane Monteiro de Moraes

O vírus zika (ZIKV) tornou-se um grande problema de saúde pública no início de 2015, quando casos de síndrome de Guillain-Barré e microcefalia foram associados à infecção viral. Atualmente, o ZIKV é endêmico em todas as áreas tropicais do mundo, e a chance de futuras epidemias permanece real, sendo crucial a utilização de testes laboratoriais precisos. O objetivo deste trabalho foi selecionar e caracterizar aptâmeros de DNA fita simples específicos para o ZIKV, para a proteína NS1 do ZIKV e para anticorpos contra a proteína NS1 do ZIKV (anti-NS1z), a fim de utilizá-los em diagnósticos para zika, sem reatividade cruzada com outros flavivírus. Para obter aptâmeros para partícula viral, o ZIKV foi cultivado em células Vero e usado como alvo da seleção. Na seleção dos aptâmeros para NS1z, utilizamos proteínas produzidas em *E. Coli* (não-glicosilada) e em células de inseto (glicosilada). Os aptâmeros para o anticorpo foram selecionados a partir de um mAb anti-NS1z produzido em Bio-Manguinhos. Seleções negativas foram adicionadas às seleções do ZIKV e da NS1z. A seleção dos aptâmeros foi realizada utilizando a metodologia SELEX, onde foram escolhidas quatro sequências de aptâmeros para a partícula viral íntegra; três sequências para a proteína NS1 glicosilada (rNS1zg); duas para a proteína NS1 não glicosilada (rNS1z); e sete para o mAb anti-NS1. Para a predição das estruturas secundárias e terciárias dos aptâmeros, foram utilizados os programas UNAFold, RNAComposer e Chimera, que possibilitaram a seleção de aptâmeros com menor energia livre. No encaixe molecular aptâmero-alvo, realizado pelo HDock, foi possível identificar modelos com maior potencial de utilização em testes de diagnóstico. A interação dos aptâmeros foi avaliada por ELISA e suas constantes de dissociação (Kd) foram calculadas por espectroscopia de fluorescência e/ou termoforese em microescala (MST) e/ou calorimetria de titulação isotérmica (ITC). Os ELISAs em placas tratadas com polilisina demonstraram que todos os aptâmeros selecionados foram capazes de reconhecer seus alvos. Nos ELISAs utilizando aptâmeros amino modificados em placas com anidrido maleico, os tampões de bloqueio testados não funcionaram efetivamente, invalidando os testes. A afinidade e a especificidade dos aptâmeros para as partículas do ZIKV foram confirmadas pela MST, demonstrando a ligação dos aptâmeros tanto na partícula viral como na proteína NS1z e não apresentando reatividade com os sorotipos do vírus dengue (DENV). O aptâmero rNS1z_19 demonstrou ser o mais promissor para a proteína NS1z não glicosilada, tanto por espectroscopia de fluorescência como por nano-ITC. Os experimentos de MST e nano-ITC envolvendo aptâmeros para a proteína NS1 e para o mAb precisam ser executados em maiores concentrações. Os aptâmeros ZIK01 e ZIK02, selecionados para a partícula de ZIKV, foram os mais promissores para utilização em ensaios de diagnóstico diferencial entre infecções causada por ZIKV e DENV.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

OBTAINING AND CHARACTERIZING APTAMERS AGAINST ZIKA VIRUS ANTIGENS AND ANTIBODIES

ABSTRACT

PHD THESIS IN MEDICINA TROPICAL

Liliane Monteiro de Morais

The Zika virus (ZIKV) became a major public health problem in early 2015, when cases of Guillain-Barré syndrome and microcephaly were associated with viral infection. Currently, ZIKV is endemic in all tropical areas of the world, and the chance of future epidemics remains real, and the use of accurate laboratory tests is crucial. The objective of this work was to select and characterize single-stranded DNA aptamers specific for ZIKV, for the NS1 protein of the ZIKV and for antibodies against the NS1 protein of the ZIKV (anti-NS1z), in order to use them in diagnostic for zika, without cross-reactivity with other flaviviruses. To obtain viral particle aptamers, ZIKV was cultured in Vero cells and used as a selection target. In the selection of aptamers for NS1z, we used proteins produced in *E. Coli* (non-glycosylated) and in insect cells (glycosylated). The aptamers for the antibody were selected from an anti-NS1z mAb produced in Bio-Manguinhos. Negative selections have been added to the ZIKV and NS1z selections. The selection of aptamers was performed using the SELEX methodology, where four aptamer sequences were chosen for the intact viral particle; three sequences for the glycosylated NS1 protein (rNS1zg); two for non-glycosylated NS1 protein (rNS1z); and seven for the anti-NS1 mAb. For the prediction of secondary and tertiary structures of aptamers, the programs UNAFold, RNAComposer and Chimera were used, which enabled the selection of aptamers with lower free energy. In the aptamer-target molecular fitting, performed by HDOCK, it was possible to identify models with greater potential for use in diagnostic tests. The interaction of aptamers was evaluated by ELISA and their dissociation constants (Kd) were calculated by fluorescence spectroscopy and/or microscale thermophoresis (MST) and/or isothermal titration calorimetry (ITC). ELISAs on polylysine-treated plates demonstrated that all selected aptamers were able to recognize their targets. In ELISAs using amino-modified aptamers on maleic anhydride plates, the blocking buffers tested did not work effectively, invalidating the tests. The affinity and specificity of aptamers for ZIKV particles were confirmed by MST, demonstrating the binding of aptamers to both the viral particle and the NS1z protein and not showing reactivity with dengue virus (DENV) serotypes. The rNS1z_19 aptamer showed to be the most promising for the non-glycosylated NS1z protein, both by fluorescence spectroscopy and by nano-ITC. MST and nano-ITC experiments involving aptamers for the NS1 protein and for the mAb need to be performed at higher concentrations. The aptamers ZIK01 and ZIK02, selected for the ZIKV particle, were the most promising for use in differential diagnosis assays between infections caused by ZIKV and DENV.

ÍNDICE

RESUMO	X
ABSTRACT	XI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. HISTÓRICO	1
1.1.1. Zika no Brasil	4
1.2. AGENTE ETIOLÓGICO: TAXONOMIA, MORFOLOGIA, ORGANIZAÇÃO GENÔMICA E PROTEÍNAS VIRAIS	8
1.2.1. Proteína de envelope (E)	10
1.2.2. Proteína não estrutural 1 (NS1)	12
1.3. CICLO DE VIDA DO ZIKV	14
1.4. TRANSMISSÃO	15
1.4.1. Transmissão por transfusão sanguínea	16
1.4.2. Transmissão sexual	17
1.4.3. Transmissão vertical	17
1.5. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	18
1.5.1. Síndrome de Guillain-Barré (SGB)	18
1.5.2. Síndrome Congênita do Zika (SCZ)	19
1.6. PREVENÇÃO E CONTROLE	20
1.7. DIAGNÓSTICO	21
1.8. APTÂMEROS	22
1.9. JUSTIFICATIVA	26
2. OBJETIVOS	28
2.1. OBJETIVO GERAL	28
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28

3.	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1.	PRODUÇÃO VIRAL	28
3.1.1.	Vírus Zika	28
3.1.2.	Outros flavivírus	29
3.2.	PROTEÍNA RECOMBINANTE NS1 DO ZIKV	31
3.2.1.	Proteína recombinante NS1 glicosilada do ZIKV (rNS1zg)	31
3.2.2.	Proteína recombinante NS1 não-glicosilada do ZIKV (rNS1z)	31
3.3.	PROTEÍNA RECOMBINANTE NS5 DO ZIKV	32
3.4.	PROTEÍNA RECOMBINANTE NS1 DO VÍRUS DA FEBRE AMARELA	33
3.5.	ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA A PROTEÍNA NS1	33
3.6.	SELEÇÃO DOS APTÂMEROS POR SELEX	34
3.6.1.	Preparo da biblioteca de oligonucleotídeos	34
3.6.2.	Seleção positiva de aptâmeros para a partícula íntegra do ZIKV	35
3.6.3.	Seleção negativa de aptâmeros para outros Flavivírus	36
3.6.4.	Seleção positiva de aptâmeros para proteína NS1 do ZIKV	37
3.6.5.	Seleção negativa de aptâmeros para proteína NS1 do YFV	38
3.6.6.	Seleção positiva de aptâmeros para anticorpos monoclonais anti-NS1	38
3.6.7.	Clonagem	39
3.6.8.	Sequenciamento	40
3.6.8.1.	Sequenciamento Automatizado de Sanger	40
3.6.8.2.	Sequenciamento de alto rendimento (NGS)	41
3.7.	ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DAS SEQUÊNCIAS DOS APTÂMEROS	43
3.7.1.	Predição da estrutura secundária dos aptâmeros	43
3.7.2.	Predição da estrutura terciária dos aptâmeros	43
3.7.3.	Simulação da interação molecular aptâmero-alvo	43
3.8.	AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DAS SEQUÊNCIAS DOS APTÂMEROS	44
3.8.1.	Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)	44
3.8.1.1.	ELISA para detecção do ZIKV utilizando aptâmeros	44

3.8.1.2.	ELISA para triagem dos anticorpos monoclonais anti-NS1 de ZIKV	45
3.8.1.3.	ELISA para detecção da proteína NS1 de zika utilizando aptâmeros	46
3.8.1.4.	ELISA para detecção do ZIKV ou da proteína E utilizando aptâmeros amimo modificados	48
3.8.1.5.	ELISA para detecção da proteína NS1 de ZIKV utilizando aptâmeros amimo modificados	49
3.8.1.6.	ELISA para detecção de anticorpo anti-NS1 de ZIKV utilizando aptâmeros amimo modificado	50
3.8.2.	Espectroscopia de fluorescência	52
3.8.2.1.	Partícula viral do zika	52
3.8.2.2.	Proteína NS1 do ZIKV	53
3.8.3.	Termoforese em microescala (MST)	53
3.8.3.1.	Proteína E do ZIKV	53
3.8.3.2.	Partículas virais	54
3.8.3.3.	Proteína NS1 do ZIKV	55
3.8.3.4.	Anticorpo monoclonal anti-NS1z	55
3.8.4.	Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)	55
3.8.4.1.	Proteína NS1 do ZIKV	56
3.8.4.2.	Anticorpo monoclonal anti-NS1z	56
4.	RESULTADOS	57
4.1.	PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DO ZIKV	57
4.2.	APTÂMEROS SELECIONADOS PARA A PARTÍCULA VIRAL ÍNTEGRA	59
4.2.1.	Alinhamento das sequências dos aptâmeros selecionados para a partícula viral íntegra	59
4.2.2.	Predição das estruturas secundária e terciária dos aptâmeros para a partícula viral íntegra	61
4.2.3.	Interação molecular dos aptâmeros com a proteína E do ZIKV	63
4.3.	APTÂMEROS SELECIONADOS PARA A PROTEÍNA RECOMBINANTE NS1 GLICOSILADA DO ZIKV	66

4.3.1. Alinhamento das sequências dos aptâmeros selecionados para a rNS1zg	66
4.3.2. Predição das estruturas secundária e terciária dos aptâmeros para a rNS1zg	67
4.3.3. Interação molecular dos aptâmeros com a rNS1zg	67
4.4. APTÂMEROS SELECIONADOS PARA A PROTEÍNA NS1 RECOMBINANTE NÃO GLICOSILADA DO ZIKV	68
4.4.1. Alinhamento das sequências dos aptâmeros selecionados para a rNS1z	68
4.4.2. Predição das estruturas secundária e terciária dos aptâmeros para a rNS1z	69
4.4.3. Interação molecular dos aptâmeros com a rNS1z	70
4.5. APTÂMEROS SELECIONADOS PARA O ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-NS1 DE ZIKA (MAB ANTI-NS1Z)	71
4.5.1. Alinhamento das sequências dos aptâmeros selecionados para o mAb anti-NS1z	71
4.5.2. Predição das estruturas secundária e terciária dos aptâmeros para o mAb anti-NS1z	73
4.6. AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DOS APTÂMEROS POR ELISA	75
4.6.1. ELISA dos aptâmeros para partícula viral	75
4.6.2. ELISA dos anticorpos anti-NS1z com proteínas virais não estruturais do ZIKV e do YFV	76
4.6.3. ELISA dos aptâmeros para a rNS1zg	77
4.6.4. ELISA dos aptâmeros para a rNS1z	77
4.6.5. ELISA dos aptâmeros amino modificados para a partícula do ZIKV	78
4.6.6. ELISA dos aptâmeros amino modificados para a rNS1zg	81
4.6.7. ELISA dos aptâmeros amino modificados para a rNS1z	82
4.6.8. ELISA dos aptâmeros amino modificados para o anticorpo monoclonal anti-NS1 LB10/BF4	84
4.7. AVALIAÇÃO DA AFINIDADE DA LIGAÇÃO APTÂMERO-ALVO POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	86

4.7.1. Aptâmeros para partícula viral	86
4.7.2. Aptâmeros para proteína rNS1z	87
4.8. AVALIAÇÃO DA AFINIDADE DA LIGAÇÃO APTÂMERO-ALVO POR TERMOFORESE EM MICROESCALA (MST)	89
4.8.1. Aptâmeros para partícula viral – ensaio com a proteína E do ZIKV	89
4.8.2. Aptâmeros para partícula viral – ensaio com as partículas de ZIKV E DENV	91
4.8.3. Aptâmeros para proteína rNS1zg	91
4.8.4. Aptâmeros para o anticorpo monoclonal anti-NS1z	92
4.9. AVALIAÇÃO DA AFINIDADE DA LIGAÇÃO APTÂMERO-ALVO POR CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA (ITC)	93
4.9.1. Aptâmeros para proteína NS1z do ZIKV	93
4.9.2. Aptâmeros para Anticorpo Monoclonal anti-NS1z	99
5. DISCUSSÃO	105
6. CONCLUSÕES	113
7. PERSPECTIVAS	114
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115
9. ANEXOS	133
ANEXO A. RESUMO GRÁFICO	134
ANEXO B- ARTIGO	135

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1.1. Representação da disseminação geográfica do ZIKV de Uganda para África Ocidental e Ásia. Adaptado de (7).	2
Figura 1.1.2. Áreas de risco para a infecção pelo ZIKV no mundo. Adaptado de (29)	4
Figura 1.1.1.1. Mapa da difusão do ZIKV no território brasileiro entre os anos de 2014 e 2016. Adaptado de (35).....	5
Figura 1.1.1.2. Curva epidêmica dos casos prováveis de zika no Brasil, por semana epidemiológica de início de sintomas, nos anos de 2021 e 2022 (até a SE 17). Adaptado de (46).....	7
Figura 1.2.1. Organização genômica do ZIKV. Adaptado de (52)	8
Figura 1.2.2. Estrutura do ZIKV. Adaptado de (52)	9
Figura 1.2.1.1. Representação da estrutura dimérica da proteína E de ZIKV. (A) Visão da região superficial, demonstrando os três ectodomínios. Adaptado de (57).....	11
Figura 1.2.2.1. Representação superficial das formas oligoméricas da proteína NS1 do ZIKV. Adaptado de (65).....	13
Figura 1.3.1. Ciclo de vida do ZIKV. Adaptado de (70).	15
Figura 1.4.1. Ciclos de transmissão do ZIKV. Adaptado de (71).....	16
Figura 1.5.2.1. Neuroimagem e sequelas clássicas observadas na síndrome congênita do ZIKV. Adaptado de (112).	20
Figura 1.8.1. Diagrama esquemático da conformação de um aptâmero de ácido nucleico e sua ligação com o alvo para formação do complexo alvo-aptâmero. Adaptado de (135).....	23
Figura 1.8.2. Diagrama esquemático do processo SELEX. Adaptado de (132).....	24
Figura 3.6.3.1. Esquema de uma placa de microtitulação demonstrando a posição dos flavivírus e o local onde os aptâmeros provenientes da seleção positiva (eluições NaCl 1,5 M e NaSCN 3 M) foram adicionados	37
Figura 3.8.1.1.1. Representação esquemática do ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção do ZIKV utilizando aptâmeros.....	45
Figura 3.8.1.2.1. Representação esquemática do ensaio imunoenzimático (ELISA) para triagem dos anticorpos monoclonais anti-NS1 de zika.....	46
Figura 3.8.1.3.1. Representação esquemática do ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção da proteína NS1 de ZIKV utilizando aptâmeros.....	47

Figura 3.8.1.4.1. Representação esquemática do ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção do ZIKV ou da proteína E utilizando aptâmeros amimo modificados	49
Figura 3.8.1.5.1. Representação esquemática do ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção da proteína NS1 de ZIKV utilizando os aptâmeros amimo modificado	50
Figura 3.8.1.6.1. Representação esquemática do ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção do anticorpo monoclonal anti-NS1 do ZIKV utilizando aptâmeros amimo modificados	51
Figura 4.1.1. Imagens de monocamada de células Vero demonstrando o efeito citopático do ZIKV ao longo do tempo	58
Figura 4.1.2. Cinética viral do ZIKV ES 2916/2015 em células Vero em MOI 0,02 e MOI 0,002	59
Figura 4.2.1.1. Alinhamento das sequências dos aptâmeros selecionados para a partícula viral de Zika	60
Figura 4.2.2.1. Predição das estruturas secundárias e terciárias dos quatro aptâmeros selecionados para o vírus zika	62
Figura 4.2.3.1. Simulação da dinâmica molecular dos quatro aptâmeros selecionados e da proteína E dimérica de ZIKV pelo servidor HDOCK	64
Figura 4.3.1.1. Alinhamento das sequências dos aptâmeros selecionados para proteína recombinante NS1 glicosilada do ZIKV	66
Figura 4.3.2.1. Predição das estruturas secundárias e terciárias dos três aptâmeros selecionados para proteína rNS1zg	67
Figura 4.3.3.1. Simulação da dinâmica molecular de três aptâmeros selecionados e da proteína NS1z glicosilada pelo servidor HDOCK	68
Figura 4.4.1.1. Alinhamento das sequências dos aptâmeros selecionados para proteína recombinante NS1 não-glicosilada do ZIKV	69
Figura 4.4.2.1. Predição das estruturas secundárias e terciárias de dois aptâmeros selecionados para proteína rNS1z	70
Figura 4.4.3.1. Simulação da dinâmica molecular de dois aptâmeros selecionados e proteína NS1z não glicosilada pelo servidor HDOCK	71
Figura 4.5.1.1. Alinhamento das sequências dos aptâmeros selecionados para o anticorpo monoclonal anti-NS1 de zika	72
Figura 4.5.2.1. Predição das estruturas secundárias e terciárias de sete aptâmeros selecionados para proteína rNS1g	74
Figura 4.6.1.1. ELISA demonstrando a ligação dos quatro grupos de aptâmeros com a partícula viral do Zika	75

Figura 4.6.2.1. ELISA demonstrando a ligação dos mAbs anti-NS1z e do Ac policlonal para NS1 com as proteínas não estruturas do ZIKV (rNS1z, rNS1zg e rNS5z) e do YFV (rNS1FA).....	76
Figura 4.6.3.1. Ensaio imunoenzimático em placa de 96 orifícios tratada com PL, demonstrando a detecção da proteína NS1 glicosilada de ZIKV (rNS1zg) com os aptâmeros rNS1zg_5, rNS1zg_12 e rNS1zg_14 em duas concentrações diferentes	77
Figura 4.6.4.1. Ensaio imunoenzimático realizado em placa de 96 orifícios tratada com PL, demonstrando a detecção da proteína não glicosilada (rNS1z) utilizando 15 aptâmeros diferentes.....	78
Figura 4.6.5.1. Ensaio imunoenzimático realizado em placa de 96 orifícios ativadas com anidrido maleico sensibilizada com o aptâmero ZIK01 (A) e ZIK02 (B) modificados (-C6 -NH ₂) para detecção de partículas virais íntegras ou da proteína E do ZIKV ...	80
Figura 4.6.6.1. Ensaio imunoenzimático realizado em placa de 96 orifícios ativadas com anidrido maleico sensibilizada com o aptâmero rNS1zg_5 amino modificado (-C6-NH ₂), para detecção da proteína NS1 glicosilada (rNS1zg).....	81
Figura 4.6.6.2. Ensaio imunoenzimático realizado em placa de 96 orifícios ativadas com anidrido maleico sensibilizada com o aptâmero rNS1zg_5 amino modificado (-C6-NH ₂), para detecção da proteína NS1 glicosilada (rNS1zg), utilizando cinco tampões de bloqueio diferentes.	82
Figura 4.6.7.1. Ensaio imunoenzimático realizado em placa de 96 orifícios ativadas com anidrido maleico sensibilizada com o aptâmero rNS1z_19 amino modificado (-C6-NH ₂), para detecção da proteína NS1 não glicosilada (rNS1z)	83
Figura 4.6.7.2. Ensaio imunoenzimático realizado em placa de 96 orifícios ativadas com anidrido maleico sensibilizada com o aptâmero rNS1z_19 amino modificado (-C6-NH ₂), para detecção da proteína NS1 não glicosilada (rNS1z), utilizando cinco tampões de bloqueio diferentes	84
Figura 4.6.8.1. Ensaio imunoenzimático realizado em placa de 96 orifícios ativadas com anidrido maleico sensibilizada com sete aptâmeros amino modificados (-C6-NH ₂), para detecção do anticorpo monoclonal LB10/BF4, utilizando dois tampões de bloqueio diferentes	85
Figura 4.6.8.2. Ensaio imunoenzimático realizado em placa de 96 orifícios ativadas com anidrido maleico sensibilizada com sete aptâmeros amino modificados (-C6-NH ₂), para detecção do anticorpo monoclonal LB10/BF4, utilizando o tampão PBS/leite1%/BSA1% como bloqueio	86
Figura 4.7.1.1. Espectros fluorimétricos da partícula viral do zika nas concentrações de 1,0 x 10 ⁷ e 1,0 x 10 ⁶ PFU/mL, do tampão de purificação (pH 7,4 e 8,5) e do marcador de pH (vermelho de fenol) a 25 °C.....	87

Figura 4.7.2.1. Espectros de supressão de fluorescência (A e C) e gráficos de Stern-Volmer (B e D) da proteína rNS1z na presença dos aptâmeros rNS1z_19 (A e B) e rNS1z_38B/39D (C e D) a 25 °C	88
Figura 4.8.1.1. Ensaio termoforético comparando a afinidade entre os quatro aptâmeros e a proteína E de ZIKV	90
Figura 4.8.2.1. Ensaio termoforético comparando a afinidade entre os dois aptâmeros e partículas de ZIKV ou <i>pool</i> dos 4 sorotipos de DENV	91
Figura 4.8.3.1. Ensaio termoforético demonstrando a interação do aptâmero rNS1zg_5 com a proteína NS1 glicosilada de ZIKV	92
Figura 4.8.4.1. Percentuais de fluorescência da interação dos aptâmeros com o anticorpo anti-NS1 em comparação a fluorescência do controle	93
Figura 4.9.1.1. Titulação calorimétrica para a avaliação da interação entre a proteína não glicosilada do ZIKV (rNS1z) e o aptâmero rNS1z_19	94
Figura 4.9.1.2. Titulação calorimétrica para a avaliação da interação entre a proteína não glicosilada do ZIKV (rNS1z) e o aptâmero rNS1z_19 e entre os tampões de diluição de cada insumo	95
Figura 4.9.1.3. Modelagens dos ensaios de titulação calorimétrica entre o aptâmero rNS1z_19 e a proteína NS1 não glicosilada de ZIKV	96
Figura 4.9.1.4. Titulação calorimétrica demonstrando a interação entre a proteína não glicosilada do ZIKV (rNS1z) e o aptâmero rNS1z_19 (em vermelho) e entre o aptâmero rNS1z_19 e o tampão da proteína (PBS/arginina) (em azul)	97
Figura 4.9.1.5. Titulação calorimétrica entre o aptâmero rNS1z_19 e a proteína NS1z não glicosilada na ausência de arginina.....	98
Figura 4.9.1.6. Modelagem dos ensaios de titulação calorimétrica entre o aptâmero rNS1z_19 e a proteína NS1z não glicosilada, na ausência de arginina	99
Figura 4.9.2.1. Titulação calorimétrica entre o aptâmero mAb_2c e o anticorpo monoclonal anti-NS1z LB10/BF4	100
Figura 4.9.2.2. Titulação calorimétrica entre o aptâmero mAb_2c e PBS	101
Figura 4.9.2.3. Titulação calorimétrica demonstrando a interação entre o mAb anti-NS1z LB10/BF4 e o aptâmero mAb_2c (em vermelho) e entre o aptâmero e o tampão PBS (em azul)	102
Figura 4.9.2.4. Modelagem dos ensaios de titulação calorimétrica entre o aptâmero mAb_2c e o mAb anti-NS1z LB10/BF4	102
Figura 4.9.2.5. Titulação calorimétrica demonstrando a interação entre o mAb anti-NS1z LB10/BF4 e o aptâmero mAb_20c.	103

Figura 4.9.2.6. Modelagem dos ensaios de titulação calorimétrica entre o aptâmero mAb_20c e o mAb anti-NS1z LB10/BF4. 104

Figura 4.9.2.7. Modelagem dos ensaios de titulação calorimétrica entre o aptâmero mAb_11p e o mAb anti-NS1z LB10/BF4 105

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.2.3.1. Posição de encaixe dos aptâmeros na proteína E.....	65
--	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

3D – Tridimensional

Ac – Anticorpo

Al(OH)₃ – Hidróxido de Alumínio

Asn- Asparagina

ATB – Antibiótico

ATCC – *American Type Culture Collection* (Coleção de Cultura de Tipos Americanos)

BALB/c – Bagg -Albino C

BCA – *Bicinchoninic Acid* (ácido bicinconínico)

Bio-Manguinhos – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos

BSA- *Bovine Serum Albumine* (albumina sérica bovina)

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais

CHIKV – Vírus Chikungunya

CN – Controle negativo

CP – Controle positivo

CPE – *Cytopathogenic Effect* (efeito citopático ou citopatogênico)

D.O. – Densidade óptica

DENV – Vírus dengue

DENV1 - Vírus dengue sorotipo 1

DENV2 - Vírus dengue sorotipo 2

DENV3 - Vírus dengue sorotipo 3

DENV4 - Vírus dengue sorotipo 4

DI – Domínio 1 da proteína de envelope

DII- Domínio 2 da proteína de envelope

DIII – Domínio 3 da proteína de envelope

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (Meio de Água Modificado por Dulbecco)

DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

DNAfd - Ácido Desoxirribonucléico fita dupla

DNAfs - Ácido Desoxirribonucléico fita simples

dNTP - Desoxirribonucleotídeo fosfatado

E – Proteína de Envelope

E. coli – *Escherichia coli*

ELISA – *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (Ensaio de imunoabsorção enzimática)

EV – Endovenoso
Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz
g – Força da gravidade
GenBank – Banco de dados de nucleotídeos
HAT – Hipoxantina-Aminopterina-Timidina
hpi – horas pós-infecção
HRP – *Horseradish peroxidase* (Peroxidase de rábano)
IC – Intervalo de confiança
IDT – *Integrated DNA Technologies* (Tecnologias de DNA Integrado)
IgG – Imunoglobulina G
IgM – Imunoglobulina M
IMAC – Immobilized Metal-ion Affinity Chromatography" (cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados)
IOC – Instituto Oswaldo Cruz
IP – Intraperitoneal
IPTG – Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo
ITC – *Isothermal Titration Calorimetry* (Calorimetria de Titulação Isotérmica)
JEV – Vírus da encefalite japonesa
Kd – Constante de dissociação
kDa – Quilodalton
Ksv – Constante de Stern-Volmer
LAMAM – Laboratório de Macromoléculas
LATAM – Laboratório de Tecnologia de Anticorpos Monoclonais
LATER – Laboratório de Tecnologia de Recombinantes
LATEV – Laboratório de Tecnologia Viroológica
LB - Meio Luria Bertani
LED – *Light Emitting Diode* (Diodo Emissor de Luz)
mAb – *Monoclonal antibody* (anticorpo monoclonal)
MOI – *Multiplicity of infection*(Multiplicidade de Infecção)
MST – *Microscale thermophoresis* (Termoforese em microescala)
NaHCO₃ - Bicarbonato de sódio
NaSCN – Tiocianato de sódio
NAT – Teste de Ácidos Nucleicos
NH₂ – Grupo amino
NS1 – Proteína não estrutural 1

NS1s – Proteína não estrutural 1 secretada
NS2 – Proteína não estrutural 2
NS3 – Proteína não estrutural 3
NS4 – Proteína não estrutural 4
NS5 – Proteína não estrutural 5
OMS – Organização Mundial de Saúde
OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde
ORF – *Open Reading Frame* (fase de leitura aberto)
PBS – *Phosphate Buffered Saline* (Tampão fosfato-salino)
PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação da Polimerase em Cadeia)
PEG – Polietilenoglicol
PFU – *Plaque-Forming Unit* (unidade formadora de placa)
PL – Polilisina
prM – Proteína pré-membrana
PRNT – *Plaque Reduction Neutralization Test* (Teste de Redução de Neutralização em Placa)
q.s.p. – Quantidade suficiente para
RNA – *Ribonucleic Acid* (Ácido ribonucleico)
RNAfd – Ácido ribonucleico fita dupla
RPM – Rotação por minuto
RT-PCR – *Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction* (Transcrição Reversa-Reação da Polimerase em Cadeia)
RVFV - Vírus da Febre do Vale do Rift
SCZ – Síndrome Congênita do Zika
SE – Semana epidemiológica
SELEX – *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment* (Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial)
SisGen – Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
SFB – Soro fetal bovino
SGB – Síndrome de Guillain-Barré
SLEV – Vírus da encefalite de St. Louis
TA – Temperatura ambiente
TB – Meio Terrific Broth
TBEV – Vírus da encefalite transmitida por carrapatos

TMB – Tetrametilbenzidina

Tris – Tris(hidroximetil)aminometano

Trp – Triptofano

UTR – *Untranslated Region* (região não codificante)

VP-SFM – *Virus Production-Serum Free Medium* (Meio livre de soro para produção de vírus)

WNV – Vírus do Nilo Ocidental

YFV – Vírus da febre amarela

ZIKV – Vírus zika

ΔG – Energia livre de Gibbs

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico

Em meados da década de 40, em Uganda, leste da África, houve a implementação de um programa de vigilância sentinela do vírus da febre amarela. Um dos locais escolhidos para esse estudo foi uma pequena área florestal denominada “Floresta Zika”. Macacos Rhesus eram colocados em gaiolas sobre plataformas de madeira, na copa das árvores, em toda a extensão da floresta, e suas temperaturas corpóreas eram verificadas diariamente. Em abril de 1947, um dos macacos (Rhesus 766) apresentou febre, ficando em observação por 30 dias. Nenhuma outra anormalidade foi detectada, porém, em estudos realizados através da inoculação intracraniana do soro desse animal em camundongos, foi possível isolar um agente transmissível filtrável desconhecido, que posteriormente foi denominado vírus zika (ZIKV). Em 1948, o ZIKV também foi isolado a partir da inoculação intracerebral de camundongos utilizando-se como inóculo *pools* de mosquitos *Aedes africanus* capturados na mesma floresta (1).

Em humanos, o primeiro isolamento ocorreu em 1954, na Nigéria. Amostras de soro de uma paciente de 10 anos que apresentava dor de cabeça e febre foram inoculados intracerebralmente em camundongos. Os animais que receberam inóculo proveniente do 6º dia após início dos sintomas ficaram doentes e o agente isolado desses camundongos foi submetido a passagens subsequentes, que foram bem-sucedidas (2). Dois anos depois, o vírus foi isolado em uma infecção humana experimental. Um voluntário foi inoculado com a cepa nigeriana do ZIKV e, após cerca de 82 horas de incubação, apresentou dor de cabeça, mal-estar e febre. O isolamento viral foi realizado da amostra de sangue do paciente coletada durante o período febril (3).

Em 1969, o ZIKV foi isolado pela primeira vez em um *pool* de mosquitos *A. aegypti* coletados na Malásia. Esse isolamento serviu como o primeiro subsídio de que o ZIKV teria também um ciclo urbano (4). Posteriormente, este mosquito foi associado como o provável vetor do ZIKV nas primeiras infecções humanas relatadas na Indonésia, entre 1977 e 1978 (5).

Durante as décadas de 60 e 70, somente casos humanos esporádicos na África e na Ásia foram identificados, sobretudo por métodos sorológicos. A infecção pelo ZIKV era associada a um quadro febril autorresoluto, não havendo nenhum registro de morte ou hospitalização. Os estudos de soroprevalência indicaram que o vírus se

espalhava de forma generalizada entre humanos (6). Estudos moleculares posteriores mapearam o deslocamento do ZIKV de Uganda para a África Ocidental e a Ásia, na primeira metade do século XX (figura 1.1.1.) (7). Estes estudos filogenéticos reiteraram a origem africana do ZIKV e indicaram a existência de duas linhagens distintas circulando concomitantemente: linhagem africana e linhagem asiática (6,7).

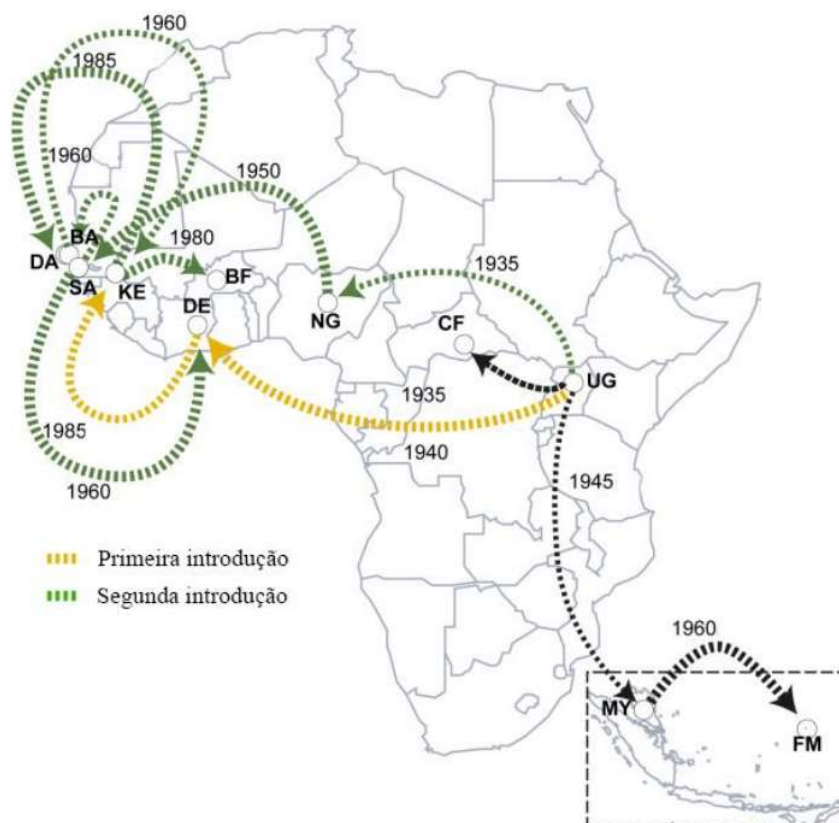


Figura 1.1.1 . Representação da disseminação geográfica do ZIKV de Uganda para África Ocidental e Ásia. As linhas direcionadas conectam as fontes mais prováveis e as localidades alvo das linhagens virais (mostradas por setas). As datas indicam os anos mais prováveis de introdução do vírus na localidade alvo. Siglas: UG – Uganda; CF - República Centro-Africana; NG – Nigéria; BF – Burkina Faso; DE – Dezidougou; KE – Kedougou; BA - Bandia; SA – Saboya; DA – Dakar; MY – Malásia; FM – Micronésia. Adaptado de (7).

Embora o ZIKV tenha sido isolado repetidamente de amostras sanguíneas de humanos, apenas 14 casos foram relatados até abril de 2007, quando o ZIKV emergiu fora da Ásia e África, causando uma epidemia em um pequeno arquipélago no oceano pacífico conhecido como Ilhas Yap, nos Estados Federados da Micronésia. Aproximadamente três quartos da população foi infectada, apresentando uma doença relativamente leve caracterizada por erupção cutânea, conjuntivite, febre, artralgia e artrite, sem nenhuma hospitalização relacionada (8).

Um grande surto ocorreu seis anos depois, em 2013, na Polinésia Francesa (9), sendo considerado a maior epidemia causada por um arbovírus diferente do vírus da Dengue (DENV) (10). Estima-se que mais de 28.000 casos (cerca de 11,5 % da população) procuraram atendimento médico com sintomas semelhantes ao zika (11). Desde então, o ZIKV se espalhou para outras ilhas vizinhas no Pacífico, incluindo Nova Caledônia, Ilhas Cook e Ilha de Páscoa (10,12–14). Além disso, casos importados do Pacífico foram notificados em países distantes, como Austrália (15), Itália (16), Japão (17) e Noruega (18). Estudos retrospectivos do surto ocorrido na Polinésia Francesa relataram, pela primeira vez, a transmissão perinatal do ZIKV (19) e a possível associação entre o vírus e malformações congênitas e complicações neurológicas e autoimunes (11,20).

Nos anos seguintes, o vírus se espalhou rapidamente pelas Américas. No primeiro semestre de 2016, quando o surto no continente atingiu seu pico, 48 países americanos já havia relatado transmissão autóctone vetorial do ZIKV (21).

Atualmente, 89 países e territórios no mundo possuem evidências documentadas de transmissão autóctone do ZIKV por mosquito, segundo relatório de atualização da epidemiologia de zika da Organização Mundial de Saúde (OMS), de fevereiro de 2022 (22). Das seis regiões da OMS, somente a região do Mediterrâneo Oriental não está nesta lista. A região das Américas continua sendo a região com o maior número de casos notificados anualmente (22). Em 2021, segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), foram notificados 21 mil casos nas Américas, sendo aproximadamente 17.500 casos e 5 mortes relatadas no Brasil (23). A Índia relatou um epidemia da doença zika em julho de 2021, marcando atividade recente de surto na região do Sudeste Asiático (24). Na região europeia, a primeira transmissão autóctone foi relatada na França em 2019, porém casos de infecção associados a viagens já vêm sendo relatados desde 2016 (25). Na região Africana, um estudo retrospectivo demonstrou soroprevalência populacional indicativa de transmissão autóctone no Quênia entre 2016 e 2017 (26). Na região do Pacífico Ocidental, desde 2010, apenas casos isolados de infecção pelo ZIKV foram relatados (27). Em 2021, foi publicado o primeiro caso provável de microcefalia em um bebê nascido no Vietnã (28).

Diante desse cenário, os Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos mantêm recomendações especiais para viajantes e gestantes, considerando as áreas de risco para o ZIKV (figura 1.1.2.) (29).



Figura 1.1.2. Áreas de risco para a infecção pelo ZIKV no mundo. As cores do mapa indicam a situação dos países e territórios com relação a presença ou ausência de infecção pelo ZIKV e/ou do mosquito transmissor. Em roxo, estão demonstrados os locais onde já ocorreu ou ocorre casos de Zika; em lilás, localidades de baixa possibilidade de infecção devido a condição geográfica; em amarelo, países onde há mosquito *Aedes aegypti*, sem casos relatados de infecção por ZIKV; e em verde, países e territórios sem *Aedes aegypti*. Adaptado de (29).

1.1.1. Zika no Brasil

O Brasil foi o primeiro país a relatar casos de infecção pelo ZIKV no continente americano, depois do surto ocorrido na Ilha de Páscoa, no Chile. No final de 2014, profissionais de saúde do Estado do Maranhão, no nordeste do Brasil, perceberam o aparecimento de casos de uma doença aparentemente leve, que causava muita coceira e manchas no corpo (30,31). A situação chegou a público no início de fevereiro de 2015. Segundo as características clínicas apresentadas, as principais suspeitas eram dengue, rubéola, parvovírus B19, sarampo, enterovírus e vários arbovírus, em especial o chikungunya, que havia entrado no país um ano antes (31). As notificações de casos foram aumentando rapidamente na região nordeste. A hipótese de zika foi levantada pela primeira vez em meados de março e, logo em seguida, em abril de 2015, foi possível identificar o ZIKV através da detecção do RNA viral em amostras

sorológicas de casos da Bahia (31–33) e do Rio Grande do Norte (34). Em julho, o vírus já estava circulando em 12 estados brasileiros: Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Rio de Janeiro, Roraima e São Paulo (30). Em 2016, o ZIKV já havia se espalhado em praticamente todo território nacional, exceto em algumas áreas remotas da região amazônica e no extremo sul do país (figura 1.1.1.1.) (35) .

Erro! Fonte de referência não encontrada.

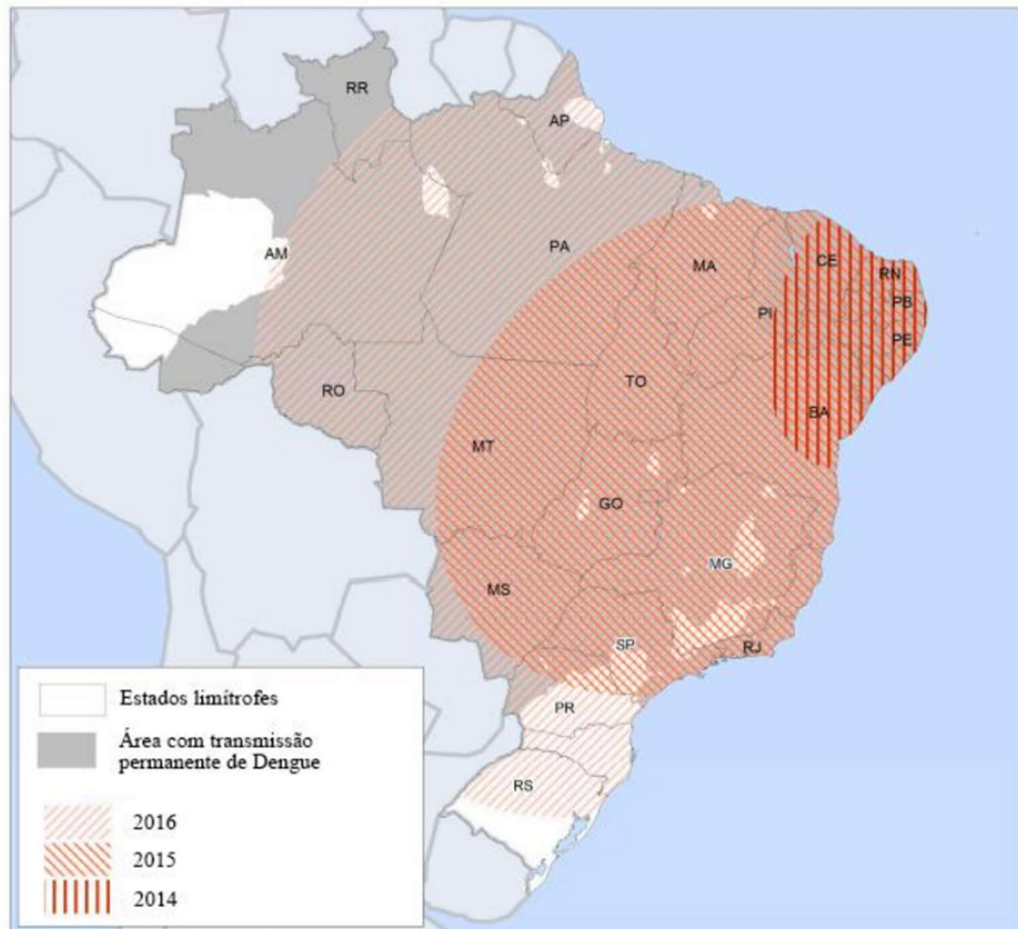


Figura 1.1.1.1. Mapa da difusão do ZIKV no território brasileiro entre os anos de 2014 e 2016. As linhas paralelas horizontais indicam os estados da região Nordeste onde ocorreram os primeiros relatos da infecção por ZIKV (2014). A disseminação do ZIKV para os estados das regiões Centro-Oeste e Sudeste, em 2015, está demonstrada por linhas paralelas diagonais para a direita. As linhas paralelas diagonais para a esquerda indicam a difusão do vírus por quase todo território brasileiro, em 2016. A área de transmissão permanente da dengue é mostrada em cinza. Adaptado de (35).

Estudos filogenéticos demonstraram uma alta identidade das cepas brasileiras com sequências da linhagem asiática do ZIKV (34,36), corroborando com achados anteriores sobre a disseminação dessa linhagem, relatado pela primeira vez nos surtos das ilhas do Pacífico (13).

A entrada do ZIKV no Brasil ainda não está bem clara, mas algumas hipóteses vêm sendo consideradas. A primeira delas foi sugerida por Zanluca e colaboradores, onde a introdução do vírus poderia estar associada à Copa do Mundo em 2014 (34). Contudo, nenhum país do Pacífico endêmico ao ZIKV participou da competição (37). Outra opção, mencionada por Musso e colaboradores, seria a entrada do vírus através da corrida de canoagem Va'a World Sprint Championships realizada no Rio de Janeiro, em agosto de 2014, onde quatro países do Pacífico, nos quais o ZIKV circulou (Polinésia Francesa, Nova Caledônia, Ilhas Cook e Ilha de Páscoa), tiveram equipes envolvidas (37). Alternativamente, uma outra teoria seria a introdução do vírus durante o torneio de futebol da Copa das Confederações de 2013. Entretanto, apesar das análises filogenéticas e de relógio molecular apontarem para uma única introdução do ZIKV nas Américas, entre maio e dezembro de 2013, sendo bem consistentes com este evento, ele terminou antes que os casos de ZIKV fossem relatados na Polinésia Francesa (36). Faria e colaboradores (2016) apontam que a data estimada de origem coincide com um aumento de passageiros aéreos provenientes de áreas endêmicas de ZIKV para o Brasil e com surtos relatados em ilhas do Pacífico, sugerindo que a grande mobilidade humana pode fornecer hipóteses mais aceitáveis sobre a introdução viral do que hipóteses focadas em eventos específicos (36).

Apesar do ZIKV ter se disseminado rapidamente no país, não havia motivos para grandes preocupações, pois os relatos mundiais sobre surtos anteriores não descreviam casos graves ou fatais. Porém, em meados do mês de julho de 2015, essa tranquilidade começou a ser interrompida. Alguns hospitais de Pernambuco, Bahia, Rio Grande do Norte e Maranhão observaram aumento expressivo nas internações de pessoas com sintomas neurológicos temporalmente associados à doença exantemática, onde alguns casos foram clinicamente confirmados como síndrome de Guillain-Barré (30,31,38). Antes que houvesse tempo para maiores investigações, um novo alerta foi acionado: em outubro de 2015, o Ministério da Saúde relatou o aumento inesperado do número de recém-nascidos com microcefalia (circunferência craniana muito menor do que o esperado) no estado de Pernambuco, que, em seguida, também foi observado em outros estados da região nordeste (31,39). Embora as causas e a extensão das consequências fossem desconhecidas, as investigações apontavam possível associação com a infecção por ZIKV durante a gravidez, o que levou o Ministério da Saúde a declarar oficialmente Emergência de Saúde Pública de Importância Nacional (ESPIN), em 11 de novembro de 2015. Neste percurso, o

conjunto de casos de microcefalia e outros distúrbios neurológicos relatados no Brasil e o acometimento semelhante ocorrido na Polinésia Francesa (2014), levou a OMS, em 1 de fevereiro de 2016, a estabelecer Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (ESPII) (40).

A ESPII perdurou por 9 meses, sendo encerrada em 18 de novembro de 2016, com o entendimento que o ZIKV é sazonal e pode retornar repetidamente aos países através dos mosquitos *Aedes aegypti* infectados. Em maio de 2017, com a queda no número de casos no Brasil, o Governo Federal também finalizou o estado de alerta (41).

Em 2016, houve o maior registro de casos de infecção pelo ZIKV no Brasil, ultrapassando 200 mil casos prováveis (42,43). Atualmente, segundo os boletins epidemiológicos do Ministério da Saúde, o ZIKV continua circulando em nosso país, porém, com índices de incidência bem menores. Nos últimos 2 anos, a notificação não ultrapassou 10 mil casos/ano (7.119 casos prováveis até a semana epidemiológica (SE) 49, em 2020; 6.143, até a SE 47, em 2021) (44,45). Neste ano, 2022, já foram registrados 3.140 casos prováveis até a SE 17 (2/1/2022 a 30/4/2022), correspondendo a um aumento de 70,7% do número de casos do país, quando comparado ao ano passado (figura 1.1.1.2.) (46).

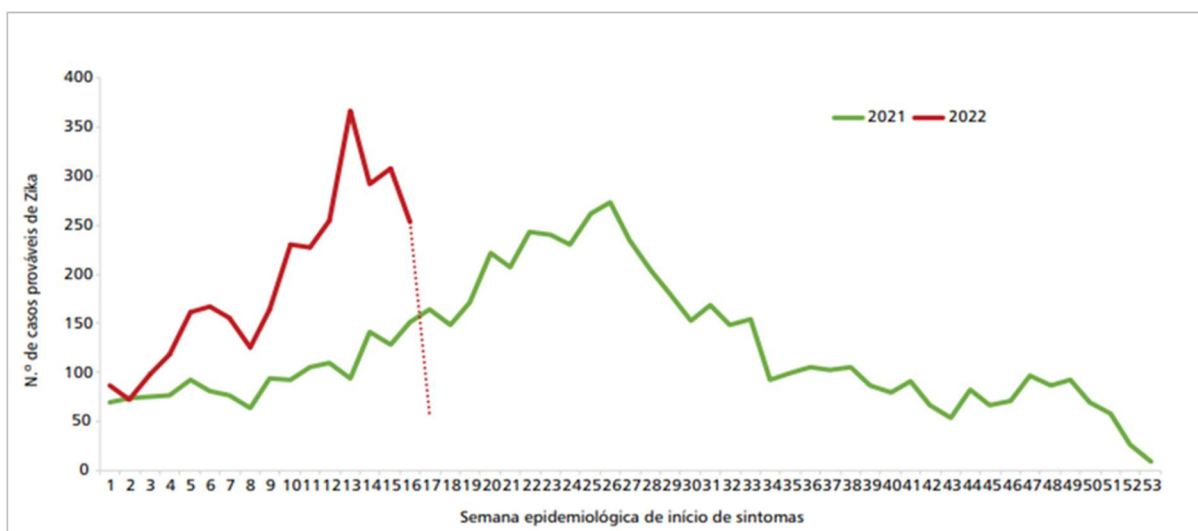


Figura 1.1.1.2. Curva epidêmica dos casos prováveis de zika no Brasil, por semana epidemiológica de início de sintomas, nos anos de 2021 e 2022 (até a SE 17). A linha verde demonstra os casos prováveis registrados durante o ano de 2021. A linha vermelha indica a notificação de casos até a SE17 de 2022. Os dados representam um aumento de 70,7% no número de casos do País em 2022, quando comparado a 2021. Adaptado de (46).

1.2. Agente etiológico: taxonomia, morfologia, organização genômica e proteínas virais

O ZIKV é um arbovírus classificado no gênero *Flavivirus* dentro da família *Flaviviridae* (47). Os flavivírus são pequenos vírus de RNA, icosaédricos, envelopados, que incluem patógenos de importância médica e veterinária, como o vírus da febre amarela (YFV), vírus da dengue (DENV), vírus do Nilo Ocidental (WNV), vírus da encefalite de St. Louis (SLEV), vírus da encefalite japonesa (JEV) e vírus da encefalite transmitida por carrapatos (TBEV) (48,49).

O ZIKV, assim como os outros flavivírus, possui RNA fita simples de polaridade positiva, com aproximadamente 11 kb de comprimento. O genoma apresenta uma longa região de leitura aberta (ORF) que codifica uma única poliproteína, que é clivada por proteases virais e celulares em três proteínas estruturais, (capsídeo – C, pré-membrana – prM, e envelope – E), e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (figura 1.2.1.) (50). As extremidades 5' e 3' do genoma apresentam duas regiões não codificantes (UTRs) de 107 e 429 nucleotídeos, respectivamente. A 5' UTR possui um cap de nucleotídeo metilado para iniciação da tradução, enquanto a 3' UTR, que não é poliadenilada, contém estruturas em forma de *loops*, que provavelmente desempenham funções diferentes durante a replicação em hospedeiros vertebrados e invertebrados (48,50,51).

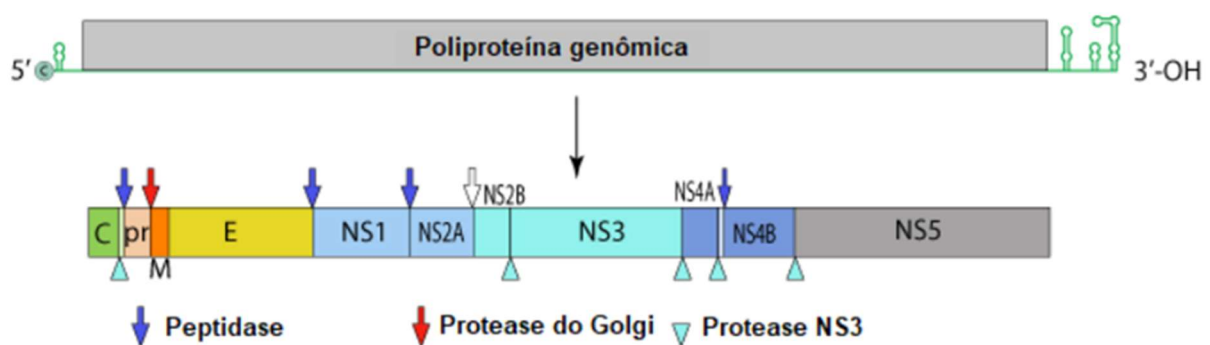


Figura 1.2.1. Organização genômica do ZIKV. O único quadro de leitura aberta (ORF) codificado no genoma viral é mostrado como uma longa barra cinza (poliproteína genômica). Na extremidade 5', um cap de nucleotídeo metilado está representado pela letra "c" dentro de um círculo verde. Estruturas secundárias em forma de alça, em verde, ocorrem nas extremidades 5' e 3'. Abaixo da ORF estão representadas as três proteínas estruturais (C, prM e E) e as sete proteínas não estruturais (NS1-5). As setas azuis e vermelhas indicam os locais de clivagem das enzimas celulares (peptidase e protease do Golgi, respectivamente) e as pontas de seta azul clara indicam os locais de clivagem da protease viral (NS3). Adaptado de (52).

Os vírions são compostos por um nucleocapsídeo envolvido por envelope lipídico. O genoma é empacotado com múltiplas cópias da proteína do capsídeo, circundado por uma bicamada lipídica e 180 cópias das glicoproteínas E e prM (figura 1.2.2). A proteína E está envolvida na ligação ao receptor celular e promoção da fusão dos vírions com o endossoma da célula hospedeira, enquanto a proteína prM auxilia no enovelamento da proteína E, como uma espécie de chaperona, e evita a fusão prematura das partículas antes de serem liberadas da célula infectada. A clivagem proteolítica de prM no peptídeo pr e proteína M promove a maturação das partículas virais (48,51).

As proteínas não estruturais, em sua maioria, têm papéis essenciais no ciclo de replicação viral. A proteína NS1 está envolvida na replicação do RNA viral, montagem de partículas e evasão do sistema imunológico do hospedeiro. NS2A também atua no processo de replicação e evasão imune. A proteína NS2B atua como cofator da proteína NS3, que, por sua vez, possui funções de protease, envolvida na replicação viral e processamento de poliproteínas, e de helicase, essencial para a ligação de RNA e hidrólise de ATP. NS4A atua na replicação viral e é um cofator de NS3. A proteína NS4B está associada a processos de replicação do RNA viral e evasão imune, enquanto a NS5 tem atividade de RNA polimerase dependente de RNA e metiltransferase, que são importantes para a síntese de RNA viral e capeamento do genoma, respectivamente (48,50,53–55).

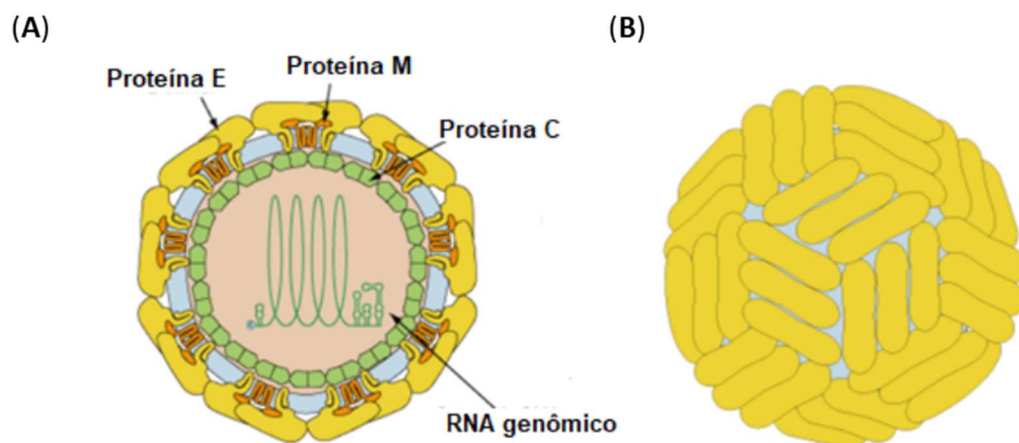


Figura 1.2.2. Estrutura do ZIKV. (A) Seção transversal, mostrando o RNA viral e as proteínas estruturais (C, M e E). (B) Simetria icosaédrica da superfície viral. Adaptado de (52).

1.2.1. Proteína de envelope (E)

A proteína E é uma glicoproteína longa de 504 resíduos dispostas na superfície viral como homodímeros antiparalelos em um padrão “espinha de peixe” com simetria icosaédrica (55,56). Cada monômero E tem duas partes topológicas: uma porção mais interna, chamada domínio transmembrana, responsável por ancorar a proteína na bicamada lipídica do vírus; e uma região superficial, denominada ectodomínio, que possui atividade de ligação ao receptor e fusão de membrana (57,58). O segmento transmembranar está dobrado em quatro α -hélices, onde as duas primeiras hélices, chamadas de haste, são anfipáticas e ficam planas na membrana viral, enquanto a terceira e a quarta atravessam a membrana como uma espiral antiparalela (59).

O ectodomínio forma três domínios estruturais: DI, DII e DIII (57,58). O domínio I (DI) está localizado centralmente no monômero de proteína E e atua como uma ponte entre os domínios II e III (58). Nesse domínio, há um sítio de glicosilação na Asn154, que pode servir como um sítio de ligação do vírus às células hospedeiras (57,58,60). O domínio II (DII) contém um *loop* de fusão em sua extremidade distal, que é responsável pela fusão entre a membrana endossomal e o envelope viral durante a entrada do vírus (58,60). No domínio III (DIII), localizado na região C-terminal da proteína, estão os sítios de ligação aos receptores celulares e o peptídeo que une o DIII de um monômero ao DII de outro monômero da proteína E (figura 1.2.1.1.) (48,58).

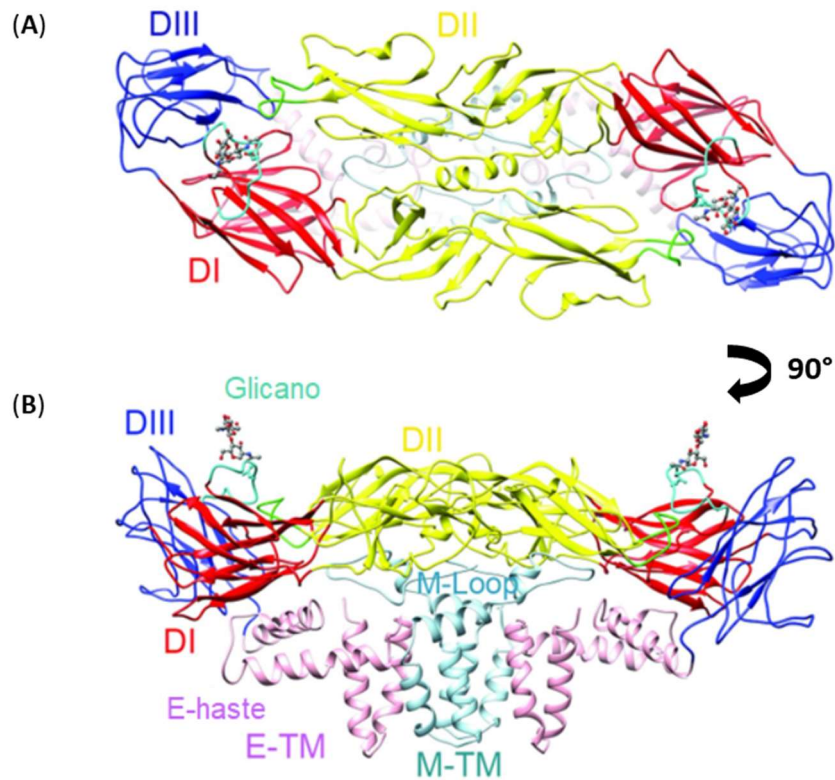


Figura 1.2.1.1. Representação da estrutura dimérica da proteína E de ZIKV. (A) Visão da região superficial, demonstrando os três ectodomínios. O domínio I está representado pela cor vermelha, o domínio II pela cor amarela e o domínio III em azul. (B) Visão lateral, evidenciando o segmento transmembranar da proteína E (E-TM e E-haste) (rosa claro) e os domínios transmembrana da proteína M (M-TM e M-loop) (verde claro). O glicano da Asn154 de cada monômero E pode ser visto projetando-se da superfície (esferas coloridas e traços cinzas). Adaptado de (57).

1.2.2. Proteína não estrutural 1 (NS1)

A proteína NS1 é uma proteína multifuncional que desempenha papéis importantes na replicação viral, patogênese do vírus e evasão do sistema imune (61,62). Ela possui 352 aminoácidos com um peso molecular aproximado de 40 a 50 kDa, dependendo do seu estado de glicosilação. No ZIKV, assim como no DENV e JEV, a NS1 apresenta dois sítios de glicosilação localizados nas asparaginas 130 e 207 (63–65). A importância da glicosilação na proteína NS1 tem sido estudada ao longo dos anos para vários flavivírus e todos os resultados indicam que o glicano ligado na posição 130 é crítico para replicação, estabilização do hexâmero e interação de NS1 com componentes do complemento, enquanto o glicano na posição 207 facilita a secreção e estabilidade de proteína extracelular (63).

A proteína NS1 existe em múltiplas formas oligoméricas e é encontrada em diferentes localizações celulares: em forma de homodímeros associados a compartimentos vesiculares intracelulares induzidos por vírus; como dímeros hidrofóbicos presentes na superfície celular; e como lipopartículas hexaméricas no meio extracelular (figura 1.2.2.1.) (66,67). Cada monômero da proteína NS1 é constituído de três domínios: um domínio N-terminal β -roll (resíduos 1-30), que contém dois β -hairpins usados na dimerização da proteína; um domínio de asa (*wing*) (resíduos 31-180); e um domínio C-terminal β -ladder (resíduos 181-352) (66). A unidade fundamental é um dímero plano em forma de cruz, formado através do β -roll entrelaçado de ponta a ponta com o β -ladder. Na face “interna” do dímero, o domínio β -roll e uma alça adjacente formam uma superfície hidrofóbica que é a principal candidata à interação com a membrana. A face “externa” é polar e contém os sítios de glicosilação. No hexâmero, três dímeros se montam com as faces polares glicosiladas apontadas para fora e as faces hidrofóbicas apontadas para dentro (65).

