ANDERSON PEREIRA SOARES

Mapeamento de epitopos das proteínas do vírus Zika na interação materno-infantil pelo método de Spot-synthesis.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2018

ANDERSON PEREIRA SOARES

Mapping Zika virus epitopes obtained by spot-synthesis method using sera from infected mothers and their newborns.

Dissertation presented to the postgraduate program of Microbiology of the Institute of Biomedical Sciences of the University of São Paulo, to obtain the degree of Master in Science.

São Paulo
2018

ANDERSON PEREIRA SOARES

Mapeamento de epitopos das proteínas do vírus Zika na interação materno-infantil pelo método de Spot-synthesis.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Paolo Marinho de Andrade Zanotto

Versão original

São Paulo
2018

ANDERSON PEREIRA SOARES

Mapping Zika virus epitopes obtained by spot-synthesis method using sera from infected mothers and their newborns.

Dissertation presented to the postgraduate program of Microbiology of the Institute of Biomedical Sciences of the University of São Paulo, to obtain the degree of Master in Science.

Concentration area: Microbiology

Advisor: Prof. Dr. Paolo Marinho de Andrade Zanotto

Original Version

São Paulo
2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Pereira Soares, Anderson

Mapeamento de epítomos das proteínas do vírus Zika na interação materno-infantil pelo método de Spot-synthesis. / Anderson Pereira Soares; orientador Paolo Marinho de Andrade Zanotto. -- São Paulo, 2018.

69 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Zika virus. 2. Spot-synthesis. 3. Mapeamento de epítomos. I. Marinho de Andrade Zanotto, Paolo , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato: Anderson Pereira Soares

Título da Dissertação: **Mapeamento de epitopos das proteínas do vírus Zika na interação materno-infantil pelo método de Spot-synthesis.**

Orientador: Prof. Dr. Paolo Marinho de Andrade Zanotto

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:.....
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Mapeamento de epítomos das proteínas do vírus zika na interação materno-infantil pelo método de Spot-synthesis.

Pesquisador: Paolo Marinho de Andrade Zanotto

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 53311616.6.0000.5467

Instituição Proponente: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo - ICB/USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.540.927

Apresentação do Projeto:

Trata-se de emenda para substituição do título do projeto

Objetivo da Pesquisa:

não se aplica

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

não se aplica

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

não se aplica

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

não se aplica

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Solicitação aprovada

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado do CEP - ICB concorda com o parecer do relator em aprovar a emenda ao projeto. Cabe aos pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este comitê relatórios anuais (parciais ou final) de acordo com o item II, II.19 e II.20 da resolução 466/12 do Conselho Nacional da Saúde. Com relação às amostras biológicas, em não havendo ainda um biorepositório e se houver

Endereço: Av. Profª Lineu Prestes, 2415

Bairro: Cidade Universitária

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7733

CEP: 05.508-000

E-mail: cep@icb.usp.br

Dedico esta dissertação primeiramente ao meu avô Edison Pereira (*in memoriam*) que embora não pode acompanhar o trabalho, me ensinou a ser uma pessoa melhor e ter força para conseguir concluir essa dissertação.

Dedico também a minha mãe Roseli Aparecida Pereira, meu irmão Rafael Pereira Soares e minha namorada Mariana Vieira Fini, os quais não me permitem fraquejar e dia após dia são minha motivação de poder realizar meus objetivos.

Sem meu orientador Prof. Dr. Paolo Marinho de Andrade Zanotto, este trabalho não seria possível, então dedico essa dissertação meu mentor. Obrigado pela confiança, paciência, incentivo, amizade e excelente orientação.

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

Inicialmente, esse trabalho não seria possível sem a orientação de meu mentor o Professor. Dr. Paolo Marinho de Andrade Zanotto. Gostaria de expressar minha gratidão por me receber tão bem em seu laboratório e me conceder essa incrível oportunidade de trabalhar na sua ótima equipe de cientistas, agradeço por confiar, ajudar e me encorajar a desenvolver o trabalho, o qual, no início, pela minha falta de experiência me parecia impossível. Obrigado por me guiar com sua mente brilhante e com os melhores conselhos para que eu tomasse a melhor decisão no decorrer do trabalho. É uma honra ser seu aluno.