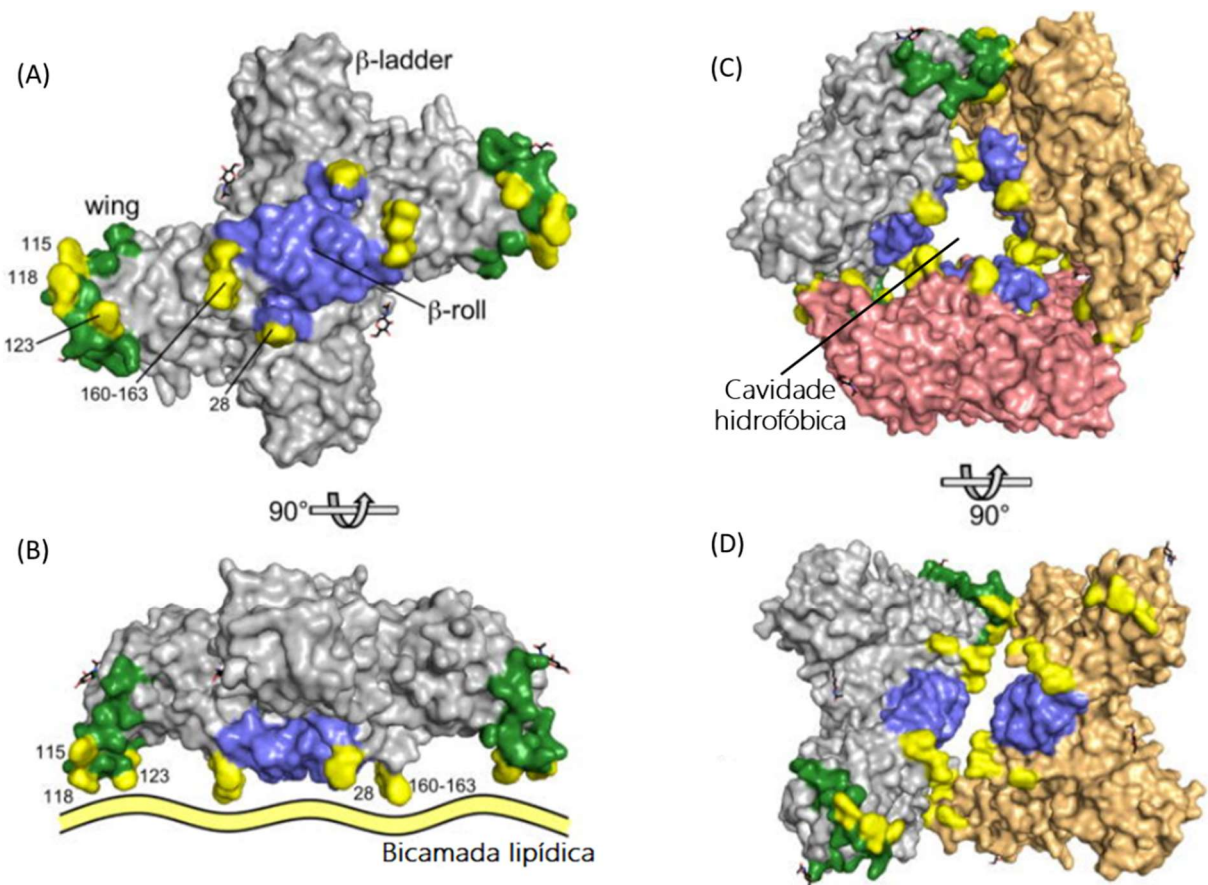


Figura 1.2.2.1. Representação superficial das formas oligoméricas da proteína NS1 do ZIKV. (A) Vista da face hidrofóbica do dímero NS1, formado por dois monômeros em cinza. Os β -rolls de cada monômero estão representados em azul; as “âncoras” aromáticas salientes (aminoácidos 28 e 160-163), em amarelo; e a alça de orientação da asa (wing), em verde. (B) Vista lateral do modelo de dímero, colorido como em (A), girado 90° em torno do eixo horizontal. O β -roll (azul) e as “âncoras” aromáticas salientes (amarelas) definem uma superfície hidrofóbica limitada, voltada para a membrana celular. (C) Vista superior do hexâmero NS1, formado por três dímeros. Os dímeros individuais estão representados nas cores cinza, laranja e salmão. Os β -rolls, as “âncoras” aromáticas salientes e a alça de orientação da asa estão coloridos conforme em (A). (D) Vista lateral do modelo de hexâmero, colorido como em (A) girado 90° em torno do eixo horizontal com o dímero de cor salmão removido para mostrar como as cadeias laterais aromáticas e o β -roll hidrofóbico revestem o interior do hexâmero. Adaptado de (65).

Intracelularmente, a NS1 existe inicialmente como um monômero, mas, após translocação para o lúmen do retículo endoplasmático, forma um homodímero associado à membrana (63,67,68). A colocalização da NS1 com o RNA fita dupla (RNAfd) e outros componentes do complexo de replicação viral sugere que essa proteína desempenhe um papel importante na replicação viral (61,62). Quando atinge a superfície celular, a proteína NS1, embora não possua um domínio transmembranar, existe como um dímero hidrofóbico ligado à membrana plasmática das células infectadas. As células infectadas secretam NS1 no espaço extracelular como uma

partícula de lipoproteína hexamérica (NS1s), formada por três subunidades diméricas ligadas a moléculas lipídicas em uma cavidade central, formando uma partícula de lipoproteína hidrofóbica. A NS1s está envolvida na evasão imune e patogênese, interagindo com componentes do sistema imune inato e adaptativo, bem como com outros fatores do hospedeiro. Nos estágios iniciais da doença aguda, a NS1s circula no sangue em altas concentrações e é altamente imunogênica. Assim, é usada como biomarcador para detecção precoce da infecção por flavivírus, incluindo ZIKV, e também como imunógeno em composições vacinais (63,66,68).

1.3. Ciclo de vida do ZIKV

O ciclo de vida do ZIKV é semelhante ao de outros flavivírus conhecidos (figura 1.3.1.). Resumidamente, os vírus se ligam à superfície da célula hospedeira por interações entre glicoproteínas de superfície viral e receptores de superfície celular e entram por endocitose mediada por clatrina. Dentro da célula, o ambiente ácido da vesícula endossomal desencadeia mudanças conformacionais no vírion, levando a fusão das membranas viral e celular e desmontagem da partícula. O RNA genômico é então liberado no citoplasma e traduzido em uma única poliproteína, que é clivada por proteases celulares e virais nas proteínas estruturais e não estruturais. A replicação do genoma viral ocorre no interior de membranas intracelulares conhecidas como pacotes de vesículas. A replicação é iniciada com a síntese de RNA de fita negativa, que serve como molde para a síntese de múltiplas cópias do RNA genômico de fita positiva. Partículas virais imaturas são formadas no lúmen do retículo endoplasmático e transitam através da rede trans-Golgi para a superfície da célula. Durante esse processo, ocorre a maturação viral, que é dependente de protease e pH, onde as proteínas E sofrem reorganização estrutural e a proteína prM é clivada em pr e M. O peptídeo pr é subsequentemente liberado do vírus. Os vírus maduros são liberados da célula por exocitose e podem infectar novas células (48,69,70).

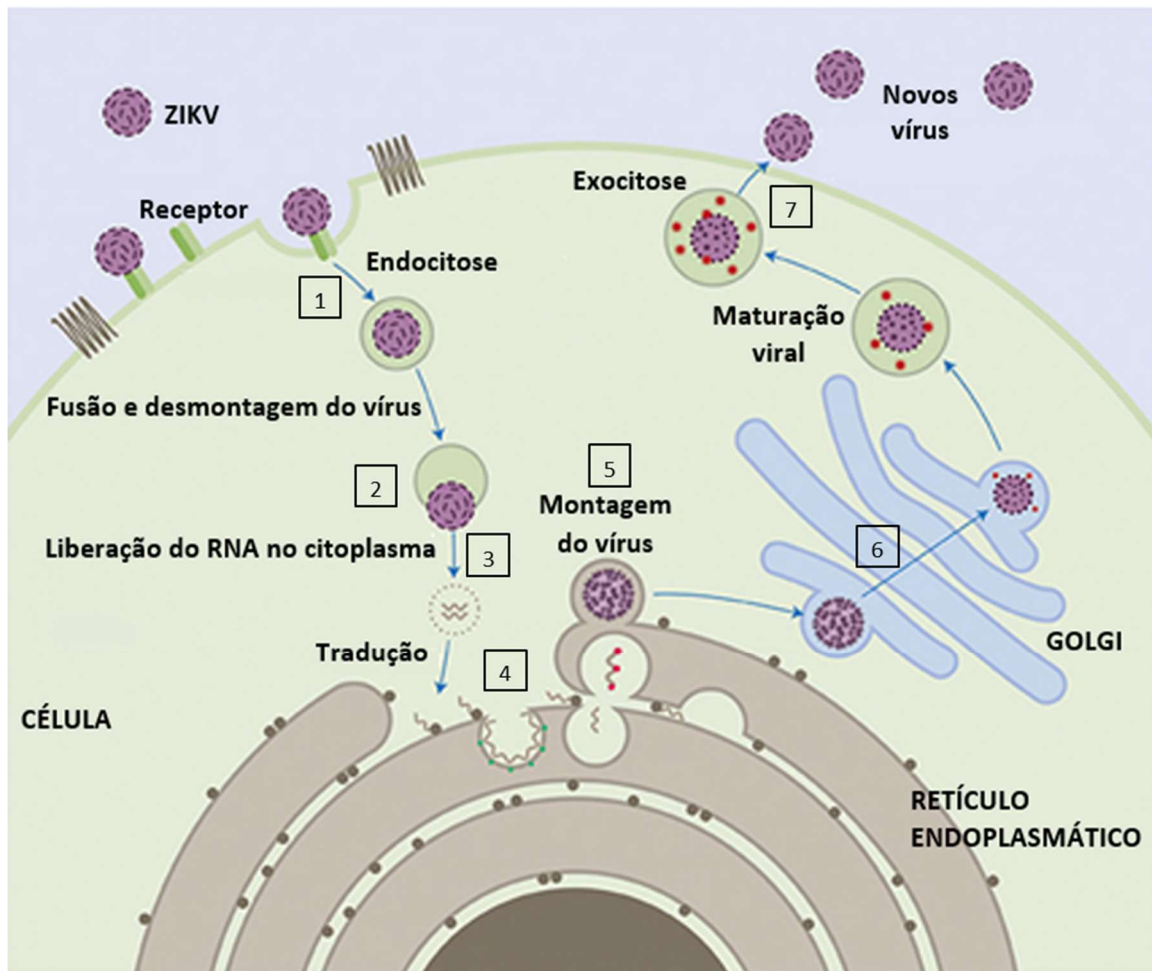


Figura 1.3.1. Ciclo de vida do ZIKV. 1- O ZIKV se liga à superfície de uma célula hospedeira e entra na célula por endocitose. 2- Uma vez dentro da célula, o vírus se funde com a membrana endossomal e é liberado no citoplasma. 3- A partícula do vírus libera o genoma viral. 4- O RNA viral é traduzido em um único polipeptídeo que é clivado em 10 proteínas e o genoma viral é replicado. 5- A montagem do vírus ocorre na superfície do retículo endoplasmático. 6- As partículas virais imaturas são transportadas através da rede trans-Golgi, onde amadurecem e se convertem em sua forma infecciosa. 7- Os vírus maduros são liberados da célula por exocitose e podem infectar outras células. Adaptado de (70).

1.4. Transmissão

O ZIKV faz parte do grupo de flavivírus transmitidos por mosquitos, sendo capaz de se disseminar através de dois ciclos de transmissão distintos, enzoótico (ou silvestre) e epidêmico (ou urbano). O ciclo enzoótico envolve primatas não humanos e mosquitos arbóreos em um habitat silvestre, enquanto o ciclo epidêmico ocorre entre humanos e mosquitos urbanos (figura 1.4.1.). A transmissão no ambiente urbano acontece pela picada de mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, que estão dispersos em quase todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo (71,72).

Embora a transmissão do ZIKV ocorra principalmente através dos mosquitos, há evidências de que o ZIKV pode ser transmitido de outras maneiras. O RNA viral já foi isolado de fluidos do corpo humano, incluindo sangue, urina, sêmen, saliva, líquido cefalorraquidiano, líquido amniótico, leite materno, placenta e tecido cerebral, possibilitando a transmissão não vetorial (73–83).

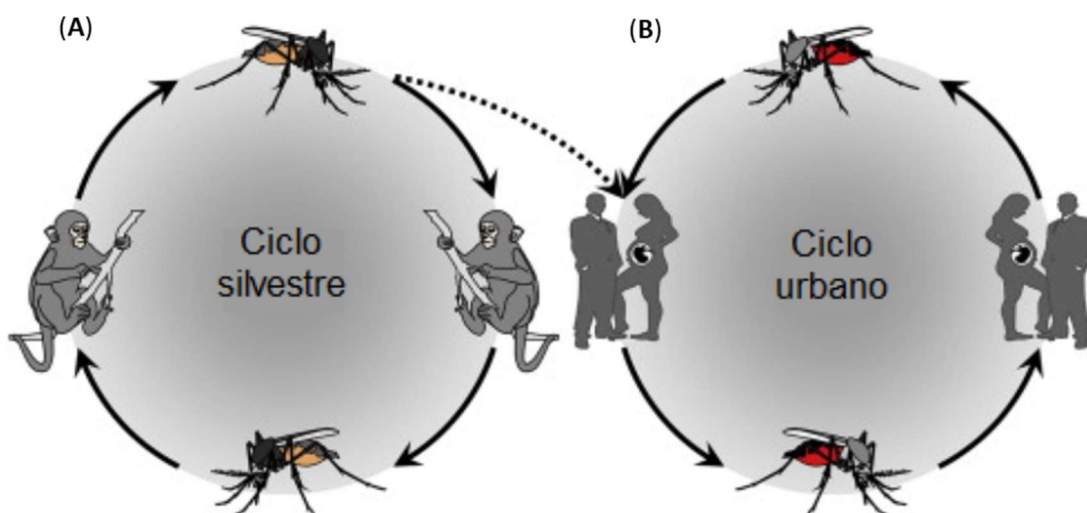


Figura 1.4.1. Ciclos de transmissão do ZIKV. Existem dois ciclos de transmissão dirigidos por mosquitos: (A) um ciclo silvestre, no qual o vírus circula entre primatas não humanos e mosquitos arbóreos; e (B) um ciclo urbano, no qual o vírus circula entre humanos e mosquitos urbanos. Sob certas circunstâncias, o ZIKV pode presumivelmente ser transmitido de primatas não humanos para humanos por meio de mosquitos arborícolas. Adaptado de (71).

1.4.1. Transmissão por transfusão sanguínea

Existe um potencial de disseminação do ZIKV por meio de transfusão de produtos sanguíneos doados por pacientes virêmicos. Em um estudo de soroprevalência durante o surto na Polinésia Francesa, em 2013-2014, o RNA viral foi detectado em 2,8 % dos doadores de sangue assintomáticos (74). A partir daí, outros estudos de triagem em bolsas de sangue também identificaram doadores virêmicos (84–86), porém nenhuma infecção pós-transfusão havia sido documentada. A confirmação foi constatada em 2016, no Brasil, em um paciente após transplante de fígado com produto sanguíneo de um doador infectado (87).

Apesar dos doadores de sangue assintomáticos poderem transmitir o ZIKV aos receptores de sangue, a infecção transmitida por transfusão é difícil de ser identificada em áreas endêmicas, pois não existem testes de triagem para zika nos postos de

coleta e a exposição a picadas de mosquito dificulta a exclusão da transmissão vetorial durante as investigações do caso (88).

1.4.2. Transmissão sexual

A possibilidade de transmissão sexual do ZIKV foi relatada pela primeira vez em 2008, quando a esposa de um cientista americano ficou doente 9 dias após o marido retornar de uma viagem ao Senegal. Na ocasião, a infecção por ZIKV no Hemisfério Ocidental ainda não havia sido relatada (89).

Em uma revisão sistemática da transmissão sexual por flavivírus, publicado em 2018 (90), a transmissão sexual por ZIKV foi relatada em 36 casais, dos quais 34 foram de homem para mulher, uma foi de mulher para homem (91) e uma de homem para homem (92). Dados sobre a duração da detecção do RNA do ZIKV no sêmen indicou uma mediana de 40 dias (IC 95 % 30–49) e máxima de 370 dias. No fluido vaginal, a duração mediana foi de 14 dias (IC 95% 7-20) e a duração máxima de 37 dias. Partículas infecciosas do vírus no sêmen humano foram detectáveis por uma duração média de 12 dias (IC 95 % 1–21), com máximo de 69 dias (90).

Semelhante aos casos de doação sanguínea, a transmissão sexual em áreas endêmicas é impossível de ser avaliada, devido à alta exposição aos mosquitos (93).

1.4.3. Transmissão vertical

A transmissão vertical do ZIKV foi sugerida pela primeira vez durante o surto na Polinésia Francesa em 2013 (19). Em 2016, durante o surto brasileiro, a transmissão intrauterina foi verificada através da detecção do RNA viral no líquido amniótico de mulheres grávidas com sintomas compatíveis com infecção pelo ZIKV (94). Posteriormente, o vírus foi isolado de cérebro fetal e placenta de mulheres grávidas provenientes de áreas endêmicas para o ZIKV que apresentavam anomalias fetais em exame ultrassonográfico, comprovando a transmissão materno-fetal do vírus (95,96).

Relatos clínicos documentam que a infecção pelo ZIKV em mulheres grávidas geralmente é seguida de anormalidades fetais, principalmente quando infectadas no primeiro trimestre. O risco de anormalidades cerebrais congênitas pode ser cerca de 50 vezes maior em mães que tiveram infecção pelo ZIKV na gravidez em comparação com aquelas que não tiveram (97).

1.5. Manifestações clínicas

A infecção aguda pelo ZIKV tem sido relatada como assintomática na maioria dos casos. Uma revisão sistemática de prevalência de casos assintomáticos mostrou uma prevalência de 61,8 % (IC 95 % 33-87) assintomáticos entre os 11.305 casos confirmados (98). Quando os sintomas estão presentes, geralmente fazem parte de uma doença leve e autolimitada, muitas vezes confundida com outras infecções arbovirais, como dengue ou chikungunya.

Após um período de incubação de até 10 dias, os sintomas típicos incluem erupção cutânea, febre, dor de cabeça, artralgia, mialgia e conjuntivite. A febre costuma ser baixa e a erupção maculopapular aparece em um padrão cefalocaudal afetando as palmas das mãos e solas dos pés. A coceira é muito comum e pode ser forte. Outros sintomas relatados com menos frequência são vômito, diarreia, vermelhidão nos olhos, fraqueza, edema, dor abdominal, perda de apetite e hematospermia. Na maioria dos casos, a duração total da doença é de 5 a 7 dias (51,72,99).

Apesar da maioria dos pacientes com zika evoluírem para cura sem maiores problemas, complicações neurológicas graves em fetos, neonatos e adultos têm sido associadas a infecção (39,70,100).

1.5.1. Síndrome de Guillain-Barré (SGB)

A síndrome de Guillain-Barré foi a primeira complicação grave relatada na infecção pelo ZIKV em adultos. A SGB é uma neuropatia paralítica aguda caracterizada por uma resposta autoimune aberrante direcionada aos nervos periféricos, que leva à fraqueza muscular e paralisia, podendo causar incapacidade vitalícia ou morte devido ao envolvimento muscular respiratório (101,102).

A ligação entre o ZIKV e a SGB foi inicialmente descrito na Polinésia Francesa, em 2013, em uma mulher polinésia (20) e em um estudo caso-controle realizado pós-epidemia (100). Em abril de 2015, com a chegada do zika ao Brasil, foi percebido aumento de casos neurológicos no nordeste brasileiro (38,103). E, pela primeira vez, foi confirmado o diagnóstico laboratorial molecular da infecção por ZIKV em indivíduos com SGB (31).

Observações adicionais de aumento da incidência de SGB também foram descritas em outros países das Américas, incluindo Colômbia, República Dominicana,

El Salvador, Polinésia Francesa, Honduras, Suriname e Venezuela (104). Em março de 2017, 23 países ou territórios já haviam relatado aumento da incidência de síndrome de Guillain-Barré ou confirmação laboratorial de infecção pelo ZIKV entre os casos de SGB (93).

A incidência da SGB associada ao ZIKV foi estimada em 2 a 3 casos por 10.000 infecções por ZIKV, em um estudo realizado, em 2018, com base em dados de 11 locais com surtos confirmados de zika e relatos de casos de SGB potencialmente associados (105). No Brasil, em 2015, um total de 1.708 casos de SGB foram registrados em todo o país, representando um aumento de 19% em relação ao anos anterior (39). O prognóstico da SGB associada ao ZIKV era dito como semelhante ao associada a outros processos infecciosos ou não infecciosos, no entanto, os achados de um estudo caso-controle, realizado por Musso e colaboradores, sugerem que a SGB associada ao ZIKV resulta em maior morbidade e neuropatia craniana mais frequente (106).

1.5.2. Síndrome Congênita do Zika (SCZ)

O termo “Síndrome Congênita do zika” foi adotado para descrever um conjunto de anomalias congênitas, estruturais e funcionais, com repercussões no crescimento e desenvolvimento dos embriões ou fetos cujas mães tiveram infecção confirmada pelo ZIKV durante a gestação (99,107). As manifestações congênitas do ZIKV incluem microcefalia; anormalidades cerebrais (calcificações subcorticais, ventriculomegalia, afinamento cortical, anomalias do padrão girial, hipoplasia do cerebelo ou anomalias do corpo caloso); achados oculares (microftalmia, coloboma da íris, catarata, calcificações intraoculares, atrofia coriorretiniana, manchas pigmentares focais da retina e atrofia/anomalias do nervo óptico); contraturas congênitas; e comprometimento neurológico (deficiências motoras e cognitivas, convulsões, dificuldades de deglutição e perda auditiva neurossensorial) (figura 1.5.2.1.) (108).

A associação entre infecção por ZIKV e microcefalia foi suspeitada pela primeira vez em Pernambuco, Brasil, onde se observou um grande aumento na incidência de microcefalia após a incursão do ZIKV no país (109,110). Em seguida, outros estados do nordeste também relataram aumento do número de crianças com microcefalia (110). Em novembro de 2015, o Ministério da Saúde brasileiro confirmou a relação entre o ZIKV e o surto de microcefalia na região nordeste a partir da identificação da presença do ZIKV em amostras de sangue e tecidos de um recém-

nascido que foi a óbito no estado do Ceará (111). Desde outubro de 2015 a dezembro de 2016, diversos países haviam notificado casos confirmados de SCZ ou microcefalia associada ao zika, incluindo Estados Unidos da América, Panamá, Colômbia, França, Paraguai, República Dominicana, Costa Rica, El Salvador, Canadá, Suriname, Guatemala, Trindade e Tobago, Bolívia, Argentina e Nicarágua (30).

Entre os anos de 2015 e 2021, foram notificados ao Ministério da Saúde brasileiro 20.444 casos suspeitos de SCZ, dos quais 1.834 foram confirmados e 13,4 % (246/1.834) foram a óbito. Em 2021, seis casos foram confirmados, quatro foram a óbito e 496 (61,9 %) continuam sob investigação (107).

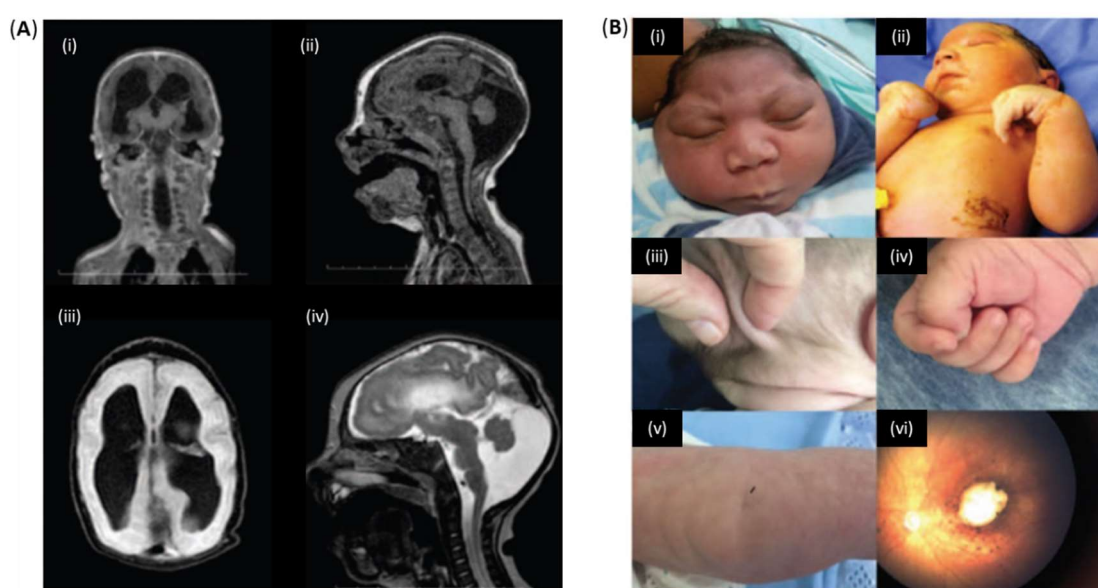


Figura 1.5.2.1. Neuroimagem e sequelas clássicas observadas na síndrome congênita do ZIKV. (A) Imagens de ressonância magnética de crânio com microcefalia. (A.i) desproporção craniofacial; (A.ii) redução da espessura da substância branca ; (A.iii) Atrofia do vermis cerebelar; (A.vi) Alargamento dos espaços perivasculares dos hemisférios cerebelares, com gliose circundante. (B) Sequelas da SCZ. (B.i) microcefalia desproporcional; (B.ii) artrogripose ao nascimento; (B.iii) couro cabeludo redundante; (B.iv) polegar cortical; (B.v) fôvea do joelho; e (B.vi) retina infantil esquerda com hipoplasia do disco óptico, atrofia peripapilar; atrofia coriorretiniana macular com aspecto colobomatoso com halo hiperpigmentado e mosqueado pigmentar. Adaptado de (112).

1.6. Prevenção e controle

Nenhuma vacina e/ou medicamentos antivirais para prevenir ou tratar a infecção por ZIKV estão licenciados até o momento. As recomendações para a proteção da população em geral são baseadas principalmente na prevenção contra picadas de mosquito e controle de vetores, através da utilização de repelente de

insetos de uso tópico, uso de camisas de manga comprida e calças compridas, higiene, limpeza e cobertura de reservatórios de água e eliminação de recipientes com água parada, instalação de telas em janelas e portas, e a implementação de programas de controle de mosquitos. O atendimento aos pacientes com infecção aguda é focado no tratamento de seus sintomas, incluindo acetaminofeno para febre e dor e anti-histamínicos para prurido (106,113).

Atualmente, várias plataformas de produção de vacina contra o ZIKV estão em desenvolvimento, incluindo as tradicionais (vacinas de vírus vivos atenuados, vacinas inativadas, vacinas recombinantes, vacinas de subunidades) e as mais novas (formulações baseadas em RNA mensageiro, DNA, proteínas e vetores) (113–115). Mais de 10 vacinas candidatas foram para os ensaios clínicos de fase 1 e uma iniciou os ensaios clínicos de fase 2 (115). A vacina mais avançada até o momento é uma vacina de DNA baseada em plasmídeo que codifica as proteínas prM e E de ZIKV, que prosseguiu para testes de eficácia de fase 2 (116).

Uma vacina segura e eficaz é uma prioridade de saúde pública. Os principais problemas são a durabilidade incerta de uma resposta imune humana protetora, o impacto potencial das reações cruzadas de anticorpos induzidas por vacinas com outros flavivírus e os ensaios realizados no contexto de surtos em rápida mudança (99). Além disso, um desafio importante é o desenvolvimento de uma vacina que possa ser administrada em gestantes (117).

1.7. Diagnóstico

O diagnóstico correto da infecção por ZIKV é essencial para o manejo clínico e epidemiológico das infecções por zika. Entretanto, a semelhança sintomática com outras infecções arbovirais e a reação cruzada com outros flavivírus dificultam o diagnóstico preciso, podendo levar a um manejo inadequado e eventos fatais (51).

No início de 2022, a OPAS e os países da Região das Américas elaboraram um documento denominado “Diretrizes para o diagnóstico clínico e o tratamento de dengue, chikungunya e zika” como parte do esforço para reduzir a gravidade dessas doenças e prevenir a morte (118). Estas diretrizes apresentam, de forma clara e simples, respostas para perguntas-chaves relacionadas ao diagnóstico e manejo clínico dessas três enfermidades (118).

O diagnóstico laboratorial da infecção aguda do ZIKV é feito principalmente através de ensaios moleculares, incluindo RT-PCR e outros testes de amplificação de

ácido nucleico (NAT) (51,119). O RNA viral pode ser detectado no sangue (sangue total, soro, plasma), urina, saliva, líquido cefalorraquidiano e outros fluidos corporais (73,76–78,120–122). A viremia dura em torno de 3 a 5 dias, podendo se estender para 10 dias após o início dos sintomas no plasma e 26 dias no sangue total (122). Na urina, o RNA do ZIKV foi detectado acima de 10 dias pós início da doença, com relatos de detecção por mais de 30 dias (121–123). No sêmen tem sido observado liberação prolongada do genome viral, podendo ser encontrado por 1 a 3 mês, com casos de detecção de até 6 meses. (121,124–126).

Os testes sorológicos para detecção de IgM e IgG são recomendados para soros coletados após a segunda semana do início dos sintomas. No entanto, a interpretação dos resultados pode ser difícil devido à reatividade cruzada em pessoas infectadas ou vacinadas contra outros flavivírus, podendo produzir resultados falso-positivos (127–129). Resultados positivos em testes de IgM com resultados negativos de NAT devem ser confirmados através de Teste de Redução de Neutralização em Placa (PRNT), principalmente em gestantes (119).

1.8. Aptâmeros

O termo aptâmero foi criado por Ellington e Szostak no ano de 1990 e é derivado da palavra latina *aptus*, que significa ajustar, e da expressão grega *meros*, que significa parte (130). Os aptâmeros são oligonucleotídeos de fita simples constituídos de DNA ou RNA capazes de se ligar a uma grande variedade de alvos, (incluindo íons, compostos químicos, proteínas, células e microrganismos inteiros) sendo caracterizados por adquirirem uma conformação tridimensional que lhes confere elevada especificidade e afinidade com a molécula alvo (figura 1.8.1.) (131). Semelhante ao reconhecimento conformacional que medeia o reconhecimento anticorpo-antígeno e a formação de complexos, os aptâmeros se ligam a seus alvos cognatos de forma não covalente, por meio de vários tipos de interação, como forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e ligações entre as bases complementares (132,133). Assim, os aptâmeros são explorados funcionalmente como antagonistas, agonistas ou ligantes de direcionamento e também são chamados de “anticorpos químicos” (132,134).

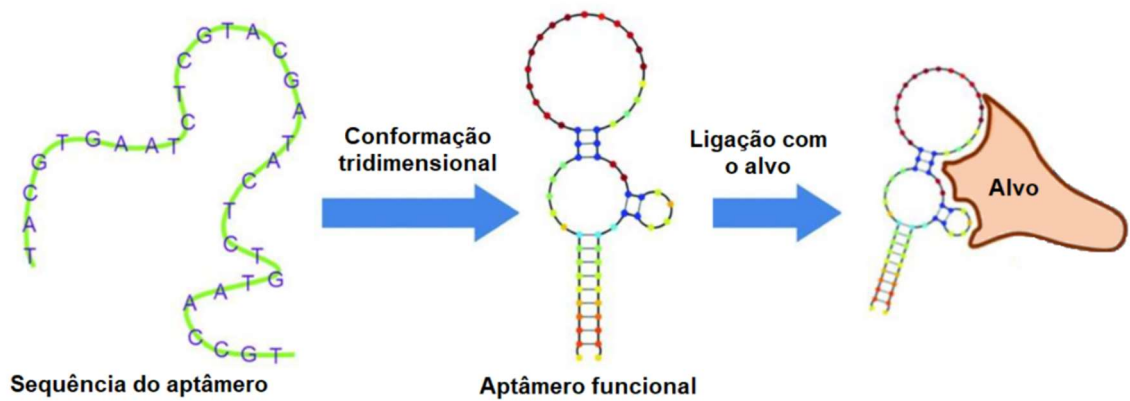


Figura 1.8.1. Diagrama esquemático da conformação de um aptâmero de ácido nucleico e sua ligação com o alvo para formação do complexo alvo-aptâmero. O aptâmero se dobra em uma estrutura 3D, que interage com a molécula alvo, resultando em um complexo alvo-aptâmero estável. Adaptado de (135).

Descritos pela primeira vez em 1990 por duas equipes independentemente, Ellington e Szostak e Tuerk e Gold, os aptâmeros são gerados *in vitro* por um procedimento conhecido como Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial (SELEX) (130,136). O método baseia-se em mecanismos usualmente atribuídos ao processo de evolução, ou seja, variação, seleção e replicação (136). O processo inclui várias rodadas de amplificação e enriquecimento que permitem a seleção de aptâmeros com alta afinidade, específicos para um determinado alvo, a partir de um conjunto de oligonucleotídeos aleatórios (figura 1.8.2.) (137).

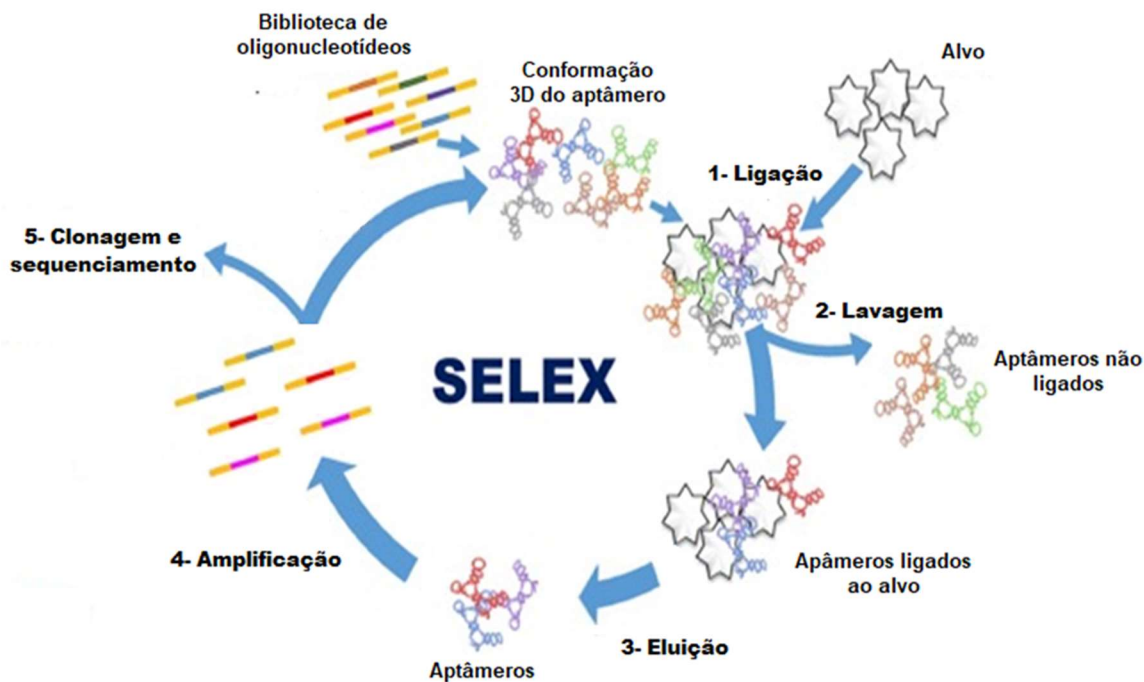


Figura 1.8.2. Diagrama esquemático do processo SELEX. (1) Incubação da biblioteca inicial com alvo específico, (2) separação das sequências não ligadas, (3) eluição de sequências ligadas, (4) amplificação de sequências eluídas e (5) clonagem e sequenciamento. Adaptado de (132).

O processo de seleção começa com a síntese de uma biblioteca de ácidos nucleicos, obtida por química combinatória, constituída por pelo menos 10^{14} a 10^{15} moléculas de DNA fita simples (DNAfs) ou RNA, flanqueada por sequências conhecidas (*primers*), que são usadas para amplificação (138,139). Cada oligonucleotídeo linear possui uma sequência única que adquire estrutura tridimensional dependendo das condições experimentais (pH, força iônica, temperatura etc.) e da presença de um ligante (140).

O primeiro ciclo do SELEX é iniciado com a incubação da biblioteca diretamente com o alvo. O alvo pode ser imobilizado, utilizando esferas magnéticas, coluna de afinidade, placas de microtitulação, ou ainda, estar livre em solução (139–141). Após a incubação, os aptâmeros não-ligantes são descartados e os oligonucleotídeos ligados ao alvo são eluídos e amplificados por PCR (DNAfs SELEX) ou RT-PCR (RNA SELEX) (132,140). Em seguida, esse novo e enriquecido conjunto de aptâmeros é submetido à próxima rodada de seleção. Após 8 a 20 ciclos de seleção, os aptâmeros enriquecidos são identificados por clonagem e sequenciamento de clones individuais, ou, mais recentemente, por métodos de sequenciamento de alto rendimento e análise de bioinformática (132,142). As sequências são investigadas quanto à sua capacidade

de se ligar ao alvo usando ensaios que caracterizam afinidades e especificidades da ligação, como, por exemplo, ressonância plasmônica de superfície, espectroscopia de fluorescência ou termoforese em microescala (143–145).

A fim de melhorar a especificidade do aptâmero, etapas de seleção negativa (contraseleções) podem ser adicionadas durante o processo SELEX, para remover aptâmeros que se liguem ao suporte do ligante e a estruturas semelhantes à do alvo (132,139,140). Além disso, modificações pós-SELEX podem ser realizadas para aumentar a estabilidade dos aptâmeros selecionados, para otimizar os parâmetros de ligação ao alvo e também para utilização na detecção ou imobilização em testes diagnósticos (140).

Embora aptâmeros de DNA e RNA possuam afinidade e especificidade similar, as bibliotecas de RNA foram preferencialmente usadas na maioria dos primeiros protocolos SELEX, com base na crença de que o RNA poderia dobrar em motivos mais funcionais, resultando em ligantes de maior afinidade (146). No entanto, evidências acumuladas sugerem que o DNA fita simples (DNAs) exibe capacidade comparável em formar estruturas terciárias complexas (131). Além disso, os aptâmeros de DNA apresentam vantagens em relação aos seus homólogos de RNA. Primeiramente, o DNA é mais estável química e biologicamente, o que facilita tanto a seleção quanto a aplicação. Em segundo lugar, o SELEX baseado em DNA é mais eficaz em termos de custo e tempo, pois não necessita de uma etapa extra de transcrição reversa, essencial para RNA SELEX. Por último, do ponto de vista da comercialização, o DNA é mais fácil de sintetizar e é mais robusto que o RNA em termos de vida útil (147). Assim, as bibliotecas de DNA estão sendo usadas com mais frequência em estudos SELEX recentes (131).

Os aptâmeros possuem diversas vantagens que os tornam ferramentas atraentes para várias aplicações originalmente desenvolvidas para anticorpos. Na clínica, sua aplicabilidade é potencialmente superior à dos anticorpos monoclonais, pois são praticamente não imunogênicos e não tóxicos *in vivo* e, devido ao seu tamanho reduzido, possuem penetração tecidual superior, aumentando seu índice terapêutico (140,148). Além disso, por serem produzidos *in vitro*, o processo de produção é mais rápido, mais barato e quase não apresenta variação lote a lote, o que facilita sua adequação à industrialização (136,140).

Os aptâmeros são fáceis de serem modificados e conjugados com uma variedade de moléculas repórter, ligantes e outros grupos funcionais, facilitando sua utilização em aplicações analíticas, como a cromatografia, os imunoenaios do tipo

ELISA, os biossensores e a PCR de afinidade (139,140,149). Uma outra grande vantagem é sua estabilidade em temperaturas elevadas. Os aptâmeros recuperam sua conformação nativa e podem se religar aos alvos, enquanto os anticorpos sofrem facilmente desnaturação irreversível quando expostos a altas temperaturas. Assim, os aptâmeros podem ser usados em uma grande variedade de condições de ensaios (140,148).

Uma vantagem inquestionável é a possibilidade de gerar aptâmeros contra moléculas tóxicas ou com baixa imunogenicidade, que é difícil no caso de anticorpos monoclonais selecionados por métodos tradicionais, por causa da imunização obrigatória dos animais. Além disso, os aptâmeros mostram uma alta afinidade e especificidade para alguns ligantes que não podem ser reconhecidos por anticorpos, como íons ou pequenas moléculas, indicando que o emprego de aptâmeros como componentes de reconhecimento pode ampliar as aplicações dos biossensores (140,148).

Em 2005, Proske e colaboradores realizaram uma revisão elucidando os avanços ocorridos no campo dos aptâmeros e demonstrando que estes oligonucleotídeos são ferramentas valiosas para diagnósticos, processos de purificação, validação de alvos, descoberta de medicamentos e até abordagens terapêuticas (149). Na área de virologia, revisões recentes descreveram abordagens diagnósticas e terapêuticas oferecidas pelos aptâmeros contra diversos vírus de importância para a saúde pública (142,150). Recentemente (julho de 2021), foi iniciado na Indonésia o primeiro estudo com ensaios clínicos utilizando aptâmeros para o diagnóstico do SARS-CoV-2. A proposta é utilizar um teste baseado em aptâmeros ligados a nanopartículas de ouro que tem como alvo a proteína S1 *spike* na superfície do SARS-CoV-2. O teste leva aproximadamente 15 minutos, sendo muito mais rápido do que o método RT-PCR, e pode ser utilizado em áreas com infraestrutura limitada, sem procedimentos invasivos para a coleta de amostras (somente exame de saliva) (150,151). Este estudo é um marco na área de aptâmeros para vírus (150).

1.9. Justificativa

O ZIKV, por ser um arbovírus transmitido por mosquitos do gênero *Aedes*, tem se propagado na mesma rota de dois outros vírus, DENV e CHIKV (152). Essa cocirculação já foi documentada na Polinésia Francesa (153), na América Latina

(154,155), na Ásia (156), na África (157) e em várias ilhas do Pacífico, locais onde DENV e CHIKV são endêmicos (120). No Brasil, a circulação concomitante dessas três arboviroses tem ocorrido desde 2015 (158). O diagnóstico diferencial tem sido um grande desafio, visto que a semelhança nos sintomas dessas viroses torna o diagnóstico clínico, muitas vezes, inconclusivo e os ensaios sorológicos disponíveis apresentam considerável reação cruzada com outros flavivírus (127,128). O diagnóstico da infecção por ZIKV é realizado principalmente através de ensaios moleculares (51,119), que são aplicados durante o período de viremia (de 3 a 5 dias).

Embora, atualmente, venha sendo observado uma redução nos casos de zika, o boletim epidemiológico Vol.53 Nº19, do Ministério da Saúde, demonstra que os casos prováveis de zika aumentaram em aproximadamente 70% em 2022 (até SE 17), quando comparado ao mesmo período de 2021 (46). Como pouco se sabe sobre o nível de susceptibilidade da população, a possibilidade de ocorrência de novos surtos e aparecimento de sequelas graves não podem ser descartados. Para uma vigilância epidemiológica eficiente, faz-se necessário o desenvolvimento e/ou aprimoramento de ferramentas de diagnóstico de baixo custo e fácil execução, que sejam sensíveis e específicos, permitindo tanto o diagnóstico precoce em grávidas, para o acompanhamento da gestação, como a detecção de infecção tardia, para identificação de populações imunes e susceptíveis (35).

Nesse sentido, sabendo que os aptâmeros têm sido utilizados como candidatos promissores para ensaios de diagnóstico, apresentando alta afinidade e especificidade, investimos na seleção de aptâmeros específicos para antígenos e anticorpos do ZIKV, a fim de utilizá-los na composição de kits diagnósticos de detecção recente, evitando reações cruzadas e agilizando o diagnóstico em campo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Selecionar e caracterizar aptâmeros capazes reconhecer o ZIKV, a proteína NS1 (glicosilada e não glicosilada) e anticorpos monoclonais contra NS1, com a finalidade de utilização futura em diagnóstico laboratorial sem reatividade cruzada com outros flavivírus.

2.2. Objetivos Específicos

- Produzir o vírus Zika em células Vero CCL-81 e purificá-lo por cromatografia líquida, para utilização como alvo nos ensaios de seleção de aptâmeros para partícula viral íntegra;
- Selecionar aptâmeros específicos para a partícula viral, para proteína NS1 (glicosilada e não glicosilada) e para anticorpos monoclonais contra NS1 do ZIKV, a partir de uma biblioteca de DNA fita simples, utilizando a metodologia SELEX;
- Sequenciar e avaliar a estrutura secundária e terciária dos aptâmeros selecionados, utilizando os programas UNAFold, RNAComposer e Chimera;
- Simular o encaixe molecular dos aptâmeros e seus alvos, pelo programa HDock;
- Avaliar a interação da ligação aptâmero-alvo utilizando testes de ELISA;
- Caracterizar a afinidade da ligação aptâmero-alvo, utilizando a técnica de espectroscopia de fluorescência e/ou termoforese em microescala e/ou calorimetria de titulação isotérmica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Produção viral

3.1.1. Vírus Zika

O isolado viral utilizado nesse estudo foi o vírus zika ES2916/2015 (GenBank: KX212103.1; SisGen: A6E5819), proveniente do Espírito Santo.

Inicialmente, foi realizado uma cinética viral, a fim de avaliar o perfil de replicação do isolado de ZIKV. O experimento foi realizado em duplicata, utilizando garrafas de 175 cm² contendo 4 x 10⁴ células Vero CCL-81 (ATCC) por cm² mantidas em meio livre de soro para produção de vírus (VP-SFM) (Thermo Fisher Scientific) suplementado com 4 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich) e 4 mg/mL de gentamicina

(Novafarma). O vírus foi inoculado usando duas multiplicidades de infecção (MOI) diferentes, 0,02 e 0,002, e incubado em estufa de CO₂ a 37 °C por uma hora. Em seguida, o inóculo foi removido, a monocamada celular lavada com PBS e 75 mL de meio VP-SFM suplementado com 4 mM de L-glutamina e 4 mg/mL de gentamicina foi adicionado. O primeiro ponto de coleta foi oito horas pós-infecção (hpi), posteriormente a coleta ocorreu a cada 24 hpi até totalizar 168 hpi. O título viral foi calculado por ensaio de titulação baseado na quantificação de unidade formadora de placas de lise (PFU) em células Vero mantidas em meio 199 (Thermo Fisher Scientific) suplementado com 5 % de soro fetal bovino (SFB) (Thermo Fisher Scientific) e 4 mg/mL de gentamicina. Brevemente, 200 µL do vírus diluído seriadamente na ordem 10 foi incubado por 1 h em monocamada celular cultivada em placas de 6 orifícios com 24 h de antecedência. O inóculo foi removido e as células foram cobertas com meio 199 contendo 2 % de carboximetilcelulose (Sigma-Aldrich), 5 % de soro fetal bovino (SFB) e 4 mg/mL de gentamicina. Quatro dias após a infecção, as células foram fixadas com formaldeído (Merck) a 5 % e coradas com cristal violeta a 0,04 % (Sigma-Aldrich) para visualização das placas de lise.

A produção do ZIKV ES 2916/2015 foi realizada utilizando o *input* viral e o tempo de coleta selecionados após os resultados de cinética. Após o período de incubação, os sobrenadantes das garrafas foram coletados, misturados e clarificados por centrifugação a 3000 x g por 10 min. A suspensão viral clarificada foi submetida a uma etapa de purificação de cromatografia líquida, em Äkta Purifier 10 Chromatograph (GE Healthcare), utilizando cromatografia de troca iônica (membrana Sartobind Q75, Sartorius) com eluição em tampão Tris-HCl 50 mM/NaCl 300 mM/D-sorbitol 8 %, pH 8,5. O material purificado foi titulado por ensaio de placa, aliquoteado em microtubos e armazenado a -80°C.

3.1.2. Outros flavivírus

Outros flavivírus utilizados foram: vírus da febre amarela/FA 17DD (cepa vacinal purificada - GenBank: DQ100292.1); vírus dengue 1/WestPac (GenBank: U88535.1); vírus dengue 2/S16803 (GenBank: GU289914.1); vírus dengue 3/16562 (GenBank: KU725665.1) e vírus dengue 4/TVP360 (GenBank: KC963424.1). Todos de origem estrangeira e cedidos pelo Laboratório de Tecnologia Viroológica (LATEV) (Bio-Manguinhos/Fiocruz), onde foram propagados.

A produção viral também foi realizada utilizando culturas de células Vero CCL-81 (ATCC) em sistema de garrafas estacionárias de 175 cm², seguindo o protocolo básico de infecção viral. Resumidamente, os vírus foram inoculados, adsorvidos e as garrafas foram incubadas a 37 °C até o momento da coleta. A data da coleta foi escolhida de acordo com a cinética viral de cada vírus. O sobrenadante de cada produção viral foi clarificado por centrifugação a 3000 x g por 10 min, aliquotado e armazenado a -80°C.

3.2. Proteína recombinante NS1 do ZIKV

A proteína recombinante NS1 utilizada neste trabalho foi obtida de duas fontes distintas: comercial (MyBioSource), proteína glicosilada, e *in house*, proteína não-glicosilada.

3.2.1. Proteína recombinante NS1 glicosilada do ZIKV (rNS1zg)

A proteína NS1 glicosilada foi comercialmente adquirida através da empresa MyBioSource (número do catálogo MBS319788), sendo produzida pelo sistema de expressão em baculovírus em células de insetos.

3.2.2. Proteína recombinante NS1 não-glicosilada do ZIKV (rNS1z)

A proteína recombinante NS1 não-glicosilada (rNS1z) foi produzida pelo Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER) (Bio-Manguinhos/Fiocruz), através da utilização da cepa de expressão *Escherichia coli* BL21 Star (DE3).

O gene que codifica a proteína NS1 do ZIKV (NS1z) foi amplificado a partir de um *amplicon*, cedido pelo LATEV (ZK10F-ZK16R), utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos. Em seguida, o gene NS1z foi clonado no vetor de expressão PET100-D/TOPO (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. Células *E. coli* TOP10 foram transformadas com o produto da ligação (NS1z + PET100-D/TOPO) e os clones recombinantes foram selecionados em placas contendo meio Luria Bertani (LB)/agar/ampicilina (100 µg/mL). Os clones selecionados foram sequenciados usando o kit *Big Dye* versão 3.1 e o sequenciador ABI Genetic Analyzer 3500XL. Os clones que apresentaram o inserto com 100 % de identidade nucleotídica com a sequência molde foram transformados na célula *E. coli* BL21 Star (DE3) e as colônias de cada clone foram selecionadas e cultivadas em meio Terrific Broth (TB) contendo 1 % de glicose e 100 µg/mL de ampicilina, por 6 h a 37 °C e 200 RPM. Os clones de *E. coli* BL21 Star (DE3) contendo o inserto pET100-D/TOPO/NS1z foram submetidos a testes de expressão e solubilidade.

Para a expressão da proteína recombinante NS1 de zika (rNS1z), as bactérias Star (DE3)/pET100-D/TOPO/NS1z foram cultivados em meio TB suplementado com 1 % glicose e 100 µg/mL ampicilina, a 37°C sob agitação de 200 rpm. A cultura foi induzida com 1 mM de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG - Sigma-Aldrich) e mantida por mais 4 h a 37°C. Ao final do processo a cultura foi centrifugada a 3.220 X

g por 15 min e o sobrenadante descartado. O precipitado bacteriano foi ressuspenso em tampão Tris-HCl 20 mM contendo 6 M de ureia pH 8,0, centrifugado a 12.000 x g, 20 min, 4 °C e o sobrenadante foi filtrado em filtro millipore PVDF Millex GV 0,22 µm.

A proteína rNS1z foi purificada por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC), utilizando o equipamento FPLC Akta Pure (GE Healthcare Life Sciences), coluna HisTrap HP 5 mL (GE Healthcare Life Sciences) e fluxo de 5 mL/min, em tampão contendo Tris-HCl 20 mM/uréia 6 M, e eluída com 500 mM de imidazol. Em seguida, a proteína foi dialisada no cassete de diálise Slide-A-Lyzer com *cut off* de 10 kDa (Thermo Scientific Pierce) em tampão Tris-HCl 20 mM/uréia 2 M, pH 8,0 e quantificada pelo método do ácido bicinconínico (BCA) utilizando o “kitPierce® BCA Protein Assay” (Thermo Scientific Pierce), de acordo com as recomendações do fabricante. Após a diálise, a proteína foi avaliada por eletroforese em gel de SDS-Page 12%, para verificar o tamanho da banda (aproximadamente 43 kDa). Sua homogeneidade foi avaliada por densitometria usando o equipamento “GS-800 Calibrated Densitometer” (Bio-Rad) e o software “Quantity One” (Bio-Rad).

3.3. Proteína recombinante NS5 do ZIKV

A proteína recombinante NS5 (rNS5z) do ZIKV foi produzida pelo Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER) (Bio-Manguinhos/Fiocruz). Brevemente, uma região de nucleotídeos responsável pela expressão de parte da região C-terminal da proteína NS5 (aminoácidos 481 a 718, NC_012532.1, YP_009227205) foi clonada no vetor pET28a. Os plasmídeos recombinantes foram inseridos na cepa de expressão *Escherichia coli* BL21 Star (DE3) e a proteína recombinante foi expressa a partir da indução com IPTG. A purificação da proteína NS5 foi realizada por IMAC utilizando coluna HiTrap HP (GE Healthcare Life Sciences), sistema de cromatografia líquida (FPLC – Akta Pure), em tampão HEPES 25 mM/NaCl 200 mM/n-lauril-sarcosil 1% pH7,0 e eluição com 500 mM de imidazol. Em seguida, a proteína foi dialisada em PBS/5% glicerol pH7,4 e HEPES 25 mM/NaCl 200 mM/5% glicerol pH7,0. A proteína purificada foi quantificada pelo método do BCA e sua homogeneidade foi avaliada por densitometria.

3.4. Proteína recombinante NS1 do vírus da febre amarela

A proteína recombinante NS1 do vírus da febre amarela (rNS1FA) foi produzida pelo Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER) (Bio-Manguinhos/Fiocruz). Resumidamente, o gene de interesse foi clonado no vetor pET100 e os plasmídeos contendo a construção pET100/NS1FA foram expressos em *E. coli* BL21 DE3 Star, a partir da indução com IPTG. A proteína rNS1FA foi purificada por IMAC, com coluna HP HisTrap (GE Healthcare) no Akta Purifier 10 (GE Healthcare), de acordo com as recomendações do fabricante. A coluna foi previamente equilibrada com 5 volumes de coluna do tampão de ligação (Tris 50 mM/NaCl 300mM/Ureia 8 M/Imidazol 5mM). A eluição foi realizada em gradiente contínuo com 100% Tris 50mM/NaCl 100mM/Ureia 4M/Imidazol 1 M/Sorbitol 8% em 30 minutos. As diferentes frações coletadas foram avaliadas por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12,5% e aquelas que continham a proteína de interesse foram dialisadas em cassetes (Slide-A-Lyzer 10k, Thermo), com redução gradual da concentração de ureia até sua completa retirada. A proteína purificada foi mantida no tampão Tris 20mM Sorbitol 8% Triton 0,5%, quantificada pelo método do BCA e a homogeneidade foi avaliada por densitometria.

3.5. Anticorpos monoclonais contra a proteína NS1

Os anticorpos monoclonais (mAb) foram produzidos pelo Laboratório de Tecnologia de Anticorpos Monoclonais (LATAM)/Bio-Manguinhos, utilizando camundongos de linhagem BALB/c fêmeas, com idade de 6 semanas.

Os camundongos foram submetidos a esquema de imunização por via intraperitoneal (IP) e endovenosa (EV) com doses de 100 µL e 50 µL, respectivamente (CEUA LW-18/13). O antígeno utilizado foi a proteína rNS1zg (MyBioSource), expressa em sistema de baculovírus.

Primeiramente, os animais receberam, pela via IP, 100 µL de uma emulsão contendo 50 µg de rNS1zg e 50 µg do adjuvante Hidróxido de Alumínio – Al(OH)₃ (Alhydrogel, Brenntag Biosector) diluídos em PBS. Quatorze e vinte oito dias após o primeiro estímulo, os camundongos foram inoculados com 25 µg de NS1g e 25 µg de adjuvante (100 µL/dose), pela mesma via. No dia 70, foi administrado, pela via EV, um reforço contendo 10 µg de rNS1zg diluída em 50 µL de PBS (50 µL/dose). Amostras de sangue foram coletadas por punção plexo venoso retro-ocular nos dias 0, 22 e 35

e por punção cardíaca, ao final do cronograma de imunização (dia 73). No dia 73, além da coleta do sangue, também foi realizada a esplenectomia, para obtenção dos esplenócitos e geração dos hibridomas. As células esplênicas foram retiradas cuidadosamente com auxílio de agulhas com seringas e pinça hemostática. Em seguida, os esplenócitos foram integrados às células de mieloma SP2/0-Ag14 (ATCC® CRL-1581™), na presença do agente fusionante polietilenoglicol (PEG) 3000-3700, gerando os hibridomas. Os hibridomas foram transferidos para placas de cultivo de 96 orifícios, utilizando meios específicos de seleção com Hipoxantina-Aminopterina-Timidina (HAT). Os policlonais foram expandidos e, aqueles que mantiveram positividade frente aos ensaios de ELISA, foram submetidos a procedimento de clonagem para a obtenção de colônias monoclonais. Para isso, a concentração da suspensão celular foi ajustada utilizando DMEM/ATB 1x/SFB 20%/HAT 1X, para haver apenas uma célula por orifício. Em seguida, a suspensão foi transferida para placas de 96 orifícios para cultura celular e incubadas a 37 °C e 5 % de CO₂ por 11 dias. As colônias que se desenvolveram foram observadas do 5º até 11º dia quanto à clonalidade (monoclonal ou policlonal). Para avaliar a secreção de anticorpos específicos, no 11º dia foi realizado um ensaio de ELISA com placas sensibilizadas com 500 ng de rNS1zg, com o sobrenadante dos orifícios que apresentaram exclusivamente colônias monoclonais. Os monoclonais positivos para o antígeno e com confluência acima de 90 % foram expandidos e novo ensaio de ELISA foi realizado. Os clones que se mantiveram estáveis, com D.O. regulares durante a expansão, foram criopreservados.

3.6. Seleção dos Aptâmeros por SELEX

Para seleção dos aptâmeros, foi empregado o protocolo descrito por Simmons e colaboradores, 2012, que utiliza a tecnologia SELEX com uma biblioteca de DNA fita simples, para a seleção de sequências (159). A imobilização do alvo foi realizada utilizando placas de microtitulação (Thermo Scientific Nunc) e ou colunas de cromatografia HiTrap NHS-Activated HP (GE Healthcare) (160).

3.6.1. Preparo da biblioteca de oligonucleotídeos

Para obtenção dos aptâmeros, uma biblioteca de DNAfd e *primers* senso (5'-GGGACAAGAATAACGCTCAA-3')

e

antisenso

(5'-

GCCTGTTGTGAGCCTCCTGTGCGAA-3') foram sintetizados pela BIONEER. Essa biblioteca era composta por 10^{15} variantes de 25 nucleotídeos aleatórios (nt) flanqueados por sequências de oligonucleotídeos específicos (5'-GGGAGACAAAGAATAAACGCTCAA-25n-TTCGACAGGAGGCTCACAACAGGC-3').

Primeiramente, a biblioteca e os *primers* foram ressuspensos em água, para concentração final de 1000 pmol/ μ L. Em seguida, foi realizada uma PCR para produzir múltiplas espécies de DNAfd, utilizando 4,2 μ L da biblioteca a 1000 μ M, 16 μ L de tampão de PCR 5X concentrado (PCR buffer 5x), 10 μ L de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP) a 20 mM, 4 μ L de cada *primer* (senso e antisenso) a 1 mM, 2 μ L de Taq polymerase a 10 U/ μ L e 80 μ L (q.s.p.) de água RNase *free*. A mistura foi dividida em dois microtubos e submetida a ciclos de amplificação [95 °C por 10 min (1 ciclo), 95 °C por 1 min e 30 s, 56 °C por 30 s e 72 °C por 1 min e 30 s (40 ciclos) e 72 °C por 10 min (1 ciclo)], utilizando o termociclador SimpliAmp™ Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific). Em seguida, foi realizado uma PCR unidirecional para gerar a biblioteca de DNAs, utilizando 30 μ L da biblioteca amplificada (DNAfd), 60 μ L de PCR buffer 5x, 25 μ L de dNTP (20 mM), 150 μ L de primer senso (1 mM), 6 μ L de Taq polymerase (10 U/ μ L) e 29 μ L de água RNase free, totalizando 300 μ L (6 tubos de 47 μ L cada). A amplificação ocorreu no mesmo protocolo de ciclagem anterior, alterando somente a quantidade de ciclos, de 40 para 100.

3.6.2. Seleção positiva de aptâmeros para a partícula íntegra do ZIKV

O processo de seleção de aptâmeros para a partícula íntegra do ZIKV ocorreu em placas de microtitulação, usando sete ciclos de seleção positiva (com ZIKV ES2916/2015 purificado) e um ciclo de seleção negativa (com YFV, DENV1, DENV2, DENV3, DENV4 clarificados).

Cem microlitros do ZIKV diluído em tampão carbonato (0,05 mol/L, pH 9,6) foram adsorvidos nos orifícios de placas de microtitulação e incubadas *overnight* (16-18 h) a 4 °C. Após incubação, as partículas não ligadas foram removidas através de lavagem com tampão PBS 1x, pH 7,4. Em seguida, 100 μ L da biblioteca de DNAs foram adicionados e a placa foi incubada por 1 h a temperatura ambiente (TA). Os aptâmeros não ligantes ou com ligação de baixa afinidade foram removidos por lavagem em PBS 1x, pH 7,4. Os aptâmeros que permaneceram ligados ao alvo foram,

primeiramente, eluídos com NaCl a 0,5 M, promovendo o rompimento de ligações fracas e removendo os aptâmeros de baixa interação. Em seguida, foi realizada uma eluição com NaCl a 1,5 M, promovendo o rompimento das ligações moderadas e fortes e eluindo os aptâmeros de média a alta interação. A última eluição foi feita utilizando tiocianato de sódio (NaSCN) 3 M, que, por ser um agente caotrópico, promove o rompimento das demais ligações, eluindo aptâmeros com elevada interação. Os aptâmeros eluídos com 0,5 M de NaCl foram descartados, enquanto aqueles eluídos em NaCl 1,5 M e NaSCN 3 M foram coletados e prosseguiram para as próximas etapas, seguindo separados até o final.

Os aptâmeros recuperados foram dessalinizados, utilizando colunas Vivaspin 500 (GE Healthcare) com peso molecular limite de 5 kDa, e amplificados numa PCR unidirecional, contendo o DNAfs dessalinizado (de 30 a 35 µL), 10 µL de PCR buffer 5x, 0,63 µL de dNTP (20 mM), 0,77 µL de MgCl₂, 1 µL de *primer* senso (100 µM), 1 µL de *primer* antisenso (1 µM), 1 µL de Taq polymerase (10 U/µL) e água RNase free q.s.p. 50 µL. A amplificação ocorreu na ciclagem descrita no item 3.4.1., para PCR unidirecional. Após amplificação, esses oligonucleotídeos foram utilizados para o início de um novo ciclo SELEX.

Após 5 ciclos SELEX, os aptâmeros eluídos foram submetidos a um ciclo de seleção negativa frente ao vírus de febre amarela e aos 4 sorotipos de dengue (item 3.4.3.). Em seguida, os aptâmeros recolhidos seguiram para mais dois novos ciclos de seleção positiva. Por fim, os aptâmeros eluídos em NaCl 1,5 M e NaSCN 3 M foram dessalinizados e amplificados por PCR bidirecional, contendo 2 µL de DNAfs dessalinizado, 5 µL de PCR buffer 5x, 0,63 µL de dNTP (20 mM), 1 µL de *primer* senso (100 µM), 1 µL de *primer* antisenso (100 µM), 0,5 µL de Taq polymerase (10 U/µL) e água RNase free q.s.p. 25 µL em ciclagem de 95 °C por 10 min (1 ciclo), 95 °C por 1 min e 30 s, 56 °C por 30 s e 72 °C por 1 min e 30 s (40 ciclos) e 72 °C por 10 min (1 ciclo).

Os produtos gerados foram clonados e sequenciados (item 3.5.1. e 3.5.2.).

3.6.3. Seleção negativa de aptâmeros para outros Flavivírus

Os aptâmeros pré-selecionados para a partícula viral integra foram submetidos à seleção negativa frente ao YFV e aos 4 sorotipos de dengue. Esse protocolo foi realizado separadamente para os aptâmeros eluídos em NaCl 1,5 M e NaSCN 3 M. A figura 3.4.3.1. apresenta um esquema com a posição dos vírus nas placas.

Cada vírus foi diluído em tampão carbonato (0,05 mol/L, pH 9,6) e imobilizado em placa de microtitulação (100 µL/orifício). Após incubação de 16-18 h a 4 °C, a placa foi lavada com PBS 1x, pH 7,4., para retirada dos vírus não ligados. Em seguida, 100 µL dos oligonucleotídeos oriundos da seleção positiva foram adicionados no orifício referente ao vírus dengue 1 e 200 µL de PBS 1x, pH 7,4 foram adicionados aos orifícios referentes aos demais vírus. A placa foi incubada por 30 min a TA. Os aptâmeros que não se ligaram ao alvo foram transferidos para o segundo orifício, contendo o vírus dengue 2, e a placa foi novamente incubada a TA por 30 min. Esse processo se repetiu até o último orifício, correspondente ao vírus da febre amarela. Os aptâmeros não ligantes foram recolhidos e submetidos à amplificação, seguindo o protocolo da PCR unidirecional (item 3.4.2.). O produto da PCR foi então utilizado para seguir no protocolo de seleção positiva.

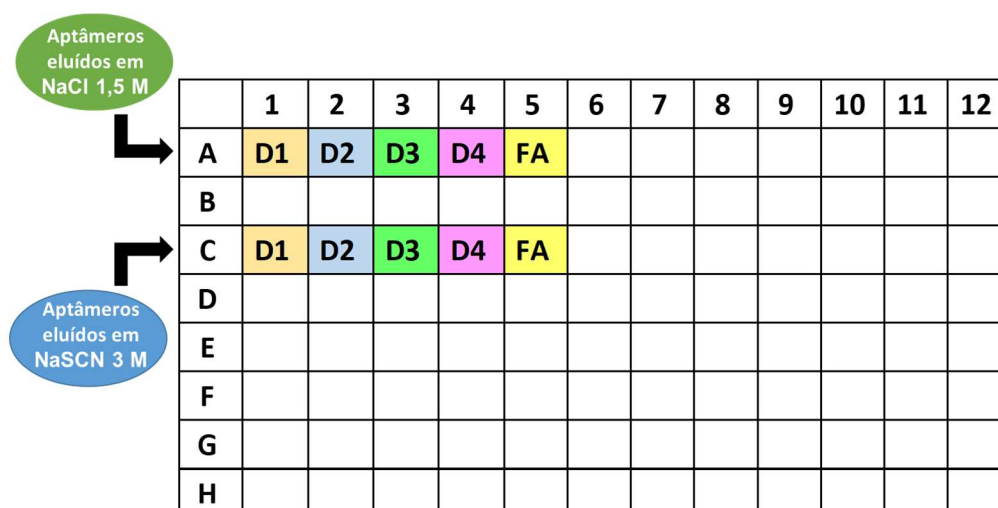


Figura 3.6.3.1. Esquema de uma placa de microtitulação demonstrando a posição dos flavivírus e o local onde os aptâmeros provenientes da seleção positiva (eluições NaCl 1,5 M e NaSCN 3 M) foram adicionados. D1= Vírus Dengue 1; D2= Vírus Dengue 2; D3= Vírus Dengue 3; D4= Vírus Dengue 4; FA= Vírus da Febre Amarela.

3.6.4. Seleção positiva de aptâmeros para proteína NS1 do ZIKV

Na seleção de aptâmeros, tanto para a proteína NS1 glicosilada como para a NS1 não glicosilada, foi empregado um protocolo semelhante ao utilizado no item 3.4.2, com algumas modificações: i) a sensibilização da placa foi realizada com 300 ng de proteína por orifício; ii) foram realizadas seis seleções positivas e uma seleção negativa; iii) a seleção negativa ocorreu após o quarto ciclo SELEX positivo, utilizando apenas a proteína recombinante NS1 do vírus da febre amarela (rNS1FA) devido à indisponibilidade de proteínas NS1 de outros flavivírus.

3.6.5. Seleção negativa de aptâmeros para proteína NS1 do YFV

Como a seleção negativa foi apenas para a proteína rNS1FA, o protocolo foi basicamente o mesmo da seleção positiva (item 3.4.4.), sem a etapa de eluição. Os aptâmeros que não se ligaram à proteína rNS1FA, foram recolhidos e submetidos à amplificação, seguindo o protocolo da PCR unidirecional (item 3.4.2.). O produto da PCR foi então utilizado para dar seguimento ao protocolo de seleção positiva.

3.6.6. Seleção positiva de aptâmeros para anticorpos monoclonais anti-NS1

A seleção de aptâmeros para o anticorpo monoclonal (mAb) anti-NS1 foi realizada em placas de microtitulação e em coluna de afinidade HiTrap NHS-Activated HP de 1 mL. Não houve seleção negativa.

Para a seleção em microplacas, o protocolo foi baseado como no descrito no item 3.4.2, com apenas algumas modificações: i) a sensibilização da placa foi feita com 1 µg/100 µL do mAb previamente selecionado (item 3.8.1.2); ii) as sequências eluídas nas soluções de NaCl 1,5 M e NaSCN 3 M foram misturadas; iii) foram realizadas 10 seleções positivas e não houve seleção negativa.

A seleção em coluna foi inicializada funcionalizando a coluna, de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, 1 µg do anticorpo foi imobilizado na matriz da coluna e usado para seleção dos aptâmeros. A biblioteca de DNAs foi diluída em PBS1x/MgCl₂ 5 mM, pH 7,4, aplicada à coluna e incubada por 1 h em TA. Em seguida, as colunas foram lavadas com 5 mL PBS1x/MgCl₂ 5 mM, pH 7,4, seguida por uma lavagem com 2 mL da solução PBS1x/MgCl₂ 5 mM/NaCl 0,5 M, pH 7,4, para romper as ligações iônicas fracas. A solução pós-lavagem foi descartada e uma nova lavagem foi realizada utilizando 1,1 mL de PBS1x/MgCl₂ 5 mM/NaCl 1,5 M, pH 7,4. O conteúdo dessa lavagem foi coletado em microtubo e foi realizada uma última lavagem com 1,1 mL da solução de PBS1x/MgCl₂ 5 mM/NaSCN 3 M, pH 7,4. O conteúdo dessa lavagem também foi coletado em microtubo. Em seguida, foi realizada a dessalinização dos DNAs coletados nos microtubos, utilizando as colunas Amicon ultra 4 mL de 3 kDa (Millipore) e Vivaspin 500 de 5 kDa (GE Healthcare). A amplificação por PCR assimétrico ocorreu com 30 a 35 µL do DNAs dessalinizado, 10 µL de PCR buffer 5x, 0,63 µL de dNTP (20 mM), 1 µL de *primer* senso (100 µM), 1 µL de *primer* antisenso (1 µM), 1 µL de Taq polymerase (10 U/µL) e água RNase free q.s.p. 50 µL. A ciclagem utilizada para amplificação está descrita no item 3.4.1. na

parte referente à PCR unidirecional. Após amplificação, esses oligonucleotídeos foram utilizados para o início de um novo ciclo SELEX. No décimo ciclo SELEX, os aptâmeros foram eluídos em concentrações crescentes de sal (1,0; 1,25 e 1,5 M de NaCl e 3 M de NaSCN). Ao final, as sequências DNAs foram eluídas em NaCl 1,5 M e NaSCN 3 M foram amplificadas por PCR para gerar DNAs, seguindo o protocolo do item 3.4.2. para PCR bidimensional.

Os produtos gerados foram sequenciados por sequenciamento de nova geração (NGS) (item 3.5.2).

3.6.7. Clonagem

Os aptâmeros selecionados para a partícula viral, para a proteína NS1 glicosilada e para NS1 não glicosilada foram submetidos à clonagem, utilizando o vetor pCR2.1 TOPO (Invitrogen - Thermo Fisher Scientific). e as células *E. coli* TOP10 eletrocompetentes.

O produto de PCR DNAs (aptâmeros) foi clonado no vetor pCR2.1 TOPO, de acordo com as normas do fabricante. A seguir, 100 µL de *E. coli* TOP10 foram transformadas por eletroporação (MicroPulser - Bio-Rad) com 3 µL da reação de ligação, utilizando cubetas de 0,2 cm (Bio-Rad). Após eletroporação, 900 µL de meio LB foram adicionados e o material foi cultivado por 1 h a 37 °C, sob agitação de 200 RPM. A seguir, a cultura foi semeada em placas LB/ágar/ampicilina (100 µg/mL) e o material foi incubado por 16-18 h a 37 °C. Os clones viáveis foram então semeados individualmente em 5 mL de meio LB/ampicilina, em tubos de fundo cônico de 15 mL, e incubados a 37 °C por 16-18 h, a 200 RPM. Posteriormente, foi realizada a extração do DNA plasmidial utilizando o kit *High Pure Plasmid Isolation* (Roche), de acordo com as recomendações do fabricante. Os plasmídeos extraídos foram quantificados por Qubit (Invitrogen - Thermo Fisher Scientific), amplificados usando *primers* M13 (senso e antisenso) e sequenciados.

3.6.8. Sequenciamento

3.6.8.1. Sequenciamento Automatizado de Sanger

Os aptâmeros selecionados para a partícula viral, para a proteína NS1 glicosilada e para NS1 não glicosilada foram submetidos ao sequenciamento automatizado de Sanger. Esse sequenciamento foi realizado pelo LATER (Bio-Manguinhos/Fiocruz), utilizando o sequenciador automático ABI PRISM® XL3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) e o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific), de acordo com as recomendações do fabricante. Ambas as fitas (senso e antisenso) foram sequenciadas para resolver compressões e ambiguidades, utilizando os *primers* direcionados para as regiões que flanqueiam os aptâmeros. A análise das sequências obtidas foi realizada através do programa SeqManII versão 5.05 (ADNStar, Inc.).

Primeiramente, foi realizada uma etapa de amplificação utilizando 2 µL de BigDye, 2 µL de tampão BigDye, 1 µL de primer a 3,2 mM, 5 µL de DNA e água Rnase free q.s.p. 10 µL. A mistura foi submetida a ciclos de 96 °C por 1 min (1 ciclo) e 96 °C por 10 s, 50 °C por 5 s e 60 °C por 4 min (25 ciclos), utilizando o termociclador Veriti (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). Após a PCR, foram adicionados 2,5 µL de EDTA 125 mM (Sigma-Aldrich) em cada orifício, seguido 25 µL de etanol absoluto (Merck) e a mistura foi homogeneizada cinco vezes, com auxílio de uma micropipeta. A placa foi incubada ao abrigo da luz em T.A. durante 15 minutos e centrifugada a 3000 X g por 30 minutos a 4°C. As placas foram invertidas em lenços absorventes em um movimento único, para descartar o líquido, e centrifugadas invertidas sobre duas folhas de lenços absorventes a 180 X g por 30 segundos. Posteriormente, 30 µL de etanol 70% (Merck) foram adicionados e a placa foi centrifugada a 1650 X g por 15 minutos a 4°C. O excesso de etanol foi descartado invertendo a placa em um movimento único e uma nova centrifugação com a placa invertida foi realizada. A placa aberta, foi incubada a 65 °C por 5 minutos, ao abrigo da luz. As amostras foram ressuspensas em 10 µL de Formamida Hi-Di (Thermo Fisher Scientific), a placa foi aquecida a 95°C por 3 minutos, para a reação de desnaturação, e colocada imediatamente no gelo por 5 a 10 minutos. Em seguida, a placa foi centrifugada brevemente e as amostras foram sequenciadas utilizando o sequenciador automático de DNA, modelo ABI PRISM® XL3500.

3.6.8.2. Sequenciamento de alto rendimento (NGS)

Os aptâmeros selecionados para o anticorpo monoclonal foram diretamente sequenciados por sequenciamento de alto rendimento (NGS) realizado na Plataforma de Sequenciamento de Ácidos Nucléicos de Nova Geração (RPT01J) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/RPT-FIOCRUZ). Para o sequenciamento, foi utilizado o sequenciador de Nova Geração - MiSeq da Illumina.

Primeiramente, foi realizado uma PCR para produção de aptâmeros em fita dupla (DNA_{fd}) e os produtos da amplificação foram quantificados usando o fluorímetro Qubit (Invitrogen - Thermo Fisher Scientific). Em seguida, foi construído uma biblioteca de aptâmeros flanqueadas com primers senso e antisenso específicos e adaptadores pendentos, para anexar os códigos de barra para o sequenciamento. A construção dessa biblioteca foi realizada em 4 etapas: PCR *Amplicon*, Limpeza da PCR *Amplicon*, PCR *Index*, Limpeza da PCR *Index*. A PCR *Amplicon* foi realizada utilizando 1-5 µL do DNA, 5 µL do primer senso com adaptador a 1 µM, 5 µL primer antisenso com adaptador a 1 µM, 12,5 µL de KAPA HiFi HotStart ReadyMix 2x e água ultrapura q.s.p. 25 µL, em um programa composto por 1 ciclo de 95 °C 3 min, 25 ciclos de 95 °C por 30 s, 55 °C por 30 s e 72 °C por 30 s e 1 ciclo de 72 °C por 5 min. Em seguida, foi realizado a limpeza da PCR. Brevemente, a placa com os *amplicons* foi centrifugada a 1000 x g a 20 °C por 1 min e 20 µL de AMPure *beads* foi adicionado em cada amostra. A mistura foi homogeneizada, com auxílio de pipeta e incubada a T.A. por 5 min. Em seguida, a placa foi colocada em um suporte magnético e, após cerca de 2 min, o sobrenadante foi descartado cuidadosamente utilizando uma pipeta multicanal. Ainda no suporte magnético, as *beads* foram lavadas com 200 µL etanol 80%, as placas foram incubadas por 30 s e o sobrenadante foi descartado cuidadosamente. Após uma segunda etapa de lavagem, o excesso de etanol foi removido com auxílio de uma pipeta multicanal. A placa ficou secando em T.A. por 10 min e, em seguida, foi retirada do suporte magnético. Foram adicionados 52,5 µL de Tris 10 mM pH 8,5, seguido por homogeneização (10 vezes, com auxílio de pipeta), de modo que as *beads* ficassem totalmente ressuspensas. A placa foi incubada a T.A. por 2 min e novamente colocada na estante magnética por 2 min (ou até que o sobrenadante estivesse limpo). Ao final, 50 µL do sobrenadante foram transferidos para uma nova placa de 96 orifícios. Posteriormente, foi realizada a etapa PCR *Index*, que adicionou códigos de barras de índice duplo ao alvo do *amplicon*. Nesta etapa os índices duplos foram conectados aos adaptadores de sequenciamento Illumina usando o Nextera XT

Index Kit v2 (Illumina). Resumidamente, 5 μ L de cada orifício da placa do PCR *Amplicon* foram transferidos para uma nova placa de 96 orifícios. Os index 1 e 2 foram arrumados em uma estante e 5 μ L de cada index foram adicionados em cada orifício, respeitando a organização. Em seguida, foram adicionados 25 μ L de KAPA HiFi HotStart ReadyMix 2x e 10 μ L de água ultrapura. A mistura foi homogeneizada 10 vezes, com auxílio de pipeta multicanal e a placa foi centrifugada a 1000 x g a 20 °C por 1 min. A ciclagem da PCR foi composta por 1 ciclo de 95 °C por 3 min, 8 ciclos de 95 °C por 30 s, 55 °C por 30 s e 72 °C por 30 s e 1 ciclo de 72 °C por 5 min. Posteriormente, a placa foi centrifugada a 280 x g a 20 °C por 1 minuto e submetida a etapa de limpeza da PCR Index. Nesta etapa foram adicionados 56 μ L de AMPure *beads* para cada amostra da placa e o protocolo seguiu semelhante ao descrito na etapa de limpeza da PCR *Amplicon*. Após a retirada da placa do suporte magnético, 27,5 μ L de Tris 10 mM pH 8,5 foram adicionados para cada orifício contendo amostra e homogeneizados 10 vezes com pipeta multicanal. Após incubação de 2 min a T.A., a placa foi colocada novamente no suporte magnético por 2 min (ou até que o sobrenadante estivesse limpo) e 25 μ L do sobrenadante foram transferidos para uma nova placa de 96 orifícios. Em seguida, foi verificada a quantificação e o tamanho dos fragmentos obtidos para cada amostra por Qubit e TapeStation (Agilent), respectivamente. O resultado da quantificação pós-construção da biblioteca foi inserido na “Tabela de diluição das amostras”, no drive da plataforma, onde foi calculada a normalização de cada amostra para uma concentração de 2nM. Antes do sequenciamento pelo MiSeq, a biblioteca foi desnaturada com NaOH a 0,1N, o controle interno (PhiX) foi adicionada e a biblioteca foi diluída com tampão de hibridização (HT1). Em seguida, a biblioteca com o PhiX, foi desnaturada a 96 °C por 2 minutos e, após 5 min de incubação em gelo, foi levada adicionada a placa do sequenciador.

Ao final do sequenciamento, os dados brutos foram tratados pela Plataforma de Bioinformática (IOC/Fiocruz), gerando um arquivo contendo as sequências geradas e o número de repetições. Em seguida, foi realizada uma triagem para selecionar as sequências, a partir do reconhecimento dos *primers* senso e antisenso, a fim de retirar produtos inespecíficos. Posteriormente, as sequências foram ranqueadas pelo número de repetições e as 20 primeiras, que apresentaram frequência acima 1000 repetições, foram selecionadas. Por fim, os *primers* foram removidos e as sequências foram alinhadas com sequências selecionadas para outros alvos (dados não mostrados), sendo removidas aquelas que apresentaram semelhança.

3.7. Análise *in silico* das sequências dos aptâmeros

3.7.1. Predição da estrutura secundária dos aptâmeros

Após sequenciamento, as sequências foram alinhadas utilizando o programa computacional para alinhamento múltiplo de sequências Clustal Omega, disponível em <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> (161). A predição das estruturas secundárias foi feita através do servidor Web UNAFold (antigo Mfold), na seção de dobramento de DNA (DNA *folding*), disponível em http://www.unafold.org/DNA_form.php (162). As sequências foram selecionadas como lineares a temperatura de 25 °C e concentração iônica de 0,1 M de Na⁺, 0,01 M de Mg²⁺, computando apenas configurações de dobra dentro de 5 % da energia livre mínima, e considerando um número máximo de 50 vezes sem limite à distância máxima entre bases emparelhadas. Além da estrutura secundária, o programa também forneceu a energia livre mínima da estrutura prevista.

3.7.2. Predição da estrutura terciária dos aptâmeros

A modelagem tridimensional foi realizada utilizando o protocolo descrito por JEDDI e SAIZ, com modificações (165). Utilizando a plataforma digital RNAalifold WebServer, disponível em <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAalifold.cgi>, as sequências dos aptâmeros DNAs em formato FASTA foram convertidas para RNAs em formato Vienna, contendo as coordenadas da estrutura tridimensional (163). Em seguida, foi utilizada a plataforma digital RNAComposer, disponível em <http://rnacomposer.cs.put.poznan.pl/>, para transformar estruturas de RNAs no formato Vienna em RNAs no formato PDB. (164). Utilizando o programa Chimera, disponibilizado em <https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>, os modelos 3D de RNAs foram traduzidos em modelos 3D de DNAs (165).

3.7.3. Simulação da interação molecular aptâmero-alvo

A simulação de encaixe molecular (*docking* molecular) foi realizada utilizando a plataforma HDock, disponível em <http://hdock.phys.hust.edu.cn> (166).

Para comparar os locais onde os aptâmeros se ligaram ao alvo através da simulação de *docking*, foram obtidos arquivos em formato PDB contendo informações sobre a estrutura do aptâmero e da proteína. As estruturas das proteínas E (código

5JHM) e NS1 (código 5GS6) de ZIKV foram obtidas pelo site RCSB Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) (167–169) e as estruturas 3D DNAs dos aptâmeros, pelo software Chimera.

3.8. Avaliação *in vitro* das sequências dos aptâmeros

Após o alinhamento das sequências, os aptâmeros selecionados foram sintetizados pela empresa *Integrated DNA Technologies* (IDT), para utilização em ensaios de interação e afinidade.

Os aptâmeros selecionados foram avaliados em, pelo menos, dois ensaios *in vitro*.

3.8.1. Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)

3.8.1.1. ELISA para detecção do ZIKV utilizando aptâmeros

Para a análise prévia dos aptâmeros selecionados para partícula viral, realizamos um ensaio onde os aptâmeros foram adsorvidos em placas de 96 orifícios tratadas com polilisina (PL).

Após pré-tratamento *overnight* (16-18h) das placas, utilizando 50 µM/orifício de PL, os aptâmeros (160 nM) foram imobilizados e incubados por 16-18h a 4 °C. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem (PBS/Tween 20 0,05 %, pH 7,4) e bloqueadas com 300 µL de albumina sérica bovina (BSA) (Thermo Scientific) a 1 % (PBS/BSA 1 %, pH 7,4) por 1 h a 37 °C. Após outro ciclo de lavagens, 100 µL do vírus (diluído seriadamente 1:10 – 5 x 10⁶ a 5 x 10³ PFU/mL) foram adicionados e incubados por 1 h a 37 °C. Em seguida, foi realizado um novo ciclo de lavagens e 100 µL do anticorpo monoclonal anti-flavivírus 4G2, diluído 1:100, foram adicionados. A placa foi incubada por 1 h a 37 °C e novamente lavada. Foram adicionados 100 µL do anticorpo monoclonal contra imunoglobulinas de camundongo conjugadas à enzima peroxidase (anti-mouse IgG/HRP - Sigma-Aldrich) na diluição de 1:30.000 e, após 1 h a 37 °C, a placa foi lavada e 100 µL da solução cromogênica de tetrametilbenzidina (TMB) (Bio-Rad) foram adicionados. Após 1 h de incubação a 37 °C, foram utilizados 100 µL de HCl 1 N para interromper a reação. A placa foi lida a densidade óptica (D.O.) de 450 nm, utilizando o espectrofotômetro Spectra Max190 (Molecular Devices), software Soft Max Pro 6.3 (figura 3.6.1.1.1.). Como controle negativo, foi utilizado o vírus da febre amarela (5 x 10⁶ PFU/mL).

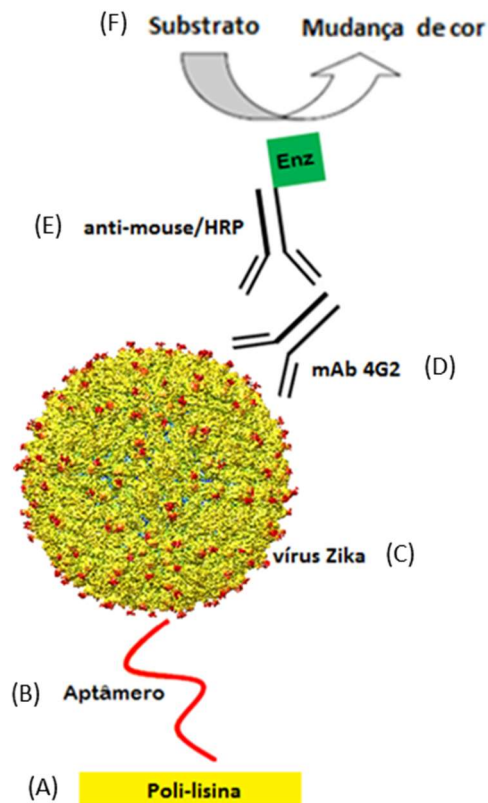


Figura 3.8.1.1.1. Representação esquemática do ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção do ZIKV utilizando aptâmeros. (A) placa de microtitulação de 96 orifícios tratada com polilisina; (B) aptâmeros revestidos na placa; (C) ZIKV em diferentes concentrações; (D) anticorpo 4G2, utilizado como anticorpo primário; (E) anti-mouse ligado a peroxidase, usado como anticorpo secundário; (F) substrato cromogênico (TMB) para revelar a reação.

3.8.1.2. ELISA para triagem dos anticorpos monoclonais anti-NS1 de ZIKV

Esse ensaio foi realizado para identificar a especificidade dos anticorpos monoclonais anti-NS1 de ZIKV produzidos no LATAM (Bio-Manguinhos/Fiocruz) frente às proteínas não estruturais do ZIKV (NS1 glicosilada e não glicosilada e NS5) e do vírus da febre amarela (NS1).

A placa foi capturada com 200 ng das proteínas rNS1z, rNS1zg, rNS5z (proteína NS5 recombinante de ZIKV) e rNS1FA e incubada *overnight* em TA. No dia seguinte, foi realizado um ciclo de 5 lavagens com tampão PBS/Tween 20 0,05 %, pH 7,4, os orifícios foram bloqueados com 300 μ L de PBS/leite 10 %, pH 7,4 e a placa foi incubada por 2 h a 37 °C. Em seguida, um novo ciclo de lavagens foi realizado e 100 μ L de cada mAb (em concentrações previamente estabelecidas) foram adicionados aos respectivos orifícios. A placa foi incubada a 37 °C por 1 h, lavada cinco vezes, e o anti-mouse IgG/HRP (1:30.000) foi adicionado. Após incubação de 1 h a 37 °C e

novo ciclo de lavagens, 100 μ L de TMB foram usados para revelação, com incubação de 20 min a TA na ausência de luz. Uma solução de HCl 1 N foi utilizada para interromper a reação e os resultados foram lidos em espectrofotômetro a 450 nm (figura 3.6.1.2.1.). Como controle positivo, foi utilizado um anticorpo policlonal anti-NS1 e, como controle negativo, soro humano normal (Sigma-Aldrich).

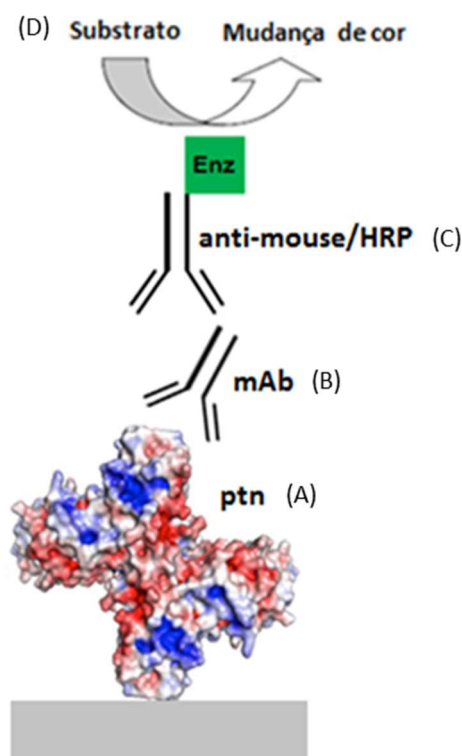


Figura 3.8.1.2.1. Representação esquemática do ensaio imunoenzimático (ELISA) para triagem dos anticorpos monoclonais anti-NS1 de zika. (A) placa de microtitulação de 96 orifícios revestida com a proteína NS1 do ZIKV; (B) mAb anti-NS1 do ZIKV, utilizado como anticorpo primário; (C) anti-mouse ligado a peroxidase, usado como anticorpo secundário; (F) substrato cromogênico (TMB) para revelar a reação.

3.8.1.3. ELISA para detecção da proteína NS1 de zika utilizando aptâmeros

Após triagem dos mAb, selecionamos um monoclonal que reconhecesse tanto a proteína glicosilada como a não glicosilada e realizamos a pré-seleção dos aptâmeros para proteína rNS1z e rNS1zg.

Os orifícios das placas de ELISA foram pré-tratados com 50 μ M de PL, *overnight* a 4 °C. Após lavagem (PBS/Tween 20 0,05 %, pH 7,4) da placa, foram adicionados 100 μ L de cada aptâmero (300 nM, para aptâmeros rNS1z, e 150 nM e 300 nM, para rNS1zg) e a placa foi novamente incubada por 16-18 h a 4 °C. No dia seguinte, foi realizado um ciclo de cinco lavagens com tampão PBS/Tween 20 0,05

%, pH 7,4, os orifícios foram bloqueados com 300 μ L de PBS/leite 10 %, pH 7,4 e a placa foi incubada por 2 h a 37 $^{\circ}$ C. Após cinco lavagens, a proteína foi adicionada (rNS1z – 200 nM e rNS1zg – 100 nM e 200 nM) e a placa foi incubada por 1 h a 37 $^{\circ}$ C. A placa foi novamente lavada e 100 μ L do monoclonal (1:1000) foi adicionado. Após incubação de 1 h/37 $^{\circ}$ C e cinco lavagens, 100 μ L o anticorpo secundário anti-mouse IgG/HRP (1:30.000) foram adicionados e incubados por 1 h/37 $^{\circ}$ C. A reação foi revelada com TMB e finalizada com HCl 1 N. Os resultados foram expressos com base na leitura da D.O. em espectrofotômetro utilizando filtro de 450 nm (figura 3.6.1.3.1.). Um aptâmero para proteína NS5 e a proteína NS1 de ZIKV (glicosilada ou não glicosilada, usadas como captura) foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente.

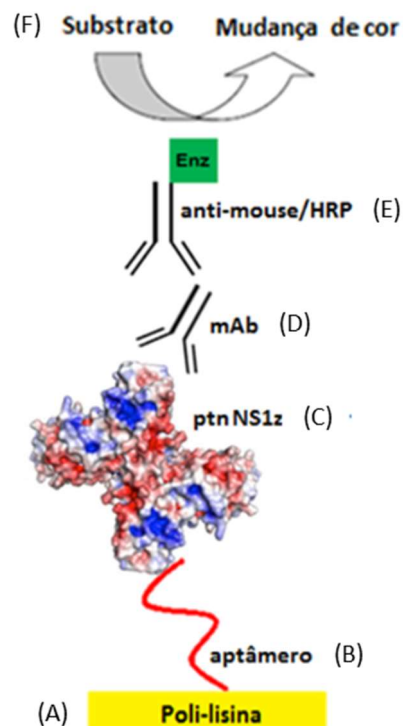


Figura 3.8.1.3.1. Representação esquemática do ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção da proteína NS1 de ZIKV utilizando aptâmeros. (A) placa de microtitulação de 96 orifícios tratada com polilisina; (B) aptâmeros revestidos na placa; (C) proteína NS1 do ZIKV em diferentes concentrações; (D) mAb anti-NS1, utilizado como anticorpo primário; (E) anti-mouse ligado a peroxidase, usado como anticorpo secundário; (F) substrato cromogênico (TMB) para revelar a reação.

3.8.1.4. ELISA para detecção do ZIKV ou da proteína E utilizando aptâmeros amimo modificados

Nesses ensaios, utilizamos aptâmeros amimo modificado (5'-amino C6-modificado) em placas de 96 orifícios de fundo chato ativadas com anidrido maleico (Pierce™ Maleic Anhydride Activated Plates, Thermo Scientific). Essas placas são úteis em ensaios de ligação para imobilizar peptídeos e outros ligantes contendo amina, que não revistam eficientemente por adsorção passiva. A reação dos grupos anidrido maleico com aminas primárias (-NH₂) resulta na formação de ligações amida que são estáveis em pH neutro (172). A metodologia é bem semelhante ao ELISA convencional, acrescida apenas de uma etapa inicial de ativação da placa.

Os aptâmeros amimo modificado foram diluídos em tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M (pH 9,6) a uma concentração final de 150 nM (100 µL/orifício). A placa foi ativada com quatro lavagem com tampão de lavagem (PBS/Tween 20 0,05%, pH 7,4), de acordo com as instruções do fabricante, e 100 µL do aptâmero foi adicionado. Após incubação de 16-18 h (*overnight*) a 4-8 °C, a placa foi lavada quatro vezes com tampão de lavagem e bloqueada com tampão de bloqueio *superblock* (Thermo Scientific) ou PBS/leite 5 % (300 µL/orifício) por 2 h a 37 °C. A placa foi lavada novamente por quatro vezes com tampão PBS/Tween 20 0,05 % e 100 µL do vírus (5 x 10⁵ PFU/mL) ou da proteína E (200 ng/orifício) foram adicionados. Após incubação de 1 h a 37 °C, a placa foi novamente lavada por quatro vezes e 100 µL do anticorpo 4G2 (1:100) ou mAb (1:1000) foram adicionados, seguido de outra etapa de incubação de 1 h a 37 °C. Após quatro lavagens, foi realizada a adição de 100 µL do anticorpo anti-mouse IgG/HRP diluído 1:30.000 e a placa foi incubada por mais 1 h a 37 °C. Após o último ciclo de lavagens, 100 µL de TMB foram adicionados e a placa incubada por 20 minutos a 37 °C na ausência de luz. Para interromper a reação, foram utilizados 100 µL de HCl 1 N. Os resultados foram obtidos pela leitura da D.O. em filtro de 450 nm, utilizando o espectrofotômetro Spectra Max190 (Molecular Devices), software Soft Max Pro 6.3 (figura 3.6.1.4.1.). Como controle positivo, foi utilizada a proteína E ou o vírus como captura e, como negativo, a proteína NS5 de ZIKV. Um outro controle negativo foi adicionado ao teste, a fim de avaliar a eficiência do bloqueio. Este controle foi realizado utilizando a proteína E ou o vírus após o bloqueio, porém sem a presença do aptâmero.

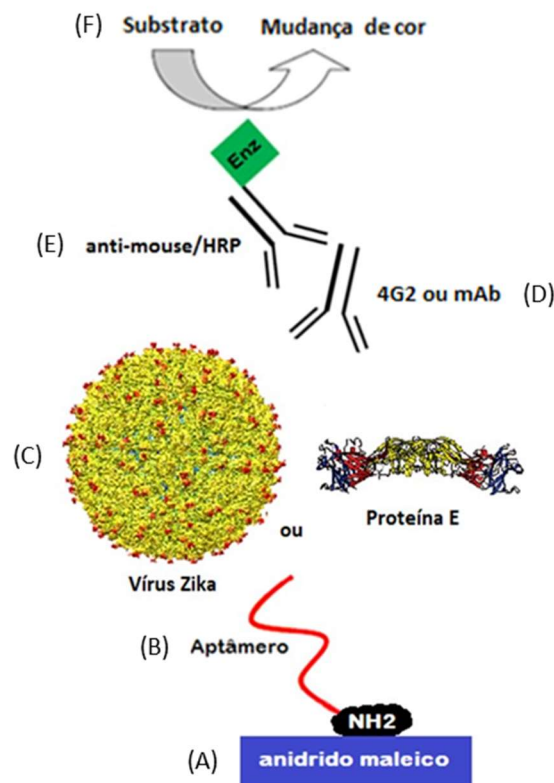


Figura 3.8.1.4.1. Representação esquemática do ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção do ZIKV ou da proteína E utilizando aptâmeros amimo modificados. (A) placa de 96 orifícios ativadas com anidrido maleico; (B) aptâmeros amimo modificados; (C) partícula viral ou proteína NS1 do ZIKV; (D) anticorpo 4G2 ou mAb anti-NS1 do ZIKV, utilizado como anticorpo primário; (E) anti-mouse ligado a peroxidase, usado como anticorpo secundário; (F) substrato cromogênico (TMB) para revelar a reação.

3.8.1.5. ELISA para detecção da proteína NS1 de ZIKV utilizando aptâmeros amimo modificados

As etapas desse ensaio são semelhantes às do item 3.6.2.1. Os aptâmeros amimo modificados foram diluídos em tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M (pH 9,6) (5 a 500 nM - 100 µL/orifício). A placa foi ativada com quatro lavagens com tampão de lavagem (PBS/Tween 20 0,05 %, pH 7,4), de acordo com as instruções do fabricante, e 100 µL do aptâmero foram adicionados. Após incubação de 16-18 h (*overnight*) a 4-8 °C, a placa foi lavada quatro vezes com tampão de lavagem e bloqueada com 300 µL de tampão de bloqueio (*superblock* ou PBS/leite 10 % ou PBS/leite 5 % ou PBS/SFB 5 %/BSA 1 % ou PBS/SFB 3 %/BSA 1 %) por 1 h a 37 °C. A placa foi lavada por quatro vezes com tampão de lavagem e 100 µL da proteína rNS1zg (100, 200 e 400 ng/orifício) ou rNS1z (100, 200 e 400 ng/orifício) foram adicionados. Após incubação de 1 h a 37 °C, a placa foi novamente lavada por quatro vezes e 100 µL do anticorpo monoclonal (1:1000) foram adicionados, seguido de outra etapa de incubação de 1 h

a 37 °C. A lavagem da placa foi realizada e foram adicionados 100 µL do anticorpo anti-mouse IgG/HRP (1:30.000). Após nova incubação de 1 h a 37 °C, a placa foi lavada, 100µL de TMB foram adicionados e a placa foi incubada por 20 minutos a 37 °C na ausência de luz. Para interromper a reação, foram utilizados 100µL de HCl 1 N. Os resultados foram obtidos pela leitura da D.O., utilizando o espectrofotômetro, em filtro de 450 nm (figura 3.6.1.5.1.). Os controles negativo e positivo foram a proteína NS5 e a proteína NS1 glicosilada ou não glicosilada de ZIKV (como captura), respectivamente. Um controle adicional, para avaliar a eficiência do bloqueio, foi realizado usando a proteína NS1 após bloqueio, sem aptâmero sensibilizado.

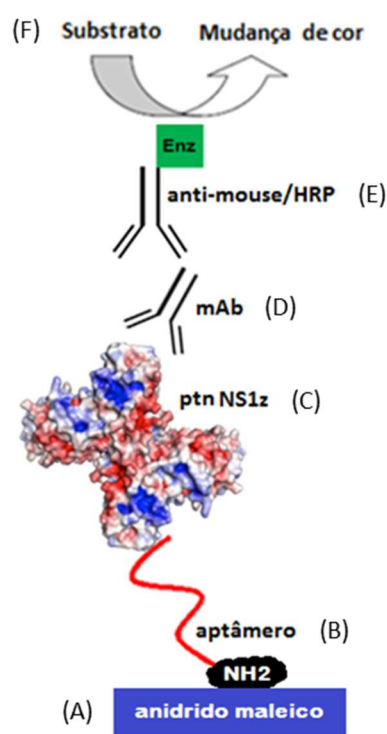


Figura 3.6.1.5.1. Representação esquemática do ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção da proteína NS1 de ZIKV utilizando os aptâmeros amimo modificados. (A) placa de 96 orifícios ativadas com anidrido maleico; (B) aptâmeros amimo modificados em diferentes concentrações; (C) proteína NS1 do ZIKV em diferentes concentrações; (D) mAb anti-NS1, utilizado como anticorpo primário; (E) anti-mouse ligado a peroxidase, usado como anticorpo secundário; (F) substrato cromogênico (TMB) para revelar a reação.

3.8.1.6. ELISA para detecção de anticorpo anti-NS1 de ZIKV utilizando aptâmeros amimo modificados

Esse ensaio seguiu as etapas do item 3.6.2.1. Os aptâmeros amino modificados foram diluídos em tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M (pH 9,6) a uma

concentração final de 100, 500, 700 ou 1000 nM (100 µL/orifício). A placa foi ativada com quatro lavagens com PBS/Tween 20 0,05 %, pH 7,4 (tampão de lavagem) e 100 µL do aptâmero foram adicionados. Após incubação de 16-18 h (*overnight*) a 4-8°C, a placa foi lavada quatro vezes com tampão de lavagem e bloqueada com *superblock* (Thermo Scientific) ou PBS/leite 1 %/BSA 1 % (300 µL/orifício) por 1 h a 37 °C. A placa foi lavada novamente por quatro ou cinco vezes com tampão PBS/Tween 20 0,05 %, pH 7,4 e 100 µL do anticorpo monoclonal (1:1000) foram adicionados. Após incubação de 1 h a 37 °C, a placa foi novamente lavada por quatro vezes, 100 µL do anticorpo anti-mouse IgG/HRP diluído (1:30.000) foram adicionados e a placa incubada por mais 1 h a 37 °C. Após o último ciclo de lavagens, 100 µL de TMB foram adicionados e a placa incubada por 20 minutos a 37 °C na ausência de luz. A reação foi interrompida com HCl 1 N e a placa foi lida em espectrofotômetro utilizando filtro de 450 nm (figura 3.6.1.6.1.). Para controle do teste, foi utilizado 200 ng de um aptâmero para proteína NS5 do ZIKV (controle negativo) e o mAb na diluição 1:1000 (controle positivo). Também foi aplicado um controle (CN2) para verificação da eficiência do tampão de bloqueio.

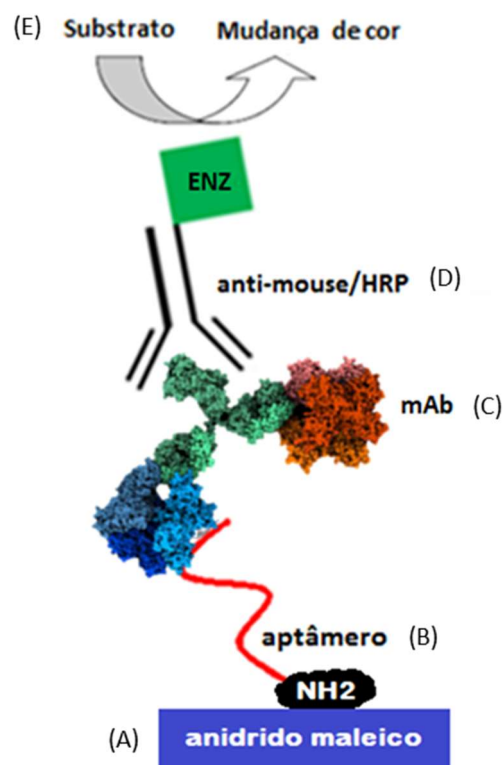


Figura 3.8.1.6.1. Representação esquemática do ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção do anticorpo monoclonal anti-NS1 do ZIKV utilizando aptâmeros amimo modificados. (A) placa de 96 orifícios ativadas com anidrido maleico; (B) aptâmeros amimo modificados em diferentes concentrações; (C) mAb anti-NS1 do ZIKV; (D) anti-mouse ligado a peroxidase; (F) substrato cromogênico (TMB).

3.8.2. Espectroscopia de fluorescência

A espectroscopia de fluorescência é uma técnica altamente sensível que permite medições de interações moleculares entre espécies em concentrações muito baixas, através do registro dos espectros de emissão de fluorescência de um composto quando uma luz de excitação incide sobre ele. A indução de fluorescência nas proteínas é determinada pela presença de aminoácidos aromáticos, principalmente o Trp, que absorve luz próximo a 290 nm e emite fluorescência próximo a 350 nm (170). A intensidade da fluorescência pode ser diminuída por uma ampla variedade de processos. Essas diminuições de intensidade são chamadas de extinção ou supressão. A extinção de fluorescência pode resultar de uma variedade de processos, como reações de estado excitado, transferências de energia, formação de complexos de estado fundamental (supressão estática) e processos colisionais (supressão dinâmica). Essa pode ser expressa matematicamente pela equação de Stern-Volmer, que permite o cálculo de constantes de extinção, chamadas de constantes de Stern-Volmer (K_{sv}) (171,172).

As titulações da fluorescência foram realizadas medindo o decaimento da intensidade de fluorescência dos resíduos de triptofano presentes no alvo após interação com os aptâmeros. Os experimentos foram realizados utilizando o fluorímetro Jasco FP-6500 em cubetas de 1000 μ L. A amostra foi diluída no tampão de diluição e os aptâmeros foram acrescentados gradativamente. Os resultados foram analisados pelo programa Microcal Origin 6 e a interação foi calculada usando a K_{sv} . Para calcular diferenças estatísticas entre as K_{sv} s foi aplicado o teste t de student.

3.8.2.1. Partícula viral do zika

Primeiramente foi avaliado o perfil fluorimétrico da suspensão viral, a fim de verificar se o tampão de purificação viral (Tris/NaCl pH 7,4 e 8,5) e o marcador de pH (vermelho de fenol) poderiam interferir na análise da interação vírus-aptâmero, bem como, avaliar a intensidade de fluorescência da partícula viral. O comprimento de onda de excitação utilizado foi de 290 nm e os espectros de emissão foram adquiridos entre 300 e 600 nm, com largura das fendas de 5 nm, O experimento foi realizado a 25 °C.

3.8.2.2. Proteína NS1 do ZIKV

Para a obtenção dos espectros, primeiramente, foi realizada a leitura do tampão de diluição (fosfato de potássio 10 mM, pH 7,4). Em seguida, a amostra foi diluída, para concentração final de 2 μ M, homogeneizada e titulada. Os aptâmeros foram sendo adicionados gradativamente, nas concentrações finais de 0,3 μ M, 0,6 μ M, 0,9 μ M, 1,2 μ M, 1,5 μ M, 1,8 μ M, 2,1 μ M, 2,7 μ M, 3,3 μ M.

Os espectros de emissão foram adquiridos entre 300 e 400 nm com um comprimento de onda de excitação de 290 nm, largura das fendas de excitação e de emissão de 5 nm, tempo de homogeneização de 1 min, tempo de incubação de 1 min e temperatura de leitura de 25 °C.

3.8.3. Termoforese em microescala (MST)

A Termoforese em Microescala (MST) é um método rápido e preciso para quantificar interações biomoleculares em solução em escala de microlitros. A base desta tecnologia é um efeito físico conhecido como termoforese, que descreve o movimento direcionado de moléculas através de gradientes de temperatura (143). O efeito termoforético é muito sensível à interface molécula-solvente, permitindo a quantificação de interações de biomoléculas pela detecção termoforética de pequenas mudanças na conformação, carga e tamanho de uma molécula à medida que são induzidas por um evento de ligação. O MST permite medir as constantes de afinidade de uma ampla variedade de interações no equilíbrio de ligação e modificações de proteínas e ácidos nucleicos (173).

Os experimentos em MST foram realizados no Laboratório de Macromoléculas (LAMAM) de Bio-Manguinhos (Fiocruz), utilizando o aparelho NanoTemper Monolith NT.115 (Nano Temper Technologies), o kit de rotulagem de proteínas monolíticas RED-NHS 2ª geração e capilares premium Monolith NT.115. Os dados foram obtidos com o software MO.Control V2.1.1 (NanoTemper Technologies) e analisados com o software MO.Affinity Analysis V3.0.4 (NanoTemper Technologies).

3.8.3.1. Proteína E do ZIKV

A avaliação da ligação pelo MST para os aptâmeros selecionados contra a partícula viral foi inicialmente realizada utilizando a proteína E do ZIKV, produzida no LATER (Bio-Manguinhos/ Fiocruz).

Resumidamente, 10 μM da proteína E do ZIKV foi marcada utilizando o kit de rotulagem RED-NHS 2^a geração, com excesso de corante RED-NHS em três vezes em PBS (pH 7,4). O corante livre foi removido de acordo com as instruções do fabricante, a proteína foi eluída em tampão PBS/Tween 20 0,05 %, pH 7,4. e centrifugada a 14.000 $\times g$ por 10 min. As medições de afinidade de ligação foram realizadas usando 20 nM de proteína marcada e uma diluição em série 1:1 de 16 concentrações de cada aptâmero, começando em 50 μM . A proteína foi mantida na presença dos aptâmeros por 15 min antes da transferência para os capilares. Os experimentos foram executados em duplicata a 25 °C, 76% de excitação e uma potência média de LED.

Para calcular diferenças estatísticas entre as Kds foi aplicado o teste t de student.

3.8.3.2. Partículas virais

Para avaliar a especificidade dos aptâmeros, foi realizado um ensaio com o ZIKV e um *pool* com os quatro sorotipos da dengue (*pool* DENV). Para calcular molaridade de cada suspensão viral, foi utilizado o título dos vírus (em PFU/mL) multiplicado pela quantidade de proteína E presente em cada partículas viral (180 proteínas). Os títulos do ZIKV e do *pool* dos dengues foram ajustados, para que no final apresentassem a mesma concentração.

Dois aptâmeros foram selecionados e rotulados com o kit de rotulagem RED-NHS de 2^a geração. A reação foi realizada de acordo com as instruções do fabricante em tampão NaHCO₃ 130 mM/NaCl 50 mM, pH 8,3, aplicando 10 μM de aptâmero (em razão molar para fluoróforo \approx 1:3) a TA por 30 minutos. O fluoróforo que não reagiu foi removido usando uma coluna de exclusão de tamanho equilibrada em tampão PBS/Tween 20 0,05 %, pH 7,4. As análises de afinidade de ligação foram conduzidas usando aptâmeros marcados ajustados para 40 nM com tampão PBS/Tween 20 0,05 %/NaCl 150 mM, pH 7,4. Para medição, cada diluição viral (ZIKV e *pool* DENV) foi misturada com um volume de aptâmero marcado, a uma concentração final de aptâmero de 20 nM e concentrações finais de vírus variando de 0,00000652 nM a 0,01335 nM. Após 15 min de incubação, as amostras foram carregadas em capilares. O efeito da termoforese foi medido a 25 °C. Os parâmetros foram definidos para 100 % ou 64 % de excitação e uma potência média do LED. Os dados das duplicatas foram analisados usando o sinal MST em 5 segundos.

3.8.3.3. Proteína NS1 do ZIKV

A análise da ligação da proteína-aptâmero foi realizada para a proteína rNS1z não glicosilada e um aptâmero selecionado. As medições foram realizadas usando 41.1 μM proteína rNS1zg, marcada conforme item 3.6.3.1., e 8 μM do aptâmero, diluído seriadamente (1:1) em 16 concentrações. Antes da transferência para os capilares, houve a incubação da proteína com o aptâmero marcado durante 15 min. O ensaio foi executado em duplicata a 25 °C, 76 % de excitação e uma potência média de LED.

3.8.3.4. Anticorpo monoclonal anti-NS1z

Para avaliar a ligação entre o mAb anti-NS1 e seus aptâmeros, foi realizado um ensaio para verificação (*binding check*), onde o alvo foi avaliado em uma única concentração. A rotulagem do anticorpo com o corante RED-NHS 2^a geração, seguiu o mesmo procedimento descrito no item 3.6.3.1. As análises foram realizadas utilizando 20 nM do mAb marcado e 50 μM dos aptâmeros. Após 15 min de incubação, as amostras foram carregadas em capilares e a amplitude de fluorescência foi medida. O experimento foi realizado em triplicata a 25 °C, 30 % de excitação e 20 % de potência do LED.

3.8.4. Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)

A calorimetria mede diretamente o calor associado às interações intrínsecas à formação de complexos, independentemente de qualquer mudança no tamanho ou massa e na ausência de quaisquer marcadores de repórter adicionais. Na calorimetria de titulação isotérmica (ITC), o calor medido de uma interação alvo-ligante equivale à mudança de entalpia (ΔH) do processo, permitindo uma visão única e direta sobre a termodinâmica fundamental subjacente (174). A ITC pode medir diretamente a energia de ligação de processos biológicos, incluindo ligação proteína-proteína, DNA-proteína e proteína-carboidrato, dentre outros (175).

Os experimentos de calorimetria foram realizados no LAMAM (Bio-Manguinhos/Fiocruz), utilizando o equipamento Nano-ITC (TA Instruments) e software NanoAnalyze®.

3.8.4.1. Proteína NS1 do ZIKV

Para a avaliação da afinidade de ligação ligante-alvo utilizando o ITC, a célula de amostra foi preenchida com 300 μL da proteína rNS1z a 10 μM em PBS/arginina 33 mM (tampão original da proteína) e a seringa de titulação foi carregada com 50 μL de aptâmero (100 μM) dituído em água. Foram realizadas 20 injeções em série de 1,96 μL cada, em intervalos de 300 segundos, sob agitação contínua de 200 RPM da solução na célula de amostra. Os ensaios foram realizados a 25 °C, em duplicata e cada experimento durou 6000 s.

Um ensaio “branco” também foi executado para verificar a interação entre os tampões da proteína e do aptâmero. Para isso, foram adicionados 50 μL de água na seringa e 300 μL do tampão PBS/arginina 33 mM, seguindo os mesmos parâmetros estabelecidos anteriormente.

Ensaio complementares foram realizados entre o aptâmero e o tampão da proteína rNS1z e entre o aptâmero e a proteína rNS1z em água, a fim de identificar possíveis associações inespecíficas. Esses experimentos também foram executados de acordo com o protocolo anterior, com 20 injeções, agitação a 200 RPM e temperatura de 25 °C.

3.8.4.2. Anticorpo monoclonal anti-NS1z

O experimento de ITC realizado para análise da ligação entre os aptâmeros e o mAb anti-NS1 foram executados com os mesmos parâmetros descritos no item 3.6.4.1.

Os ensaios iniciais foram feitos com 50 μL do aptâmero em água (100 μM) adicionados à seringa e 300 μL do mAb anti-NS1 em PBS (7,08 μM), na célula de amostra. O tempo entre duas injeções sucessivas foi de 300 segundos, totalizando 20 injeções em 6000 s. A agitação foi fixada em 200 RPM e a temperatura em 25 °C.

A fim de verificar a influência do PBS na ligação, um ensaio foi realizado utilizando 50 μL do aptâmero em água (100 μM) na seringa e 300 μL de PBS na célula. Em seguida, foi executado um experimento com troca de tampão do anticorpo. Nesse ensaio, foram usados 75 μM de aptâmero e 10 μM do mAb anti-NS1 (50 μL), ambos em água.

4. RESULTADOS

4.1. Produção e purificação do ZIKV

Antes de produzir um banco de trabalho do ZIKV, foi realizada uma cinética de propagação viral em células Vero CCL-81, para avaliar o perfil de replicação do isolado de ZIKV ES2916/2015. O vírus foi inoculado usando as MOIs 0,02 e 0,002 e coletado a cada 24 h, sendo o primeiro ponto de coleta em 8 hpi.

Na figura 4.1.1., pode ser observado que, em comparação com o controle celular, as células infectadas com ZIKV começaram a demonstrar efeito citopático (CPE) aparente a partir de 72 hpi, sendo intensificado a cada 24 h.

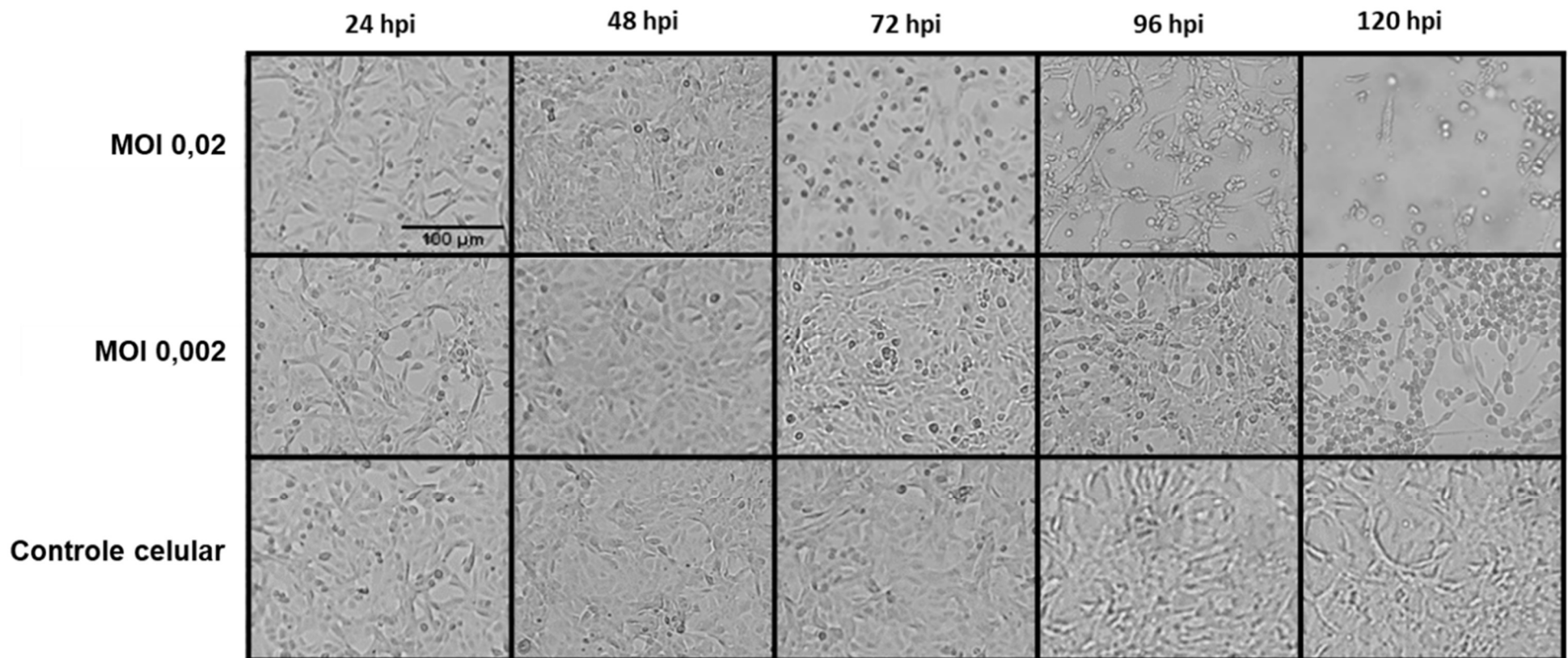


Figura 4.1.1. Imagens de monocamada de células Vero demonstrando o efeito citopático do ZIKV ao longo do tempo. As células infectadas com o ZIKV nas MOIs 0,02 e 0,002 apresentaram CPE a partir de 72 hpi. A monocamada do controle celular se manteve confluenta durante todo experimento.

A cinética viral usando MOI de 0,02 apresentou um perfil de propagação mais rápido, como esperado, e atingiu um platô 24 h antes da curva referente ao MOI 0,002. O pico de produção viral ocorreu em 48 hpi na MOI de 0,02 (6,21 Log₁₀ PFU/mL) e, em 72 hpi na MOI de 0,002 (6,32 Log₁₀ PFU/mL) (figura 4.1.2).

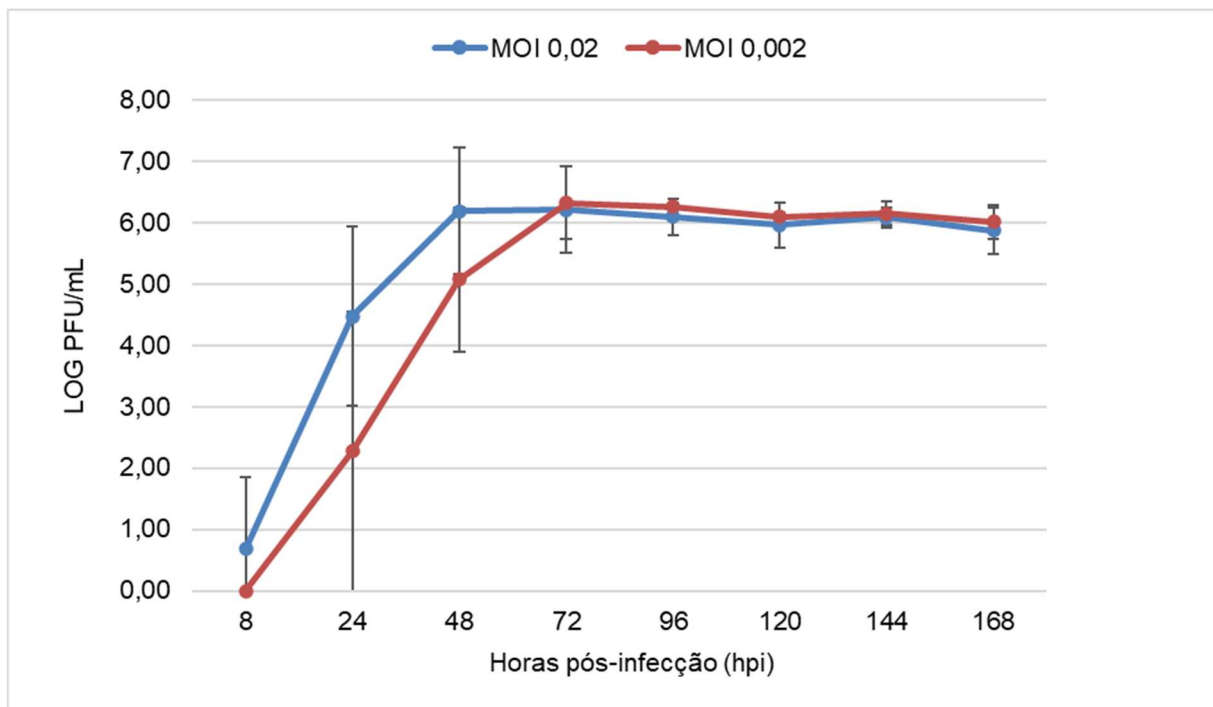


Figura 4.1.2. Cinética viral do ZIKV ES 2916/2015 em células Vero em MOI 0,02 e MOI 0,002. As curvas atingiram o platô de produção viral em 48 hpi (MOI de 0,02) e 72 hpi (MOI de 0,002).

Para a produção do banco de trabalho, culturas de células Vero foram inoculadas com *input* viral de 0,02 e o vírus foi coletado após 48 horas de infecção. Após produção e purificação do ZIKV, obteve-se um título viral de 7,44Log₁₀ PFU/mL.

4.2. Aptâmeros selecionados para a partícula viral íntegra

4.2.1. Alinhamento das sequências dos aptâmeros selecionados para a partícula viral íntegra

A tecnologia SELEX foi usada para a seleção de aptâmeros de DNA específicos contra partículas virais inteiras. Uma biblioteca de DNAs aleatória foi incubada com partículas de ZIKV imobilizadas em placas de ELISA e foram realizados ciclos de interação, separação de espécies ligadas das não ligadas, eluição e amplificação das espécies ligadas. Após a 5ª rodada de seleção, foi realizada seleção negativa com outros flavivírus, os quatro sorotipos de DENV e o YFV, para selecionar aptâmeros

mais específicos. Ao final dos ciclos SELEX, as moléculas derivadas de PCR foram clonadas e sequenciadas. Noventa e quatro clones contendo a inserção dos aptâmeros, oriundos da eluição com NaSCN 3 M, foram obtidos.

Foi realizado o sequenciamento de 27 desses clones e a homologia foi avaliada usando um alinhamento Clustal Omega. Na figura 4.2.1.1., é possível detectar a formação de quatro grupos de aptâmeros com 100% de homologia de nucleotídeos: grupo ZIK01 (aptâmeros ZK04 e ZK83); grupo ZIK02 (aptâmeros ZK06, ZK23 e ZK78); grupo ZIK03 (aptâmeros ZK34 e ZK88); e grupo ZIK04 (aptâmeros ZK17 e ZK86). Além disso, foi observada homologia de 22 nucleotídeos (GTTTAGAAACCCACCGTGGCA) entre 10 sequências: ZK06, ZK23, ZK78, ZK34, ZK88, ZK17, ZK86, ZK58, ZK80 E ZK94.

Clone	Sequência 5' → 3'	
ZK68	----CAGGGCCACCATTTC-TTTCGCTGGTC----	
ZK90	---CCAACTCCGCCACTCACCTTGGTGT-----	
ZK38	-----TGGTCCGGCCCTCGATGCCCCGTTTC---	
ZK27	--GTCTACTGCCGTGTTTCGCCCGCCCG-----	
ZK46	----GTTAGGCCGGGTTTCAGACAGATGCG----	
ZK32	---CATACACATGGTCTTACATGCGTGC-----	
ZK39	---GATAGGGGGAACGATACAATTTCGGC-----	
ZK04	---GGGTTGGTCGTTTCAGTGCAAGTAGC-----	Grupo ZIK01
ZK83	---GGGTTGGTCGTTTCAGTGCAAGTAGC-----	
ZK53	-----TCTGTCCAACCTCAGCACATAGCATG--	
ZK06	GTTTAGAAACCCACCGTGGCAACGATCATTGG	Grupo ZIK02
ZK23	GTTTAGAAACCCACCGTGGCAACGATCATTGG	
ZK78	GTTTAGAAACCCACCGTGGCAACGATCATTGG	
ZK34	GTTTAGAAACCCACCGTGGCAACAC-----	Grupo ZIK03
ZK88	GTTTAGAAACCCACCGTGGCAACAC-----	
ZK17	GTTTAGAAACCCACCGTGGCA CAATGCTA ---	Grupo ZIK04
ZK86	GTTTAGAAACCCACCGTGGCA CAATGCTA ---	
ZK58	GTTTAGAAACCCACCGTGGCA CAATGCGC ---	
ZK80	GTTTAGAAACCCACCGTGGCA C -----	
ZK94	GTTTAGAAACCCACCGTGGCA CCATGCAAATG	
ZK33	GTTTAGAAACCCACCGCGGCACAACCATG---	
ZK51	-----AATCCCGCCATTGCATATCGCACAG-	
ZK12	----GCATGGCCTAATCGCGTA--CAGCCTT--	
ZK93	-----TGAACTTGCTGCGAAGTCAGTTCAC-	
ZK60	---TCGCCGATTGGTCCGTACCGCCCC-----	
ZK64	---CCGGTTATGGTACCTTACCAAAGC-----	
ZK56	----GACTTATCGCTCTTGGTCCCGACA----	

Figura 4.2.1.1. Alinhamento das sequências dos aptâmeros selecionados para a partícula viral de Zika. Os retângulos vermelhos indicam quatro grupos de aptâmeros. O quadrado azul mostra a homologia de nucleotídeos entre as sequências. Os nucleotídeos em negrito foram removidos. Os aptâmeros foram eluídos em 3 M de NaSCN.