Sou grato a incrível equipe científica do laboratório de Evolução Molecular e Bioinformática (LEMB), aqueles com quem tive o prazer de trabalhar durante estes dois anos, gostaria de agradecer a todos os meus companheiros de laboratório: Daniel, Atila, Carla e Nicholas.

Muitos agradecimentos especiais aos meus geniais amigos Shahab, Dino e Marielton, que foram pessoas essenciais durante a minha estada no laboratório.

Muito obrigado aos Professores Edison Durigon, Saulo Passos e Armando Ventura, por me fornecerem amostras presentes neste trabalho me aconselhar muito em minha qualificação.

Agradeço também aos Professores Carlos Bonafé e Carlos Olorteghi, pela síntese da membrana e ajuda na execução dos protocolos corretamente, sem eles este trabalho também não seria possível.

Devo expressar minha gratidão a minha mãe a meu irmão e minha namorada, pelo seu apoio, incentivo e acreditarem em minha capacidade, muito obrigado.

AGRADECIMENTOS FINANCEIROS

Gostaria de agradecer à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por me conceder bolsa de estudos durante dois anos, possibilitando a realização deste trabalho.

Este estudo também não seria possível, sem os fundos recebidos da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

“A grandeza não consiste em receber honras, mas em merece-las”

Aristóteles

Resumo

SOARES, AP Mapeamento de epitopos das proteínas do vírus Zika na interação materno-infantil pelo método de Spot-synthesis. [Dissertação (Mestrado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2018.

O Vírus Zika é um arbovírus pertencente à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*, é constituído por RNA de cadeia simples senso positivo e foi primeiramente descrito em 1947 na floresta de Ziika, em Uganda. Este estudo, visa mapear os epitopos do Vírus Zika (ZIKV), experimento que nos permite avaliar e compreender a resposta imune do hospedeiro contra o vírus por meio da detecção de regiões imunodominantes nas proteínas virais. O processo de identificação dos epitopos de ZIKV foi realizado pela técnica de *spot synthesis*, que se baseia em arranjos de peptídeos relacionados às proteínas do ZIKV. Amostras de soro de pacientes residentes em áreas endêmicas de arboviroses, mães e bebês que apresentaram sintomatologia típica foram selecionadas e triadas pelo método de ELISA e PCR real time. Sequências de referência do vírus foram submetidas a análises *in silico*, para a determinação das áreas de interação na superfície da proteína e suas características antigênicas, para efeito de comparação com a resposta observada pelas amostras. Os experimentos evidenciaram uma alta antigenicidade nas proteínas estruturais do vírus, e em nas não-estruturais 1,3 e 5.

Palavras-chave: Zika, *Spot-synthesis*, Mapeamento de epítomos.

Abstract

SOARES, AP. Mapping of epitopes of Zika virus proteins in maternal-infant interaction by the Spot-synthesis method. [Master Dissertation (Microbiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2018.

The Zika virus is an arbovirus belonging to the genus *Flavivirus* of the *Flaviridae* family. It consists of single-stranded positive-sense RNA and was first described in 1947 in the Ziika Forest in Uganda. This study aims to map the Zika virus (ZIKV) epitopes, in an experimental design that allows us to evaluate and understand the immune response of the host against the virus by detecting immunodominant regions in the viral proteins. The process of identification of the ZIKV epitopes was performed by the spot synthesis technique, which is based on peptide arrangements related to the ZIKV proteins. Serum samples from patients living in arboviruses endemic areas, mothers and infants presenting typical symptoms were selected and screened by ELISA and real time PCR. Reference sequences of the virus were submitted to *in silico* analyzes to determine the interaction areas on the surface of the protein and its antigenic characteristics, for comparison with the response observed by using serum samples. The experiments demonstrated a high antigenicity in the structural proteins of the virus, and in the non-structural proteins 1, 3 and 5.