Uma sequência de cada grupo foi sintetizada para avaliação de afinidade e interação com o alvo. Os grupos ZIK01 e ZIK02 foram sintetizados na íntegra, enquanto as sequências dos grupos ZIK03 e ZIK04 foram truncadas para o tamanho pré-determinado (25 pb).

4.2.2. Predição das estruturas secundária e terciária dos aptâmeros para a partícula viral íntegra

As estruturas secundárias das moléculas de DNAs foram previstas usando o servidor Web UNAFold, que prevê as estruturas secundárias e calcula a variação da energia livre de Gibbs (ΔG).

A Figura 4.2.2.1. A demonstra as estruturas bidimensionais mais estáveis de cada grupo de aptâmero e suas respectivas ΔG . Os grupos ZIK02, ZIK03 e ZIK04 apresentam uma estrutura conservada em forma de alça em gancho (*stem-loop*), formado pelos 11 nucleotídeos finais do primer senso e os cinco primeiros nucleotídeos da sequência do aptâmero.

A transformação de sequências secundárias em estruturas tridimensionais consistiu em múltiplas etapas e na utilização do programa Chimera. Os resultados da análise tridimensional confirmam a semelhança estrutural entre os aptâmeros ZIK02, ZIK03 e ZIK04 (figura 4.2.2.1. B).

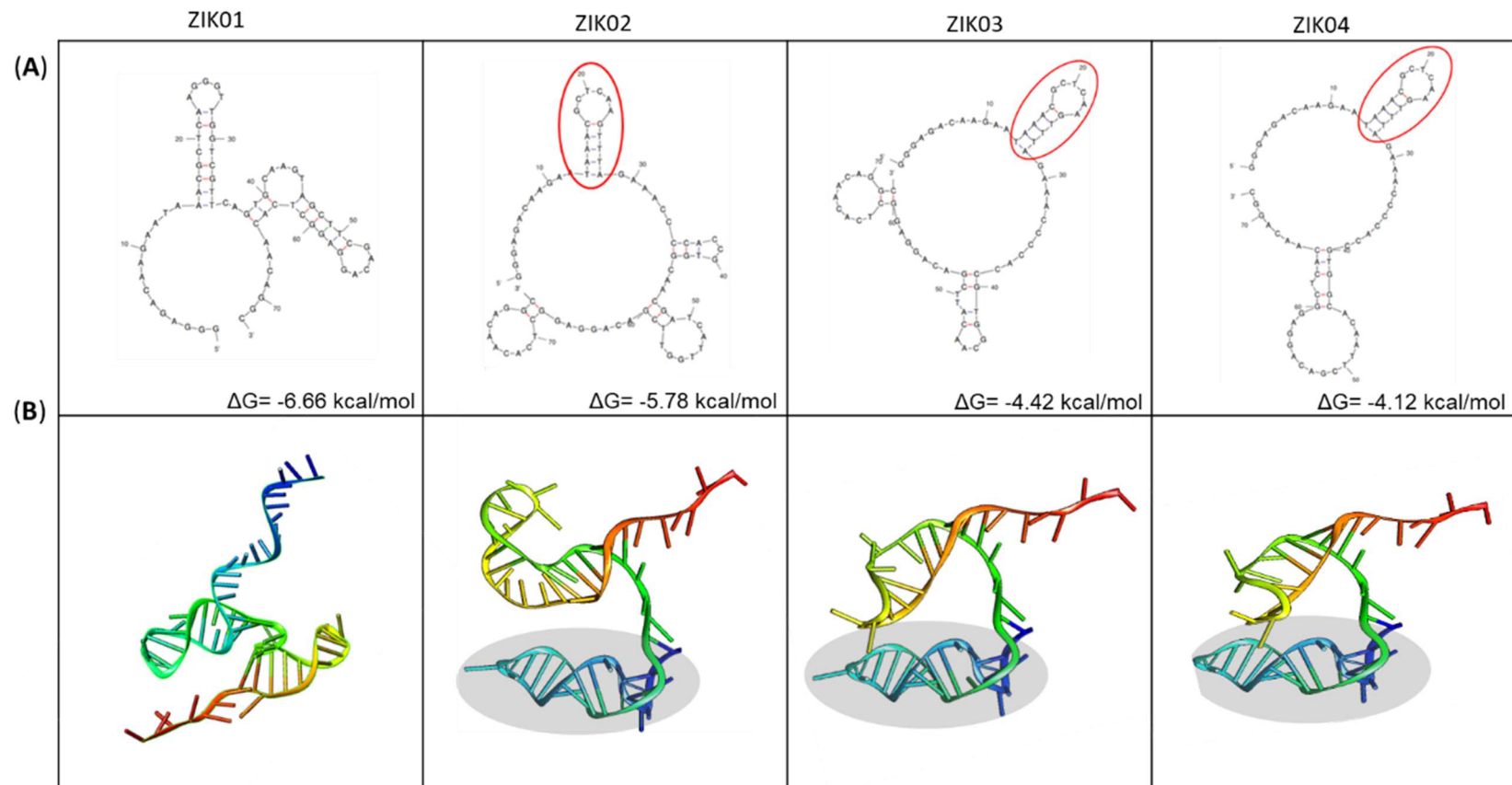


Figura 4.2.2.1. Predição das estruturas secundárias e terciárias dos quatro aptâmeros selecionados para o vírus zika. (A) Estrutura secundária dos aptâmeros pelo servidor web UNAFold. Parâmetros: DNA linear; temperatura de dobragem = 25°C; [Na+] = 0,1; [Mg⁺⁺] = 0,01; unidade = M; ΔG = energia livre; as áreas circuladas mostram estruturas em forma de grampo semelhantes em três aptâmeros. (B) Previsão computacional das estruturas 3D dos aptâmeros usando o programa Chimera. As áreas em destaque indicam a mesma estrutura terciária em três aptâmeros.

4.2.3. Interação molecular dos aptâmeros com a proteína E do ZIKV

A simulação da interação molecular entre aptâmeros e proteína E de ZIKV foi prevista usando o servidor HDOCK. O HDOCK realiza ancoragem global para prever complexos de ligação entre duas moléculas usando uma estratégia de ancoragem híbrida.

Analizamos as 10 primeiras predições (10 modelos) e eliminamos aquelas que interagiram na parte voltada para a região transmembrana da proteína E do ZIKV. Dentre os modelos ligados à superfície externa da proteína, selecionamos aquele com a menor pontuação de *docking*. Para os aptâmeros ZIK01 e ZIK02, o modelo 1 foi selecionado. Os aptâmeros ZIK03 e ZIK04 apresentaram o modelo 3 como o modelo com menor energia e que atendeu aos parâmetros pré-estabelecidos. A figura 4.2.3.1. mostra os locais de interação entre cada aptâmero e a proteína E dimérica. Observa-se que todos os aptâmeros apresentam sítios de ligação em dois monômeros adjacentes do mesmo E-dímero (figura 4.2.3.1. e tabela 4.2.3.1).

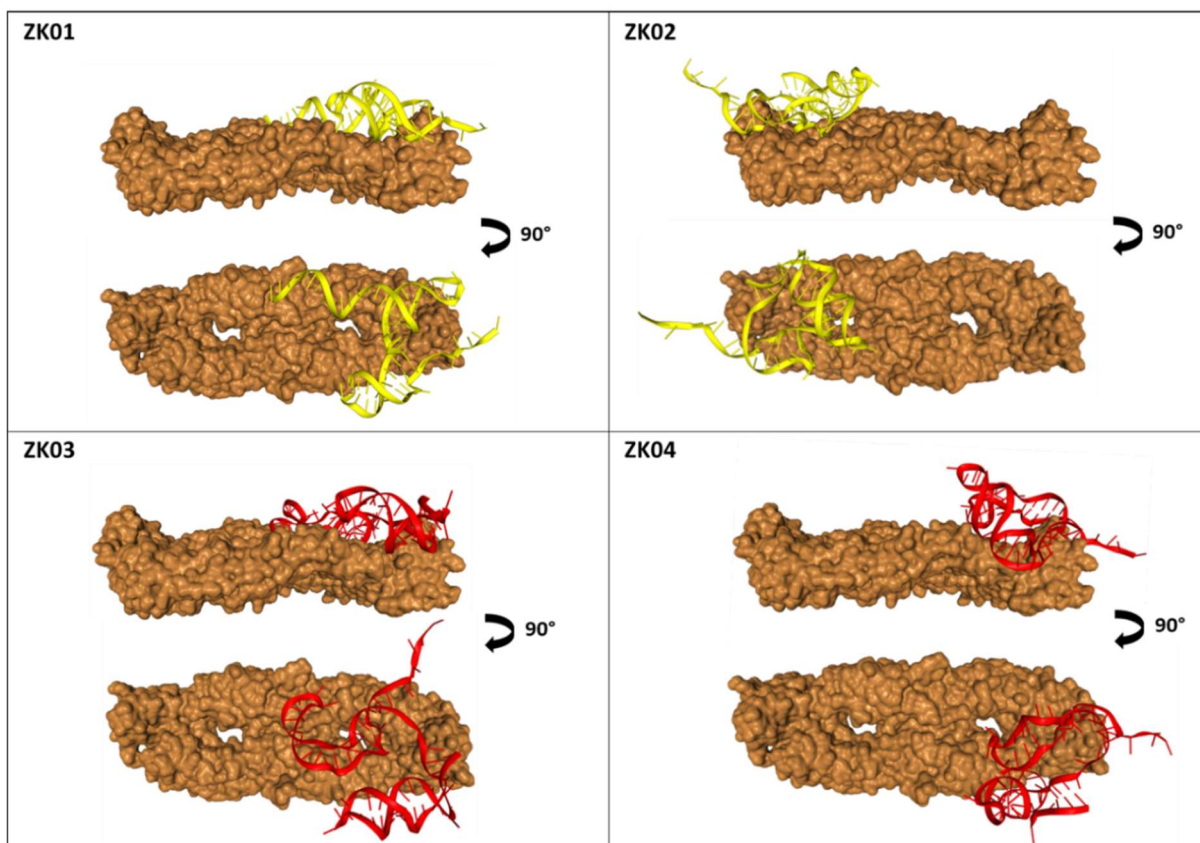


Figura 4.2.3.1. Simulação da dinâmica molecular dos quatro aptâmeros selecionados e da proteína E dimérica de ZIKV pelo servidor HDock. A proteína E, em marrom, está representada em dois ângulos: o primeiro, mostrando a ligação do aptâmero na parte externa da proteína; o segundo, após rotação de 90°, detalhando o local exato da interação. Os aptâmeros estão representados nas cores amarela (ZK01 e ZK02) e vermelha (ZK03 e ZK04).

Tabela 4.2.3.1. Posição de encaixe dos aptâmeros na proteína E.

ZIK01		ZIK02		ZIK03		ZIK04	
aa	Position [#]	aa	Position [#]	aa	Position [#]	aa	Position [#]
SER	64A	MET	68A	ARG	2A	SER	306A
SER	66A	ALA	69A	VAL	46A	THR	309A
GLN	89A	SER	70A	THR	47A	ALA	310A
LYS	118A	ASP	71A	GLU	62A	ALA	311A
PHE	119A	SER	72A	SER	64A	THR	313A
ALA	120A	ARG	73A	SER	122A	PHE	314A
CYS	121A	TYR	81A	LYS	123A	THR	315A
SER	122A	ASP	83A	LYS	124A	ILE	317A
LYS	123A	GLY	102A	ARG	138A	GLN	331A
LYS	124A	ASN	103A	MET	140A	TYR	332A
GLY	145A	HIS	249A	GLU	162A	ALA	333A
SER	146A	ALA	250A	LYS	166A	GLY	334A
GLU	162A	LYS	251A	ASN	207A	THR	335A
ASN	163A	ARG	252A	GLU	262A	ASP	336A
ARG	164A	ARG	2B	ARG	283A	GLU	367A
GLY	182A	HIS	27B	THR	313A	SER	368A
ASP	230A	VAL	46B	PHE	314A	THR	369A
THR	231A	THR	47B	THR	315A	GLU	370A
GLY	232A	MET	140B	GLN	331A	ASN	371A
THR	233A	SER	146B	GLU	367A	SER	70B
PRO	234A	GLU	162B	GLU	370A	ASP	71B
TRP	236A	ASN	163B	ASN	371A	SER	72B
ASP	278A	ARG	164B	LYS	373A	ARG	73B
GLY	279A	LYS	166B	GLU	62B	CYS	74B
ARG	283A	ASP	278B	ALA	63B	THR	76B
LYS	301A	ARG	283B	SER	64B	GLN	77B
THR	309A	LYS	301B	ILE	65B	GLY	78B
ALA	310A	VAL	303B	SER	66B	GLU	79B
ALA	311A	TYR	305B	ASP	67B	TYR	81B
THR	313A	GLN	331B	MET	68B	LEU	82B
PHE	314A	THR	335B	GLN	77B	ASP	83B
THR	315A	PRO	338B	TYR	90B	GLY	104B
ILE	317A	THR	366B	TRP	101B		
GLN	331A	GLU	367B	GLY	102B		
ALA	333A	SER	368B	ASN	103B		
GLY	334A	THR	369B	LYS	118B		
THR	335A	GLU	370B	SER	122B		
VAL	364A	ASN	371B	LYS	251B		
THR	366A	SER	372B	ARG	252B		
GLU	367A	LYS	373B	THR	254B		
SER	368A			VAL	255B		
THR	369A			VAL	256B		
GLU	370A			VAL	257B		
ASN	371A			LEU	258B		
SER	372A			SER	260B		
LYS	373A						
MET	374A						
MET	375A						
LYS	394A						
ARG	73B						
CYS	74B						
GLN	77B						
TYR	81B						
ASP	83B						
GLY	104B						

[#] A = monomer A; B = monomer B.

4.3. Aptâmeros selecionados para a proteína recombinante NS1 glicosilada do ZIKV (rNS1zg)

4.3.1. Alinhamento das sequências dos aptâmeros selecionados para a rNS1zg

Os aptâmeros para a proteína NS1 glicosilada foram selecionados utilizando a metodologia SELEX. A proteína foi imobilizada em placas de ELISA e a biblioteca de DNAs foi adicionada. Após quatro ciclos de ligação, eluição e amplificação das sequências, foi realizado um ciclo de seleção negativa utilizando a proteína NS1 de YFV, a fim de aumentar a especificidade da seleção. Após outros dois ciclos de seleção positiva, os aptâmeros oriundos das eluições em NaCl 1,5 e NaSCN 3 M foram dessalinizados, amplificados e clonados. Cinquenta clones foram selecionados, sendo 25 da eluição de NaCl 1,5 M e 25 clones da eluição de NaSCN 3 M. Três clones, referentes à eluição de NaCl 1,5 M foram sequenciados (rNS1zg_12, rNS1zg_14 e rNS1zg_20) e apenas um (rNS1zg_5) da eluição de NaSCN 3 M (figura 4.3.1.1.).

Os aptâmeros rNS1zg_12 e rNS1zg_20 apresentaram sequências bem semelhantes, diferindo somente em três nucleotídeos. Sendo assim, apenas os aptâmeros rNS1zg_5, rNS1zg_12 e rNS1zg_14 foram selecionados para as próximas etapas.

Clone	Sequência (5' → 3')
rNS1zg_14	-TTATCAAACTTTTTTTGATTAC-----
rNS1zg_5	CTCTTCCAAGCTATCACGGTAGTCA-----
rNS1zg_12	-----CGCAGCTGTCCTGGGGCATAACGAA
rNS1zg_20	--CAACGCAGCTGTCCTGGGGCATAACGAA

Figura 4.3.1.1. Alinhamento das sequências dos aptâmeros selecionados para proteína recombinante NS1 glicosilada do ZIKV. O retângulo vermelho indica a homologia de nucleotídeos entre as sequências. Os aptâmeros rNS1zg_12, rNS1zg_14 e rNS1zg_20 foram eluídos em NaCl 1,5 M e o aptâmero rNS1zg_5, eluído em NaSCN 3 M.

4.3.2. Predição das estruturas secundária e terciária dos aptâmeros para a rNS1zg

Foi realizada a predição da estrutura secundária para os três aptâmeros selecionados e aquelas que demonstraram menor energia livre para cada aptâmero estão apresentadas na figura 4.3.2.1.A. Dentre os aptâmero selecionados, o rNS1zg_14 apresentou menor ΔG .

Na figura 4.3.2.1.B., estão representadas as estruturas terciárias de cada aptâmero. É possível observar a grande diferença espacial entre os aptâmeros.

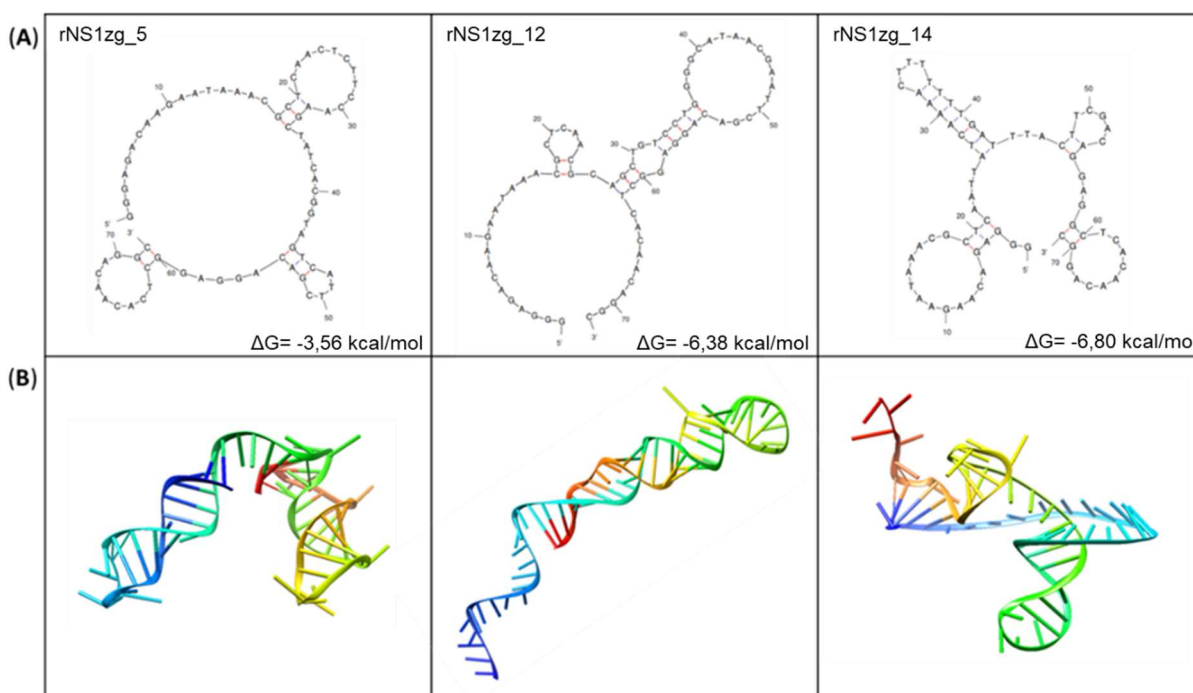


Figura 4.3.2.1. Predição das estruturas secundárias e terciárias dos três aptâmeros selecionados para proteína rNS1zg. (A) Estrutura secundária dos aptâmeros pelo servidor web UNAFold. Parâmetros: DNA linear; temperatura de dobragem = 25°C; [Na⁺] = 0,1; [Mg⁺⁺] = 0,01; unidade = M; ΔG = energia livre; (B) Previsão computacional das estruturas 3D dos aptâmeros usando o programa Chimera.

4.3.3. Interação molecular dos aptâmeros com a rNS1zg

Na simulação da interação molecular entre os aptâmeros e a proteína rNS1zg, analisamos as 10 primeiras predições (10 modelos) e eliminamos aquelas que interagiram na parte voltada para a região β -roll, partindo do princípio de que os sítios de ligação nessa região não estariam disponíveis na proteína nativa. Dentre os modelos ligados à superfície externa da proteína, selecionamos aquele com a menor pontuação de *docking*. Para o aptâmero rNS1zg_5, o modelo 1 foi o que melhor se enquadrou nos parâmetros pré-estabelecidos. Já para os aptâmeros rNS1zg_12 e

rNS1zg_14, foram selecionados os modelos 7 e 3, respectivamente. A Figura 4.3.3.1. apresenta os locais de interação entre cada aptâmero e a rNS1zg, demonstrando que rNS1zg_12 e rNS1zg_14 se ligaram na parte oposta da região β -roll.

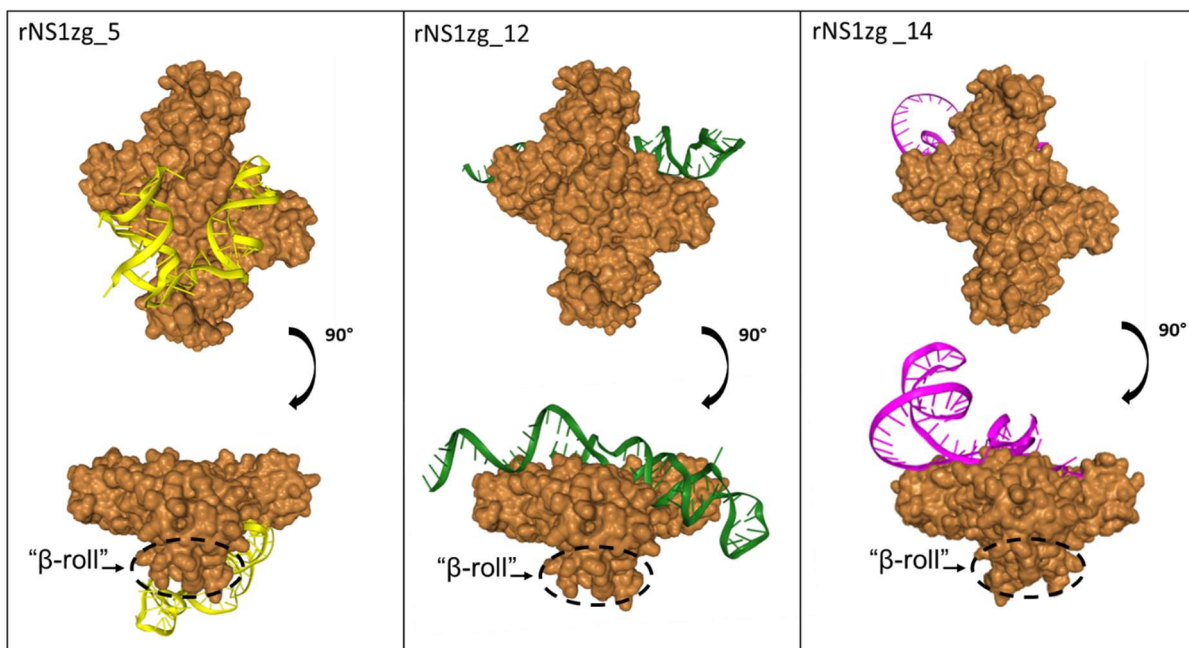


Figura 4.3.3.1. Simulação da dinâmica molecular de três aptâmeros selecionados e da proteína NS1z glicosilada pelo servidor HDock. A proteína, em marrom, está representada em dois ângulos, a fim de detalhar o local exato da interação. Os aptâmeros estão representados nas cores amarela (rNS1zg_5), verde (rNS1zg_12) e rosa (rNS1zg_14). A região tracejada indica a porção β -roll da proteína.

4.4. Aptâmeros selecionados para a proteína NS1 recombinante não glicosilada (rNS1z) do ZIKV

4.4.1. Alinhamento das sequências dos aptâmeros selecionados para a rNS1z

Utilizando a metodologia SELEX, selecionamos os aptâmeros para a proteína NS1 não glicosilada. Uma biblioteca de sequências de DNAs foi incubada com a proteína imobilizada em placa de ELISA. Foram realizados seis ciclos de seleção positiva e um de seleção negativa com a proteína NS1 de YFV. Ao final de todos os ciclos, as sequências provenientes das eluições em NaCl 1,5 e 3 M foram dessalinizadas, ampliadas e clonadas. Na obtenção dos aptâmeros para a proteína rNS1z, foram selecionados 44 clones, todos na eluição de NaSCN 3 M. Trinta e três desses foram sequenciados, obtendo-se 18 sequências, das quais 6 foram agrupadas em 3 grupos com 2 sequências cada, baseado na homologia de nucleotídeos entre as sequências (figura 4.4.1.1).

Clone	Sequência (5'– 3')
rNS1z_39C	---TTGCGGCCAGCCCGGCCTCTTCGTG-----
rNS1z_37B	---TCGCTTAGTGTCTTGCGTCTTGGTG-----
rNS1z_4A	-----GGTGGTGTCAAGTATCCCTACGTT-----GG---
rNS1z_34	-----CTCCGTGTAATGCAAATCTGCACGG-----
rNS1z_16A	-----CAACAGCAAAGGCGTTCTGAGA--GCA-----
rNS1z_33A	-----CAACAGCAAAGGCGTTCTGAGA--GCA-----
rNS1z_6A	-----CAGTCCAGGTGACGCGGGT--GTGGGG--
rNS1z_22C	-----ACCTCTCCCAGAGGGGCAGGGGAT--A-----
rNS1z_41B	-----AAACCCAAAAGAGGGGTCCAGGT-----
rNS1z_43	CGATTAGCAACCTTTCTGGAAGG-----
rNS1z_38B	-----AAGACTGGAGACTA--GCAAAT-----GGCAC---
rNS1z_39D	-----AAGACTGGAGACTA--GCAAAT-----GGCAC---
rNS1z_44B	-----TATGTCCCACGCCCGCTGAACGTGA-----
rNS1z_12	---TTGGAAAATCTAACTCCAACGCATG-----
rNS1z_7C	-----AAGTTGTTTTCCACCGGAATGC-----
rNS1z_17	-----TAACGGCCGCTGTCATTAAACAGACG-----
rNS1z_28	-----TAACGGCCGCTGTCATTAAACAGACG-----
rNS1z_19	-----AAGACTCGCCCAAACGGCGCCTGTC-----

Figura 4.4.1.1. Alinhamento das sequências dos aptâmeros selecionados para proteína recombinante NS1 não-glicosilada do ZIKV. Os retângulos vermelhos indicam três grupos de aptâmeros formados. Os aptâmeros foram eluídos em NaSCN 3 M.

4.4.2. Predição das estruturas secundária e terciária dos aptâmeros para a rNS1z

A estrutura secundária foi predita para os 15 aptâmeros que foram sequenciados (dados não mostrados). Os aptâmeros rNS1z_19 e rNS1z_38B/39D, que apresentaram menor e maior ΔG , respectivamente, foram selecionados para serem representados em suas estruturas secundárias e terciárias (figura 4.4.2.1.). Na figura 4.4.2.1.B, pode ser observada claramente a diferença das estruturas tridimensionais dos dois aptâmeros.

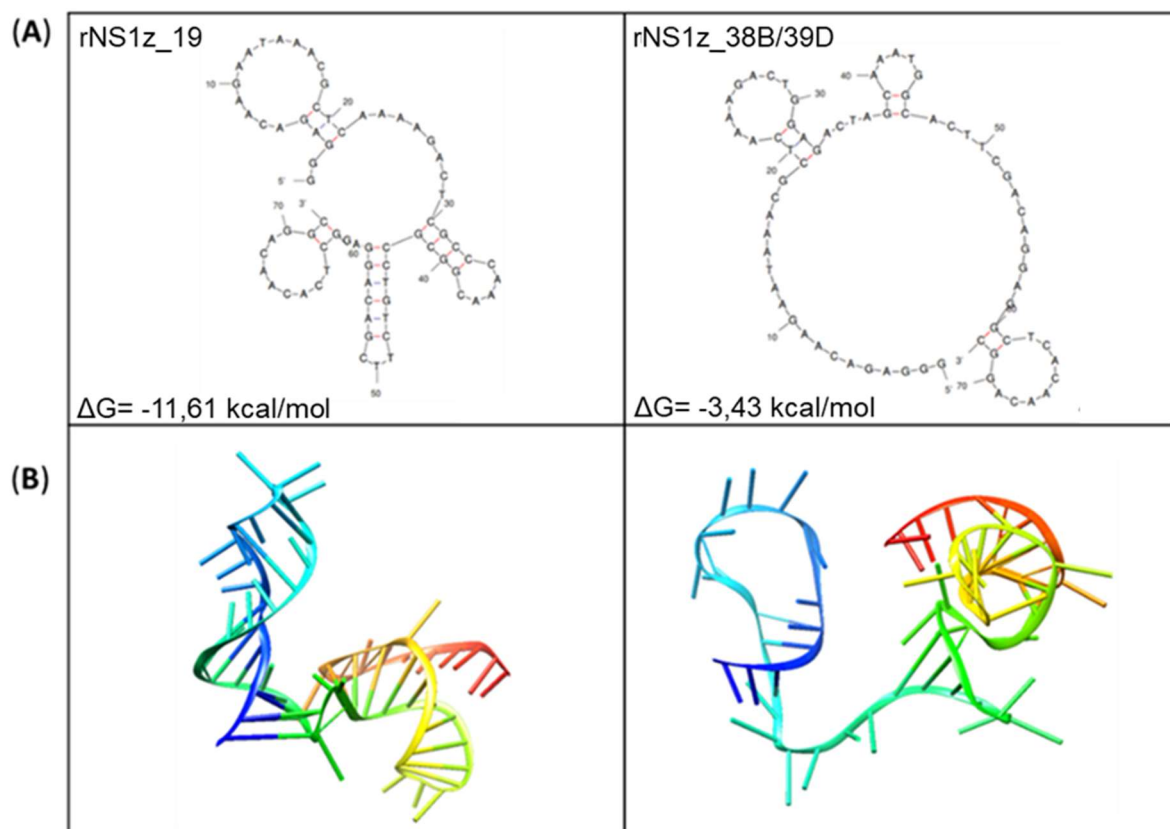


Figura 4.4.2.1. Predição das estruturas secundárias e terciárias de dois aptâmeros selecionados para proteína rNS1z. (A) Estrutura secundária dos aptâmeros pelo servidor web UNAFold. Parâmetros: DNA linear; temperatura de dobragem = 25°C; [Na⁺] = 0,1; [Mg⁺⁺] = 0,01; unidade = M; ΔG = energia livre; (B) Previsão computacional das estruturas 3D dos aptâmeros usando o programa Chimera.

4.4.3. Interação molecular dos aptâmeros com a rNS1z

Seguindo o mesmo protocolo do item 4.3.3, a simulação da interação molecular dos aptâmeros rNS1z_19 e rNS1z_38B/39D com a proteína a NS1z não glicosilada demonstrou que, para ambos os aptâmeros, o modelo de menor energia e que atendeu aos parâmetros pré-determinados foi o modelo 1. A Figura 4.4.3.1. demonstra que o primeiro aptâmero se liga fora da região β -roll, enquanto o segundo aptâmero, mesmo apresentando sua interação principal fora da região β -roll, após giro de 90°, parece apresentar sua estrutura estendida ligada a essa região, caso estivesse disponível.

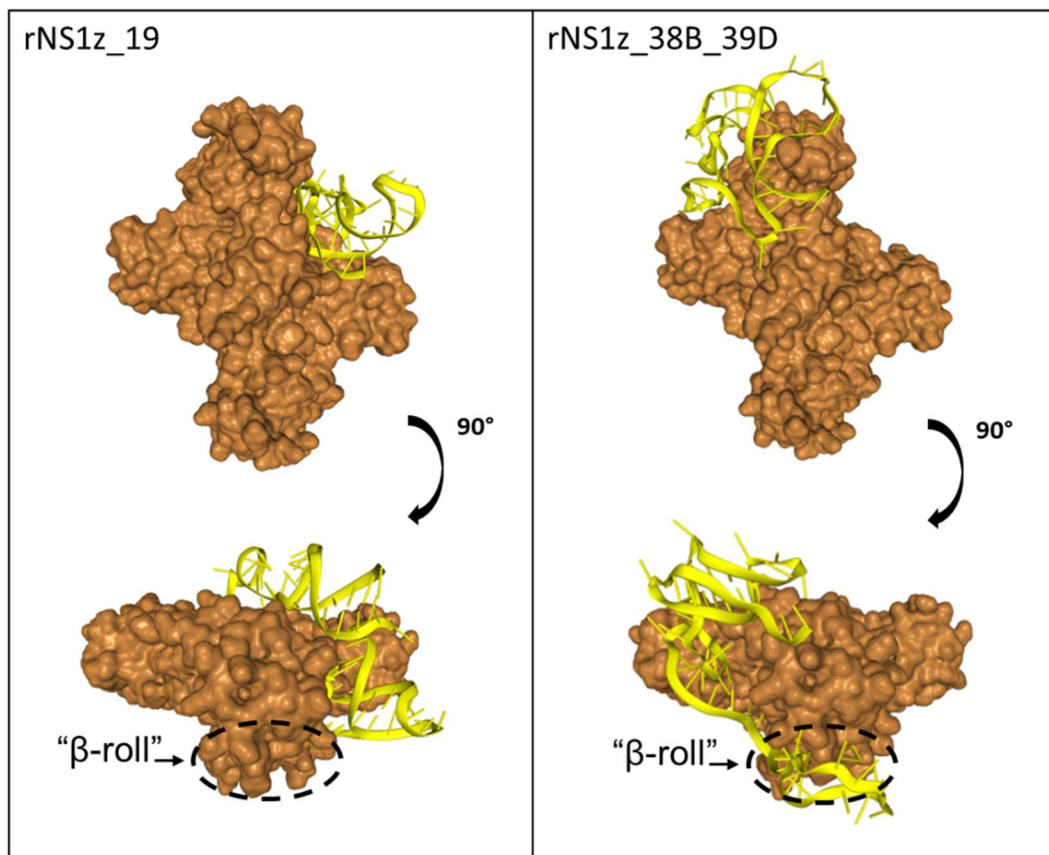


Figura 4.4.3.1. Simulação da dinâmica molecular de dois aptâmeros selecionados e proteína NS1z não glicosilada pelo servidor HDOCK. A proteína, em marrom, está representada em dois ângulos, a fim de detalhar o local exato da interação. A região tracejada indica a porção *β-roll* da proteína. Os aptâmeros estão representados pela cor amarela.

4.5. Aptâmeros selecionados para o anticorpo monoclonal anti-NS1 de zika (mAb anti-NS1z)

4.5.1. Alinhamento das seqüências dos aptâmeros selecionados para o mAb anti-NS1z

A metodologia SELEX foi utilizada para a seleção dos aptâmeros para o anticorpo monoclonal anti-NS1. A imobilização do anticorpo foi realizada de duas formas, por placa de ELISA e por coluna de afinidade. Após imobilização, o anticorpo foi incubado com uma biblioteca de seqüências de DNAs. Foram realizados 10 ciclos tanto na seleção em placa quanto na de coluna. Para seleção em placa, ao final de cada ciclo, as seqüências eluídas em NaCl 1,5 M e 3 M foram misturadas e amplificadas para início de novo ciclo. Na seleção em coluna, os espécimes não foram misturados. Ao final da seleção, os aptâmeros foram dessalinizados e sequenciados por NGS, gerando milhares de seqüências, que foram ranqueadas por número de repetições. As 20 seqüências mais frequentes de cada metodologia de seleção (placa

ou coluna) foram selecionadas e alinhadas com outras sequências previamente selecionadas para outros alvos, para eliminação das semelhantes. Por fim, foram obtidas 15 sequências da seleção em coluna e 5 de placa. Os aptâmeros gerados a partir da seleção em placas foram identificados com a letra “p” ao final do nome e os selecionados por coluna, com a letra “c”. Na figura 4.5.1.1, está exposto o alinhamento das sequências, demonstrando que 13 delas, todas provindas de colunas, apresentaram homologia em 13 nucleotídeos ATTAACCG(G/C)CTTT, indicando que essa é, possivelmente, uma sequência importante para a ligação do aptâmero no anticorpo.

Sete aptâmeros, que apresentaram prevalências superiores a 10 mil cópias, foram escolhidos para seguir com as análises posteriores (mAb_2c, mAb_5c, mAb_9c, mAb_12c, mAb_20c, mAb_11p e mAb_30c).

Aptâmero	Sequência (5' → 3')
mAb_17p	-----CCGAAGGTTGAGGGAATCCCCCACT
mAb_30p	-----TGGTACATTGAGCGGGACAGGTACC
mAb_11p	-----CACTCGGTTGAGCGGGGGGGCCAGC
mAb_12p	-----CACTCGGTTGAGCGGGGGGGCTAGC
mAb_29p	GGAGCGTGTTGTCGTGTACTTGGCAT-----
mAb_1c	-GGCCTCCTCGCGTACCAACCGCCTT-----
mAb_17c	----GATCCTGGAGATTAACCGCCCCGCG----
mAb_2c	-----GCCTCGAGATTAACCGGCTTTTCCG--
mAb_14c	-----TCCTGGAGACTAACCGCCTTTTGCG--
mAb_20c	-----CGTCCGGAGATTAACCGCCTTTGCG---
mAb_7c	-----GCCTCGTAGATTAACCGCCTTTGCG---
mAb_5c	-----GCTCCTGCGATTAACCGCCTTTGCG---
mAb_8c	-----GACCTGACGATTAACCGCCCTTGCG---
mAb_3c	-----GCCCTGACGATTAACCGCCCTTGCG---
mAb_16c	-----GCCCTGACGATTAACCGCCTTTGCG---
mAb_12c	-----GTGTGCGAATAACCGGCTTTTCCGT-
mAb_15c	-----GGCATGTGCGATTAACCGCCTTTGCG---
mAb_9c	-----GTGTGTGCGATTAACCGGCTTTTCCG--
mAb_19c	-----GGCATGTGCGATTAACCGGCTTTTCCG--
mAb_18c	-----ATAGGTGCGATTAACCGGCTTTTCCG--

Figura 4.5.1.1. Alinhamento das sequências dos aptâmeros selecionados para o anticorpo monoclonal anti-NS1 de ZIKV. O retângulo azul mostra a homologia de nucleotídeos entre as sequências. Aptâmeros com final “p” (selecionados em placas) foram eluídos em NaCl 1,5 M e 3 M. Aptâmeros com final “c” (selecionados em colunas) foram eluídos em NaCl 3 M.

4.5.2. Predição das estruturas secundária e terciária dos aptâmeros para o mAb anti-NS1z

Na figura 4.5.2.1., estão representadas as estruturas secundárias e terciárias dos sete aptâmeros (mAb_2c, mAb_5c, mAb_9c, mAb_12c, mAb_20c, mAb_11p e mAb_30p) selecionados para o anticorpo monoclonal anti-NS1z. O aptâmero que apresentou maior ΔG foi o mAb_30p, enquanto o de menor energia livre foi o mAb_20c. Os aptâmeros apresentaram estruturas secundária e terciária bem diversificadas. No entanto, todas as sequências que contém o motivo ATTAACCG(G/C)CTTT adotaram a mesma estrutura secundária nessa área conservada, com a parte ATTAA em fita simples não estruturada, acompanhada por uma estrutura *stem-loop* com o *stem* composto de três pares de GC em dupla fita e um *loop* composto pelo motivo CTTT (figura 4.5.2.1.A).

Na análise das estruturas tridimensionais foi possível identificar a semelhança estrutural na região de homologia em três dos cinco aptâmeros selecionados em coluna (mAb_2c, mAb_5c e mAb_12c) (figura 4.5.2.1. B).

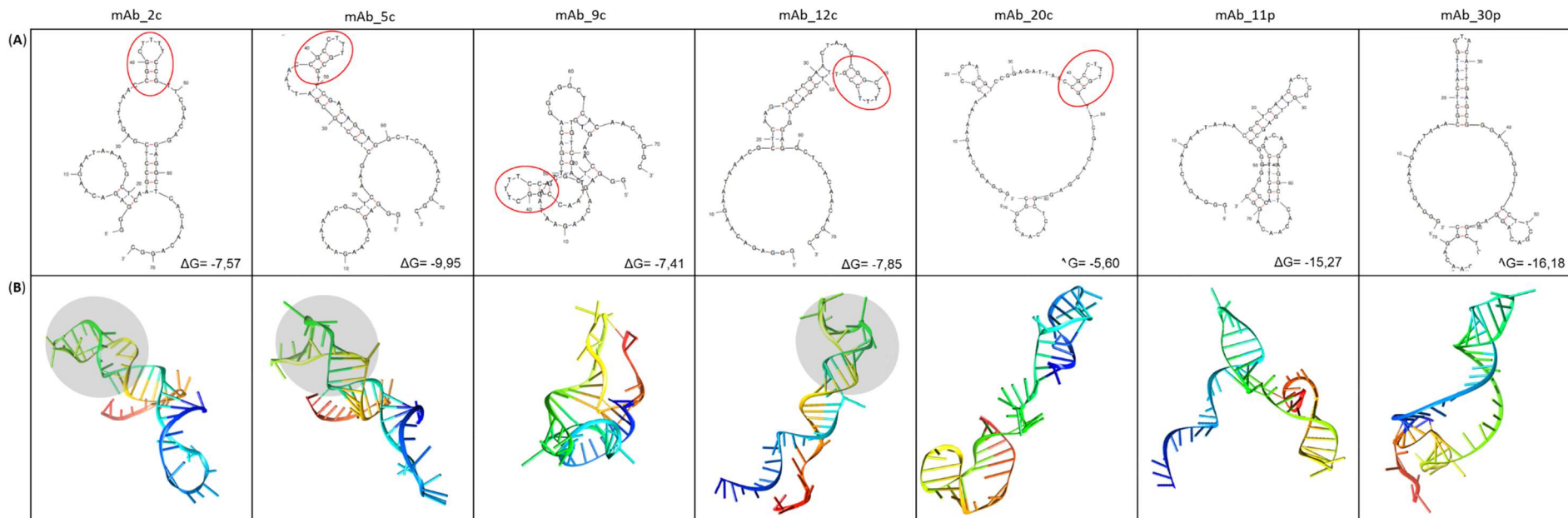


Figura 4.5.2.1. Predição das estruturas secundárias e terciárias de sete aptâmeros selecionados para proteína rNS1g. (A) Estrutura secundária dos aptâmeros pelo servidor web UNAFold. Parâmetros: DNA linear; temperatura de dobragem = 25°C; [Na⁺] = 0,1; [Mg⁺⁺] = 0,01; unidade = M; ΔG = energia livre; as áreas circuladas mostram estruturas em forma de grampo, semelhantes em cinco aptâmeros. (B) Previsão computacional das estruturas 3D dos aptâmeros usando o programa Chimera. As áreas em destaque indicam a mesma estrutura terciária em três aptâmeros.

4.6. Avaliação da interação dos aptâmeros por ELISA

4.6.1. ELISA dos aptâmeros para partícula viral

Um ELISA *in house* foi usado como ferramenta de triagem para avaliar o desempenho de ligação dos quatro grupos de aptâmeros ZIK01, ZIK02, ZIK03 e ZIK04 selecionados para a partícula viral. Os aptâmeros foram testados para o ZIKV em diferentes diluições na base 10 em uma placa de 96 orifícios tratada com PL.

Ao analisar a figura 4.6.1.1., é possível observar que os aptâmeros foram capazes de reconhecer o ZIKV apenas na diluição de 5×10^6 PFU/mL. Como não houve muita diferença entre as D.O., os aptâmeros foram selecionados com base nas análises *in silico*. Dessa forma, os aptâmeros ZIK01 e ZIK02, que apresentaram maiores diferenças estruturais entre si e menores ΔG , foram os escolhidos para prosseguir com os próximos testes.

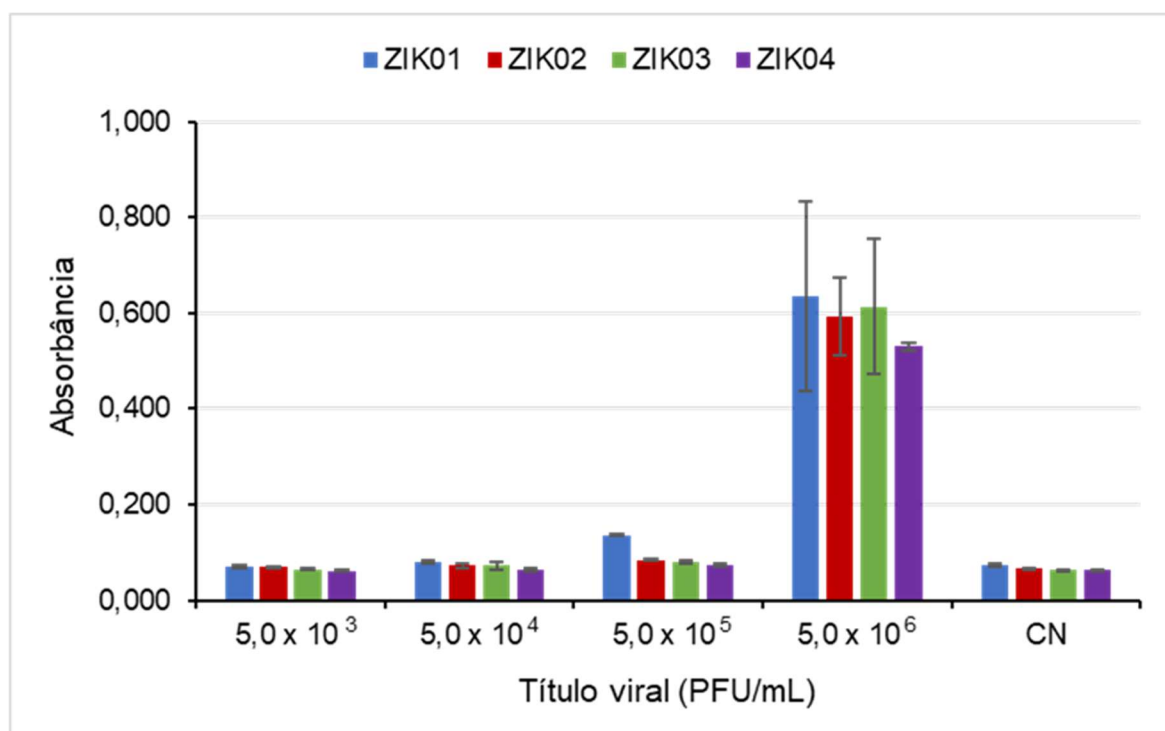


Figura 4.6.1.1. ELISA demonstrando a ligação dos quatro grupos de aptâmeros com a partícula viral do Zika. Placa tratada com polilisina 50 μ M/100 μ L. Cores: azul = aptâmero ZIK01; vermelho = ZIK02; verde = ZIK03; roxo = ZIK04. CN = YFV ($5,0 \times 10^6$ PFU/mL). Leitura em 450 nm.

4.6.2. ELISA dos anticorpos anti-NS1z com proteínas virais não estruturais do ZIKV e do YFV

Foram realizados ensaios de ELISA utilizando as proteínas rNS1z, rNS1zg, rNS5z e rNs1FA, a fim de avaliar a especificidade de quatro anticorpos monoclonais anti-NS1z produzidos no LATAM (Bio-Manguinhos/Fiocruz) e selecionar um para utilização em ensaios de ELISA para detecção da proteína NS1 com aptâmeros.

Na figura 4.6.2.1., podemos verificar que os quatro mAb testados foram capazes de reconhecer a proteína rNS1zg. Por outro lado, somente dois monoclonais (FD3/CA2 e LB10/BF4) se ligaram à proteína rNS1z. O anticorpo (Ac) policlonal, usado como controle positivo, foi capaz de reconhecer tanto as proteínas NS1 do ZIKV como a NS1 do YFV (rNS1FA). O mAb LB10/BF4 foi selecionado para utilização como anticorpo primário e controle positivo (CP) nos testes imunoenzimáticos com aptâmeros para a proteína NS1 de ZIKV, pela sua habilidade em reconhecer tanto a forma glicosilada quanto a forma não glicosilada da proteína NS1 de ZIKV e por ser utilizado em menor diluição quando comparado ao FD3/CA2 (1:10.000 x 1:500, respectivamente).

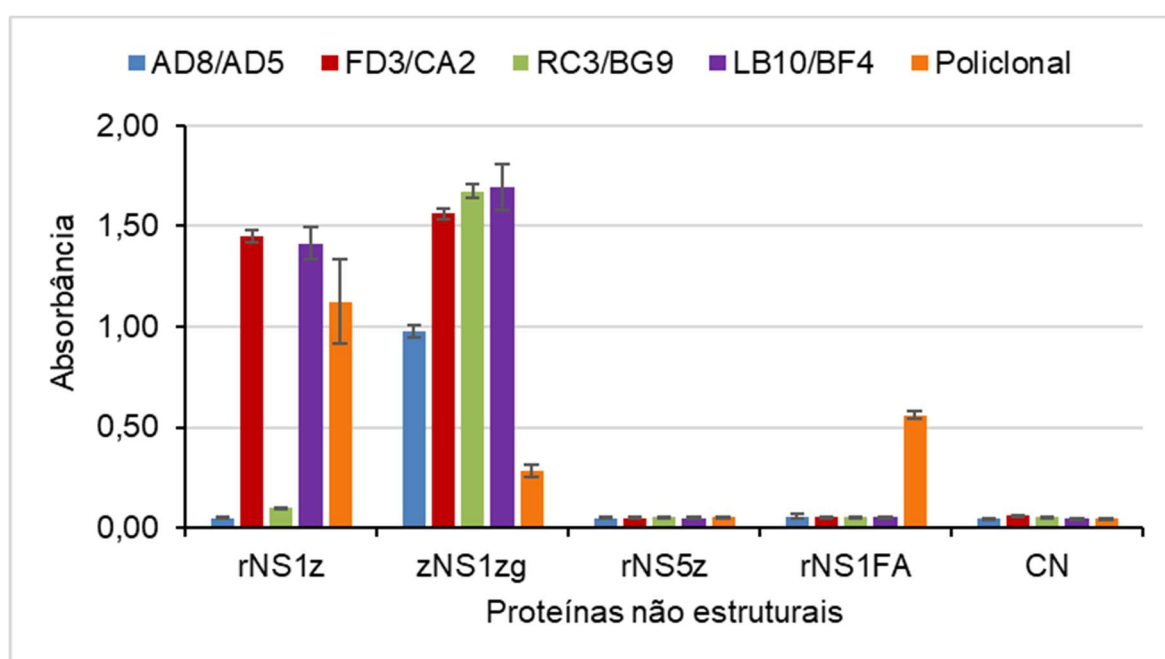


Figura 4.6.2.1. ELISA demonstrando a ligação dos mAbs anti-NS1z e do Ac policlonal para NS1 com as proteínas não estruturais do ZIKV (rNS1z, rNS1zg e rNS5z) e do YFV (rNS1FA). Cores: azul = mAb AD8/AD5; vermelho = FD3/CA2; verde = RC3/BG9; roxo = LB10/BF4; laranja = Policlonal. CN = Soro humano (Sigma-Aldrich). Concentração das proteínas = 200 ng/100 µL. Leitura em 450 nm.

4.6.3. ELISA dos aptâmeros para a rNS1zg

Os testes imunoenzimáticos para pré-seleção dos aptâmeros para proteína rNS1zg foram realizados em placas de 96 orifícios tratadas com PL, usando o mAb anti-NS1 LB10/BF4 como anticorpo primário, um aptâmero para proteína rNS5z como CN e a proteína rNS1zg diretamente ligada a placa como CP.

Todos os aptâmeros, independente da concentração, apresentaram melhor desempenho usando a proteína a 200 nM (figura 4.6.3.1). As leituras de absorbância demonstram que a densidade óptica do rNS1zg_5 [150 nM] (D.O. 450 nm = 1,516 nm) foi, em média, ligeiramente maior que as demais D.O. dos outros aptâmeros (figura 4.6.3.1.). A partir destes resultados, o aptâmero rNS1zg_5 foi selecionado para os próximos testes, assim como a concentração de 200 nM de rNS1zg.

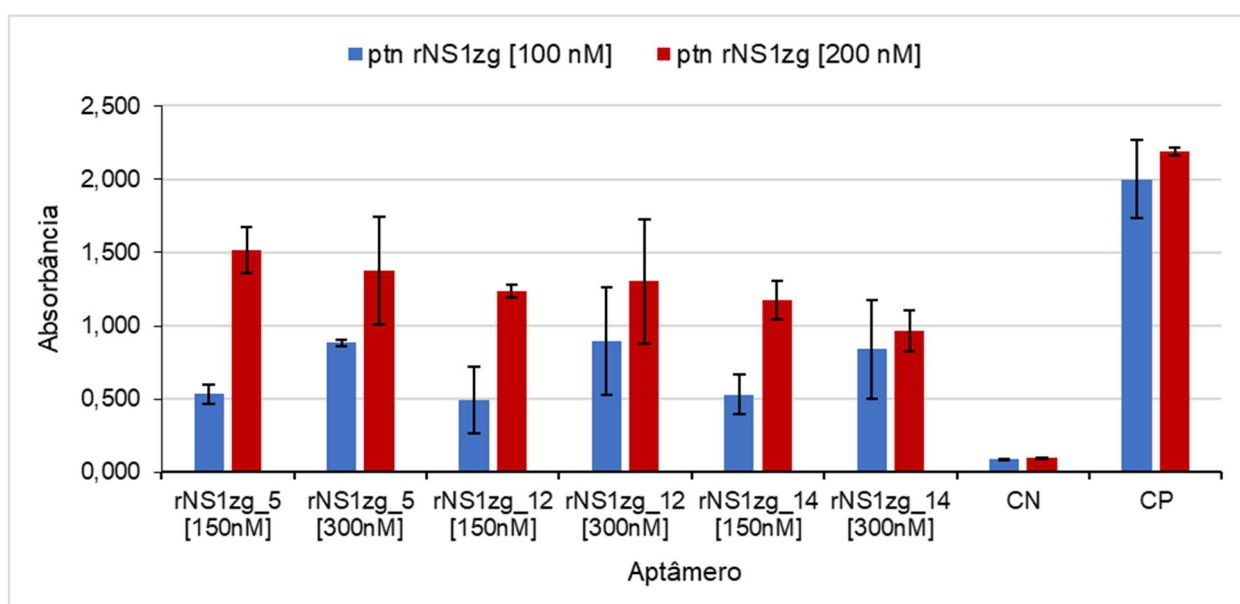


Figura 4.6.3.1. Ensaio imunoenzimático em placa de 96 orifícios tratada com PL, demonstrando a detecção da proteína NS1 glicosilada de ZIKV (rNS1zg) com os aptâmeros rNS1zg_5, rNS1zg_12 e rNS1zg_14 em duas concentrações diferentes. Cores: azul = rNS1zg a 100nM; vermelho = rNS1zg a 200 nM. CN = Aptâmero anti-NS5 do ZIKV (300 nM); CP = Proteína rNS1zg capturada diretamente na placa (100nM e 200 nM). Leitura em 450 nm.

4.6.4. ELISA dos aptâmeros para a rNS1z

Foram realizados testes imunoenzimáticos utilizando placas de 96 orifícios tratadas com PL, para a pré-seleção dos aptâmeros para proteína rNS1z. O monoclonal LB10/BF4 foi usado como anticorpo primário, um aptâmero para proteína

rNS5z foi utilizada como CN e a proteína rNS1z capturada diretamente na placa, como CP.

Na figura 4.6.4.1., podemos observar que, dentre os 15 aptâmeros analisados, o aptâmero rNS1z_19 apresentou a maior densidade óptica (D.O. 450 nm = 1,212). Por outro lado, o aptâmero rNS1z_38B/39D, que havia sido previamente escolhido para comparação nas análises *in silico*, ficou dentre os aptâmeros que apresentaram menor leitura (D.O. 450 nm = 0,469). Sendo assim, para as análises posteriores, o aptâmero rNS1z_19 foi selecionado.

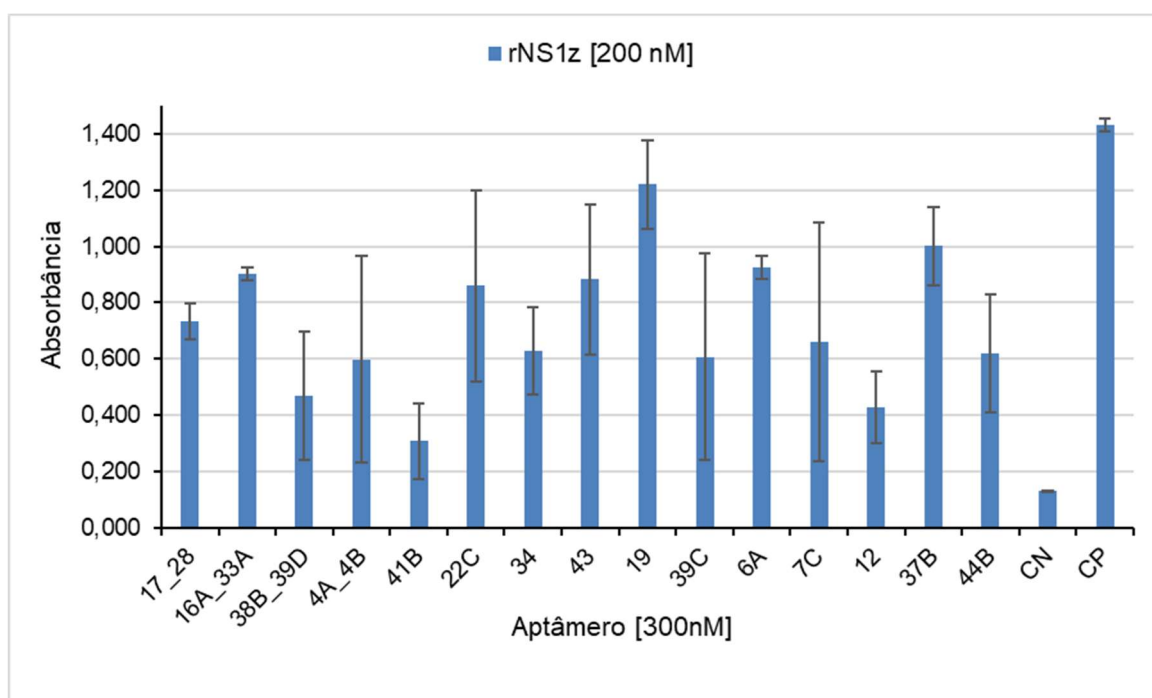


Figura 4.6.4.1. Ensaio imunoenzimático realizado em placa de 96 orifícios tratada com PL, demonstrando a detecção da proteína não glicosilada (rNS1z) utilizando 15 aptâmeros diferentes. CN = aptâmero anti-NS5 do ZIKV (300 nM); CP = Proteína rNS1z capturada diretamente na placa (200 nM). Leitura em 450 nm.

4.6.5. ELISA dos aptâmeros amino modificados para a partícula do ZIKV

Para melhor avaliação dos aptâmeros, foram realizados ensaios imunoenzimáticos utilizando placas de 96 orifícios ativadas com anidrido maleico e aptâmeros modificados na posição 5' com a adição de um grupo amina separados por 6 carbonos da base (aptâmeros amino modificados, -C6-NH₂).

Além dos CN e CP, foram adicionados dois outros controles, denominados CN-ptn e CN-vírus, para ensaios com a proteína E ou com o vírus, respectivamente. Estes controles se referem à adição de proteína ou vírus, após a etapa de bloqueio, em um

orifício onde não ocorreu a sensibilização com aptâmero. Dessa forma, foi possível avaliar a eficiência dos dois bloqueios testados (*superblock* e PBS/leite 5 %).

Analisando a figura 4.6.5.1., é possível notar que os ensaios para os aptâmeros ZIK01 e ZIK02, previamente selecionados por apresentarem as maiores diferenças estruturais entre si e menores ΔG (figura 4.2.2.1.), apresentaram grande semelhança entre si. Avaliando as densidades ópticas, verifica-se que os experimentos utilizando bloqueio com PBS/leite 5 % apresentaram resultados inferiores àqueles com *superblock*. No tampão *superblock*, ao analisar o CN_ptn e o CN_vírus, observa-se que as leituras ficaram próximas àquelas observadas nas amostras, indicando que o tampão não realizou o bloqueio de forma eficiente e invalidando o teste. Para o bloqueio PBS/leite 5 %, as D.O.s ficaram muito baixa, dificultando a análise, porém são observados valores mais expressivos nos controles CN_ptn e CN_vírus, quando comparados ao CN.

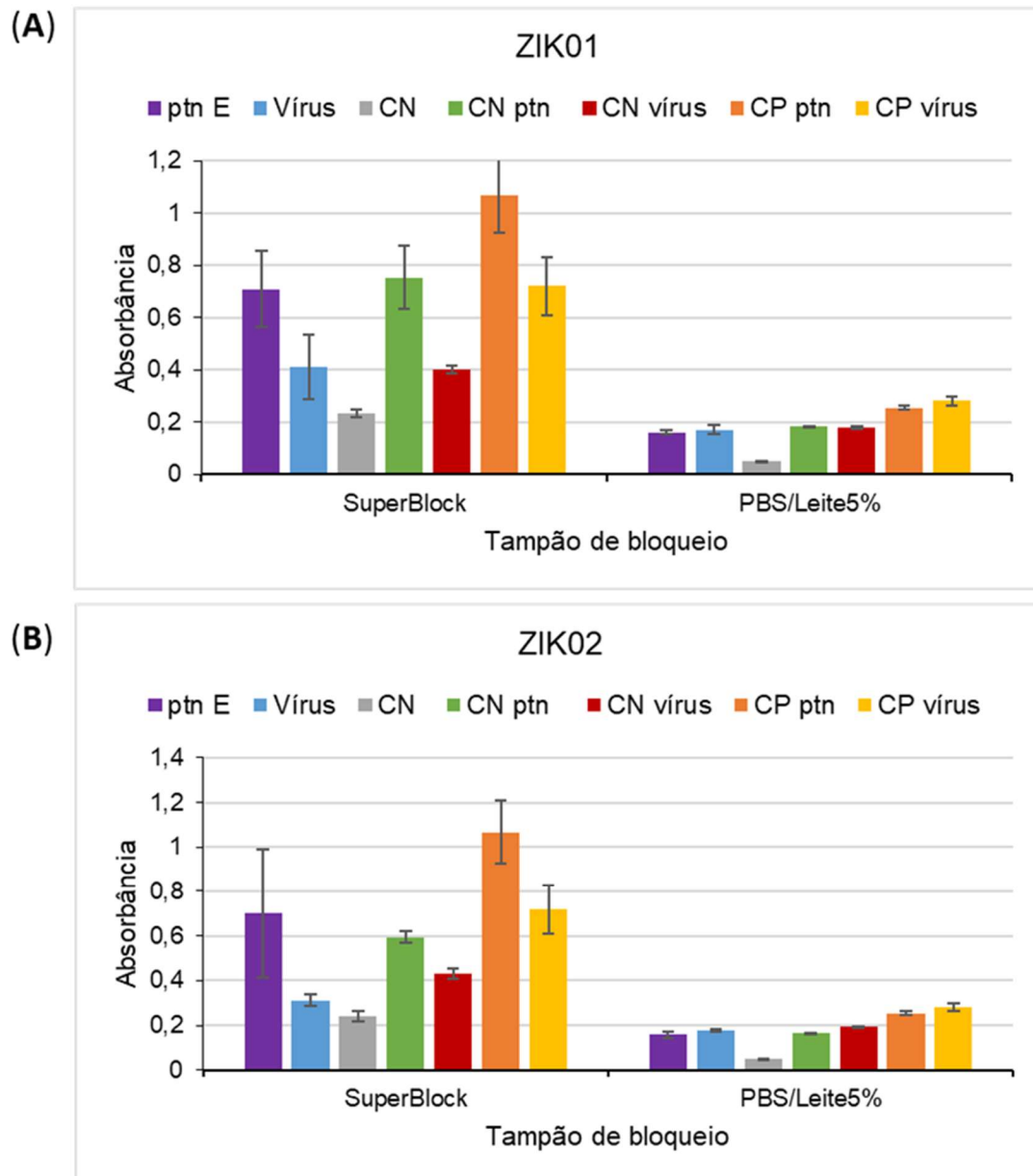


Figura 4.6.5.1. Ensaio imunoenzimático realizado em placa de 96 orifícios ativadas com anidrido maleico sensibilizada com o aptâmero ZIK01 (A) e ZIK02 (B) modificados (-C6 -NH₂) para detecção de partículas virais íntegras ou da proteína E do ZIKV. Cores: roxo = proteína E do ZIKV (200 ng/100 µL); azul = Vírus zika (5,0 x 10⁵ PFU/mL); Cinza = CN (proteína rNS5 do ZIKV a 200 ng/100 µL); verde = CNptn (proteína E do ZIKV a 200 ng/100 µL, após o bloqueio, na ausência de aptâmero); vermelho = CNvírus (ZIKV - 5,0 x 10⁵ PFU/mL- após o bloqueio, na ausência de aptâmero).; laranja = CPptn (proteína E do ZIKV - 200 ng/100 µL - como captura); amarelo = CPvírus (ZIKV - 5,0 x 10⁵ PFU/mL - como captura); aptâmeros a 150 nM. Leitura em 450 nm.

4.6.6. ELISA dos aptâmeros amino modificados para a rNS1zg

Para avaliar a interação do aptâmero rNS1zg_5 com a proteína a rNS1zg foram realizados experimentos utilizando placas de 96 orifícios ativadas com anidrido maleico e aptâmeros amino modificados na posição 5' (-C6-NH₂). Para controle negativo (CN1), foi usada a proteína NS5 (100, 200 e 400 ng/orifício) e, para positivo, a proteína rNS1z (400 ng/orifício) sensibilizada na placa em concentração de 400 ng/orifício. Um outro controle (CN2) foi utilizado a fim de avaliar a eficiência do tampão de bloqueio. Este controle foi realizado na ausência do aptâmero, utilizando a proteína rNS1zg (100, 200 e 400 ng/orifício) após o bloqueio.

Os ensaios iniciais foram realizados variando a concentração da proteína rNS1zg (100, 200 e 400 ng/orifício) e mantendo o aptâmero rNS1zg_5 em concentração fixa (150 nM), conforme selecionado em ensaio anterior (item 4.6.3.). O tampão de bloqueio utilizado foi o *superblock*. Os resultados demonstram que, apesar das altas D.O. apresentadas com o aptâmero, o controle CN2 seguiu o mesmo padrão de leitura do aptâmero (figura 4.6.6.1.), indicando que o tampão de bloqueio não funcionou da forma adequada.

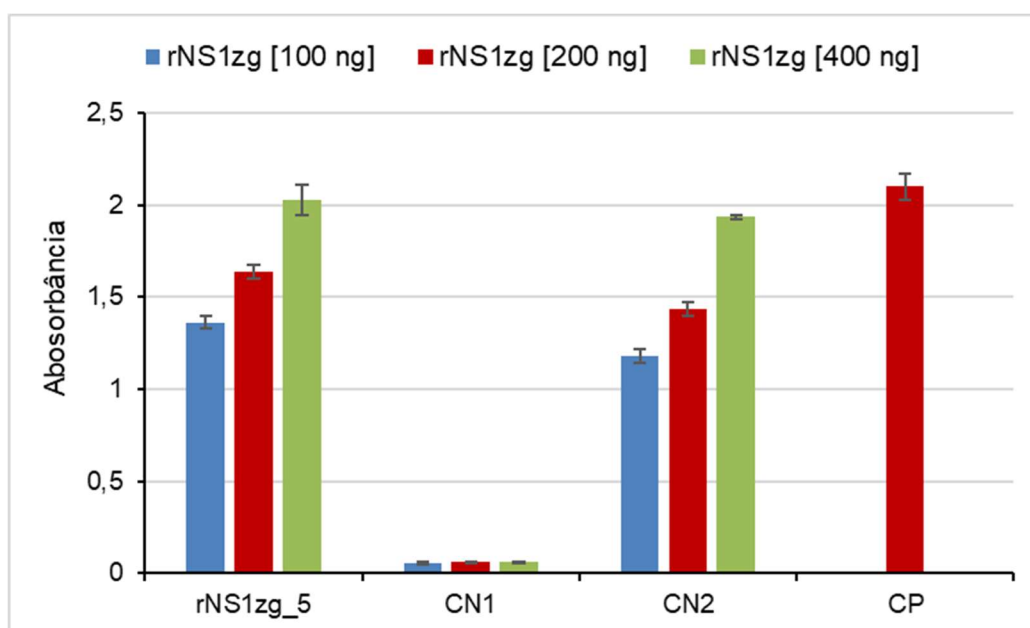


Figura 4.6.6.1. Ensaio imunoenzimático realizado em placa de 96 orifícios ativadas com anidrido maleico sensibilizada com o aptâmero rNS1zg_5 amino modificado (-C6-NH₂), para detecção da proteína NS1 glicosilada (rNS1zg). Cores: azul = rNS1zg a 100 ng/orifício; vermelho = rNS1zg a 200 ng/orifício; verde = rNS1zg a 400 ng/orifício. CN1 = proteína NS5 do ZIKV (100, 200 e 400 ng/orifício); CN2 = rNS1zg (100, 200 e 400 ng/orifício), após bloqueio, na ausência do aptâmero; CP = rNS1zg (400 ng/orifício). Aptâmero a 150 nM. Bloqueio - *superblock*. Leitura em 450 nm.

Com bases nos resultados acima, foram realizados outros experimentos em busca de novos tampões de bloqueio. Na figura 4.6.6.2., está graficamente representado o ensaio utilizando o aptâmero rNS1zg_5 na concentração de 150 nM e a proteína em 100 ng/orifício com cinco tampões diferentes. Os resultados indicam que três tampões (PBS/leite 10 %, PBS/SFB 5 %/BSA 1 %, PBS/SFB 3 %/BSA 1 %) bloquearam fortemente a reação, não permitindo a leitura. Por outro lado, o *superblock* e o PBS/leite 5 % não bloquearam de forma eficiente.

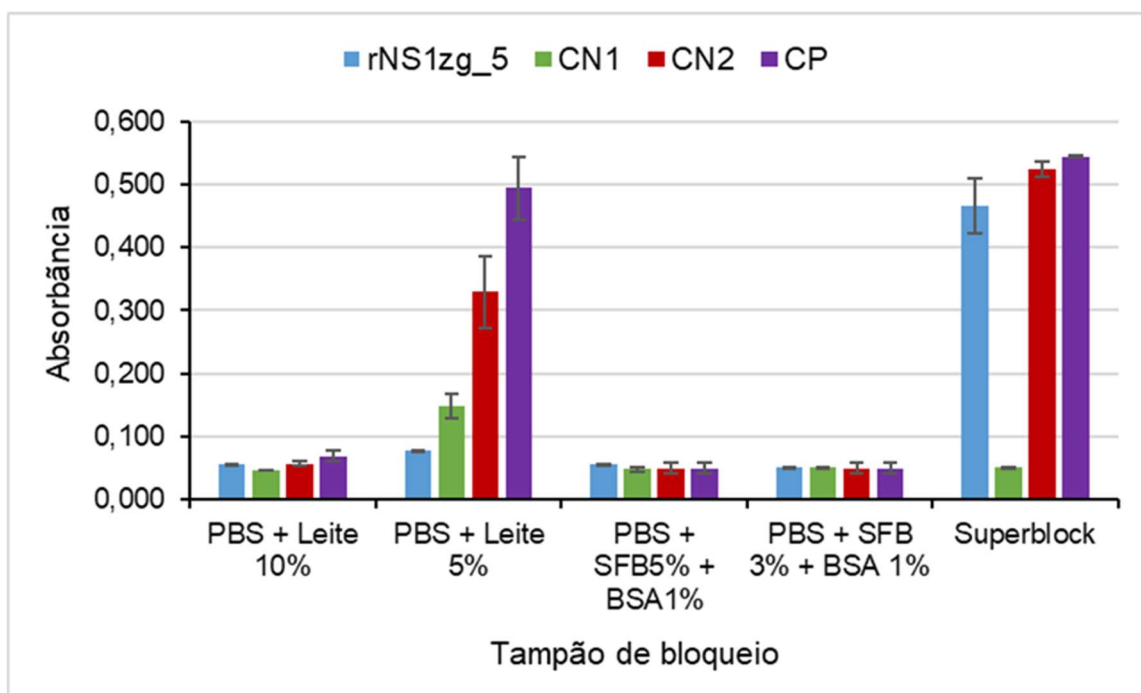


Figura 4.6.6.2. Ensaio imunoenzimático realizado em placa de 96 orifícios ativadas com anidrido maleico sensibilizada com o aptâmero rNS1zg_5 amino modificado (-C6-NH₂), para detecção proteína NS1 glicosilada (rNS1zg), utilizando cinco tampões de bloqueio diferentes. Cores: azul = aptâmero rNS1zg_5 (150 nM); verde = CN1 (proteína NS5 do ZIKV a 100 ng/orifício); vermelho = CN2 (rNS1zg a 100 ng/orifício, após bloqueio, na ausência do aptâmero); roxo = CP (rNS1zg a 100 ng/orifício). Leitura em 450 nm.

4.6.7. ELISA dos aptâmeros amino modificados para a rNS1z

Nos ensaios realizados para avaliar a interação do aptâmero rNS1z_19 com a proteína a rNS1z foi utilizado o aptâmero amino modificado sensibilizado em placas de 96 orifícios ativadas com anidrido maleico. Semelhante ao item 4.6.6., um controle para o tampão de bloqueio foi adicionado.

A figura 4.6.7.1. apresenta os resultados obtidos nos experimentos preliminares, realizados com duas concentrações do aptâmero rNS1z_19 amino

modificado (150 e 300 nM), quatro concentrações da proteína rNS1z (50, 100, 150 e 200 ng/orifício) e solução *superblock* como bloqueio. É possível observar que o valor de D.O. em cada concentração de aptâmero aumenta conforme aumenta a concentração da proteína. Entretanto, mantendo a concentração de proteína e variando a de aptâmero, não ocorre aumento de D.O. Avaliando o resultado da absorbância do CN2, verifica-se que, mais uma vez, o tampão *superblock* não bloqueou eficientemente a reação, invalidando o teste.

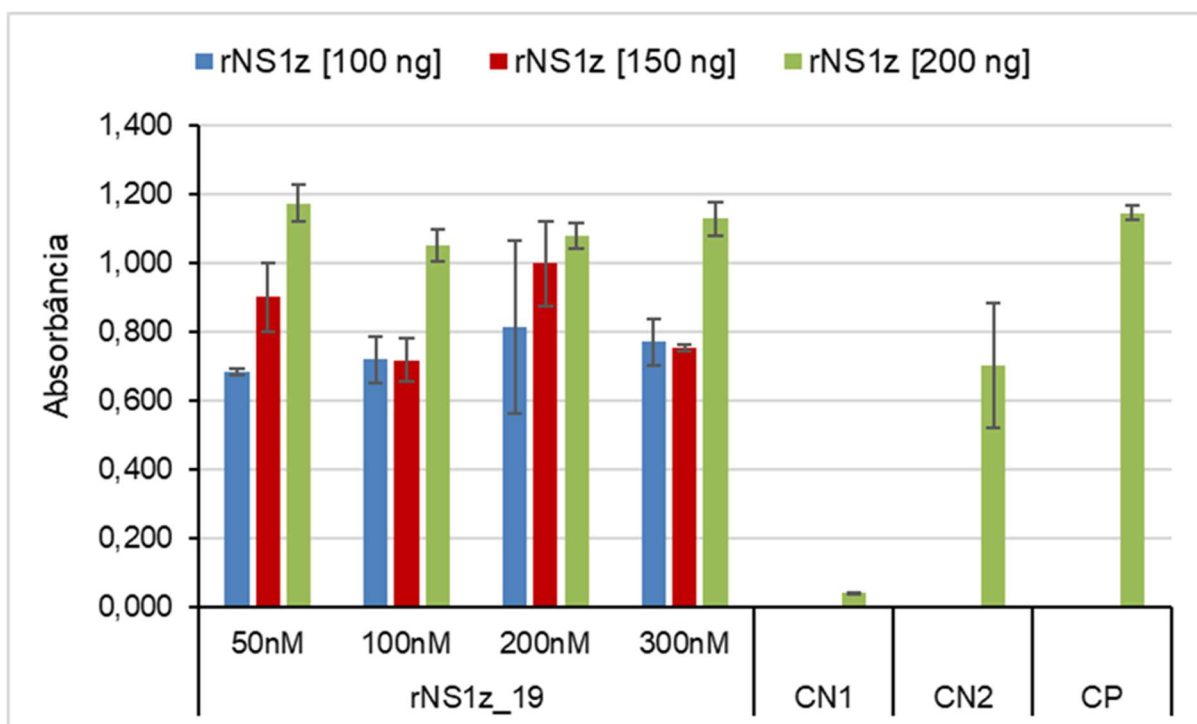


Figura 4.6.7.1. Ensaio imunoenzimático realizado em placa de 96 orifícios ativadas com anidrido maleico sensibilizada com o aptâmero rNS1z_19 amino modificado (-C6-NH₂), para detecção da proteína NS1 não glicosilada (rNS1z). Cores: azul = proteína rNS1zg a 100 ng/orifício; vermelho = rNS1zg a 150 ng/orifício; verde = rNS1zg a 200 ng/orifício. CN1 = proteína NS5 do ZIKV a 200 ng/orifício; CN2 = rNS1zg a 200 ng/orifício, após bloqueio, na ausência do aptâmero; CP = rNS1zg a 200 ng/orifício. Aptâmeros a 50, 100, 200 e 300 nM. Bloqueio – *superblock*. Leitura em 450 nm.

Experimentos utilizando outro tampão de bloqueio (PBS/BSA1%) foram realizados com a proteína rNS1z na concentração de 100 ng/100 µL e diferentes concentrações do aptâmero (variando de 5 a 500 nM). Na figura 4.6.7.2., está demonstrado que as absorbâncias foram bem altas, independente da concentração do aptâmero. Além disso, o controle CN2 também apresentou alto valor de D.O., demonstrando que a solução PBS/BSA1% não foi eficiente no bloqueio da reação.

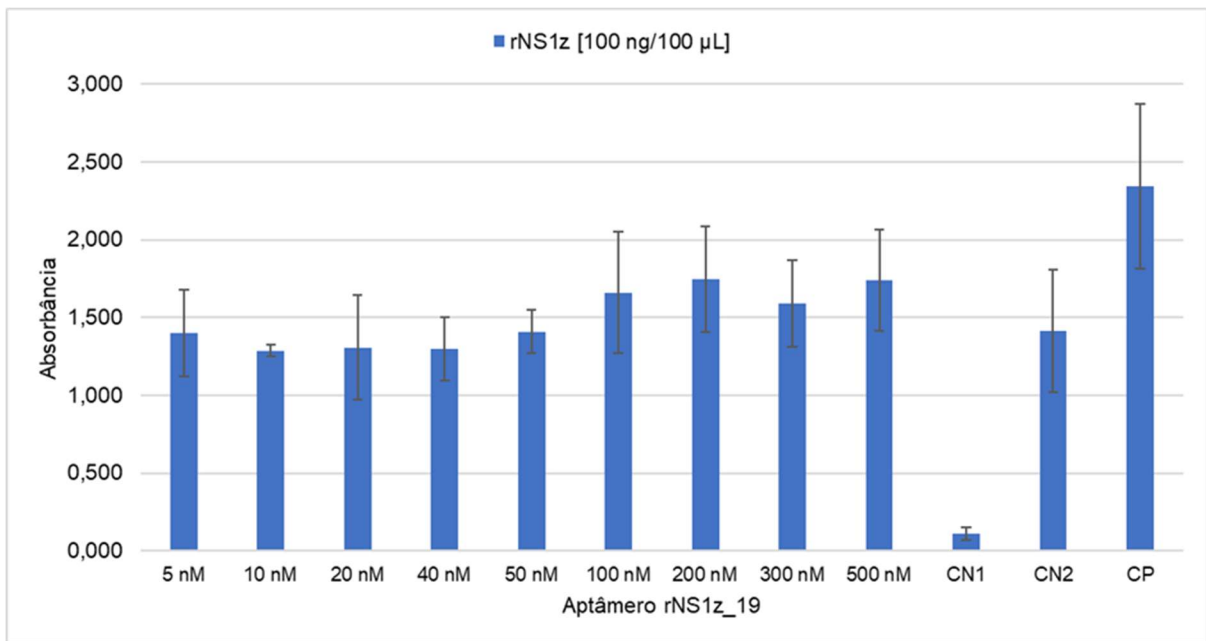


Figura 4.6.7.2. Ensaio imunoenzimático realizado em placa de 96 orifícios ativadas com anidrido maleico sensibilizada com o aptâmero rNS1z_19 amino modificado (-C6-NH₂), para detecção da proteína NS1 não glicosilada (rNS1z), utilizando cinco tampões de bloqueio diferentes. Proteína rNS1zg a 100 ng/orifício. Aptâmeros a 5, 10, 20, 40, 50, 100, 200, 300 e 500 nM. CN1 = proteína NS5 do ZIKV a 100 ng/orifício; CN2 = rNS1zg a 100 ng/orifício, após bloqueio, na ausência do aptâmero; CP = rNS1zg a 100 ng/orifício. Bloqueio - PBS/BSA1%. Leitura em 450 nm.

4.6.8. ELISA dos aptâmeros amino modificados para o anticorpo monoclonal anti-NS1 LB10/BF4

Para avaliar a interação dos sete aptâmeros com o mAb LB10/BF4, foram realizados experimentos utilizando placas de 96 orifícios ativadas com anidrido maleico e aptâmeros modificados com amina na posição 5'. Como controle negativo (CN1), foi usado um aptâmero para proteína NS5 de ZIKV (200 ng/100 µL) e, para CP, o mAb LB10/BF4 (1:10.000). O controle denominado CN2 foi feito utilizando o monoclonal, após o bloqueio, na ausência do aptâmero.

A figura 4.6.8.1. representa graficamente os ensaios realizados utilizando o monoclonal diluído 1:10.000 e sete aptâmeros previamente selecionados (100 e 500 nM) (item 4.4.5.). Além da solução de bloqueio *superblock*, também foi testado o tampão PBS/leite1%/BSA1%. As leituras obtidas utilizando o *superblock* demonstram uma grande similaridade entre diferentes concentrações do aptâmero, com absorbâncias maiores nos aptâmeros mAb_9c, mAb_12c e mAb_20c. Entretanto, o controle CN2 apresentou D.O. acima de 0,500, indicando também ineficiência do bloqueio. Por outro lado, o tampão PBS/leite1%/BSA1% não apresentou leitura em nenhum controle negativo e D.O. alta no CP, ou seja, o teste foi válido. Ao analisar os

resultados, verifica-se que não houve D.O. expressiva em nenhum aptâmero, o que pode indicar baixa concentração dos aptâmeros ou a não detecção do anticorpo pelo aptâmero nesse formato de ensaio.

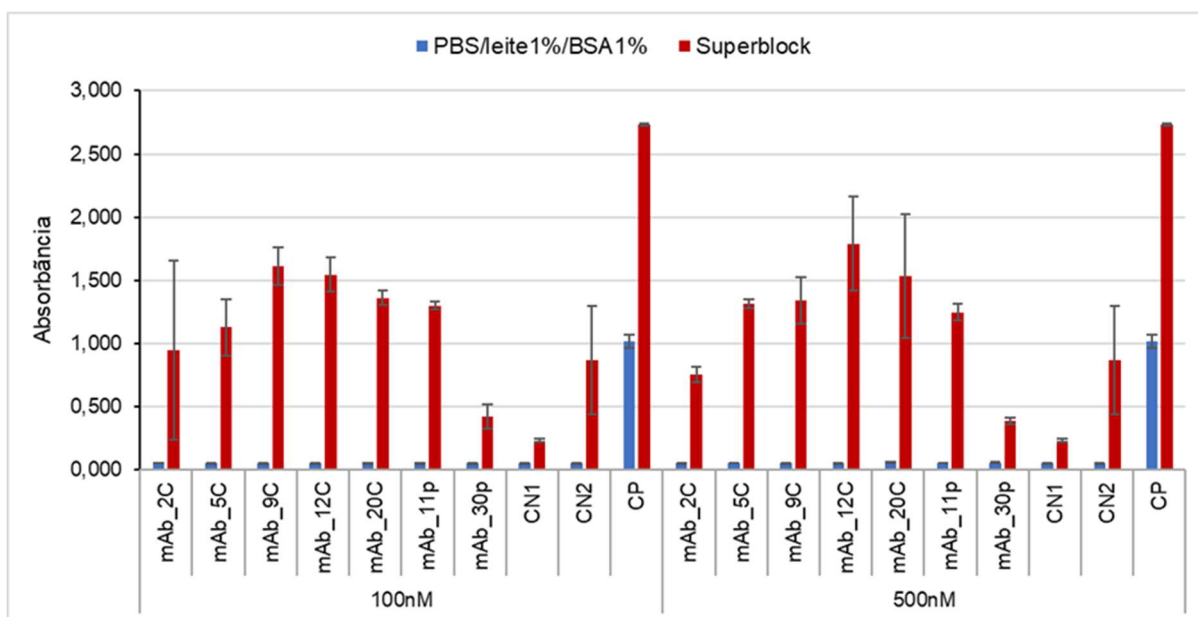


Figura 4.6.8.1. Ensaio imunoenzimático realizado em placa de 96 orifícios ativadas com anidrido maleico sensibilizada com sete aptâmeros amino modificados (-C6-NH₂), para detecção do anticorpo monoclonal LB10/BF4, utilizando dois tampões de bloqueio diferentes. Cores: azul - tampão de bloqueio PBS/leite1%/BSA1; vermelho - bloqueio *superblock*. CN1 = aptâmero contra NS5 do ZIKV a 200 ng/orifício; CN2 = mAb LB10/BF4 (1:10.000), após bloqueio, na ausência do aptâmero; CP = mAb LB10/BF4 na diluição 1:10.000. Aptâmeros a 100 e 500 nM. Leitura em 450 nm.

Novos ensaios foram realizados, a fim de avaliar novamente o uso do bloqueio PBS/leite1%/BSA1% e a ligação do aptâmero ao alvo. Dessa vez, os aptâmeros foram utilizados em maiores concentrações (700 e 1000 nM) e a placa foi lavada cinco vezes (ou invés de quatro). Na figura 4.6.8.2., observa-se que, independentemente da concentração do tampão, a leitura permanece sendo detectada somente no CP.

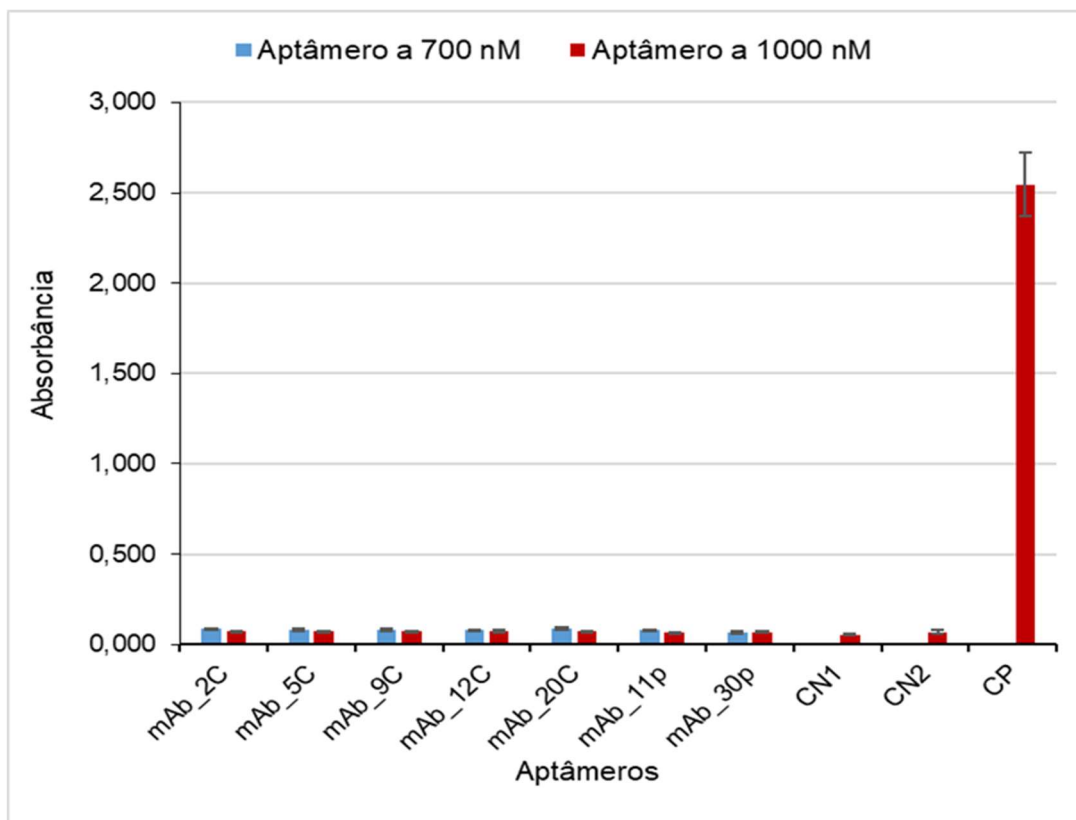


Figura 4.6.8.2. Ensaio imunoenzimático realizado em placa de 96 orifícios ativadas com anidrido maleico sensibilizada com sete aptâmeros amino modificados (-C6-NH₂), para detecção do anticorpo monoclonal LB10/BF4, utilizando o tampão PBS/leite1%/BSA1% como bloqueio. Cores: azul = aptâmeros a 700 nM; vermelho = aptâmeros a 1000 nM. CN1 = aptâmero contra NS5 do ZIKV a 200 ng/orifício; CN2 = mAb LB10/BF4 (1:10.000), após bloqueio, na ausência do aptâmero; CP = mAb LB10/BF4 na diluição 1:10.000. Leitura em 450 nm.

4.7. Avaliação da afinidade da ligação aptâmero-alvo por Espectroscopia de Fluorescência

4.7.1. Aptâmeros para partícula viral

Antes de realizar os ensaios de afinidade por espectroscopia de fluorescência, avaliamos o perfil fluorimétrico da partícula viral, do tampão de purificação e do marcador de pH (vermelho de fenol), presentes na suspensão viral.

Na figura 4.7.1.1., podemos observar os espectros de emissão de todos os materiais analisados, registrados em 300 a 600 nm de comprimento de onda. O perfil fluorimétrico da partícula viral foi analisado em duas concentrações: $1,0 \times 10^7$ e $1,0 \times 10^6$ PFU/mL. Na menor concentração, observamos baixa intensidade de emissão de fluorescência, além da ausência de um pico definido. Na maior concentração viral, ocorreu a formação de um pico de fluorescência próximo a 320 nm, porém pouco definido e com baixa intensidade, não podendo ser utilizado na avaliação da interação dos aptâmeros com o alvo. Para o tampão Tris/NaCl, analisado em dois pH distintos

(7,4 e 8,5), o pico de fluorescência ocorreu entre 550 e 600 nm, o mesmo ocorrendo para o vermelho de fenol.

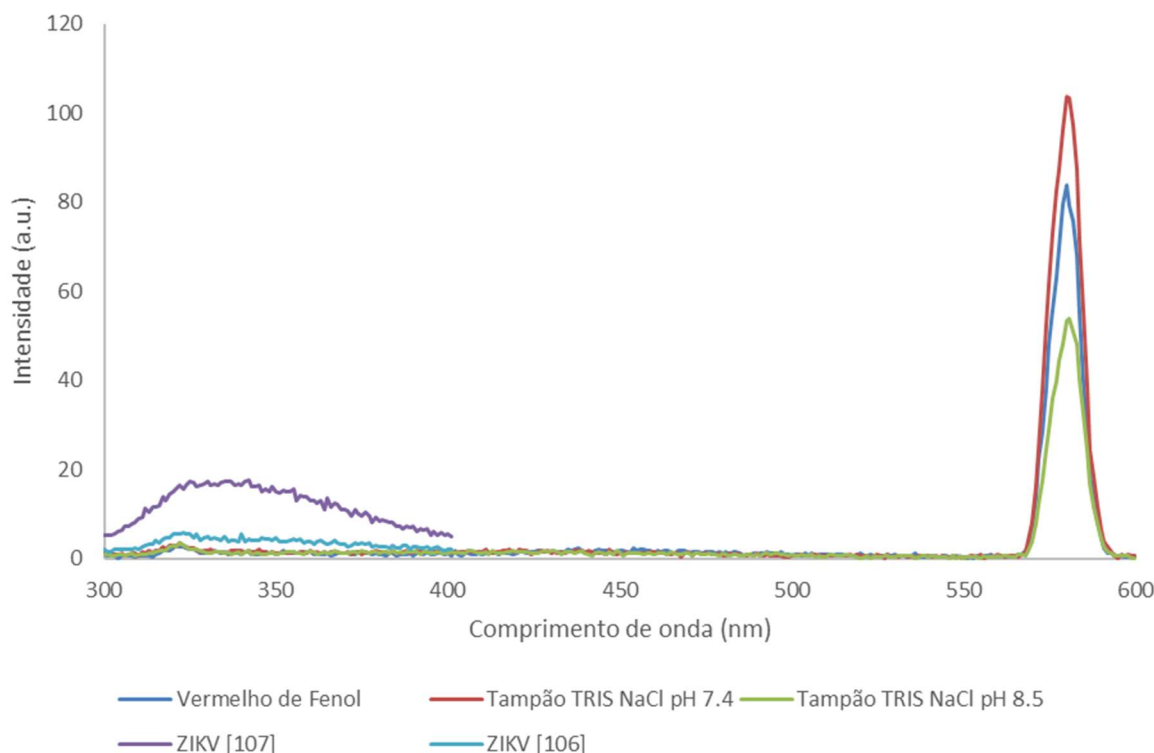


Figura 4.7.1.1. Espectros fluorimétricos da partícula viral do zika nas concentrações de $1,0 \times 10^7$ e $1,0 \times 10^6$ PFU/mL, do tampão de purificação (pH 7,4 e 8,5) e do marcador de pH (vermelho de fenol) a 25 °C. Comprimento de onda de excitação= 290 nm.

4.7.2. Aptâmeros para proteína rNS1z

Dentre as 15 sequências obtidas, selecionamos dois aptâmeros (rNS1z_19 e rNS1z_38B/39D) que apresentaram ΔG bem distintos (item 4.4.2, figura 4.4.2.1.), a fim de verificar se a diferença de ΔG refletiria na interação aptâmero-alvo. A medição da fluorescência foi realizada utilizando a fluorescência intrínseca dos triptofanos presentes na proteína NS1, com um comprimento de onda de excitação de 290 nm. Os espectros de emissão foram registrados de 300 a 400 nm de comprimento de onda, após 60 s de cada adição de aptâmero.

Ao adicionarmos concentrações crescentes dos aptâmeros, observamos a queda na intensidade da fluorescência, indicando a ocorrência de interação entre o aptâmero e a proteína NS1 de ZIKV (figura 4.7.2.1. A e C). A constante Stern-Volmer (K_{sv}) para os aptâmeros rNS1z_19 e o rNS1z_38B/39D foram $3,83 (\pm 0,13) \times 10^5 M^{-1}$ e $3,12 (\pm 0,15) \times 10^5 M^{-1}$, respectivamente (figura 4.7.2.1. B e D), confirmando a

interação do aptâmero com seu alvo. O teste t de student para diferença das constantes de Stern-Volmer apresentou p-valor da ordem de 3×10^{-6} , indicando que a diferença entre as Ksvs dos dois aptâmeros é estatisticamente significativa.

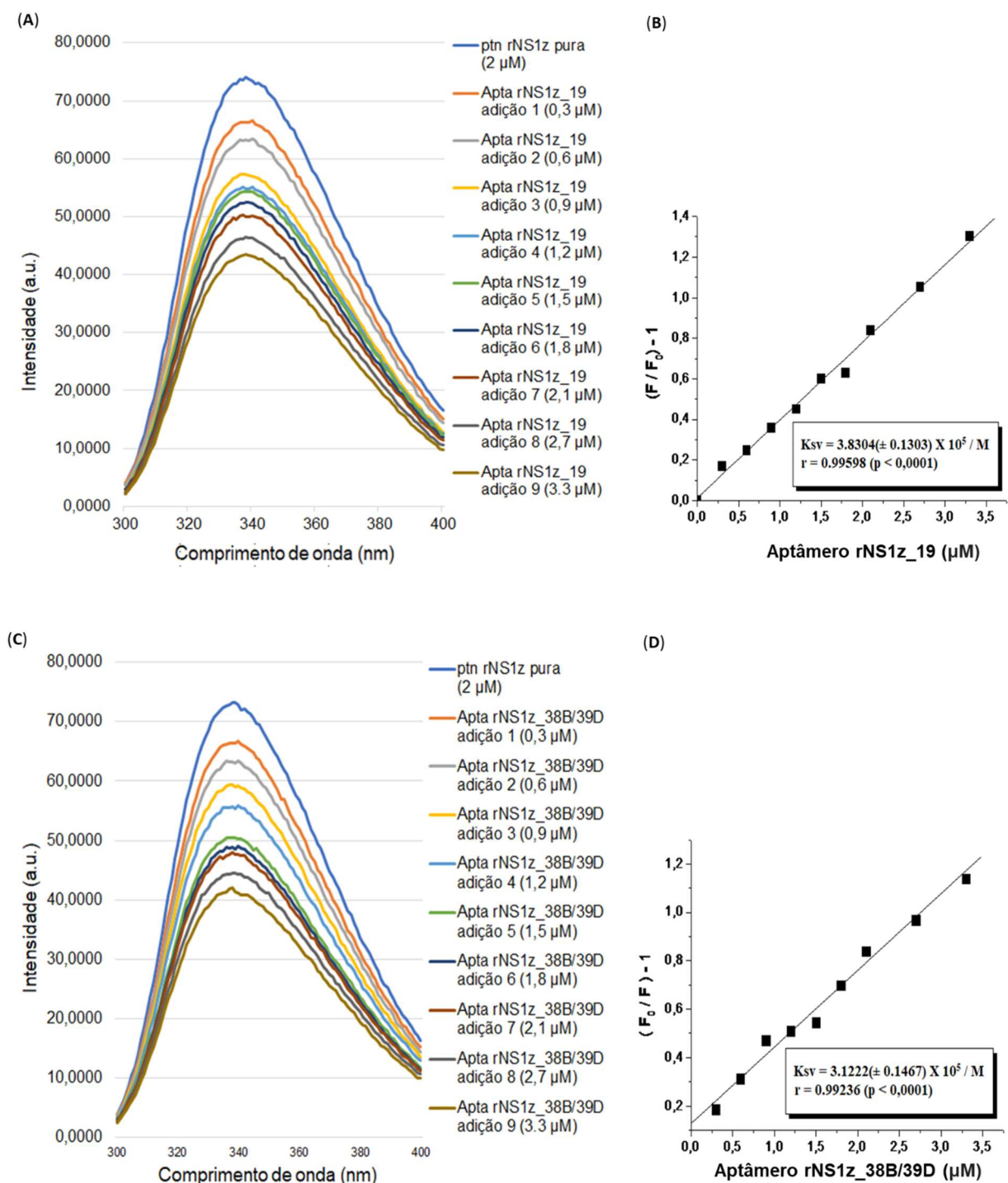


Figura 4.7.2.1. Espectros de supressão de fluorescência (A e C) e gráficos de Stern-Volmer (B e D) da proteína rNS1z na presença dos aptâmeros rNS1z_19 (A e B) e rNS1z_38B/39D (C e D) a 25 °C. Comprimento de onda de excitação = 290 nm; [rNS1z] = 2,0 μM; [Aptâmeros] = 0,3 a 3,3 μM.

4.8. Avaliação da afinidade da ligação aptâmero-alvo por Termoforese em Microescala (MST)

4.8.1. Aptâmeros para partícula viral – ensaio com a proteína E do ZIKV

Ensaio de termoforese em microescala foram utilizados para avaliar a afinidade da ligação entre os quatro aptâmeros para a partícula íntegra e a proteína E de ZIKV.

Analisando os resultados dos experimentos, é possível verificar que a afinidade de ligação do aptâmero ZIK01 ($K_d = 1.414,90 \pm 0,41$ nM) foi menor do que a dos outros aptâmeros (ZIK02 $K_d = 761,54 \pm 0,49$ nM; ZIK03 $K_d = 919,26 \pm 0,68$ nM; ZIK04 $K_d = 820,98 \pm 0,34$ nM) (figura 4.8.1.1.). Os testes t de student para diferença das médias das constantes de dissociação, realizadas de dois a dois para os quatro aptâmeros, apresentaram p-valor menor que 0,0001, demonstrando que a diferença entre as K_d s é estatisticamente significativa.

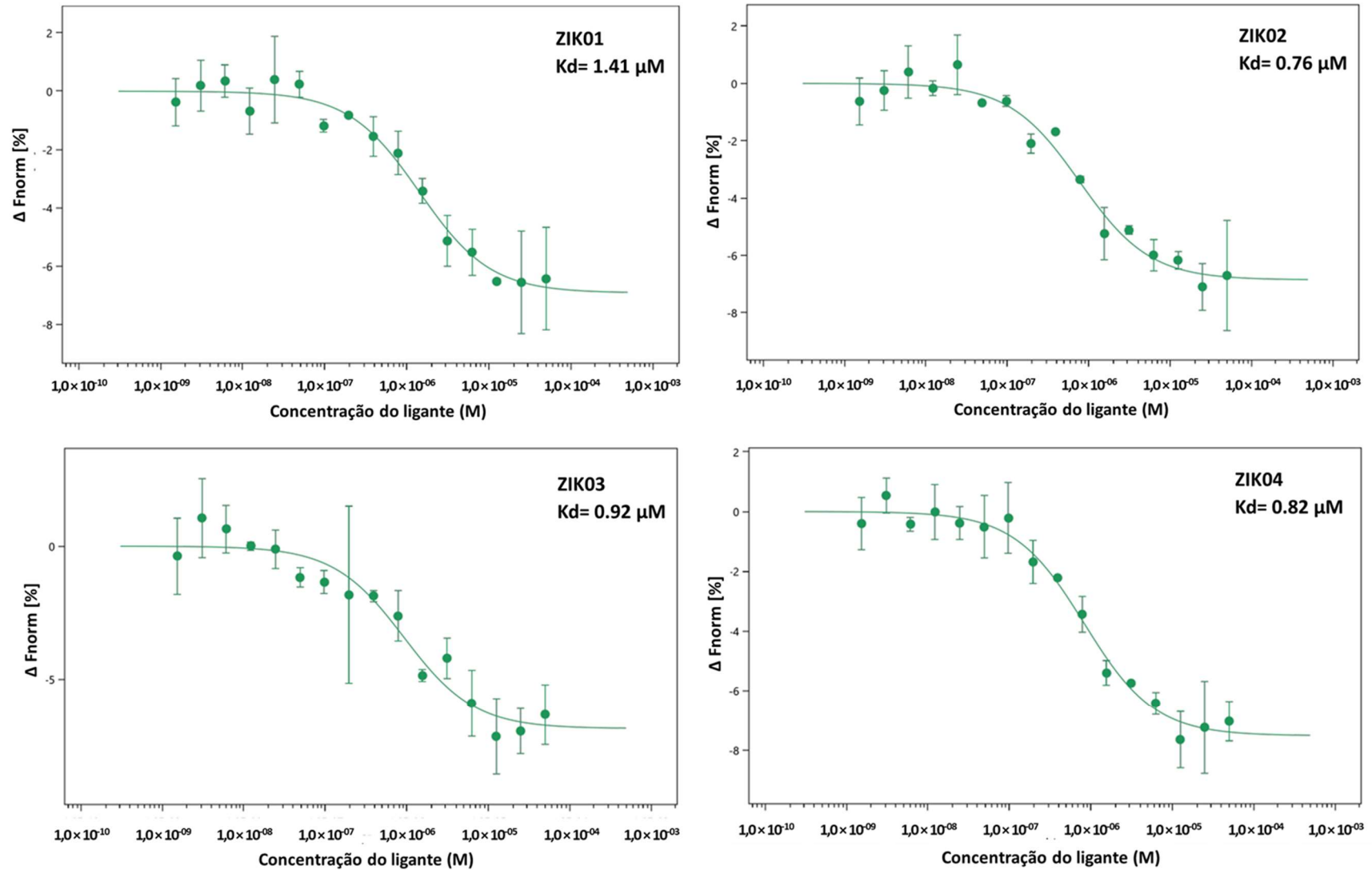


Figura 4.8.1.1. Ensaio termoforético comparando a afinidade entre os quatro aptâmeros e a proteína E de ZIKV. Parâmetros MST: concentração alvo: 20 nM; concentração de ligante: 50 μM a 0,00153 μM ; poder de excitação: 76%; temperatura: 25 °C.

4.8.2. Aptâmeros para partícula viral – ensaio com as partículas de ZIKV E DENV

A avaliação da especificidade dos aptâmeros foi verificada usando um *pool* dos quatro sorotipos de DENV em comparação com o ZIKV. Os vírus utilizados apresentavam título de $1,0 \times 10^8$ PFU/mL. O título viral foi multiplicado por 180 (quantidade de proteína E presente em cada partícula viral) e a molaridade foi calculada baseada na quantidade de partículas infecciosas, obtendo-se $2,99 \times 10^{-8}$ M.

De acordo com a figura 4.8.2.1., a variação nas concentrações do *pool* de DENV não alterou a resposta de fluorescência normalizada, o que sugere não haver interação na faixa de concentração avaliada. Por outro lado, a variação da concentração de ZIKV causou um aumento na resposta em concentrações mais altas, o que indica a presença de interação intermolecular entre aptâmeros e ZIKV. Como não houve saturação completa da curva, devido a concentrações virais insuficientes, a constante de dissociação (K_d) não pôde ser calculada.

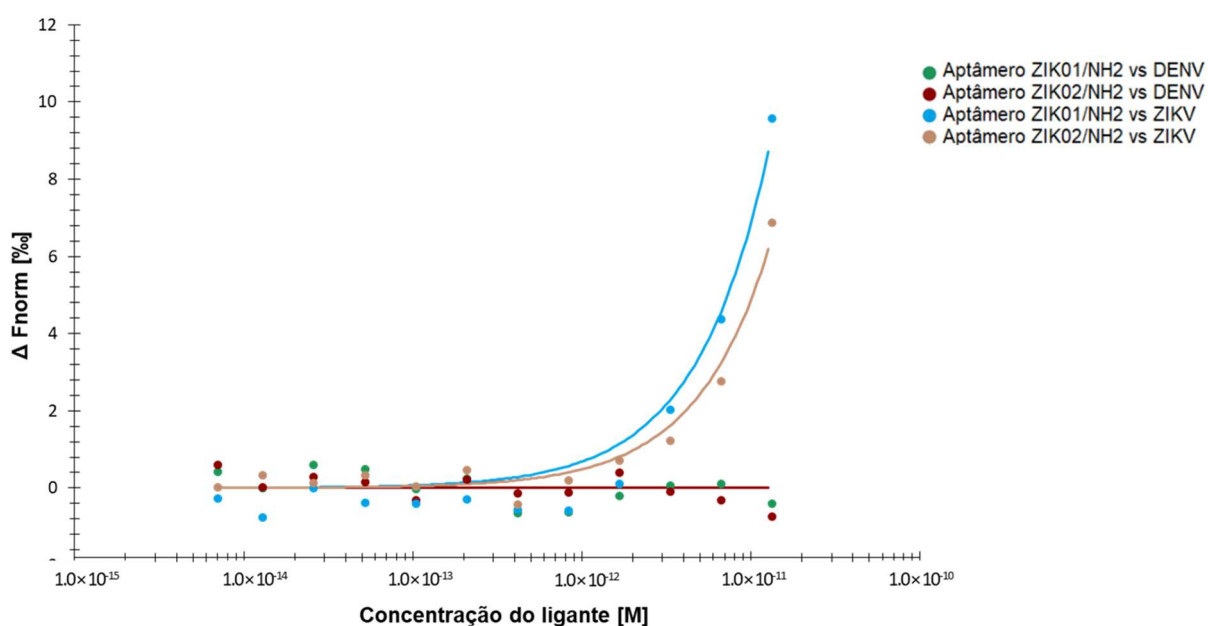


Figura 4.8.2.1. Ensaio termoforético comparando a afinidade entre os dois aptâmeros e partículas de ZIKV ou *pool* dos 4 sorotipos de DENV. A figura mostra o gráfico da fluorescência normalizada corrigida da linha de base (ΔF_{norm} - %) versus a concentração de ligante, em um tempo de aquecimento de cinco segundos.

4.8.3. Aptâmeros para proteína rNS1zg

Foi realizado um ensaio de termoforese em microescala para investigação da afinidade de ligação entre a proteína rNS1z glicosilada e o aptâmero rNS1zg_5. Na

figura 4.8.3.1., pode ser observado que a leitura dos pontos se apresentou totalmente dispersa, não formando um perfil de associação, o que demonstra não haver ligação aptâmero-alvo na concentração testada.

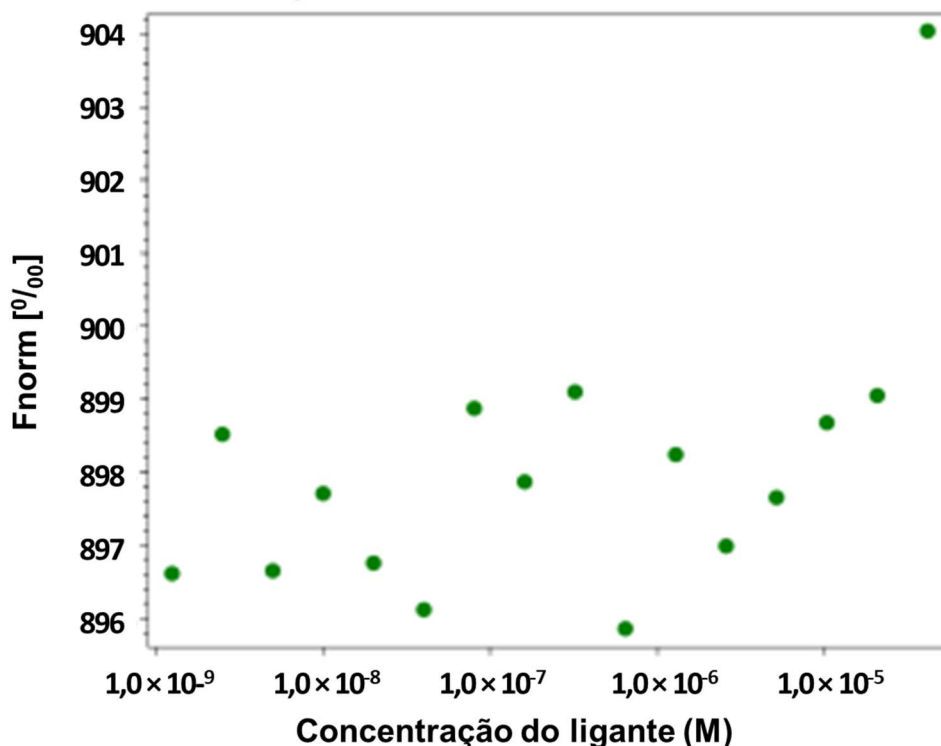


Figura 4.8.3.1. Ensaio termoforético demonstrando a interação do aptâmero rNS1zg_5 com a proteína NS1 glicosilada de ZIKV. Parâmetros MST: concentração alvo: 41.1 μM ; concentração de ligante: 8 μM a 0,00024 μM ; poder de excitação: 76%; temperatura: 25 $^{\circ}\text{C}$.

4.8.4. Aptâmeros para o anticorpo monoclonal anti-NS1z

Para avaliação inicial da interação dos sete aptâmeros selecionados e o anticorpo anti-NS1 LB10/BF4, realizamos um ensaio de verificação da ligação (*binding check*). O resultado apresentado na figura 4.8.4.1 compara os percentuais de fluorescência para a interação de todos os aptâmeros com o controle (anticorpo sem a adição de ligante). Quanto maior a diferença entre a fluorescência média da amostra e o controle, maior é a tendência da amostra apresentar afinidade. Isso significa que a complexo ligante-fluoróforo apresenta comportamento termoforético diferente do apresentado pelo controle. Como tal comportamento também é função da concentração de ligante e/ou concentração de fluoróforo, o ensaio foi realizado com as concentrações constantes de ligante (50 μM) e fluoróforo (20 nM).

Quase todos os aptâmeros apresentaram perfil termoforético semelhante ao controle sem ligante (figura 4.8.4.1). Os aptâmeros mais promissores foram os mAb_2c e mAb_20c. Portanto, foram os escolhidos para os experimentos de avaliação da afinidade por ITC.

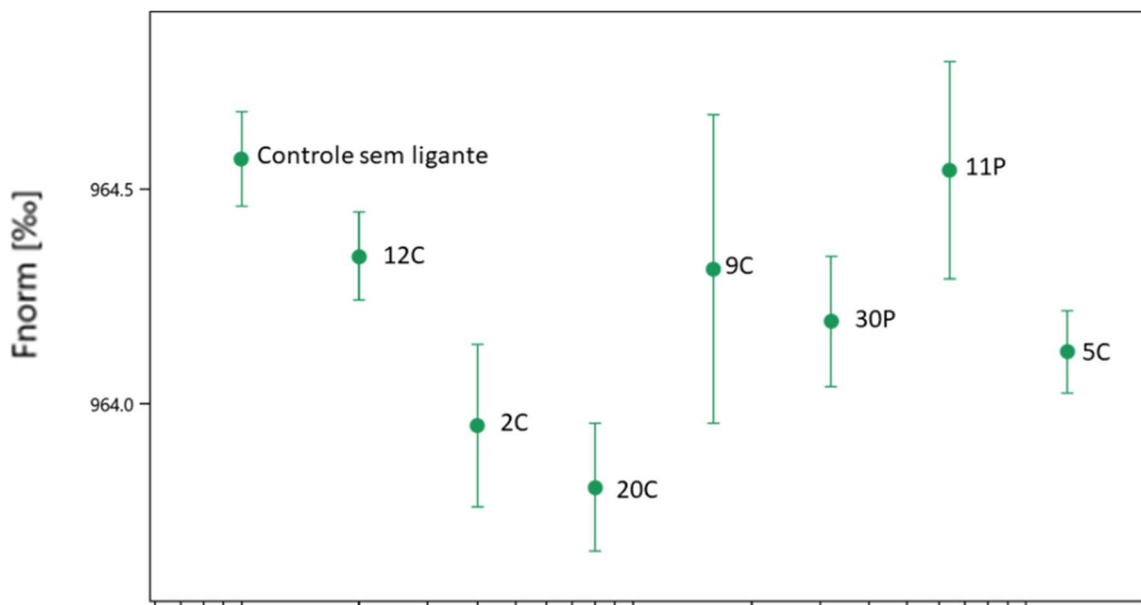


Figura 4.8.4.1. Percentuais de fluorescência da interação dos aptâmeros com o anticorpo anti-NS1 em comparação a fluorescência do controle. Parâmetros MST: concentração alvo: 20 μM ; concentração de ligante: 50 μM ; poder de excitação: 30%; temperatura: 25 $^{\circ}\text{C}$.

4.9. Avaliação da afinidade da ligação aptâmero-alvo por Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)

4.9.1. Aptâmeros para proteína NS1z do ZIKV

Foram realizados ensaios de ITC, a fim de avaliar a afinidade de interação da proteína rNS1z com o aptâmero rNS1z_19, que apresentou menor ΔG na predição da estrutura secundária (item 4.4.2., figura 4.4.2.1) e maior interação nos ensaios de ELISA (item 4.6.4, figura 4.6.4.1). Os termogramas mostram as respostas de energia do ITC versus o curso do tempo. Nos primeiros ensaios, foram utilizados 10 μM de proteína em tampão PBS/arginina (célula) e 100 μM do aptâmero em água (seringa).

A titulação apresentou um perfil endotérmico e o calor gerado foi comparável entre as duplicatas, apesar de ter ocorrido um deslocamento no tempo de cada injeção (figura 4.9.1.1.).

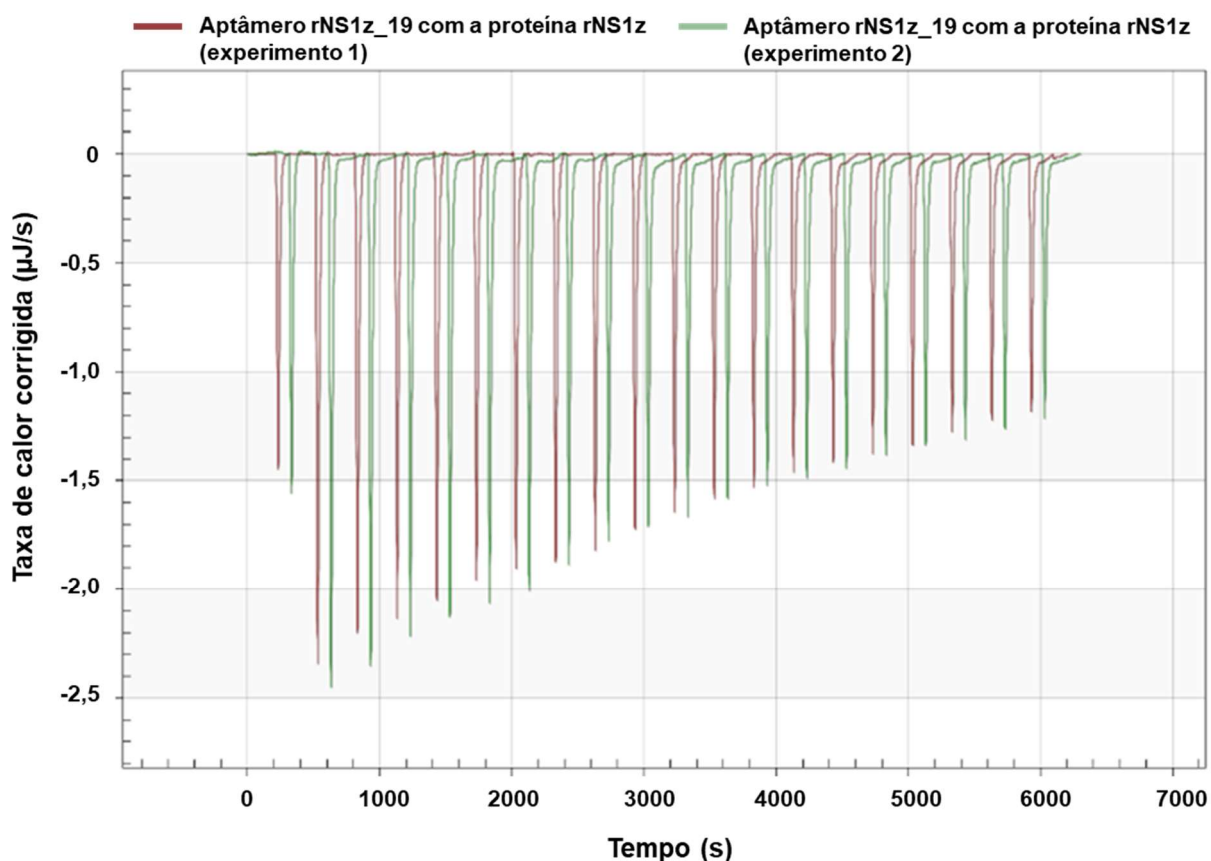


Figura 4.9.1.1. Titulação calorimétrica para a avaliação da interação entre a proteína não glicosilada do ZIKV (rNS1z) e o aptâmero rNS1z_19. Vermelho e verde = duplicatas da titulação da proteína (10 µM - célula) com o aptâmero rNS1z_19 (100 µM - seringa). Temperatura = 25 °C.

Para analisar o efeito da interação dos tampões, foi realizado um ensaio “branco”, verificando a interação entre PBS e água. Na figura 4.9.1.2., está representado o perfil do ensaio branco (em azul) juntamente com os perfis das duplicatas do ensaio anterior (cinza e vermelho). Observa-se que o ensaio branco apresentou um perfil exotérmico, diferente do que foi observado na titulação da amostra.

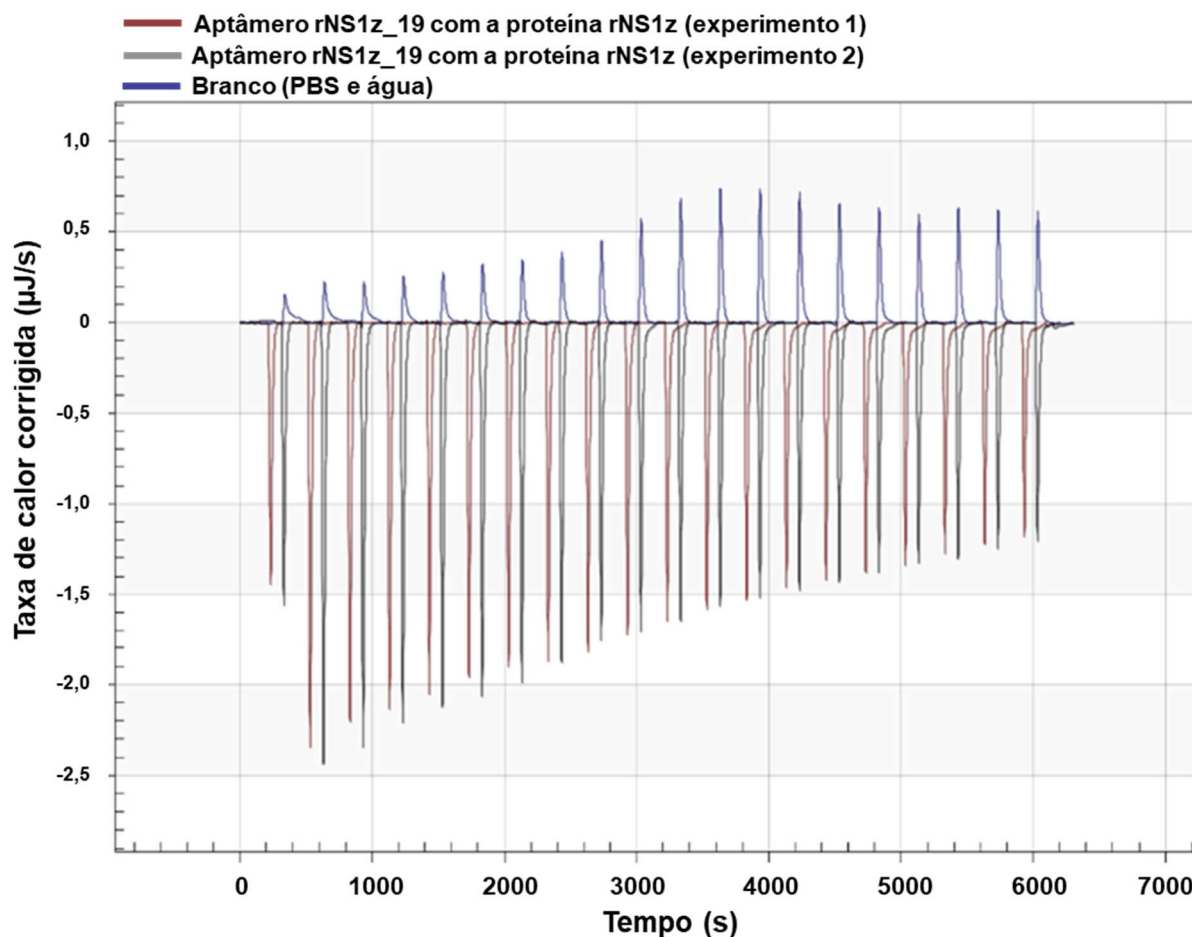


Figura 4.9.1.2. Titulação calorimétrica para a avaliação da interação entre a proteína não glicosilada do ZIKV (rNS1z) e o aptâmero rNS1z_19 e entre os tampões de diluição de cada insumo. Em vermelho e cinza estão representadas as duplicatas da titulação da proteína (10 μM - célula) com o aptâmero rNS1z_19 (100 μM - seringa). Em azul, está representada a titulação do ensaio branco (50 μL de água – seringa, e 300 μL do tampão PBS/arginina 33 mM – célula). Temperatura = 25 $^{\circ}\text{C}$.

Subtraindo o perfil calorimétrico do “branco” pelas duas réplicas do perfil do aptâmero rNS1z_19, foi realizada a modelagem (figura 4.9.1.3)., de acordo com o modelo independente de determinação da afinidade de ligação. Em ambos os ensaios, foram estimados valores próximos de constante de dissociação (K_d), $2,25 \times 10^{-4}$ M e $2,42 \times 10^{-4}$ M (média = $2,365 \times 10^{-4}$ M).