Keywords: Zika, *Spot-synthesis*, epitope mapping

Lista de figuras

Figura 1: árvore filogenética mostrando linhagens africanas e asiáticas do vírus Zika, incluindo as cepas que surgiram recentemente no Pacífico e no Brasil. Zika Virus	18
Figura 2: ilustração esquemática das proteínas estruturais e não estruturais do vírus Zika, suas funções e como estão organizadas no genoma viral.....	19
Figura 3: ilustração das etapas do ciclo de replicação do vírus Zika.....	19
Figura 4: distribuição do vírus de acordo com a atividade de transmissão.....	21
Figura 5: modelagem por homologia e predição de epitopos das proteínas não-estruturais do ZIKV.....	52
Figura 6: modelagem por homologia e predição de epitopos das proteínas estruturais do ZIKV.....	53

Lista de tabelas

Tabela 1: tabela da sintomatologia dos pacientes de Jundiaí.....	35
---	----

Lista de abreviações e símbolos

Arbovirus - athropod borne vírus
ABTS - ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
BLAST - Basic Local Alignment Search Tool (GenBank)
CDC - Center for Disease Control and Prevention
DENV - Dengue Vírus
ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Fmoc-L - 9-fluorenilmetoxycarbonila
kDa - Kilodalton
NS1 – proteína não-estrutural 1
NS2A - proteína não-estrutural 2A
NS2B - proteína não-estrutural 2B
NS3 - proteína não-estrutural 3
NS4A - proteína não-estrutural 4A
NS4B - proteína não-estrutural 4B
NS5 - proteína não-estrutural 5
PDB - formato do arquivo (Protein Data Bank)
PCR - Polimerase Chain Reaction
PRNT - Plaque-Reduction Neutralization Test
pr/M - complexo de proteínas pré-membrana/membrana
RT-PCR - Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
SNC - sistema nervoso central
TMB - tetra-metil-benzidina
ZIKV – Zika vírus

Sumário

1 Introdução	17
1.1 Zika vírus	17
1.2 Epidemiologia	20
1.3 Manifestações clínicas e complicações	23
1.3.1 Microcefalia	24
1.3.2 Diagnóstico de microcefalia	25
1.3.3 Diagnóstico etiológico e diferencial de microcefalia	26
1.4 Diagnóstico laboratorial	27
1.5 Mapeamento de epitopos	27
1.6 Bioinformática	29
2 Justificativa	29
3 Objetivo	30
3.1 Objetivos específicos	30
4 Materiais e métodos	30
4.1 Coleta de amostras	30
4.2 Síntese de peptídeos em membrana – spot synthesis	31
4.2.1 Regeneração da membrana	32
4.3 Enzyme-Linked Immunosorbment Assay (ELISA)	32
4.3.1 ELISA IgG	33
4.4 PCR Real-time	33
4.5 Bioinformática	33
5 Resultados	34
5.1 Mapeamento	34
5.2 Amostras Jundiaí (grupo I)	35
5.2.1 Amostras 87 mãe e filho	35
5.2.2 Amostras 128 mãe e filho	40
5.3 Pool de mães e filhos (grupo II)	45
5.4 Pool de amostras IgG positivas para DENV	49
5.5 Análise da somatória das respostas obtidas nas amostras	49
5.6 Predição de epitopos e modelagem por homologia	50

6 Discussão e conclusão.....	55
7 Referências bibliográficas.....	61

1 Introdução

1.1 Vírus Zika

Em meados de 2015 um surto de etiologia desconhecida foi reportado no nordeste do Brasil, os acometidos apresentavam sintomas difusos, como por exemplo, febre leve, dores musculares e de cabeça, exantema e conjuntivite, mas o diagnóstico clínico era limitado. Estas manifestações levantaram suspeitas para arboviroses endêmicas da região, tais como Dengue e Chikungunya, entretanto, após a execução de testes moleculares, constatou-se que a infecção era causada por um vírus ainda não reportado em território nacional, começavam os relatos de Zika vírus (ZIKV) no Brasil (1).

Esse vírus é transmitido por artrópodes, ou seja, um “arthropod borne virus” (arbovírus) e foi primeiramente isolado na floresta de Ziika, localizada perto de Kampala capital de Uganda, de onde deriva seu nome. Foi identificado pela primeira vez em macacos sentinela *Rhesus* em Abril de 1947 num campo de investigação de febre amarela, onde um dos macacos que apresentou febre foi coletado e submetido a análises que constatarem a infecção por esse novo patógeno o ZIKV. Em Janeiro do ano seguinte o ZIKV foi isolado em mosquitos da espécie *Aedes Africanus* (1,2). Posteriormente em 1952 em Uganda e também na Tanzânia ocorreu o primeiro isolamento do ZIKV em seres humanos, e a confirmação experimental da transmissão do vírus para camundongos e macacos se deu em 1956 (2,3).