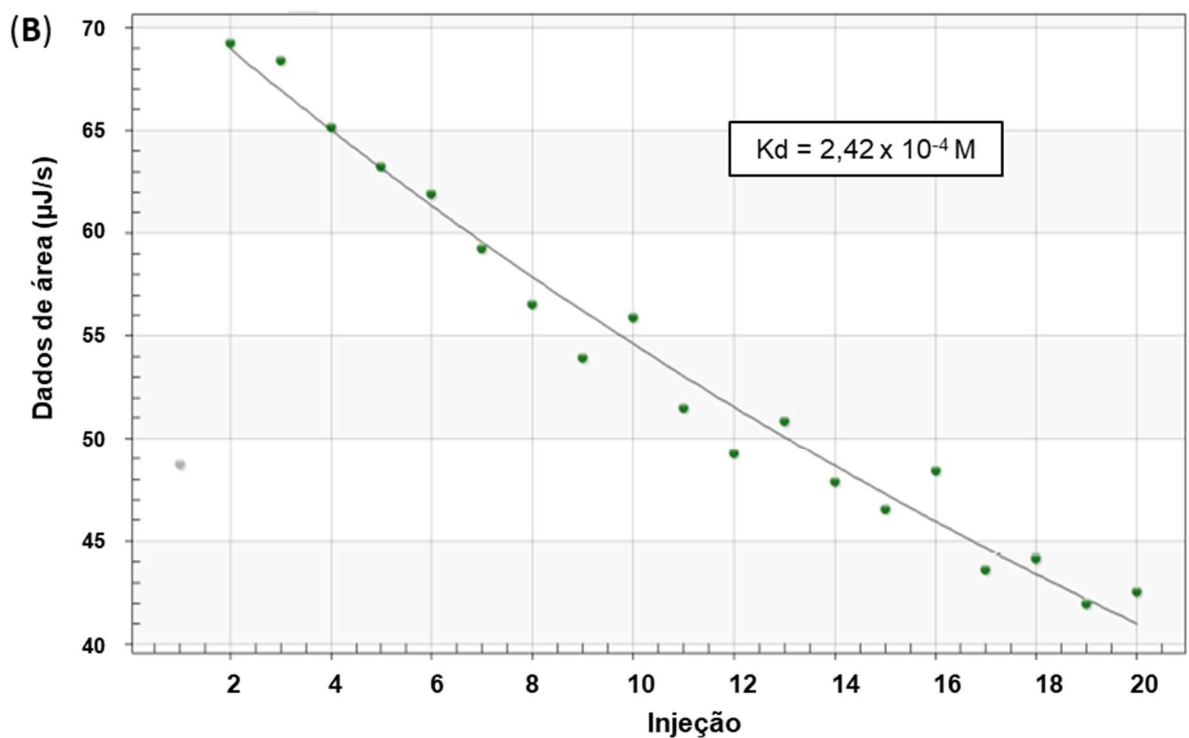
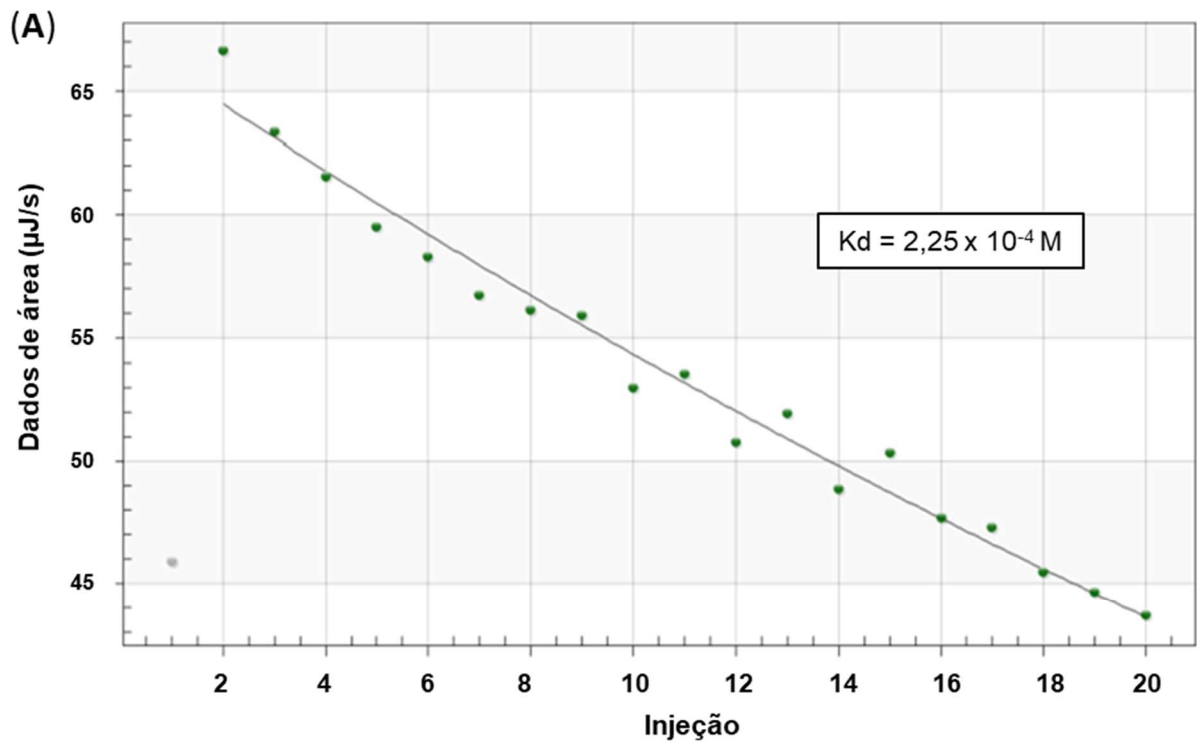


Figura 4.9.1.3. Modelagens dos ensaios de titulação calorimétrica entre o aptâmero rNS1z_19 e a proteína NS1 não glicosilada de ZIKV. Modelos independentes demonstrando os valores de K_d ($2,25 \times 10^{-4} \text{ M}$ e $2,42 \times 10^{-4} \text{ M}$) das réplicas da titulação (A e B, respectivamente).

Como a curva de interação não apresentou um comportamento sigmoidal (figura 4.9.1.3), foi realizado outro ensaio visando investigar a influência da arginina sobre a interação aptâmero-proteína (titulação controle). O resultado da titulação

controle está apresentado na figura 4.9.1.4. junto com o perfil calorimétrico da amostra. É possível observar que o calor de interação aptâmero-arginina (em vermelho) apresenta perfil similar ao da amostra (em azul), sugerindo que grande parte dos picos obtidos são referentes à interação do aptâmero com a arginina presente no meio.

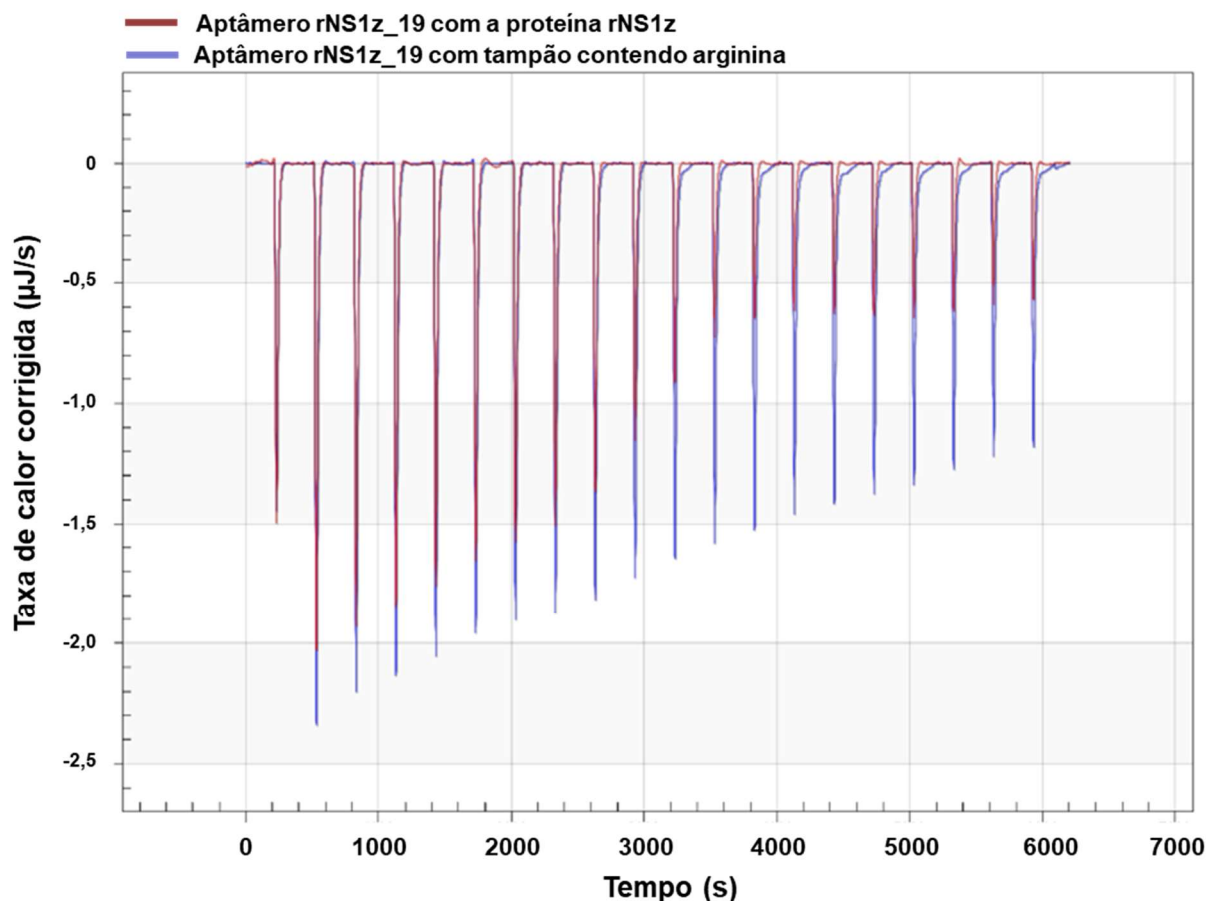


Figura 4.9.1.4. Titulação calorimétrica demonstrando a interação entre a proteína não glicosilada do ZIKV (rNS1z) e o aptâmero rNS1z_19 (em vermelho) e entre o aptâmero rNS1z_19 e o tampão da proteína (PBS/arginina) (em azul). Titulação controle (aptâmero-proteína): concentração da proteína = 10 µM (célula); concentração do aptâmero = 100 µM (seringa). Titulação teste (aptâmero-arginina): concentração da arginina = 33 mM (célula); concentração do aptâmero = 100 µM (seringa). Temperatura = 25 °C.

A solução tampão da proteína foi trocada para água, para evitar a influência da arginina na determinação do calor de titulação, e foi realizado um novo ensaio de avaliação da afinidade aptâmero-proteína.

Na figura 4.9.1.5., é possível observar que o perfil calorimétrico mudou de endotérmico para exotérmico com a retirada da arginina. O valor de K_d ($6,12 \times 10^{-5}$ M) foi menor do que o estimado previamente nos ensaios com a presença de arginina, porém o comportamento ainda possui pouca definição, como demonstrado pelo perfil da curva obtida na modelagem (figura 4.9.1.6.).

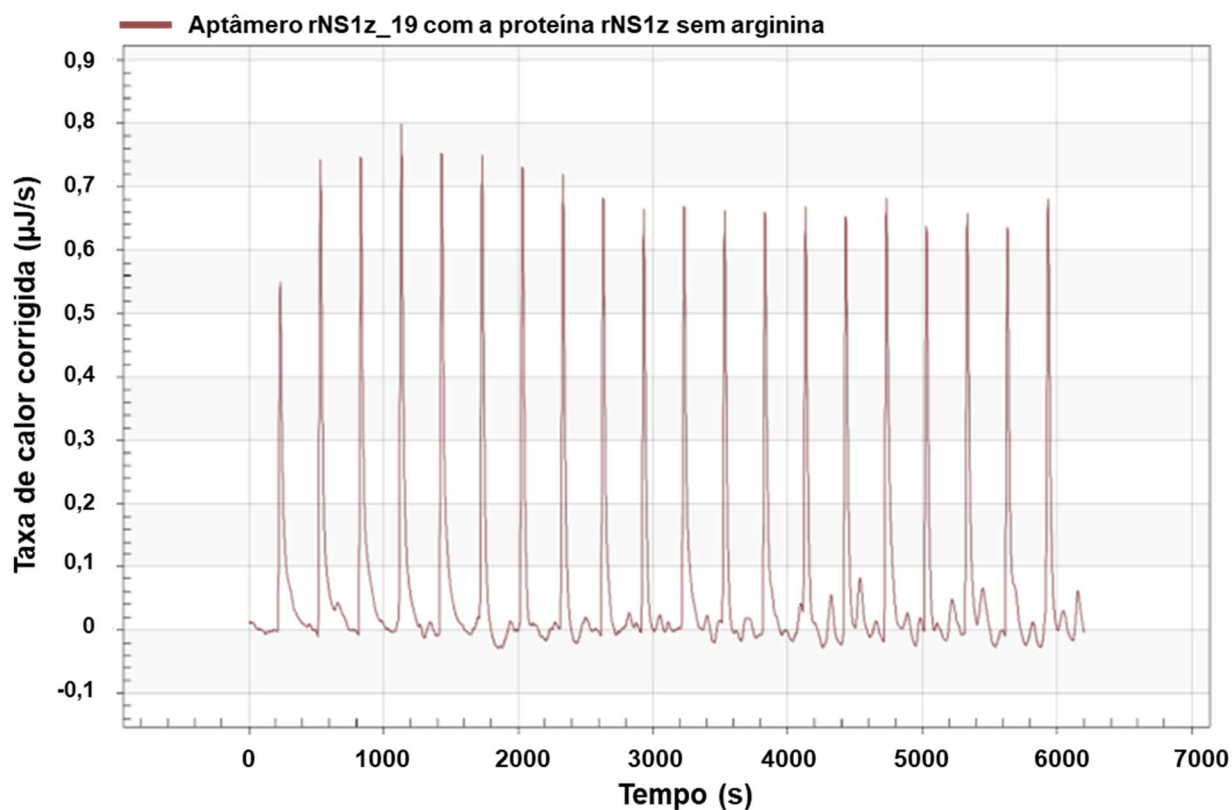


Figura 4.9.1.5. Titulação calorimétrica entre o aptâmero rNS1z_19 e a proteína NS1z não glicosilada na ausência de arginina. Concentração da proteína = $10 \mu\text{M}$ (célula); concentração do aptâmero = $100 \mu\text{M}$ (seringa). Temperatura = 25°C .

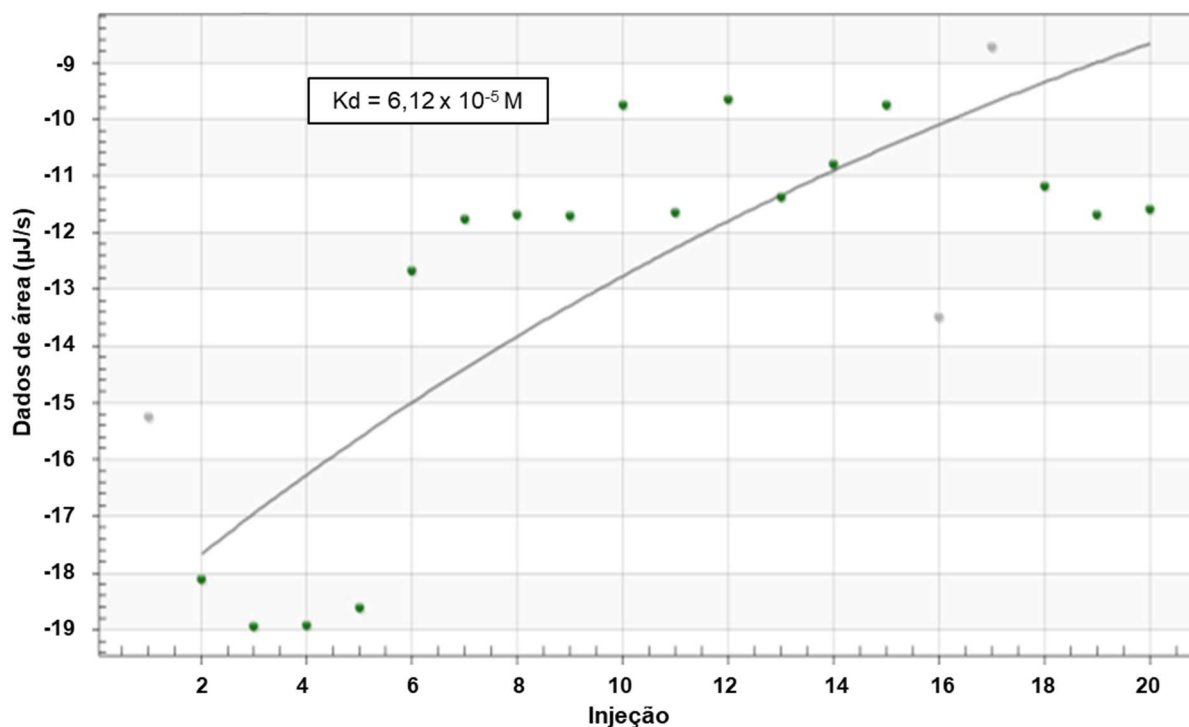


Figura 4.9.1.6. Modelagem dos ensaios de titulação calorimétrica entre o aptâmero rNS1z_19 e a proteína NS1z não glicosilada, na ausência de arginina. Modelo independente demonstrando o valor de K_d ($6,12 \times 10^{-5} \text{ M}$).

4.9.2. Aptâmeros para Anticorpo Monoclonal anti-NS1z

Através do experimento preliminar de termoforese (item 4.8.4.), foi possível observar a tendência geral do perfil de afinidade entre os sete aptâmeros (mAb_2c, mAb_5c, mAb_9c, mAb_12c, mAb_20c, mAb_11p e mAb_30p) e o anticorpo anti-NS1z. Para a análise por calorimetria, foram selecionados os aptâmeros mAb_2c e mAb_20c, que apresentaram melhor comportamento termoforético em relação ao controle sem ligante, e o aptâmero mAb_11p, que apresentou a mesma faixa de erro do controle negativo, de forma a comprovar uma afinidade inferior (vide item 4.8.4., figura 4.8.4.1.).

A figura 4.9.2.1 demonstra o perfil exotérmico da titulação calorimétrica do aptâmero mAb_2c com o mAb anti-NS1z LB10/BF4.

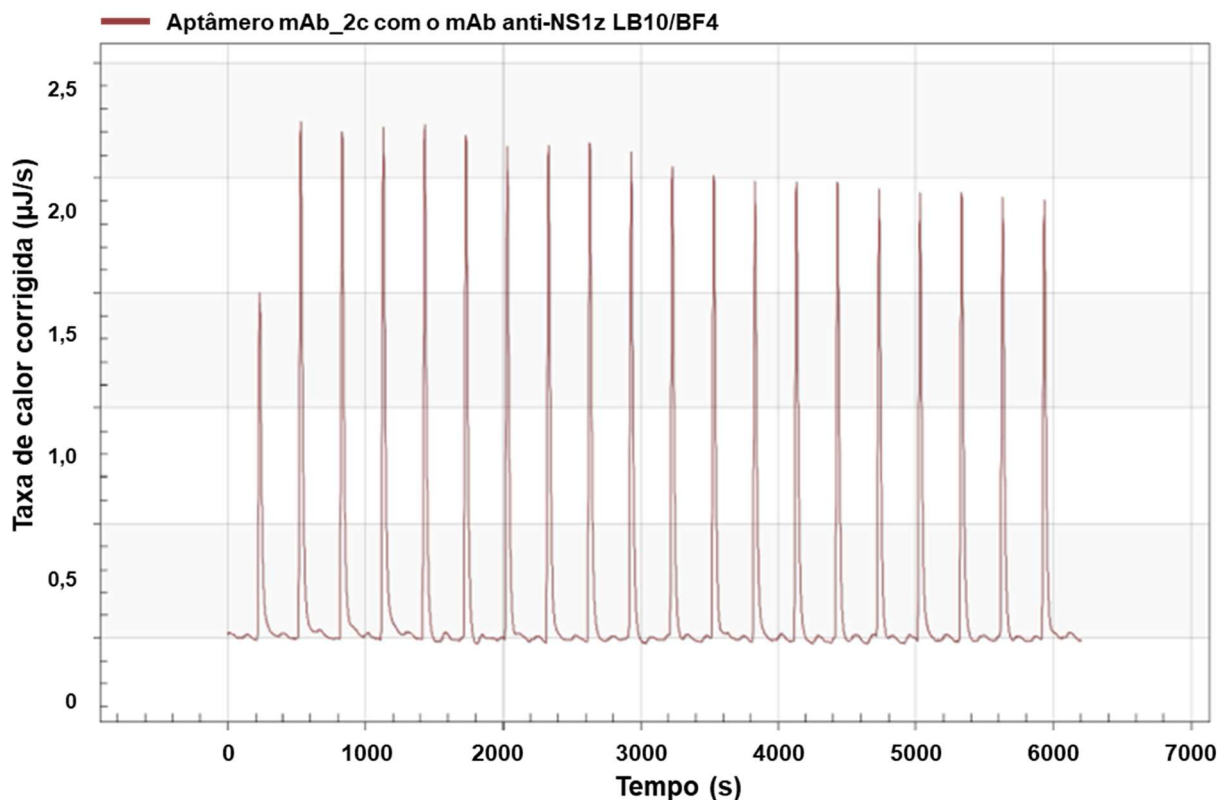


Figura 4.9.2.1. Titulação calorimétrica entre o aptâmero mAb_2c e o anticorpo monoclonal anti-NS1z LB10/BF4. Concentração do mAb = 7,08 μM (célula); concentração do aptâmero = 100 μM (seringa). Temperatura = 25 $^{\circ}\text{C}$.

Como os meios em que se encontram as amostras da seringa e da célula são diferentes (água e PBS, respectivamente), foi realizado um ensaio considerando a titulação entre o aptâmero e a solução tampão PBS (figura 4.9.2.2.).

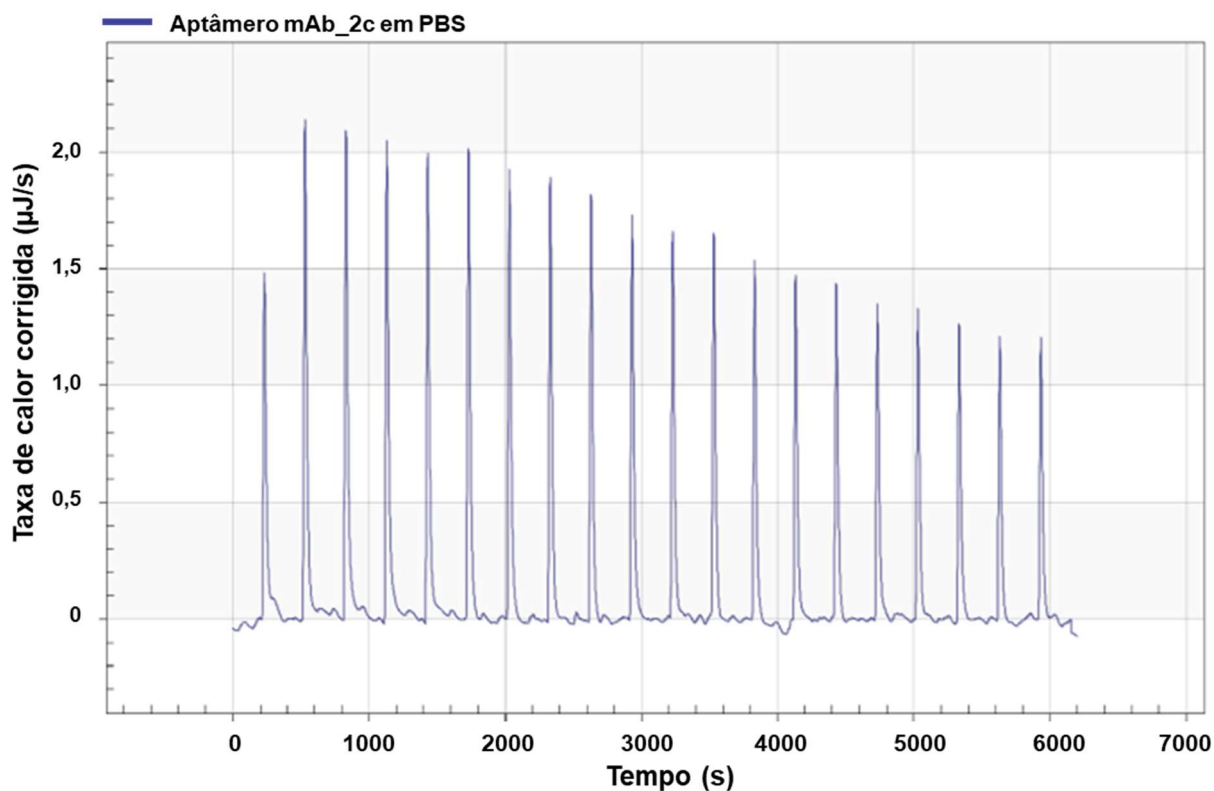


Figura 4.9.2.2. Titulação calorimétrica entre o aptâmero mAb_2c e PBS. Concentração do aptâmero = 100 µM (seringa). Temperatura = 25 °C.

Na comparação entre as titulações calorimétricas do aptâmero mAb_2c com o anticorpo anti-NS1z e com PBS, ficou evidente a contribuição do calor de dissolução do aptâmero em PBS (figura 4.9.2.3.). Desse modo, essa diferença foi subtraída da titulação para a realização da modelagem. O valor de K_d , segundo o modelo independente, foi de $1,52 \times 10^{-5}$ M. O fato de não possuir um comportamento sigmoidal, característico para esse tipo de ensaio, é um indicativo da baixa afinidade de ligação entre os compostos nas concentrações molares avaliadas (figura 4.9.2.4.).

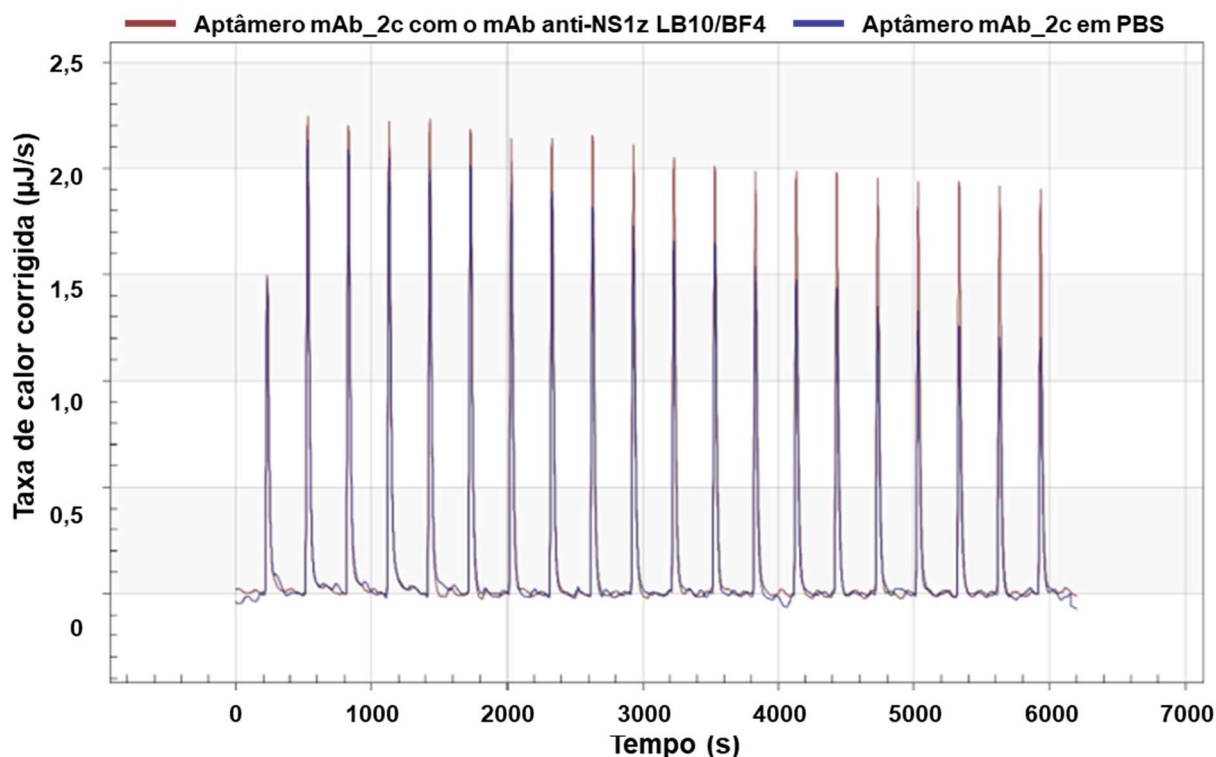


Figura 4.9.2.3. Titulação calorimétrica demonstrando a interação entre o mAb anti-NS1z LB10/BF4 e o aptâmero mAb_2c (em vermelho) e entre o aptâmero e o tampão PBS (em azul). Titulação controle (aptâmero-mAb): concentração do anticorpo = 7,08 µM (célula); concentração do aptâmero = 100 µM (seringa). Titulação teste (aptâmero-PBS): concentração do aptâmero = 100 µM (seringa). Temperatura = 25 °C.

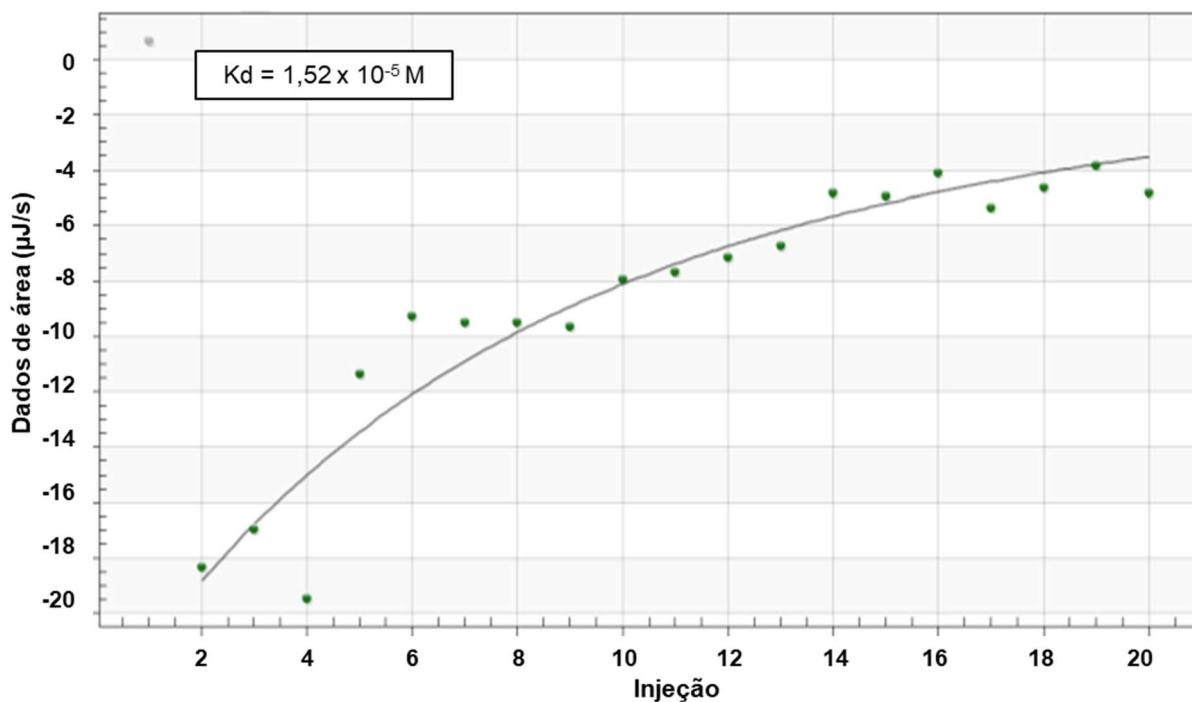


Figura 4.9.2.4. Modelagem dos ensaios de titulação calorimétrica entre o aptâmero mAb_2c e o mAb anti-NS1z LB10/BF4. Modelo independente demonstrando o valor de Kd ($1,52 \times 10^{-5}$ M).

Para o ensaio de titulação do aptâmero mAb_20c com o anticorpo anti-NS1z, foi realizada a troca da solução do anticorpo de PBS para água, para evitar efeitos de energia de diluição, como observado no experimento anterior.

A titulação e a modelagem referente à interação aptâmero mAb_20c e o anticorpo anti-NS1z estão exibidas nas figuras 4.9.2.5. e 4.9.2.6., respectivamente. O K_d obtido foi de $4,116 \times 10^{-6}$ M.

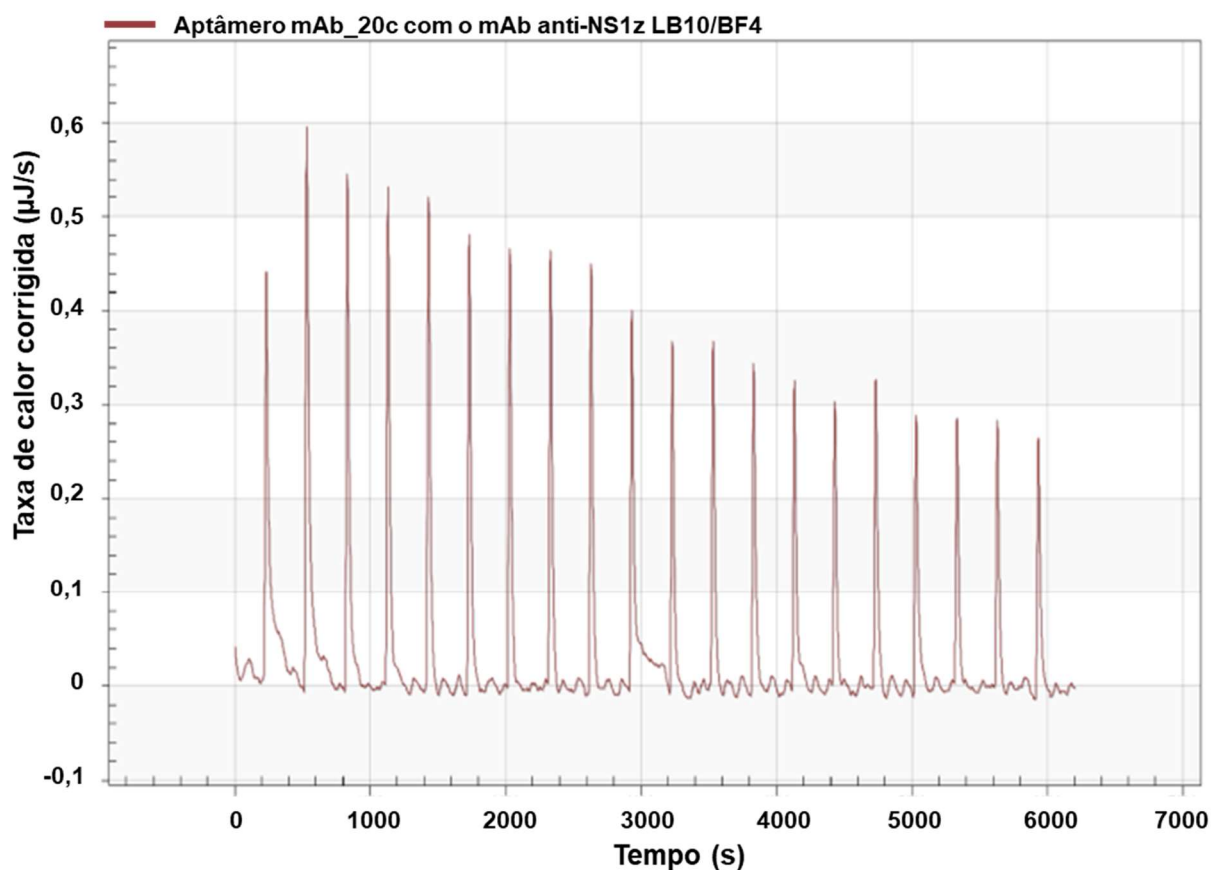


Figura 4.9.2.5. Titulação calorimétrica demonstrando a interação entre o mAb anti-NS1z LB10/BF4 e o aptâmero mAb_20c. Concentração do mAb = $7,08 \mu\text{M}$ (célula); concentração do aptâmero = $100 \mu\text{M}$ (seringa). Temperatura = $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

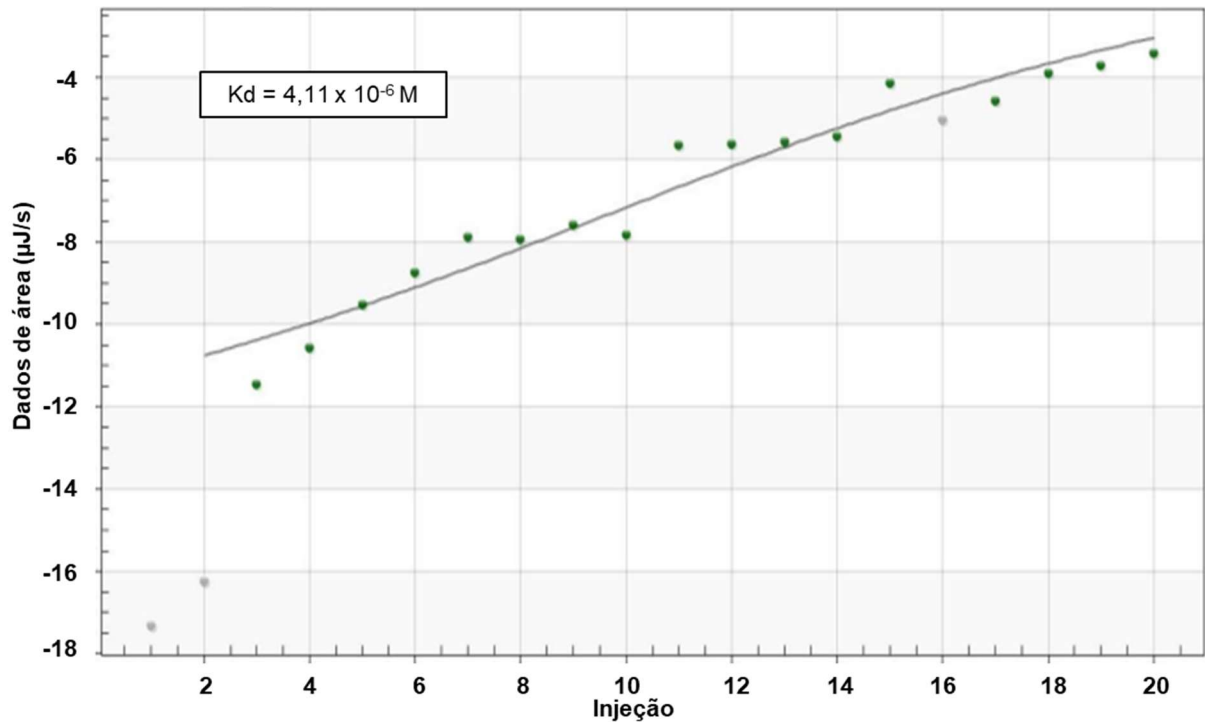


Figura 4.9.2.6. Modelagem dos ensaios de titulação calorimétrica entre o aptâmero mAb_20c e o mAb anti-NS1z LB10/BF4. Modelo independente demonstrando o valor de K_d ($4,11 \times 10^{-6} \text{ M}$).

No ensaio de titulação com aptâmero mAb_11p, também foi realizada a troca da solução do anticorpo de PBS para água, de forma a evitar efeitos de diluição capazes de interferir na determinação da afinidade.

É possível observar, pela figura 4.9.2.7., que o comportamento observado para a afinidade entre o aptâmero mAb_11p e anticorpo anti-NS1z não apresenta nenhuma tendência definida. O valor de K_d foi de $1,00 \times 10^{-3} \text{ M}$, calculado através do modelo independente.

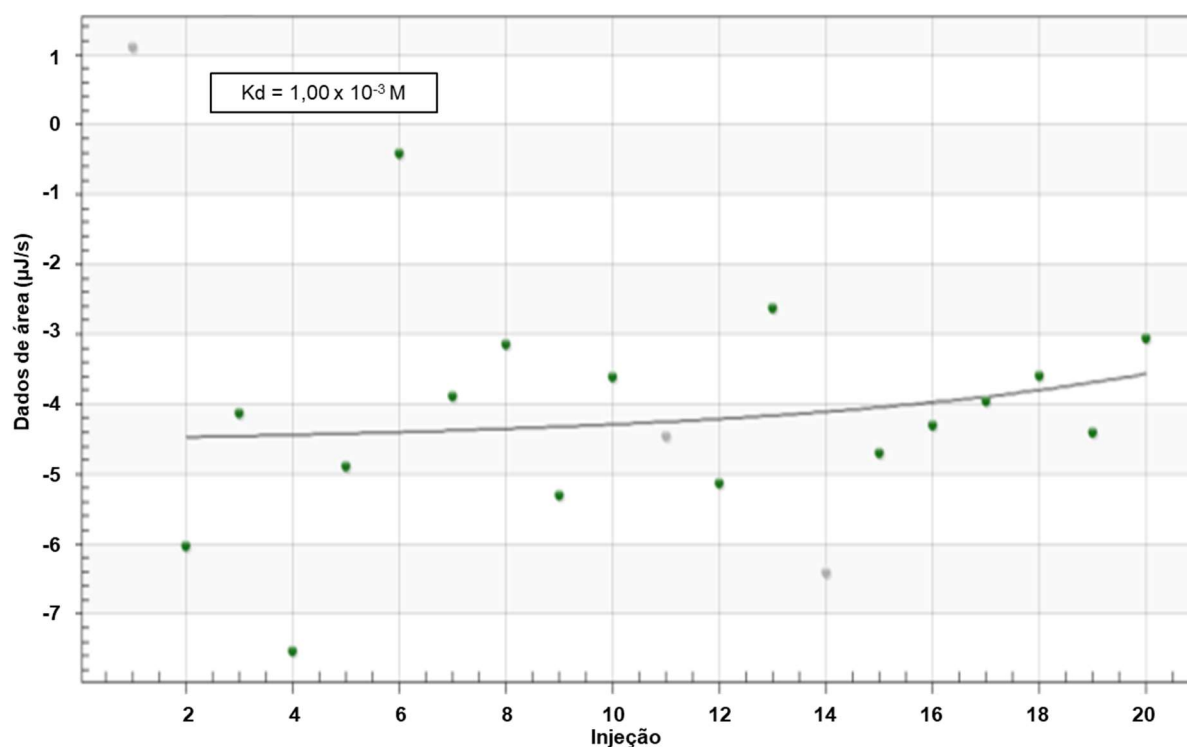


Figura 4.9.2.7. Modelagem dos ensaios de titulação calorimétrica entre o aptâmero mAb_11p e o mAb anti-NS1z LB10/BF4. Modelo independente demonstrando o valor de K_d ($1,00 \times 10^{-3} \text{ M}$).

5. DISCUSSÃO

O ZIKV é um vírus emergente transmitido por artrópodes, que ganhou reconhecimento público devido à sua associação com microcefalia em recém-nascidos. Atualmente, apesar da diminuição na notificação de casos no Brasil, o vírus continua circulando em nosso meio, juntamente com outros arbovírus transmitidos por mosquito (46). No mundo, continua causando epidemias, como a ocorrida recentemente (2021) no sudeste asiático (24). O diagnóstico diferencial entre ZIKV, DENV e CHIKV é um grande desafio, devido às semelhanças sintomatológicas entre essas arboviroses e a ocorrência de reação cruzada em ensaios sorológicos (127–129). Aptâmeros têm sido amplamente utilizados no estudo de arbovírus, tanto para aplicações diagnósticas quanto terapêuticas (142). Particularmente, na área de diagnóstico, eles são capazes de diferenciar os sorotipos de DENV e também têm sido aplicados para detecção de ZIKV, TBEV e CHIKV, com sucesso considerável (176–180). Em estudos anteriores de Zika usando aptâmeros, os autores usaram a proteína NS1 como alvo e, na maioria dos casos, os aptâmeros selecionados não foram capazes de diferenciar entre as proteínas NS1 de ZIKV e DENV (176,181).

Neste trabalho, além da seleção de aptâmeros para proteína NS1, apresentamos, pela primeira vez, aptâmeros selecionados para a partícula viral do ZIKV e para anticorpos monoclonais anti-NS1. A produção viral foi uma etapa importante nesse processo, garantindo vírus com alto rendimento e livres de impurezas que poderiam influenciar a qualidade da seleção dos aptâmeros. Em nosso experimento de cinética viral, observamos que o título do isolado viral ZIKV ES 2916/2015 atingiu seu pico em 48 h, usando MOI de 0,02. Experimentos anteriores também relatam o ápice viral em 48 h utilizando células Vero, em MOI de um (1 unidade infecciosa por célula) (182,183). O título viral foi de 7,44Log₁₀ PFU/mL, um pouco maior do que o encontrado por da Silva e colaboradores (7 log₁₀ PFU/mL) (183), demonstrando a eficiência da produção viral.

Embora diferentes estratégias tenham sido adotadas para a seleção de aptâmeros contra diferentes arbovírus (142), sua afinidade de ligação pode ser influenciada pelo rigor das condições selecionadas, como, por exemplo, reduzir a concentração do alvo ou modificar a ligação e condições de lavagem (140). Neste trabalho, usamos um protocolo baseado na interrupção das interações formadas entre o aptâmero e o alvo usando tampões com alto teor de sal e agentes caotrópicos. Em um estudo anterior, realizado por Simmons e colaboradores (159), usando as mesmas condições de seleção, foi observada alta homologia nas sequências geradas nas eluições de NaCl 1,5 M e NaSCN 3 M, e os ensaios realizados confirmaram alta afinidade com o alvo. Além do uso das mesmas condições de eluição, introduzimos rodadas negativas de seleção, visando selecionar não apenas os aptâmeros de maior ligação, mas aqueles que fossem específicos para o alvo. Para a seleção contra a partícula viral, usamos aptâmeros resultantes apenas da eluição de NaSCN 3 M e conseguimos a formação de quatro grupos de aptâmeros e uma região altamente conservada de 22 nucleotídeos e um subconjunto de identidade de sequência, indicando uma sequência central que forma uma alça de ligação. Na seleção contra a proteína NS1 glicosilada, observamos que dois aptâmeros (rNS1zg_20 e rNS1zg_22) também apresentaram sequências análogas, diferindo somente em três nucleotídeos, e, na seleção para proteína NS1 não glicosilada, sequências semelhantes foram encontradas formando 3 grupos com 2 sequências cada, sugerindo uma tendência de preferência de ligação. Para as seleções (placa e coluna) realizadas contra o anticorpo monoclonal, o número de sequências 100 % homólogas foi muito maior, devido ao método de sequenciamento (NGS). Além disso, encontramos homologia de 13 nucleotídeos em 13 sequências provindas da seleção em coluna.

Na última década, vários métodos computacionais de bioinformática foram propostos para facilitar a seleção de potenciais aptâmeros através da previsão da estrutura do aptâmero (184). A estrutura secundária do aptâmero desempenha um papel fundamental para análise da ligação do aptâmero à molécula alvo, prevendo estruturas como *G-quadruplex*, alça em gancho e junção em T, que aumentam a afinidade de ligação. Além disso, a estrutura secundária contribui para a previsão da estrutura 3D do aptâmero (184). Ao analisar as estruturas secundárias e terciárias no presente trabalho, utilizamos o programa Mfold, que prevê estruturas secundárias com o mínimo de energia livre, e o RNAComposer, para predição da estrutura 3D de RNA. Verificamos, em todas as seleções, a presença de diversas estruturas de alça em gancho que poderiam elevar a afinidade aptâmero-alvo. Na seleção de aptâmeros para a proteína rNS1 não glicosilada, utilizamos o critério de menor ΔG para selecionar o aptâmero (rNS1z_19) que seguiria para as análises de afinidade. Em um estudo realizado por Heiat e colaboradores (2016), quatro aptâmeros de DNAs foram selecionados para inibir a atividade da angiotensina II, utilizando os programas Mfold e RNAComposer para prever a estrutura secundária e terciária dos aptâmeros (185). Hu e colaboradores (2015) realizaram seleção computacional de aptâmero usando RNAComposer e selecionaram aptâmeros de RNA com alta afinidade de ligação pela angiopoietina II (186).

Adicionalmente, realizamos modelagem molecular a fim de simular o local de ligação aptâmero-alvo. A simulação do encaixe molecular é feita por uma ferramenta de simulação computacional usada para modelar a interação entre duas moléculas. Este método é amplamente utilizado nas áreas farmacêutica e de biotecnologia para desenvolver candidatos a fármacos que se liguem a sítios ativos específicos de uma substância alvo. Estudos com aptâmeros vêm empregando cada vez mais essa ferramenta para a previsão do encaixe ao alvo e seleção *in silico*. Oh e colaboradores (2020) selecionaram dois aptâmeros específicos para o sítio ativo da toxina botulínica, utilizando a identificação de sítios de ligação por simulação de encaixe (187). Nas análises de interação molecular realizadas em nosso estudo, avaliamos a posição de encaixe dos aptâmeros com as proteínas de envelope (E) e NS1, relacionando-as com os sítios de ligação disponíveis nas proteínas no estado nativo. A proteína E, que está presente em toda superfície viral, possui uma região voltada para o exterior (ectodomínio) e outra voltada para a membrana do envelope (57). Na análise dos aptâmeros selecionados para a partícula viral, após avaliarmos as 10 primeiras predições, verificamos que os aptâmeros ZIK01 e ZIK02 apresentaram acoplamento

na região do ectodomínio na primeira modelagem (modelo 1), que é o modelo de menor energia livre. Já os aptâmeros ZIK03 e ZIK04 só apresentaram ligação favorável no modelo 3, indicando que os dois primeiros aptâmeros tendem a ser melhores alvos para fins de diagnóstico. A proteína NS1 está presente no organismo infectado em duas formas: dimérica (ligada à membrana celular) e hexamérica (excretada). No hexâmero, três dímeros se montam com as faces polares apontadas para fora e as faces hidrofóbicas, formadas pelo domínio β -roll e alça adjacente, apontadas para dentro (65). Os aptâmeros foram avaliados utilizando o critério de exclusão dos modelos que apresentaram acoplamento no β -roll, partindo do princípio de que os sítios de ligação nessa região não estariam disponíveis na proteína nativa. Assim, dentre os aptâmeros selecionados para NS1 glicosilada e não glicosilada, o rNS1zg_19 foi o que apresentou melhor encaixe utilizando o modelo de menor energia livre (modelo 1) e, adicionalmente, foi o aptâmero que apresentou o menor ΔG (-11,61 kcal/mol) na estrutura secundária, sendo um grande candidato à utilização em testes laboratoriais.

No ensaio de ELISA, a carga negativa do esqueleto do DNA, devido aos fosfatos, dificulta a adesão dos aptâmeros às placas de poliestireno. Uma alternativa prática e barata é o uso de PL, que modifica a carga superficial de frascos e placas para cultura de células (188) e placas para ensaios enzimáticos (189). Desenvolvemos um ELISA interno com placas revestidas por PL, que permitiram a imobilização de aptâmeros para a realização dos ensaios. Usando este método, demonstramos que os aptâmeros específicos para cada alvo foram capazes de reconhecê-los em ensaios de ELISA. No entanto, a sensibilidade do ensaio pode ser potencialmente melhorada, pois se entende que o uso de lisina permite a deposição dos aptâmeros de forma desordenada, não otimizando a exposição dos sítios de ligação dos aptâmeros.

Métodos alternativos usando aptâmeros modificados com grupos funcionais, para imobilização (biotina, amina) ou otimização da detecção (moléculas fluorescentes) dos aptâmeros, podem melhorar o desempenho do sistema e permitir o uso direto em testes de diagnóstico (140). No presente trabalho, realizamos experimentos imunoenzimáticos sanduiche (aptâmero-alvo-anticorpo), utilizando aptâmeros modificados com um grupamento amina (-NH₂) na extremidade 5' em placas tratadas com anidrido maleico. Os experimentos iniciais foram realizados utilizando o tampão de bloqueio recomendado pelo manual da placa, denominado *superblock*, seguindo as orientações do fabricante. Através da utilização de um

controle negativo sem aptâmero (CN2), avaliamos a eficiência do bloqueio na reação. Os resultados dos experimentos realizados, tanto para os aptâmeros contra a partícula viral como para aqueles contra a proteína NS1 (glicosilada e não glicosilada), demonstraram que havia ligação do alvo com o anticorpo na ausência do aptâmero de captura, indicando que o referido bloqueio não funcionou de modo adequado. Em seguida, outros tampões também foram testados, porém sem êxito, pois bloqueavam totalmente qualquer reação. Para os experimentos com o mAb, verificamos que, utilizando o tampão PBS/leite 1%/BSA 1%, todos os controles funcionaram. Esse pode ser considerado um tampão promissor, porém precisa ser melhor analisado quanto à possível interferência sobre a interação do aptâmero com seu alvo, visto que nenhum aptâmero apresentou leitura. Além disso, os resultados podem indicar que esses aptâmeros não se ligam ao alvo, pelo menos nesse formato, ou que não se ligaram aptâmeros suficientes na placa. Esses dados devem ser avaliados em conjunto com outras técnicas de análise e futuros testes de verificação de ligação do aptâmero à placa. Outros trabalhos utilizando aptâmeros amino modificados imobilizados via amina primária marcada na posição 5', descritos por Nie e colaboradores (2013) e Oh e colaboradores (2020), obtiveram sucesso na detecção de aptâmeros para cocaína e neurotoxina, respectivamente (187,190). Esses ensaios, que também eram do tipo sanduiche, não utilizavam anticorpo na revelação (aptâmero-alvo-aptâmero) e, dessa forma, não existia a possibilidade de reação cruzada antígeno-anticorpo. Para utilização de ensaios nesse formato, é necessário que haja aptâmeros que se liguem em locais diferentes do alvo que sejam avaliados a priori quanto à afinidade de ligação com o alvo.

A espectroscopia de fluorescência é uma técnica altamente sensível que permite medições de interações moleculares entre espécies em concentrações muito baixas. A indução de fluorescência nas proteínas é determinada pela presença de aminoácidos aromáticos, principalmente o Trp, que absorve luz próximo a 290 nm e emite fluorescência próximo a 350 nm (170). Existem vários ligantes que suprimem a emissão de fluorescência, denominados *quenchers*, em função do grupo fluorescente estar em contato com o meio que o circunda, ou mesmo estar protegido por outras estruturas. Sendo assim, a supressão da fluorescência é resultante de qualquer processo de interação molecular por uma determinada substância que diminua a intensidade da fluorescência emitida. A supressão pode ser induzida por diferentes processos, tais como reações no estado excitado, rearranjos moleculares, transferência de energia, formação de complexo no estado fundamental (supressão

estática) e processos colisionais (supressão dinâmica) (191). No presente trabalho, estudamos a interação entre os aptâmeros selecionados contra a partícula viral e a proteína NS1 não glicosilada através da supressão da fluorescência dos resíduos de triptofano (Trp) presentes nas proteínas E e NS1, respectivamente.

A partícula do ZIKV contém 180 moléculas de proteína E, cada uma possuindo 10 Trp (48). Ao analisarmos a suspensão viral, observamos que o espectro de emissão da fluorescência não foi satisfatório, ocorrendo baixa emissão e ausência de um pico bem definido. Vários fatores podem ter ocasionado pouco sinal de fluorescência, dentre eles, a baixa concentração de vírus, visto que, a quantidade total de proteína E na suspensão viral é bem menor que a utilização de proteína purificada. Isso também foi observado nos ensaios de MST (item 4.8) (resultados discutidos abaixo). Também poderia ocorrer interferência do tampão da suspensão viral ou do marcador de pH. Entretanto, ao analisar o perfil de emissão do tampão e do marcador de pH, observamos que ambos apresentaram picos fluorescentes em comprimentos de onda bem acima do Trp, não interferindo na leitura da amostra. Experimentos utilizando a proteína E podem ser uma boa alternativa para avaliar a afinidade dos aptâmeros pelo método de espectroscopia de fluorescência.

Nos experimentos fluorimétricos envolvendo a proteína NS1 não glicosilada, a diminuição da intensidade de fluorescência da proteína pôde ser prontamente observada em ambos os aptâmeros, indicando a existência de sítio(s) de ligação próximos aos resíduos de Trp. Silva e colaboradores, também demonstraram a supressão de fluorescência de albuminas de soro humano e bovino (HSA e BSA) por dois aptâmeros distintos, identificando inclusive o tipo de extinção observado em cada um deles (dinâmica e estática) (144). Em nosso estudo, o aptâmero rNS1z_19 apresentou maior afinidade que o rNS1z_38B/39D, corroborando os resultados da análise de energia livre das estruturas secundárias e o acoplamento molecular. Entretanto, nossos resultados de K_d ($3,12$ a $3,83 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) foram menores do que os observados por Simmons e colaboradores (2012), que identificaram altas afinidades de ligação entre aptâmeros para heparanase (7×10^7 a $8 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$), utilizando a mesma tecnologia (159).

A termoforese em microescala (MST) também foi utilizada para avaliar a afinidade de ligação aptâmero-alvo. A MST se baseia no movimento de moléculas através de gradientes de temperatura para caracterizar interações molécula-aptâmero em escala de microlitros. A avaliação de afinidade dos aptâmeros contra as partículas do ZIKV confirmou a capacidade dos aptâmeros em reconhecer tanto a partícula

viral inteira quanto a proteína E em particular. Além disso, foi possível identificar a incapacidade do aptâmero de interagir com os quatro sorotipos de DENV.

A afinidade dinâmica no MST abrange faixas de μM a mM . Nos estudos descritos por Entzian e Schubert (2015), a interação de um aptâmero com a molécula de ATP apresentou K_d na unidade de μM (192). Sass e colaboradores (2019) apresentaram a avaliação da afinidade entre aptâmeros e antraciclinas, onde foram encontradas constantes de dissociação em nM , indicando alta interação molecular (193). Em nossos estudos, três aptâmeros (ZIK02, ZIK03 e ZIK04) também apresentaram K_d s inferiores a $1 \mu\text{M}$. Apesar das constantes de dissociação desses três aptâmeros serem estatisticamente diferentes, a presença de regiões de similaridade, encontradas na predição da estrutura secundária e terciária, podem contribuir para uma melhor afinidade com o alvo, ou seja, estas regiões provavelmente interagem com sítios específicos da proteína E.

Os ensaios de MST envolvendo a proteína rNS1z demonstraram que não houve interação definida entre o aptâmero rNS1zg_5 e a proteína. Outras concentrações de ligante e alvo devem ser experimentadas, a fim de obter uma melhor avaliação dessa ligação, especialmente diante dos resultados de ELISA e fluorescência, além da própria seleção, que confirmam essa interação.

Para avaliação de afinidade por MST, dos sete aptâmeros selecionados contra o mAb LB10/BF4, realizamos um teste preliminar que comparou os percentuais de fluorescência de interação apresentados por cada um deles e uma amostra controle negativo (sem adição do ligante). A tendência geral do perfil de afinidade demonstrou que os aptâmeros mAb_2c e mAb_20c apresentaram a maior diferença quando comparados ao controle. Esses aptâmeros foram, em seguida, avaliados por ITC.

O método calorimétrico ITC mede diretamente o calor liberado ou consumido no decorrer de um evento de ligação molecular. Nos experimentos realizados com o aptâmero rNS1z_19 e a proteína rNS1z, além da avaliação ligante-alvo, também avaliamos a interação entre os tampões de cada molécula e a interferência da arginina sobre a interação aptâmero-proteína. É possível observar que o perfil calorimétrico mudou de endotérmico para exotérmico com a retirada da arginina, demonstrando a forte influência do aminoácido sobre a interação e o ensaio como um todo. Isso pode ser justificado devido à carga positiva da arginina, que interage fortemente com a carga negativa dos fosfatos. Em diversas interações de aptâmeros com proteínas alvo, a arginina age como âncora para facilitar o *docking* do aptâmero (194). De fato, para o caso de aptâmero interagindo com proteínas específicas, o perfil exotérmico

condiz mais com o descrito na literatura (195). Ao trocar o tampão da proteína, verificamos um aumento da K_d (de $2,365 \times 10^{-4}$ M para 6.123×10^{-5} M), porém a curva de interação não apresentou um perfil sigmoidal. Isto pode ser ocasionado pela baixa afinidade ou baixa concentração das amostras, sugerindo a necessidade de novos experimentos com maior quantidade de amostra para uma melhor definição da curva de titulação.

Nas análises realizadas por ITC entre os aptâmeros e mAb LB10/BF4, também verificamos contribuição de calor do PBS no aptâmero. A afinidade entre o anticorpo anti-NS1 e os dois aptâmeros previamente selecionados no MST, mAb_2c e mAb_20c, apresentaram valores de K_d de $1,523 \times 10^{-5}$ M e $4,116 \times 10^{-6}$ M, respectivamente. Entretanto, o fato de não possuir um perfil sigmoidal, característico para esse tipo de ensaio, é um indicativo da baixa afinidade de ligação entre os compostos nas concentrações molares avaliadas. Experimentos utilizando maiores concentrações são necessários para uma melhor avaliação.

A fim de comprovar afinidade inferior dos aptâmeros que estavam na mesma faixa de erro do controle (experimentos em MST), a afinidade do aptâmero mAb_11p com o anticorpo anti-NS1 foi testada. Os resultados obtidos demonstraram um valor de K_d superior ao obtido para os aptâmeros mAb_20c e mAb_2c, corroborando a tendência observada no experimento por termoforese. Além disso, esse é o valor máximo calculado pelo software NanoAnalyze®. Portanto, tal valor não deve ser considerado como representativo do ponto de vista quantitativo, mas sim como uma análise qualitativa de que a afinidade para o aptâmero mAb_11p é bem menor, quando comparada com os outros aptâmeros testados.

Nesse trabalho, com base nos resultados observados tanto nas análises *in silico* como nos experimentos de MST, os aptâmeros ZIk01 e ZIk02 se mostraram promissores para utilização no diagnóstico diferencial entre infecções causadas por ZIKV e DENV. A investigação de modificações pós-SELEX para aumentar a afinidade dos aptâmeros, bem como a otimização do formato de desenvolvimento dos ensaios, são pretensões para aproveitar ao máximo a capacidade do aptâmero de se ligar ao ZIKV e desenvolver novas estratégias de diagnóstico para infecções pelo vírus zika.

6. CONCLUSÕES

- ✓ A cinética viral do ZIKV foi eficiente, demonstrando o pico de produção viral nos dois MOIs estudados;
- ✓ A estratégia adotada para a produção do ZIKV ES2916/2015 em células Vero foi considerada eficiente, obtendo título viral de 7,44 Log₁₀ PFU/mL;
- ✓ A seleção SELEX se mostrou capaz de obter sequências de aptâmeros para todos os alvos nas eluições de maior concentração de sal (NaCl 1,5 M e NaSCN 3 M);
- ✓ As ferramentas utilizadas para predição das estruturas secundárias e terciárias foram úteis para a identificação de estruturas semelhantes entre aptâmeros e para a seleção de aptâmeros com menor energia livre;
- ✓ A modelagem molecular utilizando a plataforma HDOCK permitiu uma análise tridimensional da ligação aptâmero-alvo, possibilitando relacionar a posição de encaixe dos aptâmeros com as proteínas nativas e identificar modelos com maior possibilidade de utilização em testes de diagnóstico;
- ✓ Os ELISAs utilizando placas tratadas com polilisina foram capazes de identificar a ligação dos aptâmeros a seus respectivos alvos;
- ✓ Os testes de ELISA utilizados para a avaliação dos anticorpos monoclonais anti-NS1 de ZIKV frente às proteínas virais não estruturais do ZIKV (NS1 e NS5) e do YFV (NS1) foram capazes de confirmar a especificidade desses anticorpos para a NS1 de ZIKV e permitiram selecionar um mAb que reconhecesse a proteína em sua forma glicosilada e não glicosilada;
- ✓ Os ensaios imunoenzimáticos utilizando aptâmeros modificados com amina em placas tratadas com anidrido maleico não permitiram avaliação dos aptâmeros, devido à ocorrência de reações falso-positivas ou baixo sinal de absorbância resultantes dos tampões de bloqueio utilizados;
- ✓ A espectroscopia de fluorescência não possibilitou a avaliação de aptâmeros contra a partícula viral inteira, porém se mostrou útil na análise da interação entre o aptâmero rNS1z_19 e rNS1z_38B/39D com a proteína rNS1z;
- ✓ Os ensaios de termoforese em microescala (MST) foram capazes de avaliar os aptâmeros contra ZIKV, sugerindo a aptidão dos aptâmeros em reconhecer tanto a partícula viral inteira quanto a proteína E;
- ✓ Através da MST, foi possível averiguar a especificidade dos aptâmeros ZIK01 e ZIK02 ao ZIKV, demonstrada pela incapacidade desses aptâmeros se ligarem aos quatro sorotipos de DENV;

- ✓ Os experimentos de MST para avaliação de aptâmeros para proteína NS1 glicosilada e para o mAb precisam ser executados em maiores concentrações;
- ✓ O método calorimétrico ITC foi capaz de identificar a interferência de tampões contendo PBS e arginina na análise da afinidade entre aptâmeros e alvo;
- ✓ A avaliação dos aptâmeros para proteína NS1 não glicosilada e para o anticorpo monoclonal LB10/BF4 pelo nano-ITC mostrou constantes de afinidade entre 10^{-5} M e 10^{-6} M, porém a curva de interação não apresentou um perfil sigmoidal, sugerindo a necessidade de experimentos utilizando concentrações maiores;
- ✓ Ambos os métodos, MST e nano-ITC, foram capazes de identificar baixa ligação do aptâmero mAb_11p ao mAb LB10/BF4;
- ✓ O aptâmero rNS1z_19 para a proteína NS1 não glicosilada demonstrou afinidade na mesma ordem de grandeza nos ensaios de espectroscopia de fluorescência e no nano-ITC ($3,83 \times 10^{-5}$ M e $6,12 \times 10^{-5}$ M, respectivamente).
- ✓ Os aptâmeros ZIK01 e ZIK02 são ótimos candidatos para utilização em diagnóstico diferencial entre infecções causadas por ZIKV e DENV.