O ZIKV, é um vírus pertencente à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*, gênero tal que inclui outros vírus de grande relevância clínica como, os vírus da dengue, febre amarela, febre do oeste do Nilo e encefalite de St. Louis (4,5).

Fonte: mr.asm.org/content/29/3/487.figures-only

Figura 1: árvore filogenética mostrando linhagens africanas e asiáticas do vírus Zika, incluindo as cepas que surgiram recentemente no Pacífico e no Brasil que são de origem asiática.

O ZIKV tem simetria icosaédrica, com um tamanho de ~50 nm, e está envolto por um envelope lipídico. Seu genoma está classificado no grupo IV pela classificação de Baltimore, pois é constituído por uma molécula de RNA com cadeia simples de senso positivo, de aproximadamente 11 mil pares de base, com duas regiões não codificantes e uma longa fase de leitura que codifica uma poliproteína de quase 3900 aminoácidos. Essa é clivada por proteases da célula hospedeira para originar a proteína C do capsídeo, o precursor de membrana (prM), a proteína E do envelope, e sete proteínas não estruturais, classificadas como NS1, NS2A e B, NS3, NS4A e B e NS5. A superfície dos vírions é formada pelas proteínas E e M. A proteína E (~53 kDa) é glicosilada, e tem como funções de ligação a receptores celulares, permitindo a fusão pH-mediada entre o envelope viral e a membrana endosomal intracelular após a penetração viral na célula infectada que segue o contato do vírion com receptores extracelulares (4,6).

Fonte: www.elsevier.es/en-revista-medicina-universitaria-304-articulo-the-zika-virus-disease-an

Figura 2: ilustração esquemática das proteínas estruturais e não estruturais do vírus Zika, suas funções e como estão organizadas no genoma viral.

Fonte: www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166354208003124?via%3Dihub

Figura 3: ilustração das etapas do ciclo de replicação do vírus Zika.

O vírus é transmitido principalmente por mosquitos do gênero *Aedes*, dentre eles, o *A. aegypti*, *A. africanus*, *A. albopictus*, *A. furcifer* e *A. taylori*. O ciclo urbano é mantido pelo *A. aegypti* (com possível envolvimento do *A. albopictus*) e o ciclo silvático é realizado pelas outras três espécies (2,7).

Preferencialmente o ZIKV mantém um ciclo silvático, onde ocorre em macacos e mosquitos, mas anticorpos contra o vírus também foram encontrados em outros mamíferos, como por exemplo, búfalos, elefantes, bodes, ovelhas, hipopótamos, leões, gnus, zebras e roedores. A transmissão para os seres humanos em regiões onde predomina o ciclo silvático é acidental, já em regiões onde existem poucos primatas não humanos, a transmissão torna-se ativa e o ser humano o principal hospedeiro e reservatório do vírus, o que é observado no ciclo urbano (7).

1.2 Epidemiologia

No período de Maio a Novembro de 2015, dezoito dos vinte e sete estados do país reportaram casos de infecções por ZIKV, essa nova epidemia chamou a atenção do mundo para o Brasil pois, concomitantemente às infecções, ocorreu um aumento nos casos de microcefalia na região, posteriormente modelos experimentais confirmaram a relação entre o vírus e a microcefalia. As hipóteses propostas da entrada do vírus no país consideram o período de Janeiro à Julho de 2014 como o período mais provável para tal evento, e até o presente momento já foram relatados casos de Zika nas Américas do sul, central, Estados Unidos e Europa (2,8).

A primeira epidemia conhecida causada por ZIKV fora do continente africano ocorreu em 2007 na Micronésia, com o relato de 99 casos da doença confirmados em aproximadamente dois meses, um surto subsequente ocorreu também em 2013 na Polinésia Francesa, alarmando assim as autoridades de saúde para o potencial de espalhamento da infecção, neste período ocorreu um aumento dos casos de microcefalia, os quais na época não (2–4).

Fonte: <https://www.cdc.gov/zika/geo/index.html>

Figura 4: distribuição mundial do ZIKV de acordo com a atividade de transmissão.