7. PERSPECTIVAS

- Utilizar aptâmeros modificados com biotina na região 5' nos testes de ELISA, utilizando placas cobertas por estreptavidina;
- Avaliar os aptâmeros selecionados para a partícula viral utilizando a proteína E nos ensaios de espectroscopia de fluorescência e nano-ITC;
- Aumentar a concentração dos aptâmeros e alvos nos testes de MST e nano-ITC;
- Realizar dicroísmo circular para avaliar estrutura secundária das proteínas NS1 e E do ZIKV;
- Desafiar os aptâmeros selecionados para ZIKV em testes de ELISA frente a um painel de soros positivos para diferentes flavivírus.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dick GWA, Kitchen SF, Haddow AJ. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1952;46(5):509–20. Disponível em: [https://academic.oup.com/trstmh/article-lookup/doi/10.1016/0035-9203\(52\)90042-4](https://academic.oup.com/trstmh/article-lookup/doi/10.1016/0035-9203(52)90042-4)
2. MacNamara FN. Zika virus : A report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1954;48(2):139–45. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0035920354900061>
3. Bearcroft WGC. Zika Virus Infection experimentally induced in a Human Volunteer. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1956;50(5). Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19581000235>
4. Marchette NJ, Garcia R, Rudnick A. Isolation of Zika Virus from *Aedes Aegypti* Mosquitoes in Malaysia. *Am J Trop Med Hyg.* 1969;18(3):411–5. Disponível em: <https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/18/3/article-p411.xml>
5. Olson JG, Ksiazek TG, Suhandiman null, Triwibowo null. Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1981;75(3):389–93.
6. Haddow AD, Schuh AJ, Yasuda CY, Kasper MR, Heang V, Huy R, et al. Genetic Characterization of Zika Virus Strains: Geographic Expansion of the Asian Lineage. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(2):e1477. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001477>
7. Faye O, Freire CCM, Iamarino A, Faye O, de Oliveira JVC, Diallo M, et al. Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. *Bird B*, organizador. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(1):e2636. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0002636>
8. Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med.* 2009;360(24):2536–43. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0805715>
9. Cao-Lormeau VM, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry AL, Mallet HP, et al. Zika Virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(6):1085–6. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4036769/>
10. Tognarelli J, Ulloa S, Villagra E, Lagos J, Aguayo C, Fasce R, et al. A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. *Arch Virol.* 2016;161(3):665–8. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00705-015-2695-5>
11. European Centre for Disease Prevention and Control. Rapid risk assessment: Zika virus infection outbreak, French Polynesia. ECDC [Internet]. 14 de fevereiro de 2014 [citado 17 de março de 2022]; Disponível em: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/media/en/publications/Publications/Zika-virus-French-Polynesia-rapid-risk-assessment.pdf>

12. Roth A, Mercier A, Lepers C, Hoy D, Duituturaga S, Benyon E, et al. Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections – an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012–2014. *Eurosurveillance*. 2014;19(41):20929. Disponible em: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES2014.19.41.20929>
13. Musso D, Nilles EJ, Cao-Lormeau VM. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(10):O595–6. Disponible em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X1465391X>
14. Dupont-Rouzeyrol M, O'Connor O, Calvez E, Daurès M, John M, Grangeon JP, et al. Co-infection with Zika and Dengue Viruses in 2 Patients, New Caledonia, 2014. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(2):381–2. Disponible em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4313662/>
15. Pyke AT, Daly MT, Cameron JN, Moore PR, Taylor CT, Hewitson GR, et al. Imported Zika Virus Infection from the Cook Islands into Australia, 2014. *PLoS Curr*. 2014;6:ecurrents.outbreaks.4635a54dbffba2156fb2fd76dc49f65e. Disponible em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4055592/>
16. Zammarchi L, Stella G, Mantella A, Bartolozzi D, Tappe D, Günther S, et al. Zika virus infections imported to Italy: Clinical, immunological and virological findings, and public health implications. *J Clin Virol*. 2015;63:32–5. Disponible em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386653214004673>
17. Kutsuna S, Kato Y, Takasaki T, Moi ML, Kotaki A, Uemura H, et al. Two cases of Zika fever imported from French Polynesia to Japan, December 2013 to January 2014. *Eurosurveillance*. 2014;19(4):20683. Disponible em: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES2014.19.4.20683>
18. Wæhre T, Maagard A, Tappe D, Cadar D, Schmidt-Chanasit J. Zika Virus Infection after Travel to Tahiti, December 2013. *Emerg Infect Dis*. 2014;20(8):1412–4. Disponible em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4111184/>
19. Besnard M, Lastère S, Teissier A, Cao-Lormeau VM, Musso D. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Eurosurveillance*. 2014;19(13):20751. Disponible em: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES2014.19.13.20751>
20. Oehler E, Watrin L, Larre P, Leparç-Goffart I, Lastère S, Valour F, et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome – case report, French Polynesia, December 2013. *Eurosurveillance*. 2014;19(9):20720. Disponible em: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES2014.19.9.20720>
21. Organización Panamericana de la Salud. Zika - Actualización Epidemiológica Regional de la OPS (Américas) 25 de agosto de 2017 [Internet]. Pan American Health Organization / World Health Organization. 2016 [citado 18 de março de 2022]. Disponible em:

- https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11599:regional-zika-epidemiological-update-americas&Itemid=41691&lang=es
22. World Health Organization. Zika epidemiology update - February 2022 [Internet]. [citado 18 de março de 2022]. Disponível em: <https://www.who.int/publications/m/item/zika-epidemiology-update---february-2022>
 23. Pan American Health Organization. Cases of Zika Disease by Country or Territory [Internet]. Pan American Health Organization / World Health Organization. 2019 [citado 24 de abril de 2022]. Disponível em: <https://www3.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/zika/524-zika-weekly-en.html>
 24. World Health Organization. Zika Virus Disease – India [Internet]. Disease Outbreak News. [citado 24 de abril de 2022]. Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/zika-virus-disease-india>
 25. Giron S, Franke F, Decoppet A, Cadiou B, Travaglini T, Thirion L, et al. Vector-borne transmission of Zika virus in Europe, southern France, August 2019. *Eurosurveillance*. 2019;24(45):1900655. Disponível em: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.45.1900655>
 26. Chepkorir E, Tchouassi DP, Konongoi SL, Lutomiah J, Tigoi C, Irura Z, et al. Serological evidence of Flavivirus circulation in human populations in Northern Kenya: an assessment of disease risk 2016–2017. *Virology*. 2019;16(1):65. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1176-y>
 27. Wikan N, Smith DR. Zika virus from a Southeast Asian perspective. *Asian Pac J Trop Med*. 2017;10(1):1–5. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1995764516307350>
 28. Calvez E, Vetsaphong P, Somlor S, Xaybounsou T, Viengphouthong S, Dupont-Rouzeyrol M, et al. First probable case of congenital Zika syndrome in Lao People’s Democratic Republic. *Int J Infect Dis*. 2021;105:595–7. Disponível em: [https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712\(21\)00236-8/fulltext](https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712(21)00236-8/fulltext)
 29. Centers for Disease Control and Prevention. Zika Travel Information | Travelers’ Health | CDC [Internet]. [citado 19 de março de 2022]. Disponível em: <https://wwwnc.cdc.gov/travel/page/zika-travel-information>
 30. Pan American Health Organization (PAHO). Timeline of Emergence of Zika virus in the Americas [Internet]. Pan American Health Organization / World Health Organization. 2016 [citado 20 de março de 2022]. Disponível em: https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11959:timeline-of-emergence-of-zika-virus-in-the-americas&Itemid=41711&lang=en
 31. Ministério da Saúde. Vírus Zika no Brasil: a resposta do SUS. 2017. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/publicacoes-svs/zika/af_zika_28mar17_isbn_web.pdf/view

32. G1/BA. Identificado vírus causador de doença misteriosa em Salvador e RMS [Internet]. Bahia. 2015 [citado 23 de abril de 2022]. Disponível em: <http://g1.globo.com/bahia/noticia/2015/04/identificado-virus-causador-de-doenca-misteriosa-em-salvador-e-rms.html>
33. Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(10):1885–6. Disponível em: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/21/10/15-0847_article.htm
34. Zanluca C, Melo VCA de, Mosimann ALP, Santos GIV dos, Santos CND dos, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015;110:569–72. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/mioc/a/XpyZfLm7yZbBckwwqWjWxnz/?lang=en>
35. Lowe R, Barcellos C, Brasil P, Cruz OG, Honório NA, Kuper H, et al. The Zika Virus Epidemic in Brazil: From Discovery to Future Implications. *Int J Environ Res Public Health.* 2018;15(1):96. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5800195/>
36. Faria NR, Azevedo R do S da S, Kraemer MUG, Souza R, Cunha MS, Hill SC, et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science.* 2016;352(6283):345–9. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4918795/>
37. Musso D. Zika Virus Transmission from French Polynesia to Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(10):1887. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4593458/>
38. Malta JMAS, Vargas A, Leite PL e, Percio J, Coelho GE, Ferraro AHA, et al. Guillain-Barré syndrome and other neurological manifestations possibly related to Zika virus infection in municipalities from Bahia, Brazil, 2015. *Epidemiol E Serviços Saúde.* 2017;26:09–18. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/ress/a/nbJBMK8wFWvZs3jcf3HrPCR/?lang=en>
39. Pan American Health Organization (PAHO). Reported increase of congenital microcephaly and other central nervous system symptoms [Internet]. Pan American Health Organization / World Health Organization. 2016 [citado 31 de maio de 2022]. Disponível em: https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=zika-virus-infection-7880&alias=33188-10-february-2016-reported-increase-congenital-microcephaly-other-central-nervous-system-symptoms-epidemiological-update-188&Itemid=270&lang=en
40. World Health Organization. WHO statement on the first meeting of the International Health Regulations (2005) (IHR 2005) Emergency Committee on Zika virus and observed increase in neurological disorders and neonatal malformations [Internet]. World Health Organization. 2016 [citado 5 de junho de 2022]. Disponível em: [https://www.who.int/news/item/01-02-2016-who-statement-on-the-first-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-\(ihr-2005\)-emergency-committee-on-zika-virus-and-observed-increase-in-neurological-disorders-and-neonatal-malformations](https://www.who.int/news/item/01-02-2016-who-statement-on-the-first-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-(ihr-2005)-emergency-committee-on-zika-virus-and-observed-increase-in-neurological-disorders-and-neonatal-malformations)

41. Ministério da Saúde. Ministério da Saúde declara fim da Emergência Nacional para Zika e microcefalia [Internet]. Ministério da Saúde. 2017 [citado 6 de junho de 2022]. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2017/maio/ministerio-da-saude-declara-fim-da-emergencia-nacional-para-zika-e-microcefalia>
42. Secretaria de Vigilância em Saúde. Informe Epidemiológico sobre o monitoramento da situação de enfrentamento a Dengue, Zika e Chikungunya no Brasil [Internet]. Ministério da Saúde. 2016 [citado 5 de junho de 2022]. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/aceso-a-informacao/gestao-dos-sus/articulacao-interfederativa/cit/pautas-de-reunioes-e-resumos-cit/2016/outubro/2-b-situacao-dengue-chkv-zika_cit_outubro-2016_2.pdf/view
43. Pan American Health Organization. PAHO/WHO Data - Reporte de Casos Acumulados | OPS/OMS [Internet]. Pan American Health Organization / World Health Organization. 2019 [citado 5 de junho de 2022]. Disponível em: https://www3.paho.org/data/index.php/es/?option=com_content&view=article&id=528:zika-weekly-es&Itemid=353
44. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico Vol. 51 N° 51 [Internet]. Ministério da Saúde. 2020 [citado 6 de junho de 2022]. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/edicoes/2020/boletim_epidemiologico_svs_51.pdf/view
45. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico Vol 52 - N° 48 [Internet]. Ministério da Saúde. 2021 [citado 6 de junho de 2022]. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/edicoes/2021/boletim-epidemiologico-vol-52-no-48.pdf/view>
46. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico Vol.53 N°19 [Internet]. Ministério da Saúde. 2022 [citado 5 de junho de 2022]. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/edicoes/2022/boletim-epidemiologico-vol-53-no19/view>
47. International Committee on Taxonomy of Viruses. Taxonomy [Internet]. International Committee on Taxonomy of Viruses ICTV. [citado 6 de junho de 2022]. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>
48. Hasan SS, Sevvana M, Kuhn RJ, Rossmann MG. Structural biology of Zika virus and other flaviviruses. *Nat Struct Mol Biol.* 2018;25(1):13–20. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41594-017-0010-8>
49. Gould EA, Solomon T. Pathogenic flaviviruses. *The Lancet.* 2008;371(9611):500–9. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(08\)60238-X/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(08)60238-X/fulltext)
50. Lindenbach BD, Rice CM. Molecular biology of flaviviruses. Em: *Advances in Virus Research.* Elsevier; 2003. p. 23–61. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065352703590029>

51. Saiz JC, Vázquez-Calvo Á, Blázquez AB, Merino-Ramos T, Escribano-Romero E, Martín-Acebes MA. Zika Virus: the Latest Newcomer. *Front Microbiol.* 2016;7:496. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4835484/>
52. Flavivirus [Internet]. ViralZone. [citado 6 de junho de 2022]. Disponível em: https://viralzone.expasy.org/24?outline=all_by_species
53. Murray CL, Jones CT, Rice CM. Architects of Assembly: roles of Flaviviridae nonstructural proteins in virion morphogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(9):699–708. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2764292/>
54. Lin HH, Yip BS, Huang LM, Wu SC. Zika virus structural biology and progress in vaccine development. *Biotechnol Adv.* 2018;36(1):47–53. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975017301155>
55. Cox BD, Stanton RA, Schinazi RF. Predicting Zika virus structural biology: Challenges and opportunities for intervention. *Antivir Chem Chemother.* 2015;24(3–4):118–26. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/2040206616653873>
56. Yun SI, Lee YM. Zika virus: An emerging flavivirus. *J Microbiol.* 2017;55(3):204–19. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12275-017-7063-6>
57. Sirohi D, Chen Z, Sun L, Klose T, Pierson TC, Rossmann MG, et al. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science.* 2016;352(6284):467–70. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aaf5316>
58. Kostyuchenko VA, Lim EXY, Zhang S, Fibriansah G, Ng TS, Ooi JSG, et al. Structure of the thermally stable Zika virus. *Nature.* 2016;533(7603):425–8. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nature17994>
59. Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. *EMBO J.* 2004;23(4):728–38. Disponível em: <https://www.embopress.org/doi/full/10.1038/sj.emboj.7600064>
60. Dai L, Song J, Lu X, Deng YQ, Musyoki AM, Cheng H, et al. Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. *Cell Host Microbe.* 2016;19(5):696–704. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931312816301494>
61. Muller DA, Young PR. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Res.* 2013;98(2):192–208.
62. Sironi M, Forni D, Clerici M, Cagliani R. Nonstructural Proteins Are Preferential Positive Selection Targets in Zika Virus and Related Flaviviruses. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(9):e0004978. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004978>
63. Carpio KL, Barrett ADT. Flavivirus NS1 and Its Potential in Vaccine Development. *Vaccines.* 2021;9(6):622. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8229460/>

64. Xu X, Song H, Qi J, Liu Y, Wang H, Su C, et al. Contribution of intertwined loop to membrane association revealed by Zika virus full-length NS1 structure. *EMBO J* 2016;35(20):2170–8. Disponible em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5069551/>
65. Brown WC, Akey DL, Konwerski J, Tarrasch JT, Skiniotis G, Kuhn RJ, et al. Extended Surface for Membrane Association in Zika Virus NS1 Structure. *Nat Struct Mol Biol.* 2016;23(9):865–7. Disponible em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5951387/>
66. Hilgenfeld R. Zika virus NS1, a pathogenicity factor with many faces. *EMBO J* 2016;35(24):2631–3. Disponible em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5167348/>
67. Shi Y, Dai L, Song H, Gao GF. Structures of Zika Virus E & NS1: Relations with Virus Infection and Host Immune Responses. Em: Hilgenfeld R, Vasudevan SG, organizadores. *Dengue and Zika: Control and Antiviral Treatment Strategies*. Singapore: Springer; 2018. p. 77–87. (Advances in Experimental Medicine and Biology). Disponible em: https://doi.org/10.1007/978-981-10-8727-1_6
68. Song H, Qi J, Haywood J, Shi Y, Gao GF. Zika virus NS1 structure reveals diversity of electrostatic surfaces among flaviviruses. *Nat Struct Mol Biol.* 2016;23(5):456–8. Disponible em: <https://www.nature.com/articles/nsmb.3213>
69. White MK, Wollebo HS, David Beckham J, Tyler KL, Khalili K. Zika virus: An emergent neuropathological agent. *Ann Neurol.* 2016;80(4):479–89. Disponible em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ana.24748>
70. Acosta-Ampudia Y, Monsalve DM, Castillo-Medina LF, Rodríguez Y, Pacheco Y, Halstead S, et al. Autoimmune Neurological Conditions Associated With Zika Virus Infection. *Front Mol Neurosci.* 2018;11. Disponible em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnmol.2018.00116>
71. Song BH, Yun SI, Woolley M, Lee YM. Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. *J Neuroimmunol.* 2017;308:50–64. Disponible em: [https://www.jni-journal.com/article/S0165-5728\(16\)30483-0/fulltext](https://www.jni-journal.com/article/S0165-5728(16)30483-0/fulltext)
72. Pielnaa P, Al-Saadawe M, Saro A, Dama MF, Zhou M, Huang Y, et al. Zika virus-spread, epidemiology, genome, transmission cycle, clinical manifestation, associated challenges, vaccine and antiviral drug development. *Virology.* 2020;543:34–42. Disponible em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682220300210>
73. Musso D, Roche C, Nhan TX, Robin E, Teissier A, Cao-Lormeau VM. Detection of Zika virus in saliva. *J Clin Virol.* 2015;68:53–5. Disponible em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138665321500133X>
74. Musso D, Nhan T, Robin E, Roche C, Bierlaire D, Zisou K, et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Eurosurveillance.* 2014;19(14):20761. Disponible em:

<https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES2014.19.14.20761>

75. Musso D, Roche C, Robin E, Nhan T, Teissier A, Cao-Lormeau VM. Potential Sexual Transmission of Zika Virus - Volume 21, Number 2—February 2015 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. [citado 2 de julho de 2022]; Disponível em: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/21/2/14-1363_article
76. Gourinat AC, O'Connor O, Calvez E, Goarant C, Dupont-Rouzeyrol M. Detection of Zika Virus in Urine - Volume 21, Number 1—January 2015 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. [citado 2 de julho de 2022]; Disponível em: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/21/1/14-0894_article
77. Barzon L, Pacenti M, Berto A, Sinigaglia A, Franchin E, Lavezzo E, et al. Isolation of infectious Zika virus from saliva and prolonged viral RNA shedding in a traveller returning from the Dominican Republic to Italy, January 2016. *Eurosurveillance*. 2016;21(10):30159. Disponível em: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.10.30159>
78. Rozé B, Najjioullah F, Signate A, Apetse K, Brouste Y, Gourgoudou S, et al. Zika virus detection in cerebrospinal fluid from two patients with encephalopathy, Martinique, February 2016. *Eurosurveillance*. 2016;21(16):30205. Disponível em: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.16.30205>
79. Dupont-Rouzeyrol M, Biron A, O'Connor O, Huguon E, Descloux E. Infectious Zika viral particles in breastmilk. *The Lancet*. 2016;387(10023):1051. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(16\)00624-3/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(16)00624-3/fulltext)
80. Driggers RW, Ho CY, Korhonen EM, Kuivanen S, Jääskeläinen AJ, Smura T, et al. Zika Virus Infection with Prolonged Maternal Viremia and Fetal Brain Abnormalities. *N Engl J Med*. 2016;374(22):2142–51. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1601824>
81. Noronha L de, Zanluca C, Azevedo MLV, Luz KG, Santos CND dos. Zika virus damages the human placental barrier and presents marked fetal neurotropism. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016;111:287–93. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/mioc/a/JX4VMxymCLk89BMLJMjxFcK/?lang=en>
82. Bôtto-Menezes CHA, Neto AM, Calvet GA, Kara EO, Lacerda MVG, Castilho M da C, et al. Zika Virus in Rectal Swab Samples. *Emerg Infect Dis*. 2019;25(5):951–4. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6478207/>
83. Menezes-Neto A, Castilho M da C, Calvet GA, Kara EO, Bôtto-Menezes CHA, Lacerda MVG, et al. Zika virus RNA excretion in sweat with concomitant detection in other body fluid specimens. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2021;115:e200339. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7836980/>
84. Magnus MM, Espósito DLA, Costa VA da, Melo PS de, Costa-Lima C, Fonseca BAL da, et al. Risk of Zika virus transmission by blood donations in Brazil. *Hematol*

- Transfus Cell Ther. 2018;40(3):250–4. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2531137918300671>
85. Kuehnert MJ. Screening of Blood Donations for Zika Virus Infection — Puerto Rico, April 3–June 11, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* [Internet]. 2016 [citado 2 de julho de 2022];65. Disponível em: <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/wr/mm6524e2.htm>
 86. Galel SA, Williamson PC, Busch MP, Stanek D, Bakkour S, Stone M, et al. First Zika-positive donations in the continental United States. *Transfusion (Paris)* [Internet]. 2017 [citado 2 de julho de 2022];57(3pt2):762–9. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/trf.14029>
 87. Barjas-Castro ML, Angerami RN, Cunha MS, Suzuki A, Nogueira JS, Rocco IM, et al. Probable transfusion-transmitted Zika virus in Brazil. *Transfusion*. 2016;56(7):1684–8. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/trf.13681>
 88. Musso D, Gould E, Lanteri MC. Documentation of transfusion-transmitted arbovirus infections in endemic areas. *Transfusion*. 2016;56(12):3143–4. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/trf.13861>
 89. Foy BD, Kobylinski KC, Foy JLC, Blitvich BJ, Rosa AT da, Haddow AD, et al. Probable Non-Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(5):880–2. Disponível em: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/17/5/10-1939_article
 90. Counotte MJ, Kim CR, Wang J, Bernstein K, Deal CD, Broutet NJN, et al. Sexual transmission of Zika virus and other flaviviruses: A living systematic review. *PLOS Med*. 2018;15(7):e1002611. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.1002611>
 91. Davidson A. Suspected Female-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus — New York City, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* [Internet]. 2016 [citado 2 de julho de 2022];65. Disponível em: <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/wr/mm6528e2.htm>
 92. Deckard DT. Male-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus — Texas, January 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* [Internet]. 2016 [citado 2 de julho de 2022];65. Disponível em: <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/wr/mm6514a3.htm>
 93. Baud D, Gubler DJ, Schaub B, Lanteri MC, Musso D. An update on Zika virus infection. *The Lancet*. 2017;390(10107):2099–109. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(17\)31450-2/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(17)31450-2/fulltext)
 94. Oliveira Melo AS, Malingier G, Ximenes R, Szejnfeld PO, Alves Sampaio S, Bispo de Filippis AM. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2016;47(1):6–7. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/uog.15831>

95. Mlakar J, Korva M, Tul N, Popović M, Poljšak-Prijatelj M, Mraz J, et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. *N Engl J Med*. 2016;374(10):951–8. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1600651>
96. van der Eijk AA, van Genderen PJ, Verdijk RM, Reusken CB, Mögling R, van Kampen JJA, et al. Miscarriage Associated with Zika Virus Infection. *N Engl J Med*. 2016;375(10):1002–4. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMc1605898>
97. Krauer F, Riesen M, Reveiz L, Oladapo OT, Martínez-Vega R, Porgo TV, et al. Zika Virus Infection as a Cause of Congenital Brain Abnormalities and Guillain–Barré Syndrome: Systematic Review. *PLOS Med*. 2017;14(1):e1002203. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.1002203>
98. Haby MM, Pinart M, Elias V, Reveiz L. Prevalence of asymptomatic Zika virus infection: a systematic review. *Bull World Health Organ*. 2018;96(6):402–413D. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5996208/>
99. Martins MM, Medronho RDA, Cunha AJLAD. Zika virus in Brazil and worldwide: a narrative review. *Paediatr Int Child Health*. 2021;41(1):28–35. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/20469047.2020.1776044>
100. Cao-Lormeau VM, Blake A, Mons S, Lastère S, Roche C, Vanhomwegen J, et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *The Lancet*. 2016;387(10027):1531–9. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(16\)00562-6/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(16)00562-6/fulltext)
101. Mittal R, Nguyen D, Debs LH, Patel AP, Liu G, Jhaveri VM, et al. Zika Virus: An Emerging Global Health Threat. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2017.00486>
102. Willison HJ, Jacobs BC, Doorn PA van. Guillain-Barré syndrome. *The Lancet*. 2016;388(10045):717–27. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(16\)00339-1/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(16)00339-1/fulltext)
103. Nóbrega MEB da, Araújo EL de L, Wada MY, Leite PL e, Dimech GS, Pércio J. Outbreak of Guillain-Barré syndrome possibly related to prior Zika virus infection, Metropolitan Region of Recife, Pernambuco, Brazil, 2015. *Epidemiol E Serviços Saúde*. 2018;27. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/ress/a/KvbfHJVgKj9DyfFrp4nymLN/?lang=en>
104. Dos Santos T, Rodriguez A, Almiron M, Sanhueza A, Ramon P, de Oliveira WK, et al. Zika Virus and the Guillain-Barré Syndrome - Case Series from Seven Countries. *N Engl J Med*. 2016;375(16):1598–601.
105. Mier-y-Teran-Romero L, Delorey MJ, Sejvar JJ, Johansson MA. Guillain–Barré syndrome risk among individuals infected with Zika virus: a multi-country assessment. *BMC Med*. 2018;16(1):67. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12916-018-1052-4>

106. Musso D, Ko AI, Baud D. Zika Virus Infection — After the Pandemic. *N Engl J Med*. 2019;381(15):1444–57. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJMra1808246>
107. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico Vol.53 N°06 — Português (Brasil) [Internet]. Ministério da Saúde. [citado 29 de junho de 2022]. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/edicoes/2022/boletim-epidemiologico-vol-53-no06/view>
108. Moore CA, Staples JE, Dobyns WB, Pessoa A, Ventura CV, da Fonseca EB, et al. Congenital Zika Syndrome: Characterizing the Pattern of Anomalies for Pediatric Healthcare Providers. *JAMA Pediatr*. 2017;171(3):288–95. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5561417/>
109. Grupo de Pesquisa de Epidemia de Microcefalia. Microcephaly in Infants, Pernambuco State, Brazil, 2015. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(6):1090–3. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4880105/>
110. Ministério da Saúde. Ministério da Saúde divulga novos dados de microcefalia [Internet]. Ministério da Saúde. [citado 28 de junho de 2022]. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2015/dezembro/ministerio-da-saude-divulga-novos-dados-de-microcefalia>
111. Ministério da Saúde. Ministério da Saúde confirma relação entre vírus Zika e microcefalia [Internet]. Ministério da Saúde. [citado 28 de junho de 2022]. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2015/dezembro/ministerio-da-saude-confirma-relacao-entre-virus-zika-e-microcefalia>
112. Adachi K, Nielsen-Saines K. Zika clinical updates: implications for pediatrics. *Curr Opin Pediatr*. 2018;30(1):105–16. Disponível em: https://journals.lww.com/co-pediatrics/Fulltext/2018/02000/Zika_clinical_updates_implications_for_pediatrics.17.aspx
113. Masmajan S, Baud D, Musso D, Panchaud A. Zika virus, vaccines, and antiviral strategies. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2018;16(6):471–83. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14787210.2018.1483239>
114. Poland GA, Ovsyannikova IG, Kennedy RB. Zika Vaccine Development: Current Status. *Mayo Clin Proc*. 2019;94(12):2572–86. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7094556/>
115. Wilder-Smith A, Vannice K, Durbin A, Hombach J, Thomas SJ, Thevarjan I, et al. Zika vaccines and therapeutics: landscape analysis and challenges ahead. *BMC Med*. 2018;16(1):84. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12916-018-1067-x>
116. Gaudinski MR, Houser KV, Morabito KM, Hu Z, Yamshchikov G, Rothwell RS, et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of two Zika virus DNA vaccine candidates in healthy adults: randomised, open-label, phase 1 clinical trials. *Lancet Lond Engl*. 2018;391(10120):552–62. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6379903/>

117. Ferraris P, Yssel H, Missé D. Zika virus infection: an update. *Microbes Infect.* 2019;21(8):353–60. Disponible em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457919300528>
118. Organización Panamericana de la Salud. Directrices para el diagnóstico clínico y el tratamiento del dengue, el chikunguña y el zika. 2022.
119. Sharp TM; Fischer M; Muñoz-Jordán JL; Paz-Bailey G; Staples JE; Gregory CJ; Waterman SH. Dengue and Zika Virus Diagnostic Testing for Patients with a Clinically Compatible Illness and Risk for Infection with Both Viruses. *MMWR Recomm Rep* [Internet]. 2019 [citado 4 de agosto de 2022];68. Disponible em: <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/68/rr/rr6801a1.htm>
120. Pabbaraju K, Wong S, Gill K, Fonseca K, Tipples GA, Tellier R. Simultaneous detection of Zika, Chikungunya and Dengue viruses by a multiplex real-time RT-PCR assay. *J Clin Virol.* 2016;83:66–71. Disponible em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386653216305194>
121. Paz-Bailey G, Rosenberg ES, Doyle K, Munoz-Jordan J, Santiago GA, Klein L, et al. Persistence of Zika Virus in Body Fluids — Preliminary Report. *N Engl J Med.* 2018. Disponible em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5831142/>
122. Rossini G, Gaibani P, Vocale C, Cagarelli R, Landini MP. Comparison of Zika virus (ZIKV) RNA detection in plasma, whole blood and urine – Case series of travel-associated ZIKV infection imported to Italy, 2016. *J Infect.* 2017;75(3):242–5. Disponible em: [https://www.journalofinfection.com/article/S0163-4453\(17\)30209-8/fulltext](https://www.journalofinfection.com/article/S0163-4453(17)30209-8/fulltext)
123. Gourinat AC, O'Connor O, Calvez E, Goarant C, Dupont-Rouzeyrol M. Detection of Zika Virus in Urine. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(1):84–6. Disponible em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4285245/>
124. Nicastrì E, Castillettì C, Liuzzi G, Iannetta M, Capobianchi MR, Ippolito G. Persistent detection of Zika virus RNA in semen for six months after symptom onset in a traveller returning from Haiti to Italy, February 2016. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* 11 de agosto de 2016;21(32).
125. Barzon L, Pacenti M, Franchin E, Lavezzo E, Trevisan M, Sgarabotto D, et al. Infection dynamics in a traveller with persistent shedding of Zika virus RNA in semen for six months after returning from Haiti to Italy, January 2016. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* 11 de agosto de 2016;21(32).
126. Medina FA, Torres G, Acevedo J, Fonseca S, Casiano L, De León-Rodríguez CM, et al. Duration of the Presence of Infectious Zika Virus in Semen and Serum. *J Infect Dis.* 2019;219(1):31–40.
127. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007 - Volume 14, Number 8—August 2008 - *Emerging Infectious Diseases journal - CDC.* Disponible em: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/14/8/08-0287_article

128. Priyamvada L, Quicke KM, Hudson WH, Onlamoon N, Sewatanon J, Edupuganti S, et al. Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. *Proc Natl Acad Sci.* 2016;113(28):7852–7. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1607931113>
129. Morales I, Rosenberger KD, Magalhaes T, Morais CNL, Braga C, Marques ETA, et al. Diagnostic performance of anti-Zika virus IgM, IgAM and IgG ELISAs during co-circulation of Zika, dengue, and chikungunya viruses in Brazil and Venezuela. *PLoS Negl Trop Dis.* 2021;15(4):e0009336. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8084345/>
130. Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature.* 1990;346(6287):818–22. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/346818a0>
131. Wang T, Chen C, Larcher LM, Barrero RA, Veedu RN. Three decades of nucleic acid aptamer technologies: Lessons learned, progress and opportunities on aptamer development. *Biotechnol Adv.* 2019;37(1):28–50. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975018301770>
132. Pan Q, Luo F, Liu M, Zhang XL. Oligonucleotide aptamers: promising and powerful diagnostic and therapeutic tools for infectious diseases. *J Infect.* 2018;77(2):83–98. Disponível em: [https://www.journalofinfection.com/article/S0163-4453\(18\)30110-5/fulltext](https://www.journalofinfection.com/article/S0163-4453(18)30110-5/fulltext)
133. Hermann T, Patel DJ. Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. *Science.* 4 de fevereiro de 2000;287(5454):820–5.
134. Sun H, Zu Y. A Highlight of Recent Advances in Aptamer Technology and Its Application. *Molecules.* 2015;20(7):11959–80. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6331864/>
135. Sun H, Zhu X, Lu PY, Rosato RR, Tan W, Zu Y. Oligonucleotide Aptamers: New Tools for Targeted Cancer Therapy. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2014;3(8):e182. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4221593/>
136. Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science.* 1990;249(4968):505–10. Disponível em: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.2200121>
137. Argondizzo APC, Silva D, Missailidis S. Application of Aptamer-Based Assays to the Diagnosis of Arboviruses Important for Public Health in Brazil. *Int J Mol Sci.* 2021;22(1):159. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/1/159>
138. González VM, Martín ME, Fernández G, García-Sacristán A. Use of Aptamers as Diagnostics Tools and Antiviral Agents for Human Viruses. *Pharmaceuticals.* 2016;9(4):78. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1424-8247/9/4/78>
139. Mairal T, Cengiz Özalp V, Lozano Sánchez P, Mir M, Katakis I, O'Sullivan CK. Aptamers: molecular tools for analytical applications. *Anal Bioanal Chem.* 2008;390(4):989–1007. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1346-4>

140. Stoltenburg R, Reinemann C, Strehlitz B. SELEX—A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomol Eng.* 2007;24(4):381–403. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389034407000664>
141. Ferreira CSM, Matthews CS, Missailidis S. DNA Aptamers That Bind to MUC1 Tumour Marker: Design and Characterization of MUC1-Binding Single-Stranded DNA Aptamers. *Tumor Biol.* 2006;27(6):289–301. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/FullText/96085>
142. Argondizzo APC, Silva D, Missailidis S. Application of Aptamer-Based Assays to the Diagnosis of Arboviruses Important for Public Health in Brazil. *Int J Mol Sci.* 2020;22(1):159. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7796157/>
143. Breitsprecher D, Schlinck N, Witte D, Duhr S, Baaske P, Schubert T. Aptamer Binding Studies Using MicroScale Thermophoresis. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2016;1380:99–111.
144. Silva D, Cortez CM, Silva CMC, Missailidis S. A fluorescent spectroscopy and modelling analysis of anti-heparanase aptamers–serum protein interactions. *J Photochem Photobiol B.* 2013;127:68–77. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S101113441300136X>
145. Kumar PKR. Monitoring Intact Viruses Using Aptamers. *Biosensors.* 2016;6(3):40. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5039659/>
146. Cheng AC, Calabro V, Frankel AD. Design of RNA-binding proteins and ligands. *Curr Opin Struct Biol.* 2001;11(4):478–84. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959440X00002360>
147. Lakhin AV, B ЛА, Tarantul VZ, 3 TB, Gening LV, B ГЛ. Aptamers: Problems, Solutions and Prospects. *Acta Naturae.* 2013;5(4):34–43. Disponível em: <https://doi.org/10.32607/20758251-2013-5-4-34-43>
148. Song KM, Lee S, Ban C. Aptamers and Their Biological Applications. *Sensors.* 2012;12(1):612–31. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1424-8220/12/1/612>
149. Proske D, Blank M, Buhmann R, Resch A. Aptamers—basic research, drug development, and clinical applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005;69(4):367–74. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0193-5>
150. Yadavalli T, Volety I, Shukla D. Aptamers in Virology—A Consolidated Review of the Most Recent Advancements in Diagnosis and Therapy. *Pharmaceutics.* 2021;13(10):1646. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8540715/>
151. Achiko AG. Saliva-based COVID-19 DNA Aptamer Test: Formative Usability and Internal Validation Study [Internet]. *clinicaltrials.gov*; 2021 jul [citado 12 de setembro de 2022]. Report No.: NCT04974203. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04974203>

152. Musso D, Cao-Lormeau VM, Gubler DJ. Zika virus: following the path of dengue and chikungunya? *The Lancet*. 2015;386(9990):243–4. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673615612739>
153. Cao-Lormeau VM, Musso D. Emerging arboviruses in the Pacific. *The Lancet*. 2014;384(9954):1571–2. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673614619772>
154. Rodriguez-Morales AJ, Villamil-Gómez WE, Franco-Paredes C. The arboviral burden of disease caused by co-circulation and co-infection of dengue, chikungunya and Zika in the Americas. *Travel Med Infect Dis*. 2016;14(3):177–9. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1477893916300370>
155. Carrillo-Hernández MY, Ruiz-Saenz J, Villamizar LJ, Gómez-Rangel SY, Martínez-Gutierrez M. Co-circulation and simultaneous co-infection of dengue, chikungunya, and zika viruses in patients with febrile syndrome at the Colombian-Venezuelan border. *BMC Infect Dis*. 2018;18(1):61. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12879-018-2976-1>
156. Chia PY, Yew HS, Ho H, Chow A, Sadarangani SP, Chan M, et al. Clinical features of patients with Zika and dengue virus co-infection in Singapore. *J Infect*. 2017;74(6):611–5. Disponível em: [https://www.journalofinfection.com/article/S0163-4453\(17\)30084-1/fulltext](https://www.journalofinfection.com/article/S0163-4453(17)30084-1/fulltext)
157. Sow A, Loucoubar C, Diallo D, Faye O, Ndiaye Y, Senghor CS, et al. Concurrent malaria and arbovirus infections in Kedougou, southeastern Senegal. *Malar J*. 2016;15:47. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4730666/>
158. Cabral-Castro MJ, Cavalcanti MG, Peralta RHS, Peralta JM. Molecular and serological techniques to detect co-circulation of DENV, ZIKV and CHIKV in suspected dengue-like syndrome patients. *J Clin Virol*. 2016;82:108–11. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386653216301871>
159. Simmons SC, McKenzie EA, Harris LK, Aplin JD, Brenchley PE, Velasco-Garcia MN, et al. Development of Novel Single-Stranded Nucleic Acid Aptamers against the Pro-Angiogenic and Metastatic Enzyme Heparanase (HPSE1). *PLOS ONE*. 2012;7(6):e37938. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0037938>
160. Ferreira CSM, Matthews CS, Missailidis S. DNA Aptamers That Bind to MUC1 Tumour Marker: Design and Characterization of MUC1-Binding Single-Stranded DNA Aptamers. *Tumor Biol*. 2006;27(6):289–301. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/FullText/96085>
161. Sievers F, Barton GJ, Higgins DG. Multiple Sequence Alignments. Em: Baxevanis AD, Bader GD, Wishart DS, organizadores. *Bioinformatics* [Internet]. Wiley; 2020 [citado 9 de agosto de 2022]. p. 227–50. Disponível em: <https://www.wiley.com/en-gb/Bioinformatics%2C+4th+Edition-p-9781119335580>

162. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(13):3406–15. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkg595>
163. Lorenz R, Bernhart SH, Höner zu Siederdissen C, Tafer H, Flamm C, Stadler PF, et al. ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms Mol Biol.* 2011;6(1):26. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1748-7188-6-26>
164. Antczak M, Popena M, Zok T, Sarzynska J, Ratajczak T, Tomczyk K, et al. New functionality of RNAComposer: An application to shape the axis of miR160 precursor structure. *Acta Biochim Pol.* 2016;63:737–44.
165. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 2004;25(13):1605–12.
166. Yan Y, Zhang D, Zhou P, Li B, Huang SY. HDOCK: a web server for protein-protein and protein-DNA/RNA docking based on a hybrid strategy. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(W1):W365–73.
167. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(1):235–42. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
168. Bank RPD. RCSB PDB - 5GS6: Full-length NS1 structure of Zika virus from 2015 Brazil strain [Internet]. [citado 8 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://www.rcsb.org/structure/5GS6>
169. Bank RPD. RCSB PDB - 5JHM: Crystal structure of Zika virus Envelope protein [Internet]. [citado 8 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://www.rcsb.org/structure/5JHM>
170. Missailidis S, Brady K. Characterization of Antibody-Antigen Interactions by Fluorescence Spectroscopy. Em: Lo BKC, organizador. *Antibody Engineering: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2004. p. 431–41. (Methods in Molecular Biology™). Disponível em: <https://doi.org/10.1385/1-59259-666-5:431>
171. Cortez CM, Silva D, Silva CMC, Missailidis S. Interactions of aptamers with sera albumins. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2012;95:270–5.
172. Lakowicz JR, organizador. *Introduction to Fluorescence*. Em: Principles of Fluorescence Spectroscopy. Boston, MA: Springer US; 2006. p. 1–26. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4_1
173. Jerabek-Willemsen M, Wienken CJ, Braun D, Baaske P, Duhr S. Molecular Interaction Studies Using Microscale Thermophoresis. *Assay Drug Dev Technol.* 2011;9(4):342–53. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3148787/>
174. Johnson CM. Isothermal Titration Titrations Calorimetry. Em: Daviter T, Johnson CM, McLaughlin SH, Williams MA, organizadores. *Protein-Ligand Interactions: Methods and Applications*. New York, NY: Springer US; 2021. p. 135–59.

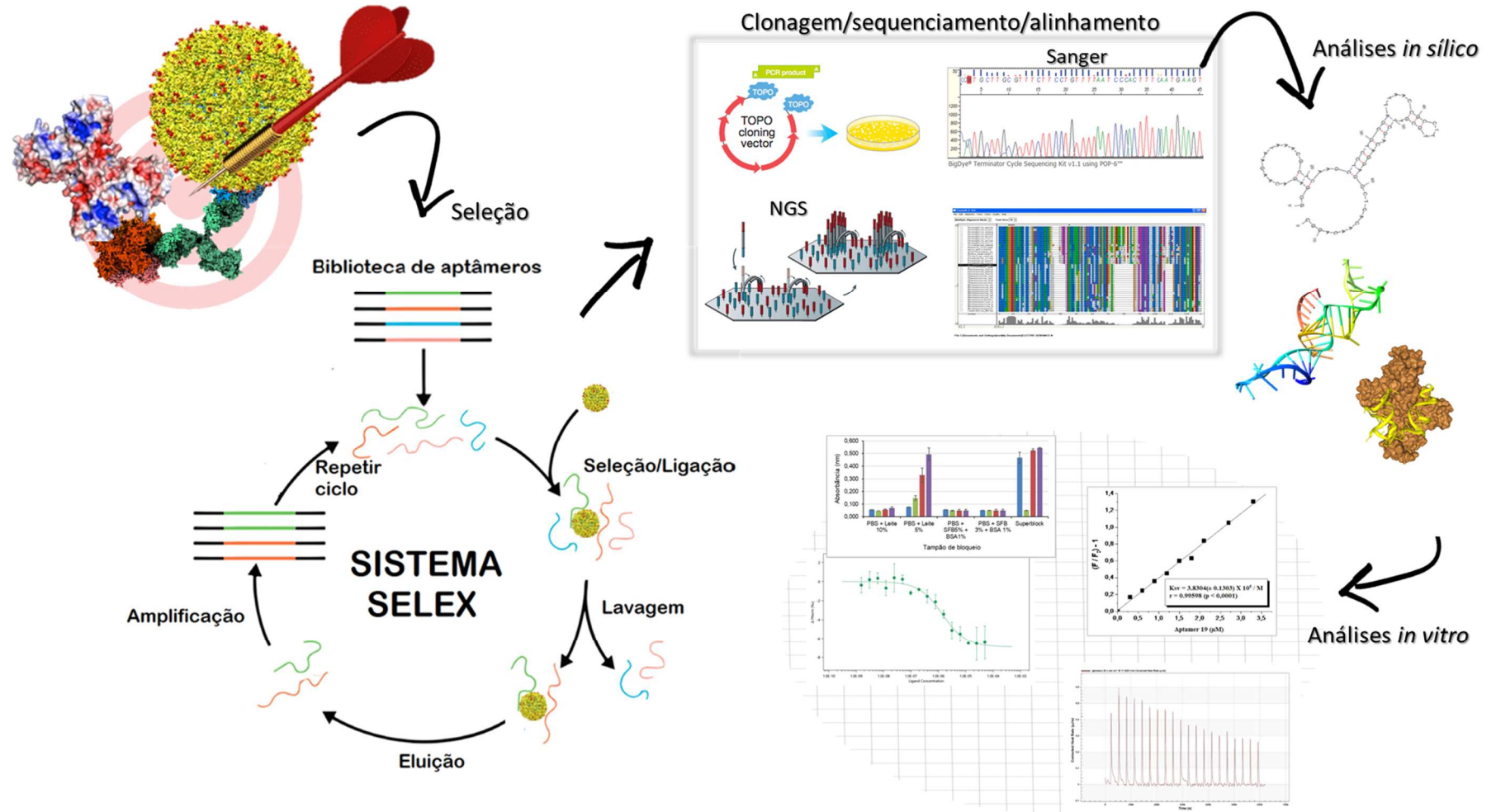
(Métodos em Biologia Molecular). Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1197-5_5

175. Velázquez-Campoy A, Ohtaka H, Nezami A, Muzammil S, Freire E. Isothermal Titration Calorimetry. *Curr Protoc Cell Biol.* 2004;23(1):17.8.1-17.8.24. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/0471143030.cb1708s23>
176. Lee KH, Zeng H. Aptamer-Based ELISA Assay for Highly Specific and Sensitive Detection of Zika NS1 Protein. *Anal Chem.* 2017;89(23):12743–8. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b02862>
177. Basso CR, Crulhas BP, Magro M, Vianello F, Pedrosa VA. A new immunoassay of hybrid nanomater conjugated to aptamers for the detection of dengue virus. *Talanta.* 2019;197:482–90. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003991401930058X>
178. Alejo-Cancho I, Navero-Castillejos J, Peiró-Mestres A, Albarracín R, Barrachina J, Navarro A, et al. Evaluation of a novel microfluidic immuno-magnetic agglutination assay method for detection of dengue virus NS1 antigen. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020;14(2):e0008082. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0008082>
179. Fletcher SJ, Phillips LW, Milligan AS, Rodda SJ. Toward specific detection of Dengue virus serotypes using a novel modular biosensor. *Biosens Bioelectron.* 2010;26(4):1696–700. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566310004215>
180. Bruno JG, Carrillo MP, Richarte AM, Phillips T, Andrews C, Lee JS. Development, screening, and analysis of DNA aptamer libraries potentially useful for diagnosis and passive immunity of arboviruses. *BMC Res Notes.* 2012;5(1):633. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-633>
181. Almeida NBF, Sousa TASL, Santos VCF, Lacerda CMS, Silva TG, Grenfell RFQ, et al. DNA aptamer selection and construction of an aptasensor based on graphene FETs for Zika virus NS1 protein detection. *Beilstein J Nanotechnol.* 2022;13:873–81.
182. Bernhauerová V, Rezelj VV, Vignuzzi M. Modelling Degradation and Replication Kinetics of the Zika Virus In Vitro Infection. *Viruses.* 2020;12(5):547. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7290367/>
183. da Silva SR, Cheng F, Huang IC, Jung JU, Gao SJ. Efficiencies and kinetics of infection in different cell types/lines by African and Asian strains of Zika virus (ZIKV). *J Med Virol.* 2019;91(2):179–89. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6294704/>
184. Chen Z, Hu L, Zhang BT, Lu A, Wang Y, Yu Y, et al. Artificial Intelligence in Aptamer–Target Binding Prediction. *Int J Mol Sci.* 2021;22(7):3605. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8038094/>
185. Heiat M, Najafi A, Ranjbar R, Latifi AM, Rasaee MJ. Computational approach to analyze isolated ssDNA aptamers against angiotensin II. *J Biotechnol.*

- 2016;230:34–9. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165616302772>
186. Hu WP, Kumar JV, Huang CJ, Chen WY. Computational Selection of RNA Aptamer against Angiopoietin-2 and Experimental Evaluation. *BioMed Res Int.* 2015;2015:e658712. Disponível em:
<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/658712/>
187. Oh IH, Park DY, Cha JM, Shin WR, Kim JH, Kim SC, et al. Docking Simulation and Sandwich Assay for Aptamer-Based Botulinum Neurotoxin Type C Detection. *Biosensors.* 2020;10(8):98. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7460441/>
188. Wang J, Tian L, Chen N, Ramakrishna S, Mo X. The cellular response of nerve cells on poly-l-lysine coated PLGA-MWCNTs aligned nanofibers under electrical stimulation. *Mater Sci Eng C.* 2018;91:715–26. Disponível em:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493117342613>
189. Stearns NA, Zhou S, Petri M, Binder SR, Pisetsky DS. The Use of Poly-L-Lysine as a Capture Agent to Enhance the Detection of Antinuclear Antibodies by ELISA. *PLoS ONE.* 2016;11(9). Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5017613/>
190. Nie J, Deng Y, Deng QP, Zhang DW, Zhou YL, Zhang XX. A self-assemble aptamer fragment/target complex based high-throughput colorimetric aptasensor using enzyme linked aptamer assay. *Talanta.* 2013;106:309–14. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914012009502>
191. Lakowicz JR, organizador. Quenching of Fluorescence. Em: *Principles of Fluorescence Spectroscopy* [Internet]. Boston, MA: Springer US; 2006. p. 277–330. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4_8
192. Entzian C, Schubert T. Studying small molecule–aptamer interactions using MicroScale Thermophoresis (MST). *Methods.* 2016;97:27–34. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046202315300682>
193. Sass S, Stöcklein WFM, Klevesath A, Hurpin J, Menger M, Hille C. Binding affinity data of DNA aptamers for therapeutic anthracyclines from microscale thermophoresis and surface plasmon resonance spectroscopy. *Analyst.* 2019;144(20):6064–73. Disponível em:
<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2019/an/c9an01247h>
194. Rhinehardt KL, Srinivas G, Mohan RV. Molecular Dynamics Simulation Analysis of Anti-MUC1 Aptamer and Mucin 1 Peptide Binding. *J Phys Chem B.* 2015;119(22):6571–83. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b02483>
195. Bayraç C, Öktem HA. Evaluation of Staphylococcus aureus DNA aptamer by enzyme-linked aptamer assay and isothermal titration calorimetry. *J Mol Recognit.* 2017;30(2):e2583. Disponível em:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jmr.2583>

9. ANEXOS

ANEXO A. RESUMO GRÁFICO



Article

Selection and Characterization of Single-Stranded DNA Aptamers of Diagnostic Potential against the Whole Zika Virus

Liliane Monteiro de Moraes ¹, Thiago Santos Chaves ², Marco Alberto Medeiros ³, Kaique Alves Brayner Pereira ⁴, Patrícia Barbosa Jurgilas ⁴, Sheila Maria Barbosa de Lima ¹, Sotiris Missailidis ^{3,*} and Ana Maria Bispo de Filippis ^{5,†}

¹ Laboratório de Tecnologia Viroológica—LATEV, Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro 22725, RJ, Brazil

² Laboratório de Tecnologia Recombinante—LATER, Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro 22725, RJ, Brazil

³ Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico—VDTEC, Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro 22725, RJ, Brazil

⁴ Laboratório de Macromoléculas—LAMAM, Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro 22725, RJ, Brazil

⁵ Laboratório de Flavivirus, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro 22725, RJ, Brazil

* Correspondence: sotiris.missailidis@bio.fiocruz.br

† These authors contributed equally to this work.



Citation: de Moraes, L.M.; Chaves, T.S.; Medeiros, M.A.; Pereira, K.A.B.; Jurgilas, P.B.; Barbosa de Lima, S.M.; Missailidis, S.; Bispo de Filippis, A.M. Selection and Characterization of Single-Stranded DNA Aptamers of Diagnostic Potential against the Whole Zika Virus. *Viruses* **2022**, *14*, 1867. <https://doi.org/10.3390/v14091867>

Academic Editors: Luciana Barros de Arruda, Maurício L. Nogueira and Renato Santana de Aguiar

Received: 25 July 2022

Accepted: 22 August 2022

Published: 25 August 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Zika virus became a major public health problem in early 2015, when cases of Guillain-Barré syndrome and microcephaly were associated with viral infection. Currently, ZIKV is endemic in all tropical areas of the world, and the chance for future Zika epidemics remains very real and accurate diagnosis is crucial. The aim of this work was to select specific ssDNA aptamers that bind to the entire Zika virus and can be used to compose specific diagnostics, without cross-reactivity with other flaviviruses. Zika virus was cultivated in Vero cells and used as a target for aptamer selection. Aptamers specific for the ZIKV were selected using whole-virus SELEX, with counterselection for other flavivirus. Secondary and tertiary structures were evaluated and the molecular anchoring between the aptamers and target were simulated by the HDOCK server. Aptamer interaction was evaluated by ELISA/ELASA and the dissociation constant (Kd) was calculated by thermophoresis. Four ZIKV-specific aptamers were selected. The best two were further characterized and proved to be specific for ZIKV. Aptamers are capable of binding specifically to the ZIKV and differentiate from Dengue virus. The aptamers selected in this work can be used as capture agents in the composition of diagnostic tests to specifically detect ZIKV infection.

Keywords: Zika virus; DNA aptamers; SELEX aptamer technique; viral envelope protein; molecular docking simulation

1. Introduction

Zika virus (ZIKV) is an arthropod-borne virus (arbovirus) primarily transmitted by the *Aedes* mosquitoes. ZIKV was discovered in 1947 in primates in the Zika Forest of Uganda during surveillance for yellow fever [1,2]. The first documented ZIKV epidemic occurred in the Yap Island in Micronesia in 2007, followed by outbreaks in the Pacific Islands in 2013–2014 [3,4]. In 2015, ZIKV emerged in the Americas, and spread to 87 countries and territories with autochthonous transmission, according to the WHO, by July 2019 [5,6]. Currently, ZIKV is endemic in all tropical areas of the world, similarly to Dengue virus (DENV), and the chance for future Zika epidemics remains very real [7].

ZIKV is a small enveloped positive-strand RNA virus belonging to the *Flavivirus* genus of the *Flaviviridae* family. The RNA genome encodes three structural (core C, membrane

precursor prM, and envelope E) and seven non-structural genes (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, and NS5), with untranslated region (UTR) genes flanking the 5' and 3' ends [8,9]. High-resolution ZIKV structures identified by cryo-electron microscopy indicate that the overall ZIKV structure is similar to that of other flaviviruses. The flavivirus E protein, the major protein involved in receptor binding and fusion, is formed as a head-to-tail dimer on the surface of viral particles. There are 90 dimers of the E protein on the surfaces of mature viruses [10]. Each monomer has four domains: the stem/transmembrane domain (E-S/E-TM) that anchors the protein into the membrane and domains I, II, and III (ectodomains) that constitute the predominantly surface portion of the protein [10,11].

Although most ZIKV infections are asymptomatic (75–80%), and symptomatic infections are generally mild [12], the Zika virus became a major public health problem in early 2015, when cases of the Guillain-Barré syndrome, microcephaly, and neurological disorders were associated with virus infection [13–15]. Due to its association with congenital infections, ZIKV has been considered the newest member of the TORCH pathogens (toxoplasmosis, others, rubella, cytomegalovirus, and herpes) in the Americas [16,17].

Brain changes caused by congenital Zika appear in the second and third trimesters of pregnancy, while other dysmorphic features are often observed in the newborns of mothers infected with the virus [18,19]. As time is a very important factor in the evolution of Zika infection in pregnant women, accurate and early detection becomes of paramount importance for vertical transmission control, and future therapeutic strategies.

There is an increasing need for affordable, rapid, sensitive, and high throughput methods in identifying new or re-emerging infectious agents [20]. The availability of the point of care (POC) tests eliminates diagnostic delays and uncertainties, enabling the timely initiation of proper treatments and the prevention of the spread of diseases [20]. The use of aptamer-based POC tests has been increasingly described in the literature [21,22].

Aptamers are small single-stranded oligonucleotides simultaneously developed by two groups of researchers, Ellington and Szostak, and Tuerk and Gold, in 1990 [23,24]. They are also called chemical antibodies because of their ability to specifically bind to a target, just like antibodies [25]. However, while antibodies recognize and bind to protein epitope sequences, aptamers recognize and bind based on the 3D structure of the target molecule [26]. In addition to specific, high-affinity binding to their targets, aptamers offer several advantages, including in vitro selection, lack of batch-to-batch variation, room temperature transport, and a relatively low cost, making them ideal for use in diagnostic assays [27].

This paper describes the selection and characterization of specific ssDNA aptamers that bind to the whole Zika virus that can be used to compose a specific diagnostic test without cross reactivity with other Flaviviruses.

2. Material and Methods

2.1. Zika Virus Strain

The Zika virus isolate ES2916/2015 (accession number: KX212103.1), from the State of Espírito Santo, Brazil, was used as a target in the selection of aptamers.

2.2. Other Flavivirus Strains

Other circulating Flaviviruses used were yellow fever virus/YFV 17DD (purified vaccine strain); Dengue 1/WestPac Virus; Dengue Virus 2/S16803; Dengue Virus 3/16,562; and Dengue virus 4/TVP36, with accession numbers DQ100292.1; U88535.1; GU289914.1; KU725665.1; and KC963424.1, respectively. All viruses were supplied by the Laboratory of Virological Technology (Bio-Manguinhos/Fiocruz).

2.3. Zika Protein E Gene

The gene encoding the ectodomain of Zika virus E protein (E-ZIKV) was synthesized from the genetic sequence available from GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (accessed on 23 March 2017)—Accession code YP_009227198.1—Envelope pro-

tein E (Zika virus)), by the company Integrated DNA Technology (IDT). A polyhistidine tail was inserted into the C-terminal portion to facilitate the further purification of the protein.

2.4. Production and Purification of Zika Virus

In order to evaluate the replication profile of the Zika viral isolate, growth kinetics were performed in stationary bottles. This experiment was performed in duplicate, and aliquots were collected daily for the evaluation of viral titer (PFU/mL). Vero cells were seeded at a density of 4×10^4 cells/cm² in 175 cm² flasks 2 days before infection. Virus was inoculated at two different MOIs (0.02 and 0.002) and allowed to bind to cells for 1 h at 37 °C/5% CO₂. Thereafter, the inoculum was removed, the cells were washed with PBS, and VP/SFM medium supplied with 4 mM glutamine and gentamicin 1% (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) was added. The virus was harvested every 24 h, the first collection point being eight hours post-infection (hpi). The viral titers were determined by plaque-forming unit (PFU) assay on Vero cells. Briefly, 200 µL of 10-fold serial dilutions were incubated for 1 h on Vero cell monolayers in 6-well plates. The virus inoculum was removed, and the cells were overlaid with medium 199 containing 2% Carboxymethyl cellulose (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), 5% FBS, and 1% penicillin/streptomycin. Four days post-infection, cells were fixed with 5% formaldehyde and stained with 0.04% crystal violet (Sigma-Aldrich) to visualize plaques.

The production of ES 2916/2015 Zika virus was performed using a previously selected viral input and time for harvest. The supernatant was collected and clarified using Sartobran P—0.45/0.2 µm filter capsule (Sartorius). After clarification, the viral suspension was submitted to one purification step of liquid chromatography, in Äkta Purifier 10 Chromatograph (GE Healthcare), using ion exchange chromatography (Sartobind Q75 membrane, Sartorius) in 50 mM Tris/300 mM NaCl/sorbitol 8% solution buffer, pH 8.5. The purified viral titer was calculated using the plaque assay.

2.5. Obtaining the Zika Virus Recombinant Protein E (E-ZIKVre)

The E-ZIKVre gene contained in the pUCIDT commercial vector was amplified by PCR with specific oligonucleotides: E-ZIKVre FW (5'-CAT GCC ATG GGC ATT AGG TGC ATA GGC GTT AGC-3') and E-ZIKVre RV (5'-CCC AAG CTT CTA ATG GTG GTG ATG GTG ATG C-3') and then cloned into the pET28a expression vector (Novagen, Madison, WI, USA) using restriction endonucleases NcoI (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) and HindIII (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) and the enzyme T4 DNA ligase (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), following the manufacturer's recommendations. E. coli TOP10 cells were transformed with the pET28a + E-ZIKVre construct by electroporation. Subsequently, the cells were grown on LB agar plates supplemented with 50 µg/mL kanamycin. After overnight incubation at 37 °C, colonies were individually transferred to tubes containing 5 mL of LB medium and 50 µg/mL kanamycin and then incubated for 16 h with shaking at 200 rpm at 37 °C. Plasmid DNA was extracted using the High Pure Plasmid Isolation kit (Roche Life Science, Mannheim, Germany). The pET28a + E-ZIKVre purified plasmid was transformed into *SHuffle E. coli* competent cells (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) using electroporation. A single positive clone was picked to inoculate 10 mL of Terrific Broth (TB) medium, supplemented with 50 µg/mL kanamycin and 1% v/v glucose, and submitted to agitation at 37 °C overnight. Thereafter, 1 mL of bacterial culture was grown in 25 mL of TB medium, containing 50 µg/mL kanamycin and 1% v/v glucose, at 37 °C with 200 RPM shaking until obtaining an optical density (OD) of 0.8 at 600 nm. Before induction, a sample of the culture (1 mL) was collected, centrifuged at 14,000 rpm and stored. For protein expression, the culture was induced with 1 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) at 37 °C for 4 h. Then, the OD_{600nm} of the culture was read. The cells were subsequently pelleted by centrifugation and the supernatants were discarded.

2.6. Analysis of the Expression and Solubility of the Zika Virus Recombinant Protein E (E-ZIKVre)

The pellet collected in the uninduced culture was resuspended in 25 μ L of 1 \times sample buffer—50 mM Tris-HCl, 2% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.1% (w/v) blue bromophenol, 10% (v/v) glycerol, 100 mM 2-mercaptoethanol—for every 0.1 OD_{600nm} and boiled at 100 °C for 5 min.

The induced culture pellets were resuspended in 20 mM Tris-HCl/1 mM EDTA/0.1% triton x-100 buffer and lysed by sonication (3 cycles/30 s) on ice. The insoluble fraction was subsequently separated from the soluble cell lysate by centrifugation (14,000 rpm, 10 min, 4 °C). E-ZIKVre was analyzed using SDS-PAGE and Immunoblot.

2.7. E-ZIKVre Protein Solubilization Study

Different formulations of the lysis buffer were used in order to select the best protein solubilization condition. Six buffers containing Tris-HCl, EDTA, triton x-100, and urea at pH 8.0 were tested. The difference between the lysis buffers was only due to the concentration of the chaotropic agent (urea), which ranged from 1 to 6 M. All formulations were added at a rate of 25 μ L for each 0.1 OD_{600nm} and subjected to lysis by sonication in 3 cycles of 30 s on ice.

2.8. Purification of E-ZIKVre Protein

The culture conditions in the shake flasks were scaled to a 2 L bioreactor for biomass production in order to obtain biomass for the purification step by metal ion affinity chromatography (IMAC). To express the recombinant E Protein at a large scale, the recombinant strain pET28a + E-ZIKVre was inoculated into *E. coli* SHuffle cells grown in a 2 L bioreactor (New Brunswick, St Albans, UK). Biomass growth was induced at an OD_{600nm} of 0.8 with 1 mM IPTG at 37 °C for 4 h. Cell culture was centrifuged at 14,000 rpm for 10 min and the pellet resuspended in wash buffer I [20 mM Tris-HCl + 1 mM EDTA + 0.5% triton x-100 + 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), pH 8.0] in the proportion of 10 mL for each 1 g of pellet. The cell suspension was sonicated for two cycles for 15 s with an interval of 30 s on ice and centrifuged at 8000 rpm for 15 min. The pellet was resuspended in washing buffer II (20 mM Tris-HCl + 1 mM EDTA + 0.5% triton x-100 + 1 M Urea + 1 mM PMSF, pH 8.0) and the processes of sonication and centrifugation were repeated. At the end, the soluble fraction was filtered through a 0.22 μ m filter and the recombinant protein was purified by IMAC, using the Ni²⁺ loaded affinity columns of the His Trap HP model (GE Healthcare) in the AKTA Pure equipment (GE Healthcare). Purification took place in steps of increasing imidazole concentration. The purification fractions were analyzed by SDS-PAGE gel and those with the highest concentration were pooled and dialyzed in a step of desalination and refolding of the recombinant protein. The concentration of E-ZIKVre protein was determined by the bicinchoninic acid (BCA) method, using the Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific).

2.9. In Vitro Selection of Zika Virus ssDNA Aptamers Using Conventional SELEX

The Systematic Evolution of Binding by Exponential Enrichment (SELEX) procedure was implemented using the protocol described by Simmons et al., 2012, with modifications. A random single-stranded DNA library was used to select sequences that recognize Zika virus particles. This library contained 10¹⁵ variants of 25 random nucleotides flanked by fixed sequences (5'-GGGAGACAAGAATAAACGCTCAA-25n-TTCGACAGGAGGCTCAACAACAGGC-3'). Primers annealing to the flanking regions were used during the selection procedure.

The experiment started with an overnight immobilization of the whole Zika virus to the 96-well ELISA plate at 4 °C. One hundred microliters of the aptamer library (1 mM) were added and incubated for 1 h at room temperature (RT). After incubation, target binding sequences were kept, while unbound nucleotide sequences were removed by washing 3 times with PBS-Tween solution, pH 7.4. The elution of bound aptamers was performed using a salt gradient (1.0 M, 1.2 M, and 1.5 M NaCl) and 3.0 M NaSCN. Eluates were

desalted using 5 kDa Microcon filters (Millipore, Life Sciences, Burlington, NJ, USA) and amplified by unidirectional PCR using 10 μ L 5 \times reaction buffer, 1.5 U of Taq polymerase (Invitrogen, Waltham, MA, USA), 200 nM primer sense, 2 nM primer antisense, 20 mM dNTPs, and 50 mM MgCl₂. Amplification conditions were 10 min at 95 °C; 100 cycles of 90 s at 95 °C; 30 s at 56 °C; 90 s at 72 °C; and a final elongation of 10 min at 72 °C. The SELEX cycle was repeated seven times.

To increase the specificity of aptamers, negative selection was performed with the yellow fever virus (YFV) and the four dengue virus serotypes after the fifth round.

On the last cycle of SELEX, standard PCR of the selected sequences was performed instead, and the quality of the PCR product was verified in 2% agarose gel.

2.10. Cloning and Sequencing of Oligonucleotides Enriched by SELEX

The PCR product was cloned into a pCR2.1 TOPO (Promega) vector. The plasmid was transformed into *E. coli* TOP10 and after electroporation, the LB medium was added and the material was grown for 1 h at 37 °C, 200 RPM. The culture was then plated onto LB/agar/ampicillin (100 μ g/mL) and the material was incubated overnight at 37 °C. The viable clones were then individually seeded from the colonies in 5 mL of LB/ampicillin and incubated overnight at 37 °C, 200 RPM. The plasmids were extracted following the manufacturer protocol of the High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche, Mannheim, Germany). The extracted plasmids were quantified by Qubit (Invitrogen, Waltham, MA, USA) and amplified using M13 forward and M13 reverse primers. Sequencing was performed using Sanger's automated methodology using the Big Dye kit, version 3.1, protocol and the 3500 XL equipment (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). Selected ssDNA molecules were aligned by Clustal 1.2 (Version 1.2.4, Institute Pasteur, Paris, France).

2.11. Generation of Two- and Three-Dimensional Structure

The secondary structure of ssDNA was constructed from their nucleotide sequences using the Mfold Web Server [28]. The sequences were selected as linear at a temperature of 25 °C and ionic concentration of 0.1 M of Na⁺, 0.01 M of Mg²⁺, computing only fold configurations within 5% from the minimum free energy, and considering a maximum number of 50 folds with no limit to the maximum distance between paired bases. In addition to the predicted secondary structure of ssDNA, the minimum free energy of the predicted structure is provided.

Three-dimensional modeling was performed using the protocol described by JEDDI and SAIZ, with modifications [29]. Briefly, using the RNAalifold Web Server, ssDNA aptamer sequences in FASTA format were converted into ssRNA (Vienna format), containing the coordinates of the three-dimensional structure. The digital platform "RNA Composer" was used to transform structures from ssRNA in Vienna format into ssRNA in PDB format. Equivalent 3D ssRNA models were constructed using the VMD software, and the 3D RNA models were translated into DNA models using the Chimera program. The final 3D ssDNA structures were visualized by the Chimera software.

2.12. Molecular Dynamics Simulations between Zika Virus E Protein and Aptamers

The Zika virus E protein [30], available in the Protein Data Bank (PDB) database [31], and the 3D ssDNA structures of the aptamers, finalized in the Chimera software, were applied to simulate molecular dynamics (molecular docking) using the HDOCK platform.

2.13. Binding Affinity of Selected Aptamers

2.13.1. ELISA

Enzyme immunoassay plates were coated with 50 μ M/well of poly-lysine (PL) at 5 μ g/mL then stored at 4 °C for 16 h. Aptamers were immobilized on wells and the plate was incubated overnight at 4 °C. To remove unbound aptamers, wells were washed three times with washing buffer (10 mM PBS, 0.05% Tween-20, pH 7.4). The plate was blocked with 300 μ L/well of a blocking agent (10 mM PBS, 1% BSA, pH 7.4) for 1 h at

37 °C; and another cycle of washes followed and 100 µL/well of different concentrations of virus in 10-fold serial dilutions (5,000,000–0 PFU/mL) was added. After incubation for 1 h at 37 °C, the unbound virus was removed by washing three times. One hundred microliters of monoclonal antibody 4G2 in a 10-fold dilution was added and the plate was incubated at 37 °C for another 1 h. Subsequently, the plate was washed again, 100 µL of anti-mouse conjugated with peroxidase at a dilution of 1/30,000 in PBS was added and the plate was incubated for 1 h at 37 °C. The plate was again washed three times and 100 µL of tetramethylbenzidine (TMB) chromogenic solution was added before 20 min of incubation at 37 °C. The color reaction was stopped by adding 100 µL of 1 N HCl and the absorbance was read at 450 nm using the Spectra Max190 reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) supplied with the Soft Max Pro 6.3 software.

2.13.2. Affinity Binding by Microscale Thermophoresis

Microscale thermophoresis (MST) was performed on a NanoTemper Monolith NT.115 apparatus (Nano Temper Technologies). Briefly, 10 µM Zika virus E protein was labeled using a Monolith Protein Labeling Kit RED-NHS 2nd Generation, with 3-fold excess NHS dye in PBS (pH 7.4). The free dye was removed according to the manufacturer's instructions, and the protein was eluted in the MST buffer (PBS containing 0.05% Tween 20) and centrifuged at $14,000 \times g$ for 10 min. Binding affinity measurements were performed using 20 nM of labeled protein and a serial dilution 1:1 of 16 concentrations of the four aptamers, starting at 50 µM. The protein was maintained in the presence of the aptamers for 15 min prior to transferring to premium Monolith NT.115 capillaries. Experiments were run in duplicate at 76% excitation and a medium MST power at 25 °C. Data were obtained with MO.Control V2.1.1 software (NanoTemper Technologies, Munich, Germany) and recorded data were analyzed with MO.Affinity Analysis V3.0.4 software (NanoTemper Technologies, Munich, Germany). The dissociation constant (K_d) quantifies the equilibrium of the reaction of the labeled molecule A (concentration c_A) with its target T (concentration c_T) to form the complex AT (concentration c_{AT}) and is defined by the law of mass action as $K_d = c_A c_T / c_{AT}$, where all concentrations are "free" concentrations. During the titration experiments, the concentration of the labeled molecule A is kept constant, and the concentration of added target T is increased.

In order to assess the specificity of aptamers, we used a pool of viral particles containing all four Dengue serotypes. Two aptamers were selected and labeled with the second-generation RED-NHS labeling kit. The reaction was carried out according to the manufacturer's instructions in buffer 130 mM NaHCO₃, 50 mM NaCl, pH 8.3, applying 10 µM of aptamer (in molar ratio to fluorophore \approx 1:3) at room temperature for 30 min. Unreacted fluorophore was removed using a size exclusion column equilibrated in PBS buffer, 0.05% Tween 20, pH 7.4. Binding affinity analyzes were conducted using labeled aptamers adjusted to 40 nM with PBS buffer, 0.05% Tween 20, 150 mM NaCl, pH 7.4. For measurement, each virus dilution (ZIKV and DENGV pool) was mixed with a volume of labeled aptamer, at a final aptamer concentration of 20 nM and final virus concentrations ranging from 0.00000652 nM to 0.01335 nM. After 15 min of incubation, samples were loaded into standard capillaries. The effect of thermophoresis was measured using the Monolith NT.115 equipment at room temperature of 25 °C. The parameters were set for 100% or 64% excitation (ZIK01/NH2 or ZIK02/NH2 aptamers, respectively) and average LED power. Data from the duplicates were analyzed using the MST signal at 5 s.

3. Results

3.1. Zika Virus Production

Before creating a working virus seed (WVS), a growth kinetics of the virus in Vero cells was performed to evaluate the replication profile of the Zika virus isolate ES2916/2015. The virus was inoculated at the MOIs 0.02 and 0.002 and was collected every 24 h, the first collection point being 8 hpi. Compared to the cell control, ZIKV-infected cells demonstrated

no apparent cytopathic effect (CPE) up to 48 hpi for both MOIs. Infected cells demonstrated mild CPE by 72 hpi, moderate CPE by 96 hpi, and extensive CPE by 96–120 hpi (Figure 1A).

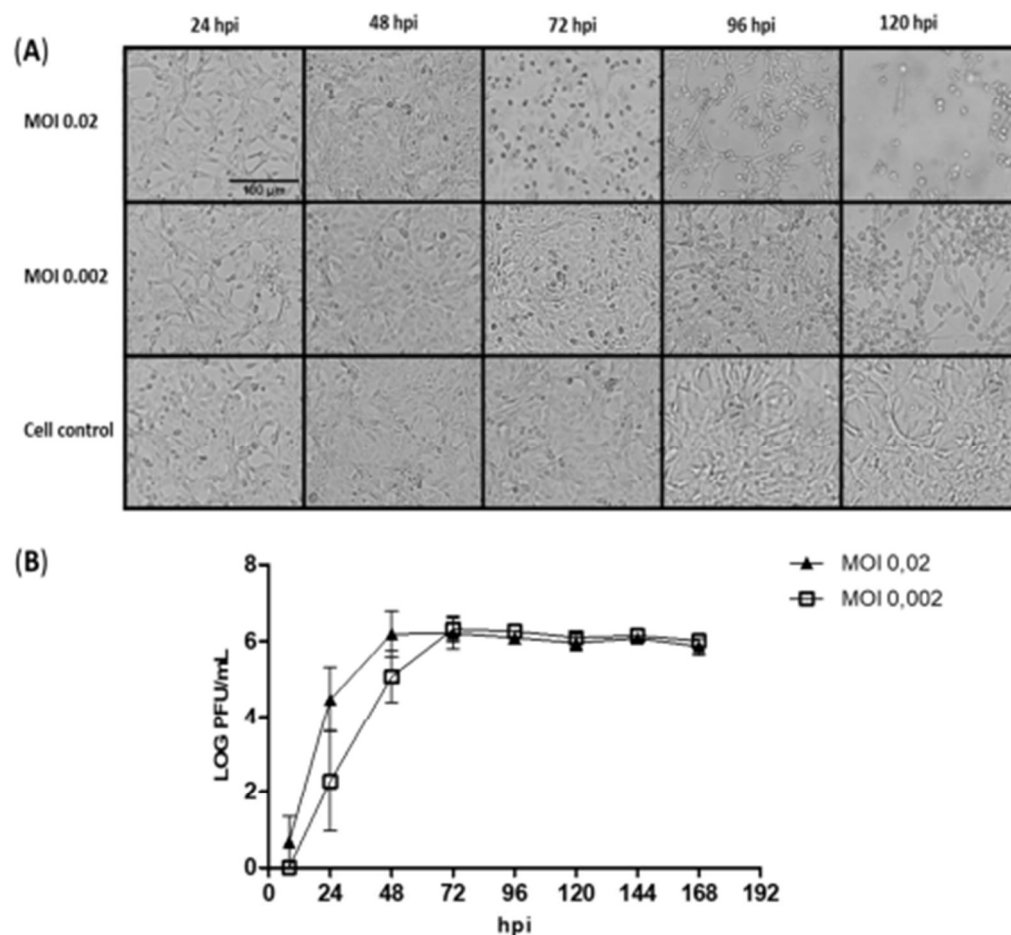


Figure 1. Viral kinetics of ES 2916/2015 Zika virus (ZIKV) in VERO cells at MOI 0.02 and MOI 0.002. (A) Cell monolayer images demonstrating the cytopathic effect of ZIKV over time. (B) Viral titers determined by plaque-forming unit (PFU) assay.

Viral kinetics using MOI 0.02 showed faster growth, as expected, and reached a plateau 12 h before the MOI 0.002 curve. The peak of viral production is between 48 and 72 h at MOI 0.02 (6.19 and 6.21 Log₁₀ PFU/mL, respectively) and 72 h, at MOI 0.002 (6.32 Log₁₀ PFU/mL) (Figure 1B).

For working seed bank production, Vero cell cultures were inoculated with a viral input of 0.02 and the virus was collected after 48 h of infection. Following the purification of the ZIKV, a viral titer of 7.44 Log₁₀ PFU/mL was obtained.

3.2. Cloning, Expression, and Purification of E-ZIKVre Recombinant Protein in *E. coli* SHuffle System

For the expression of the recombinant protein E-ZIKVre, the gene was amplified by PCR. In Figure 2A, it is possible to observe a band of approximately 1247 bp corresponding to the E-ZIKVre gene. This gene was cloned into pET28a vector and *E. coli* TOP10 cells were

transformed with the pET28a+E-ZIKVre construct. Plasmids of possible recombinant clones were treated with restriction endonucleases NcoI and HindIII, where a band corresponding to the E-ZIKVre insert was observed (Figure 2B). Clone 3 was selected to transform *E. coli* SHuffle cells.

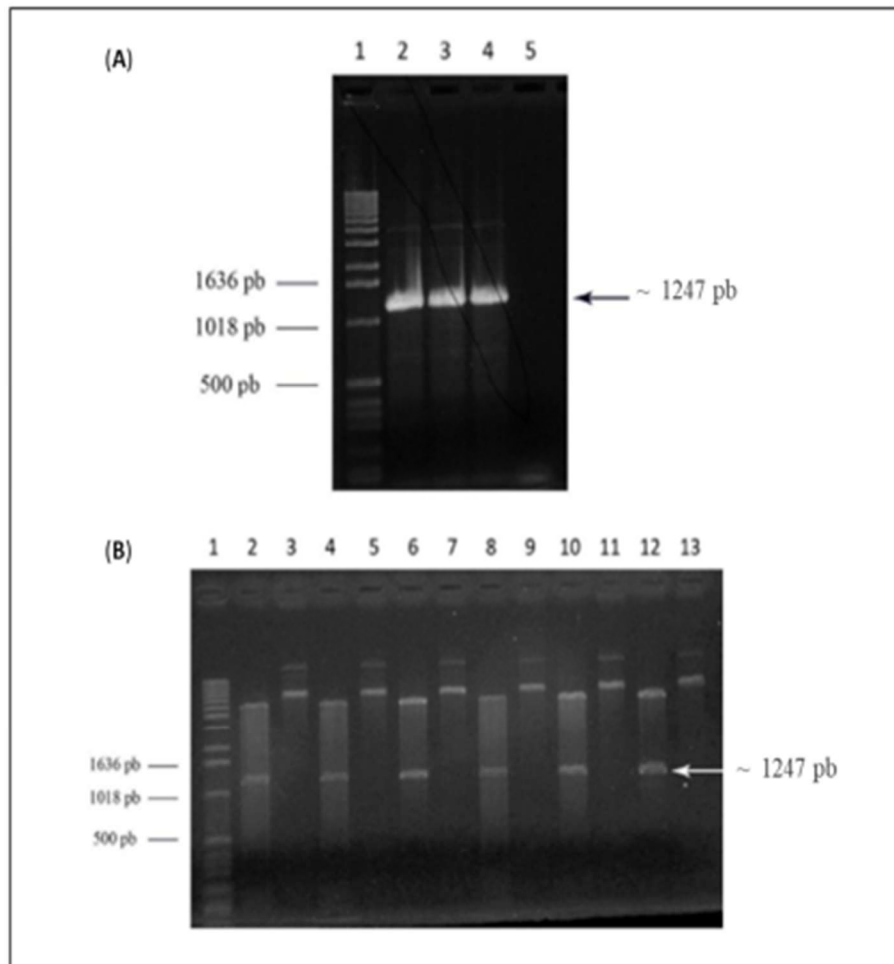


Figure 2. One percent agarose gel. (A) Electrophoresis of the PCR product of the Zika virus recombinant protein E (E-ZIKVre) gene in the commercial vector pUCIDT + E-ZIKVre. Lane 1—Molecular marker 1kb DNA Ladder™ (Life Technologies); line 2–4—PCR product E-ZIKVb; lane 5—negative control. (B) Electrophoresis of the enzymatic cleavage digestion products of the pET28a + E-ZIKVre construct with restriction endonucleases NcoI and HindIII. Lane 1—Marker 1kb DNA Ladder™ (Life Technologies); lane 2—digested clone 1; lane 3—undigested clone 1; lane 4—digested clone 2; lane 5—undigested clone 2; lane 6—digested clone 3; lane 7—undigested clone 3; lane 8—digested clone 4; lane 9—undigested clone 4; lane 10—digested clone 5; lane 11—undigested clone 5; lane 12—digested clone 6; and lane 13—undigested clone 6.

The expression and solubility of the E-ZIKVre protein was evaluated in induced and non-induced cell extracts using SDS-PAGE (Figure 3A) and immunoblotting (Figure 3B). The expected molecular mass (45 kDa) was observed both in the samples referring to the in-

duced cells and in the samples of the insoluble fraction in SDS-PAGE. The immunoblotting assay with anti-his antibody confirmed these results.

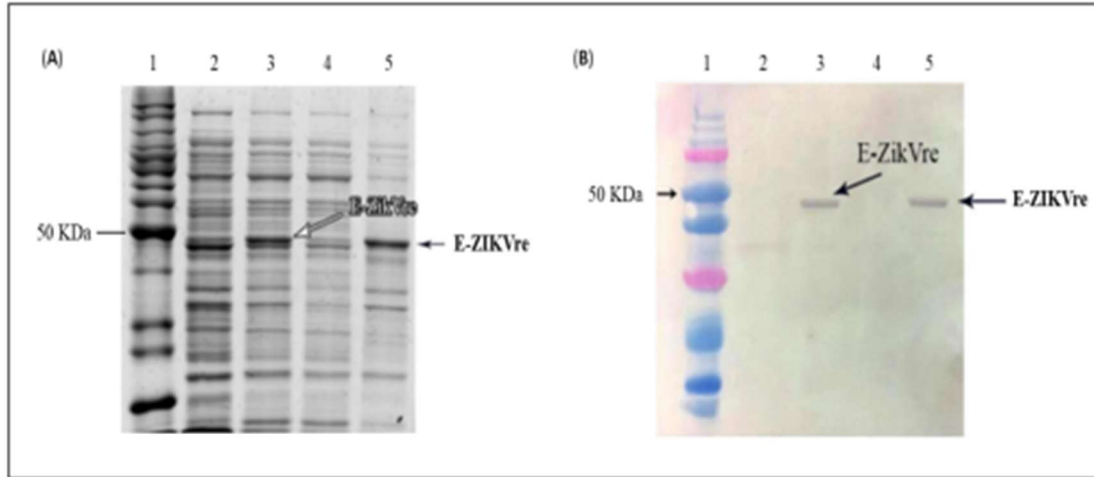


Figure 3. Evaluation of E-ZIKVre expression and solubility analysis in *E. coli SHuffle*. (A) SDS-PAGE gel. Line 1—benchmark; line 2—non-induced culture; line 3—induced culture; line 4—soluble fraction; line 5—insoluble fraction. (B) Immunoblot assay. Line 1—dual color; line 2—non-induced culture; line 3—induced culture; line 4—soluble fraction; line 5—insoluble fraction. Primary antibody: Anti-His.

Protein solubilization assays were performed and analyzed by SDS-PAGE with different concentrations of chaotropic agent (urea). The condition of 20 mM Tris buffer + 1 mM EDTA + 0.5% triton x-100 + 4 M urea pH 8.0, 3 cycles of 30 s and 30 s intervals on ice was established as ideal to obtain the complete solubilization of the E-ZIKVre protein (Figure 4).

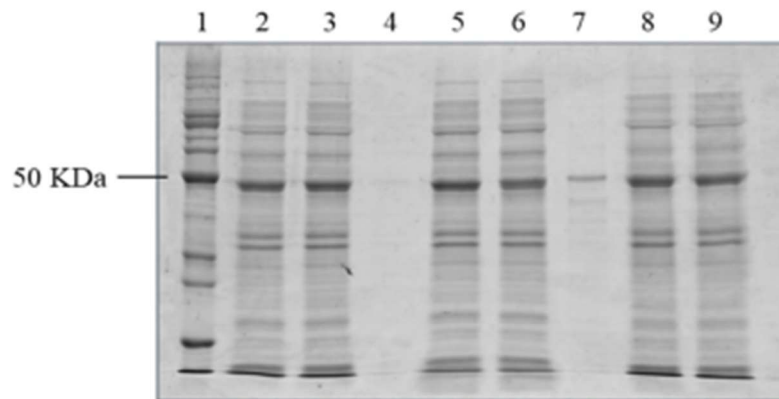


Figure 4. SDS-PAGE of the E-ZIKVre protein solubilization assay expressed in *E. coli SHuffle*. Line 1—benchmark; line 2—crude extract 4 M urea; line 3—soluble fraction 4 M urea; line 4—insoluble fraction 4M urea; line 5—crude extract 5 M urea; line 6—soluble fraction 5 M urea; line 7—insoluble fraction 5 M urea; line 8—crude extract 6 M urea; line 9—soluble fraction 6 M urea; line 10—insoluble fraction 6 M urea.

Cell culture conditions were scaled-up to a 2 L bioreactor in order to obtain sufficient biomass for protein purification. The E-ZIKVre protein was purified by IMAC (Figure 5A) and eluted in buffer containing 500 mM imidazole. Fractions collected during elution were analyzed by SDS-PAGE (Figure 5B), with a high degree of homogeneity >85%. After the purification step, the E-ZIKVre protein was dialyzed to remove the chaotropic agent and refold. The quantitation results demonstrated a recovery of E-ZIKVre protein of approximately 37 mg/L.

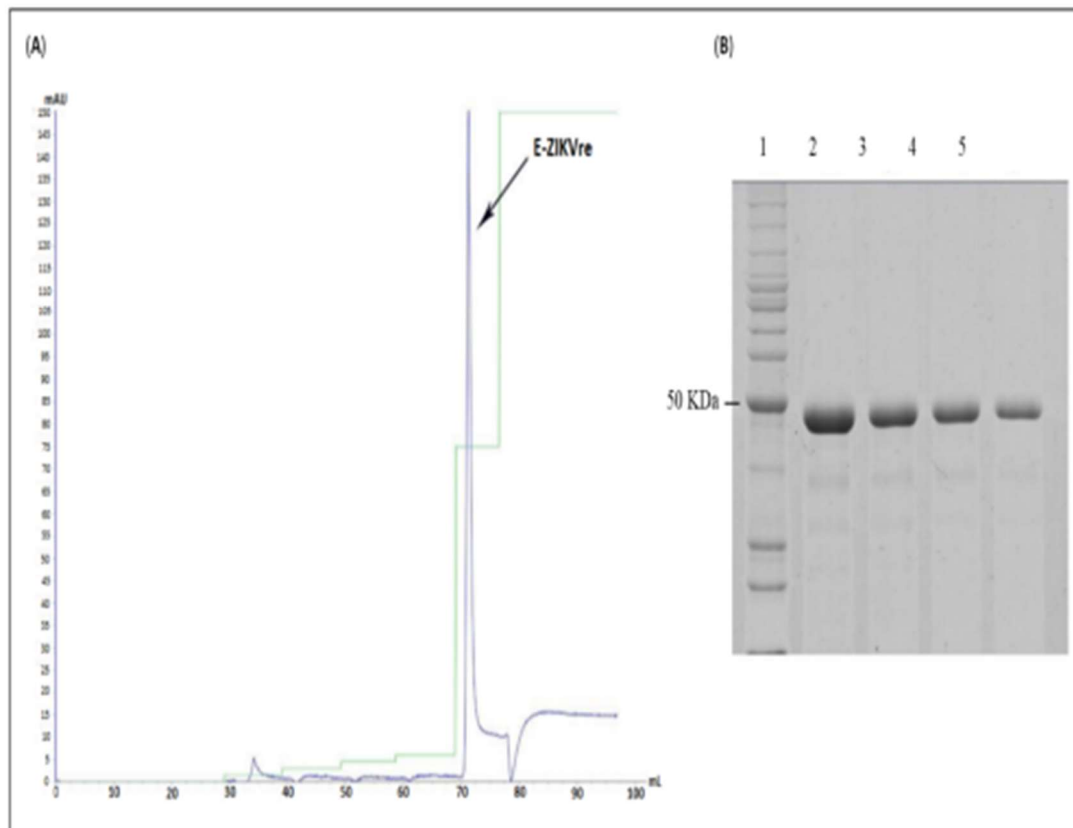


Figure 5. Analysis of the E-ZIKVre protein purification step. (A) Chromatogram of purification of protein by IMAC on Ni^{2+} column. On the vertical axis are the absorbance values in mAU ($\lambda = 280 \text{ nm}$) and on the horizontal axis are the volumes in milliliters. The blue peak represents the E-ZIKVre protein. Elution in 20 mM Tris-HCl + 1 mM EDTA + 0.5% triton x-100 + 4M urea (pH 8.0). (B) SDS-PAGE of E-ZIKVre protein purification product by IMAC. Line 1—benchmark; lines 2–5—purified fractions of E-ZIKVre protein.

3.3. ssDNA Aptamers against Zika Virus

SELEX technology was used for the selection of specific DNA aptamers against whole viral particles. A randomized ssDNA library was incubated with Zika virus particles immobilized on ELISA plates and cycles of interaction, and the separation of the bound from unbound species as well as the elution and amplification of the bound species were performed. After the fifth selection round, negative selection was performed with others flaviviruses, the four dengue serotypes and yellow fever virus, to increase the specificity of aptamers. At the end of the SELEX cycles, the PCR-derived molecules were cloned and

sequenced. Ninety-four clones containing an aptamer insert were obtained by elution with 3 M NaSCN. The sequencing of 28 of these clones was performed and their homology was evaluated using a Clustal 2.1 alignment (Figure 6). The formation of four aptamers clusters with 100% nucleotide homology was detected: cluster ZK01 (aptamers ZK04 and ZK83); cluster ZK02 (aptamers ZK06, ZK23 and ZK78); cluster ZK03 (aptamers ZK34 and ZK88); and cluster ZK04 (aptamers ZK17 and ZK86). In addition, the homology of 22 nucleotides (GTTTAGAAACCCACCGTGGCA) was observed in 10 sequences (Figure 6). The four clusters were chosen from the selected pool for further characterization. Clusters ZK01 and ZK02 were analyzed using their complete sequence, whereas the sequences of clusters ZK3 and ZK04 were truncated to their appropriate predetermined size.

Clone	Sequence 5' - 3'	
ZK68	----CAGGGCCACCATTC-TTTCGTGGTC----	
ZK90	---CCAACTCCGCCACTCACCTTGGTGT----	
ZK38	-----TGGTCCGGCCCTCGATGCCCGTTC---	
ZK27	--GTCTACTGCCGTGTTCCGCCGCCCG-----	
ZK46	----GTTAGGCCGGGTTTCAGACAGATGCG----	
ZK32	---CATACACATGGTCTTACATGCGTGC----	
ZK39	---GATAGGGGGAACGATACAATTCCGC-----	
ZK04	---GGGTTGGTCGTTTCAGTGCAAGTAGC-----	Cluster ZK01
ZK83	---GGGTTGGTCGTTTCAGTGCAAGTAGC-----	
ZK53	-----TCTGTCCAACCTCAGCACATAGCATG--	
ZK06	GTTTAGAAACCCACCGTGGCAACGATCATTGG	Cluster ZK02
ZK23	GTTTAGAAACCCACCGTGGCAACGATCATTGG	
ZK78	GTTTAGAAACCCACCGTGGCAACGATCATTGG	
ZK34	GTTTAGAAACCCACCGTGGCAACAC-----	Cluster ZK03
ZK88	GTTTAGAAACCCACCGTGGCAACAC-----	
ZK17	GTTTAGAAACCCACCGTGGCAACATGCTA----	Cluster ZK04
ZK86	GTTTAGAAACCCACCGTGGCAACATGCTA----	
ZK58	GTTTAGAAACCCACCGTGGCAACATGCGC----	
ZK80	GTTTAGAAACCCACCGTGGCAC-----	
ZK94	GTTTAGAAACCCACCGTGGCACCATGCAAATG	
ZK33	GTTTAGAAACCCACCGCGGCACAACCATG---	
ZK51	-----AATCCCGCCATGTCATATCGCACAG-	
ZK12	----GCATGGCCTAATCGCGTA--CAGCCTT--	
ZK93	-----TGAACCTGCTGCGAAGTCAGTTCAC-	
ZK60	---TCGCCGATTGGTCCGTACCGCCCC-----	
ZK64	---CCGGTTATGGTACCTTACCAAAGC-----	
ZK56	----GACTTATCGCTCTTGGTCGCCGACA----	

Figure 6. Alignment of the sequences obtained after selection against the whole Zika virus particle. Red rectangles indicate four clusters of aptamers. Blue square shows nucleotide homology between sequences. The nucleotides in bold were removed.

3.4. Secondary and Tertiary Structure Prediction of the ssDNA Aptamers

Secondary structures of the ssDNA molecules were predicted using the Mfold Web Server, based on free energy minimization techniques. In mfold, all possible secondary structures are approximated based on Watson-Crick pairing and the most thermodynamically stable structures are selected.

Figure 7A shows the most stable two-dimensional structures of each aptamer group and their respective minimum-fold free energies (ΔG). Clusters ZK02, ZK03, and ZK04 demonstrated a conservation of structure, a hairpin formed by the final 11 nucleotides of the forward primer and the first five nucleotides of the aptamer sequence.

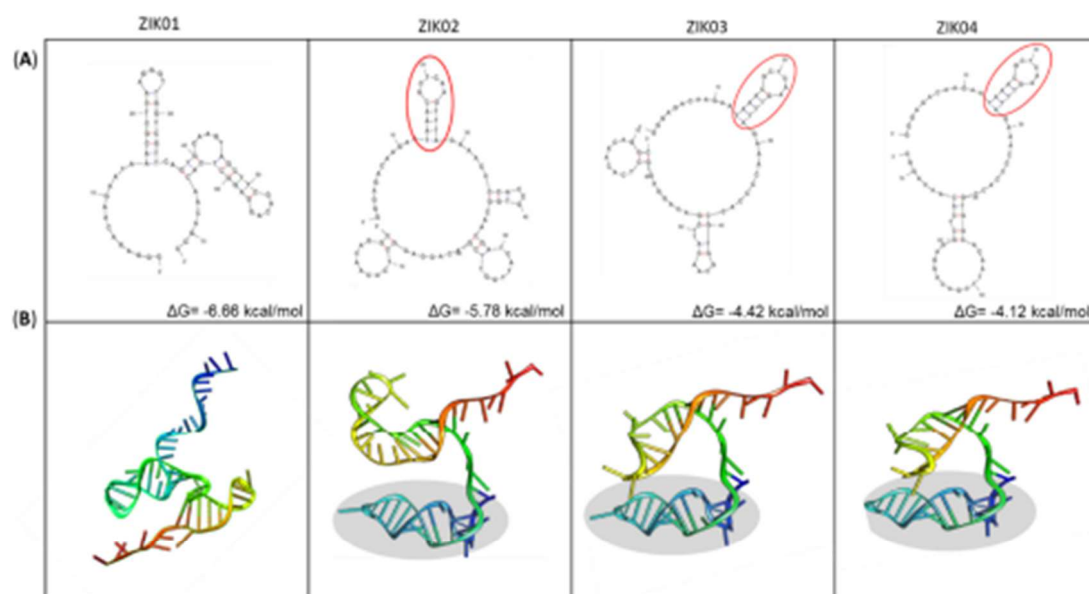


Figure 7. Prediction of secondary and tertiary structures of the four selected aptamers for Zika virus. (A) Secondary structure of the aptamers by Mfold web server. Parameters: linear DNA; folding temperature = 25 °C; [Na⁺] = 0.1; [Mg⁺⁺] = 0.01; unit = M; ΔG = free energy; the circled areas show the same hairpins structures in 3 aptamers. (B) Computational prediction of the 3D structures of the aptamers using Chimera program. The highlighted areas indicate the same tertiary structure in three aptamers.

The transformation of secondary sequences into three-dimensional structures consisted of multiple steps and the use of two programs, VMD and chimera. The results of the three-dimensional analysis confirm the structural similarity between aptamers ZK02, ZK03, and ZK04 (Figure 7B).

3.5. Molecular Docking between ssDNA Aptamers and the E-ZIKV Protein

Protein E is a glycoprotein that involves the entire surface of flavivirus viral particles. Each glycoprotein E monomer forms stable homodimers, and 90 dimers assemble to form the outer envelope of the infectious virus. Protein E is the main target of neutralizing antibodies against the Zika virus and the likely target of the selected aptamers. We verified this assumption using recombinant protein E in thermophoretic analyses, to confirm that the aptamers indeed bind to this protein, verify the binding profile, and calculate the dissociation constants. We also performed the assays with the intact virus to confirm the aptamer-target specificity, using a Dengue virus pool as a control (see next section).

Having confirmed the interaction of the selected aptamers with the E protein, molecular dynamics simulation between the aptamers and ZIKV E protein was performed using the HDOCK server. HDOCK performs global docking to predict binding complexes between two molecules using a hybrid docking strategy.

We analyzed the first 10 predictions and eliminated those that interacted in the unexposed part of the protein, facing the transmembrane region of protein E of ZIKV. Among the models linked to the outer surface of the protein, we selected the one with the lowest docking score. For aptamers ZK01 and ZK02, model 1 was selected. The aptamers ZK03 and ZK04 presented model 3 as the model with the lowest energy that met the pre-established parameters. Figure 8 shows the sites of interaction between each aptamer and the dimeric E protein.

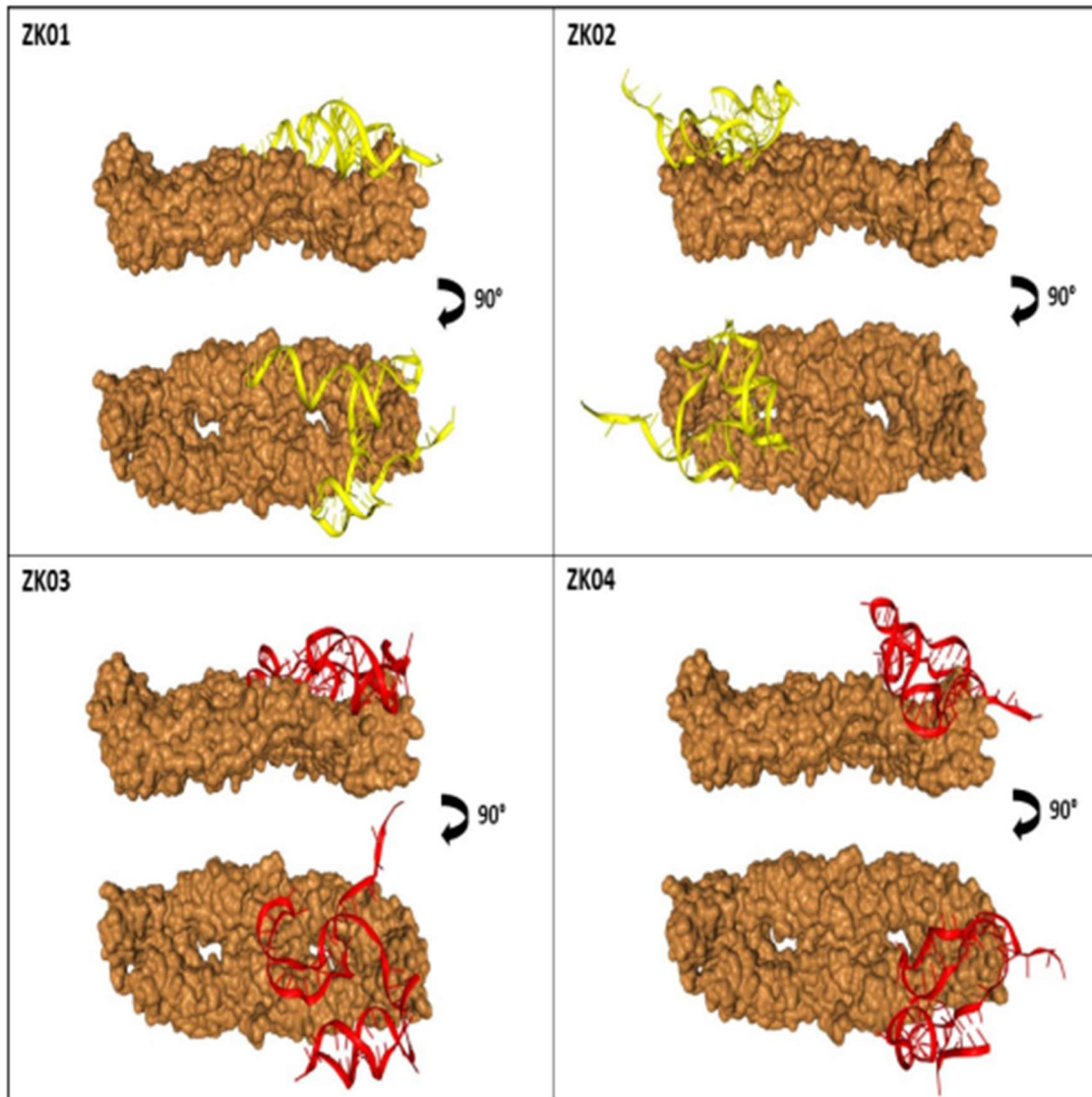


Figure 8. Molecular dynamics simulation of the selected aptamers and dimeric ZIKV E protein by the HDOCK server. Protein E is represented at two angles: the first, showing the aptamer binding on the outside of the protein; the second, with a 90° rotation, detailing the exact location of interaction.

It is observed that all aptamers present binding sites on two adjacent monomers of the same E-dimer (Figure 8 and Table 1).

Table 1. Docking position of aptamers in the E protein.

ZK01		ZK02		ZK03		ZK04	
aa	Position [#]	aa	Position [#]	aa	Position [#]	aa	Position [#]
SER	64A	MET	68A	ARG	2A	ER	306A
SER	66A	ALA	69A	VAL	46A	THR	309A
GLN	89A	SER	70A	THR	47A	ALA	310A
LYS	118A	ASP	71A	GLU	62A	ALA	311A
PHE	119A	SER	72A	SER	64A	THR	313A
ALA	120A	ARG	73A	SER	122A	PHE	314A
CYS	121A	TYR	81A	LYS	123A	THR	315A
SER	122A	ASP	83A	LYS	124A	ILE	317A
LYS	123A	GLY	102A	ARG	138A	GLN	331A
LYS	124A	ASN	103A	MET	140A	TYR	332A
GLY	145A	HIS	249A	GLU	162A	ALA	333A
SER	146A	ALA	250A	LYS	166A	GLY	334A
GLU	162A	LYS	251A	ASN	207A	THR	335A
ASN	163A	ARG	252A	GLU	262A	ASP	336A
ARG	164A	ARG	2B	ARG	283A	GLU	367A
GLY	182A	HIS	27B	THR	313A	SER	368A
ASP	230A	VAL	46B	PHE	314A	THR	369A
THR	231A	THR	47B	THR	315A	GLU	370A
GLY	232A	MET	140B	GLN	331A	ASN	371A
THR	233A	SER	146B	GLU	367A	SER	70B
PRO	234A	GLU	162B	GLU	370A	ASP	71B
TRP	236A	ASN	163B	ASN	371A	SER	72B
ASP	278A	ARG	164B	LYS	373A	ARG	73B
GLY	279A	LYS	166B	GLU	62B	CYS	74B
ARG	283A	ASP	278B	ALA	63B	THR	76B
LYS	301A	ARG	283B	SER	64B	GLN	77B
THR	309A	LYS	301B	ILE	65B	GLY	78B
ALA	310A	VAL	303B	SER	66B	GLU	79B
ALA	311A	TYR	305B	ASP	67B	TYR	81B
THR	313A	GLN	331B	MET	68B	LEU	82B
PHE	314A	THR	335B	GLN	77B	ASP	83B
THR	315A	PRO	338B	TYR	90B	GLY	104B
ILE	317A	THR	366B	TRP	101B		
GLN	331A	GLU	367B	GLY	102B		
ALA	333A	SER	368B	ASN	103B		
GLY	334A	THR	369B	LYS	118B		
THR	335A	GLU	370B	SER	122B		
VAL	364A	ASN	371B	LYS	251B		
THR	366A	SER	372B	ARG	252B		
GLU	367A	LYS	373B	THR	254B		
SER	368A			VAL	255B		
THR	369A			VAL	256B		
GLU	370A			VAL	257B		
ASN	371A			LEU	258B		
SER	372A			SER	260B		
LYS	373A						
MET	374A						
MET	375A						
LYS	394A						
ARG	73B						
CYS	74B						
GLN	77B						
TYR	81B						
ASP	83B						
GLY	104B						

[#] A = monomer A; B = monomer B.

3.6. ELISA

An in-house ELISA/ELASA was used as a screening tool to assess the performance of the ZK01, ZK02, ZK03, and ZK04 aptamer clusters. Aptamers were tested against the serial dilution of Zika virus at base 10. Optical density data demonstrated that all sequences were only able to recognize Zika virus at a dilution of 5×10^6 PFU/mL (Figure 9).

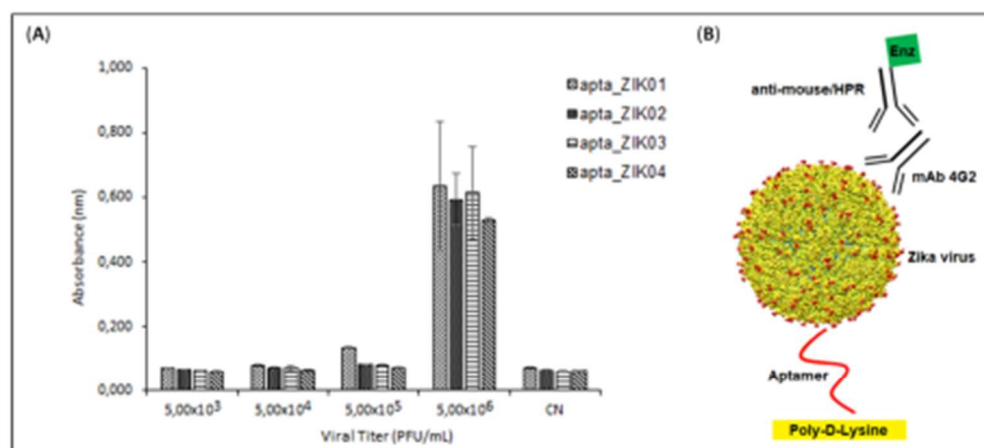


Figure 9. In-house ELISA: (A) Reactivity of the four aptamer clusters with the ES 2916/2015 Zika virus and negative control (no virus); and (B) Schematic representation of the test.

3.7. Microscale Thermophoresis

Identification and quantification of interactions between ZIKV and aptamers was analyzed by microscale thermophoresis (MST) using a NanoTemper Monolith NT.115 apparatus, aiming to determine the dissociation constants (K_d) and confirm the specificity of the aptamers.

Labeling of the E-ZIKVre protein was performed with reactive dyes using N-Hydroxy-succinimide (NHS)-ester chemistry, which reacts efficiently with the protein's primary amines to form highly stable dye-protein conjugates. The efficiency of the labeling step was evaluated by preliminary tests available on the equipment, and the intensity of gross fluorescence within the detection limit could be verified. After the preliminary test, the binding check test was performed to assess whether there was a detectable response amplitude between the target (labeled E-ZIKVre protein) and the ligands (aptamers) at the maximum concentration available. In this test, one can select the best assay buffer for the protein, targeting an optimal MST binding assay. With this, it was possible to evaluate the conditions of protein aggregation, adsorption in the capillaries, fluorescence intensity, and homogeneity to obtain a higher signal/noise ratio and establish the assay conditions to carry out the quantification of the affinity through the binding affinity test.

To investigate the binding affinity between E protein and Zika virus aptamers, 20 nM of the labeled protein (target) and serial dilutions (50–1.53 nM) of the four aptamers were used. As shown in Figure 10, the binding affinity of aptamer ZK01 for E-ZIKVre ($K_d = 1414.90 \pm 0.41$ nM) was slightly higher than for the other aptamers with the greater homology (ZK02 $K_d = 761.54 \pm 0.49$ nM; ZK03 $K_d = 919.26 \pm 0.68$ nM; ZK44 $K_d = 820.98 \pm 0.34$ nM) (Figure 10).

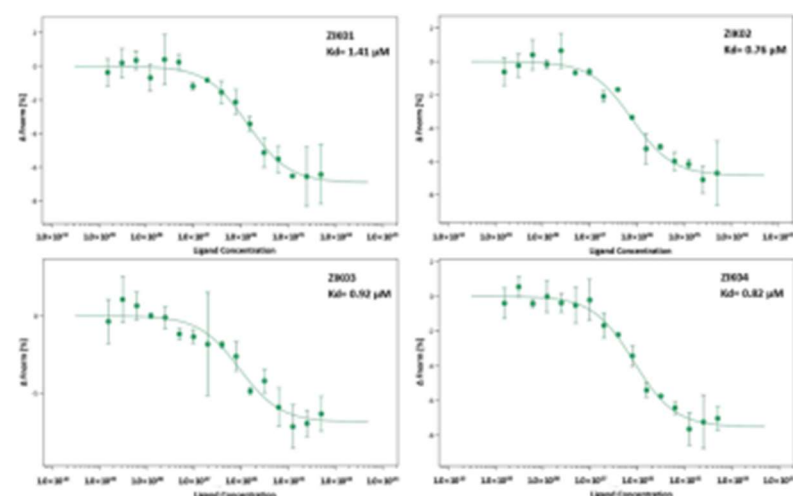


Figure 10. Thermophoretic assay to compare affinity between aptamers and E-ZIKVre protein. MST parameters: target concentration: 20 nM; ligand concentration: 50 μM –0.00153 μM ; excitation power: 76%; temperature: 25 $^{\circ}\text{C}$.

The evaluation of the specificity of the aptamers was verified using a pool of Dengue serotypes in comparison with the Zika virus, as DENG is well-known to cross-react with Zika in many diagnostic tests. According to Figure 11, the variation in the concentrations of the DENG pool did not change the normalized fluorescence response, which suggests no interaction in the concentration range evaluated. On the other hand, the variation of ZIKV concentration caused an increase in the response at higher concentrations, which indicates the presence of intermolecular interaction between aptamers and ZIKV (Figure 11). As there was no complete saturation of the curve, due to insufficient viral titers, the dissociation constant (Kd) could not be calculated.

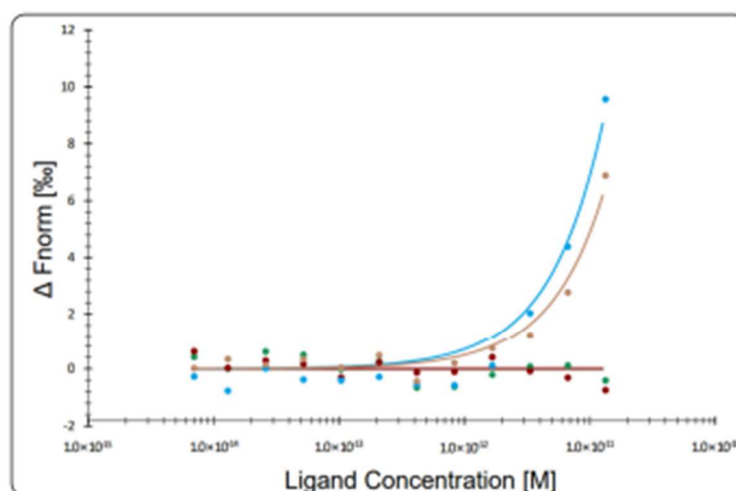


Figure 11. Thermophoretic assay to compare affinity between aptamers and Zika virus (ZIKV) and Dengue virus (DENG) particles. The figure shows the plot of baseline-corrected normalized fluorescence (ΔF_{norm}) (%) versus ligand concentration, in a heating time of five seconds.

4. Discussion

Aptamers have been extensively used in the study of arbovirus with some very interesting results, both for diagnostic and therapeutic applications, which have been recently reviewed by our group [32]. Particularly in the area of diagnostics, they have been capable of separating between different Dengue serotypes, but have also been applied for ZIKV, tick-borne encephalitis virus (TBEV), Rift Valley fever virus (RVFV) and Chikungunya Virus (CHIKV) with considerable success [32]. In the case of previous Zika studies using aptamers, the authors used the NS1 protein as a target, and in most cases, their selected aptamers are not capable of differentiating between ZIKV and DENV NS1 proteins, with one exception [32]. In this study, we are presenting for the first time aptamers selected against the whole viral particle, verifying its binding to the whole virus and the E protein specifically, and demonstrating the specificity of that aptamer and its capacity to differentiate between Zika and dengue viruses.

Several studies in the literature have reported the expression of structural and non-structural flavivirus proteins using the *E. coli* prokaryotic system [33–36]. This system has the advantage of enabling high levels of expression at a relatively low cost. The flavivirus envelope protein is the most abundant on the surface of the viral particle. Despite the system's limitation in carrying out post-translational modifications, such as glycosylation, immunogenicity assays using flavivirus envelope proteins produced in the prokaryotic system demonstrated the ability of this protein to induce the formation of neutralizing antibodies [37,38], indicating the conservation of antigenic epitopes.

The recombinant protein E-ZIKVre was expressed in the form of inclusion bodies, as shown in other works in the literature [33,37]. Yields of E-ZIKV protein expression in the prokaryotic system of 0.55 mg/mL and 10 mg/L were reported by Han et al. [37] and Liang et al. [39], respectively. In this work, we obtained a final yield after purification of 37 mg/L of culture at a final concentration of 0.76 mg/mL with a purity > 90%, demonstrating the efficiency of the strategy used.

Although different strategies have been adopted for the selection of aptamers against different arboviruses, as shown above [32], their binding affinity can be influenced by the stringency of the selected conditions, such as, for example, reducing the target concentration or modifying the binding and washing conditions [40]. In this work, we used a protocol based on the interruption of interactions formed between the aptamer and the target using buffers with a high salt content and chaotropic agents. In a previous study carried out by Simmons et al. [41], using the same selection conditions, high homology was observed in the sequences generated in both 1.5 M NaCl and 3 M NaSCN elutions, and the performed assays confirmed binding with the target. In our experiments, in addition to the use of the same elution conditions, we introduced negative rounds of selection against the yellow fever virus and the different dengue serotypes, aiming to select not only the highest binding aptamers, but the ones that were only specific to Zika virus and not for other circulating flaviviruses in the country. We used aptamers resulting only from the 3 M NaSCN elution and we achieved the formation of four aptamer clusters and a highly conserved region of 22 nucleotides and a subset of complete sequence identity, indicating a core sequence necessary for binding, with some variability permitted in the formation of the additional binding loop.

The affinity of the specificity of the aptamers for the ZIKV viral particles was studied by ELISA and microscale thermophoresis, confirming the ability of the aptamers to recognize both the entire viral particle, and the E protein in particular. In the ELISA assay, the negative charge on the DNA backbone, due to the phosphates, makes it difficult for aptamers to adhere to polystyrene plates. A practical and inexpensive alternative is the use of polylysine to modify the surface charge of the bottles and plates for cell culture [42] and plates for enzyme assays [43]. We developed an in-house ELISA with polylysine-coated plates that permitted the immobilization of aptamers in order to perform the ELISA assays. Using this method, we demonstrated that the aptamers were capable of recognizing the ZIKV in ELISA assays. The sensitivity of the assay could potentially be improved, as it is

understood that the use of lysine permits de deposition of the aptamers in a disorderly manner, not optimizing the exposure of the aptamer binding sites. Alternative methods of immobilization using biotin–streptavidin systems, or gold nanoparticles with thiol-modified aptamers could improve the performance of the system and permit direct use in immunochromatography-based tests. Nevertheless, our current results permit the verification of the aptamers to bind to whole viral particles. This was further confirmed in the MST, where it was possible to identify not only the interaction of the aptamers to ZIKV, but also the inability of the aptamer to interact with DENG V particles at the same viral count.

Finally, it was supposed that the most probable target on the viral particle surface would have been the E protein. This was verified by MST, where the affinity of the aptamer for a recombinant purified ZIKV E protein was calculated. Post-SELEX modifications with functional groups have been described to optimize the detection (fluorescent molecules) or immobilization (biotin, amine) of aptamers [40]. In the development of this project into a viable diagnostic, we aimed to investigate post-SELEX modification to increase aptamer affinity, as well as optimize the assay development format to take advantage of the capability of the aptamer to bind to ZIKV and differentiate from DENG V particles, into developing novel diagnostic strategies for Zika virus infections.

Author Contributions: All authors listed have made a substantial, direct, and intellectual contribution to the work. More specifically, L.M.d.M. is the principal contributor in this work, having personally executed or participated in all aspects of the project. T.S.C. and M.A.M. were responsible for the expression and purification of the E protein, K.A.B.P. and P.B.J. offered support in the analytical techniques and the MST execution, training, and interpretation of the data. S.M.B.d.L. is responsible for the viral research laboratory and contributed to the production of the ZIKV, YFV, and DENG V used in this research. A.M.B.d.F. is the project supervisor who contributed to technical discussions and support on flavivirus, and the revision of the overall project. S.M. is the project supervisor, in addition to conducting the technical discussions and manuscript preparation, was responsible for the training and methodology of the aptamer selection. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro: E_18/2015—Research program on Zika, Chikungunya and Dengue in the State of RJ.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We acknowledge Dilson Silva, Henrique Francisco Rocha, Mariana Pierre de Barros Gomes, Noemi Rovaris Gardinali, Ygara da Silva Mendes, and Renata Chagas Bastos, for helpful technical support and discussions. This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro—FAPERJ.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest related to their research work.

References

- Dick, G.W.A. Zika virus (II). Pathogenicity and physical properties. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1952**, *46*, 521–534. [CrossRef]
- Dick, G.W.A.; Kitchen, S.F.; Haddock, A.J. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1952**, *46*, 509–520. [CrossRef]
- Duffy, M.R.; Chen, T.H.; Hancock, W.T.; Powers, A.M.; Kool, J.L.; Lanciotti, R.S.; Pretrick, M.; Marfel, M.; Holzbauer, S.; DuBray, C.; et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *360*, 2536–2543. [CrossRef]
- Cao-Lormeau, V.M.; Musso, D. Emerging arboviruses in the Pacific. *Lancet* **2014**, *384*, 1571–1572. [CrossRef]
- World Health Organization. Zika Epidemiology Update. July 2019. Available online: <https://www.who.int/emergencies/diseases/zika/zika-epidemiology-update-july-2019.pdf?ua=1> (accessed on 18 July 2019).
- Zanluca, C.; de Melo, V.C.A.; Mosimann, A.L.P.; dos Santos, G.I.V.; dos Santos, C.N.D.; Luz, K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2015**, *110*, 569–572. [CrossRef]

7. Castanha, P.M.S.; Marques, E.T.A. Vaccine development during global epidemics: The Zika experience. *Lancet Infect. Dis.* **2020**, *20*, 998–999. [CrossRef]
8. Lindenbach, B.D.; Rice, C.M. Molecular biology of flaviviruses. In *Advances in Virus Research*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2003; pp. 23–61. [CrossRef]
9. Kuno, G.; Chang, G.J.J. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Arch. Virol.* **2007**, *152*, 687–696. [CrossRef]
10. Kostyuchenko, V.A.; Lim, E.X.Y.; Zhang, S.; Fibriansah, G.; Ng, T.S.; Ooi, J.; Shi, J.; Lok, S.-M. Structure of the thermally stable Zika virus. *Nature* **2016**, *533*, 425–428. [CrossRef] [PubMed]
11. Sirohi, D.; Chen, Z.; Sun, L.; Klose, T.; Pierson, T.C.; Rossmann, M.G.; Kuhn, R.J. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science* **2016**, *352*, 467–470. [CrossRef] [PubMed]
12. Musso, D.; Cao-Lormeau, V.M.; Gubler, D.J. Zika virus: Following the path of dengue and chikungunya? *Lancet* **2015**, *386*, 243–244. [CrossRef]
13. Oehler, E.; Watrin, L.; Larre, P.; Leparc-Goffart, I.L.; Lastère, S.; Valour, F.; Baudouin, L.; Mallet, H.P.; Musso, D.; Ghawche, F. Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome—Case report, French Polynesia, December 2013. *Eurosurveillance* **2014**, *19*, 20720. [CrossRef] [PubMed]
14. Cao-Lormeau, V.M.; Blake, A.; Mons, S.; Lastère, S.; Roche, C.; Vanhonnwegen, J.; Dub, T.; Baudouin, L.; Teissier, A.; Larre, P.; et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: A case-control study. *Lancet* **2016**, *387*, 1531–1539. [CrossRef]
15. Schuler-Faccini, L.; Ribeiro, E.M.; Feitosa, I.M.L.; Horovitz, D.D.; Cavalcanti, D.P.; Pessoa, A.; Doriqui, M.J.R.; Neri, J.I.; Neto, J.M.D.P.; Wanderley, H.Y.; et al. Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly—Brazil, 2015. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2016**, *65*, 59–62. [CrossRef]
16. Coyne, C.B.; Lazear, H.M. Zika virus—Reigniting the TORCH. *Nat. Rev. Microbiol.* **2016**, *14*, 707–715. [CrossRef]
17. Kovacs, A.A.Z. Zika, the Newest TORCH Infectious Disease in the Americas. *Clin. Infect. Dis.* **2020**, *70*, 2673–2674. [CrossRef]
18. de Miranda-Filho, D.B.; Martelli, C.M.T.; de Ximenes, R.A.A.; Araújo, T.V.B.; Rocha, M.A.W.; Ramos, R.C.F.; Dhalia, R.; de Oliveira França, R.F.; de Azevedo Marques Júnior, E.T.; Rodrigues, L.C. Initial Description of the Presumed Congenital Zika Syndrome. *Am. J. Public Health* **2016**, *106*, 598–600. [CrossRef]
19. Oliveira Melo, A.S.; Malingier, G.; Ximenes, R.; Szejnfeld, P.O.; Alves Sampaio, S.; Bispo de Filippis, A.M. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: Tip of the iceberg? *Ultrasound Obstet. Gynecol.* **2016**, *47*, 6–7. [CrossRef]
20. Li, H.Y.; Jia, W.N.; Li, X.Y.; Zhang, L.; Liu, C.; Wu, J. Advances in detection of infectious agents by aptamer-based technologies. *Emerg. Microbes Infect.* **2020**, *9*, 1671–1681. [CrossRef]
21. Ma, X.; Chen, Z.; Zhou, J.; Weng, W.; Zheng, O.; Lin, Z.; Guo, L.; Qiu, B.; Chen, G. Aptamer-based portable biosensor for platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) with personal glucose meter readout. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *55*, 412–416. [CrossRef]
22. Gopinath, S.C.B.; Lakshmpriya, T.; Chen, Y.; Phang, W.M.; Hashim, U. Aptamer-based ‘point-of-care testing’. *Biotechnol. Adv.* **2016**, *34*, 198–208. [CrossRef]
23. Ellington, A.D.; Szostak, J.W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **1990**, *346*, 818–822. [CrossRef]
24. Tuerk, C.; Gold, L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* **1990**, *249*, 505–510. [CrossRef]
25. Jayasena, S.D. Aptamers: An Emerging Class of Molecules That Rival Antibodies in Diagnostics. *Clin. Chem.* **1999**, *45*, 1628–1650. [CrossRef]
26. Wang, C.H.; Chang, C.P.; Lee, G.B. Integrated microfluidic device using a single universal aptamer to detect multiple types of influenza viruses. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *86*, 247–254. [CrossRef]
27. Dunn, M.R.; Jimenez, R.M.; Chaput, J.C. Analysis of aptamer discovery and technology. *Nat. Rev. Chem.* **2017**, *1*, 76. [CrossRef]
28. Zuker, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 3406–3415. [CrossRef]
29. Jeddi, I.; Saiz, L. Three-dimensional modeling of single stranded DNA hairpins for aptamer-based biosensors. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1178. [CrossRef]
30. Dai, L.; Shi, Y.; Qi, J.; Gao, G.F. 5JHM: Crystal Structure of Zika Virus Envelope Protein. Protein Data Bank. Available online: <https://www.rcsb.org/structure/5jhm> (accessed on 13 June 2019).
31. Berman, H.M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T.N.; Weissig, H.; Shindyalov, I.N.; Bourne, P.E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235–242. [CrossRef]
32. Argondizzo, A.P.C.; Silva, D.; Missailidis, S. Application of Aptamer-based Assays to the Diagnosis of Arboviruses Important for Public Health in Brazil. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 159. [CrossRef]
33. Dai, L.; Song, J.; Lu, X.; Deng, Y.Q.; Musyoki, A.M.; Cheng, H.; Zhang, Y.; Yuan, Y.; Song, H.; Haywood, J.; et al. Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. *Cell Host Microbe* **2016**, *19*, 696–704. [CrossRef]
34. Fan, J.; Liu, Y.; Xie, X.; Zhang, B.; Yuan, Z. Inhibition of Japanese encephalitis virus infection by flavivirus recombinant E protein domain III. *Virol. Sin.* **2013**, *28*, 152–160. [CrossRef]

35. Tripathi, N.K.; Shrivastava, A.; Biswal, K.C.; Rao, P.V.L. Recombinant dengue virus type 3 envelope domain III protein from *Escherichia coli*. *Biotechnol. J.* **2011**, *6*, 604–608. [[CrossRef](#)]
36. Ganguly, A.; Malabadi, R.B.; Das, D.; Suresh, M.R.; Sunwoo, H.H. Enhanced Prokaryotic Expression of Dengue Virus Envelope Protein. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2013**, *16*, 609–621. [[CrossRef](#)]
37. Han, J.F.; Qiu, Y.; Yu, J.Y.; Wang, H.J.; Deng, Y.Q.; Li, X.F.; Zhao, H.; Sun, H.-X.; Qin, C.-F. Immunization with truncated envelope protein of Zika virus induces protective immune response in mice. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 10047. [[CrossRef](#)]
38. Collier, B.A.G.; Clements, D.E.; Bett, A.J.; Sagar, S.L.; ter Meulen, J.H. The Development of Recombinant Subunit Envelope-Based Vaccines to Protect against Dengue Virus Induced Disease. *Vaccine* **2011**, *29*, 7267–7275. [[CrossRef](#)]
39. Liang, H.; Yang, R.; Liu, Z.; Li, M.; Liu, H.; Jin, X. Recombinant Zika virus envelope protein elicited protective immunity against Zika virus in immunocompetent mice. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0194860. [[CrossRef](#)]
40. Stoltenburg, R.; Reinemann, C.; Strehlitz, B. SELEX—A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomol. Eng.* **2007**, *24*, 381–403. [[CrossRef](#)]
41. Simmons, S.C.; McKenzie, E.A.; Harris, L.K.; Aplin, J.D.; Brenchley, P.E.; Velasco-Garcia, M.N.; Missailidis, S. Development of Novel Single-Stranded Nucleic Acid Aptamers against the Pro-Angiogenic and Metastatic Enzyme Heparanase (HPSE1). *PLoS ONE* **2012**, *7*, e37938. [[CrossRef](#)]
42. Wang, J.; Tian, L.; Chen, N.; Ramakrishna, S.; Mo, X. The cellular response of nerve cells on poly-L-lysine coated PLGA-MWCNTs aligned nanofibers under electrical stimulation. *Mater. Sci. Eng. C* **2018**, *91*, 715–726. [[CrossRef](#)]
43. Stearns, N.A.; Zhou, S.; Petri, M.; Binder, S.R.; Pisetsky, D.S. The Use of Poly-L-Lysine as a Capture Agent to Enhance the Detection of Antinuclear Antibodies by ELISA. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0161818. [[CrossRef](#)]