A primeira epidemia conhecida causada por ZIKV fora do continente africano ocorreu em 2007 na Micronésia, com o relato de 99 casos da doença confirmados em um período de aproximadamente dois meses. Um surto subsequente ocorreu em 2013 na Polinésia Francesa, alarmando assim as autoridades de saúde para o potencial de espalhamento da infecção. Neste período ocorreu um aumento dos casos de microcefalia, os quais na época não foram detectados. Somente após o reconhecimento do surto de microcefalia no Brasil em 2015 que as autoridades de saúde no Taiti revisitaram mulheres que estiveram grávidas e foram infectadas em 2013 e confirmaram casos de crianças nascidas com microcefalia (2,4,9). Estes dados são relevantes pois indicam que a capacidade do vírus de causar uma síndrome congênita antecede sua chegada ao Brasil.

O ZIKV era entendido como um vírus de pouca relevância clínica até então quando circulava apenas na África e Ásia e infectou principalmente primatas selvagens e mosquitos. Somente ocasionalmente o ZIKV causou infecção em humanos antes do surto de 2007 na ilha de Yap na República da Micronésia (10).

Pesquisadores africanos descreveram um padrão de espalhamento das infecções causadas pelo Zika e percebeu-se que ele tende a seguir o mesmo observado anteriormente com o vírus Chikungunya (CHIKV). Em suma, o padrão que se iniciou em 2013 quando Chikungunya se espalhou mundialmente agora ocorre com o Zika (11,12).

O ZIKV foi inicialmente associado no Brasil como uma síndrome “dengue-like”, pois as manifestações clínicas apresentadas são muito similares às causadas pelo vírus da dengue (DENV). Após a entrada do ZIKV no Brasil talvez em 2014, durante o segundo semestre de 2015, ocorreu um aumento dos casos de microcefalia na região nordeste do Brasil. A microcefalia é uma malformação congênita do sistema nervoso central, e a relação com as infecções por ZIKV foi demonstrada em modelos animais que mostraram redução na espessura do córtex cerebral dos filhotes de camundongos, e também experimentos *in vitro*, por meio da infecção de neuroesferas indicando a morte de células precursoras neuronais (13). Outra doença neurológica grave também foi relacionada a infecção, a síndrome de Guillain-Barré (GB ou Polirradiculoneurite aguda) (14), uma doença desmielinizante, que teve uma alta nos casos durante o período de epidemia de ZIKV, enfatizando a importância do entendimento dos mecanismos de infecção utilizados pelo vírus (13,15,16). No caso da infecção pelos ZIKV e CHIKV a síndrome de Guillain-Barré parece envolver a infecção de células do sistema nervoso periférico além de um componente autoimune.

Após o início dessa nova epidemia foi necessária uma grande mobilização dos pesquisadores brasileiros, criando várias forças tarefas no Brasil e no exterior. Nosso grupo participou efetivamente nos esforços para o treinamento de grupos de pesquisa, pesquisa na virologia básica, no desenvolvimento de vacinas e métodos diagnósticos mais específicos para a detecção do ZIKV. Apesar de todos os esforços para o

desenvolvimento de novas tecnologias, ainda cabe à prevenção da propagação do vetor, o papel crucial disponível para impedir o avanço do ZIKV (11).

1.3 Manifestações clínicas e complicações

As manifestações clínicas da infecção por ZIKV, são muito similares às apresentadas na infecção pelo DENV. Sendo assim, o diagnóstico clínico diferencial é limitado. Outro fato que dificulta o diagnóstico é que cerca de 80% das pessoas infectadas são assintomáticas (6,17,18).

Nos indivíduos sintomáticos, as manifestações clínicas variam, e podem durar de poucos dias até uma semana. Os sintomas são geralmente brandos e se caracterizam por início súbito de quadro febril, artralgia, exantema, rash maculopapular ou conjuntivite não purulenta. Formas graves da doença são raras, razão pela qual é incomum ocorrerem hospitalizações e óbitos (6,18,19). De acordo com diretrizes do CDC (Center for Disease Control and Prevention), a suspeita de infecção por ZIKV deve ocorrer quando dois ou mais sintomas (incluindo febre, rubores, artralgia ou conjuntivite) estão presentes durante ou no período de até duas semanas de estada em área endêmica do vírus (6,20).

1.3.1 Microcefalia

Após a associação da microcefalia com a infecção por vírus Zika (13), diversos estudos foram iniciados no intuito de evidenciar quais as possíveis modificações o ZIKV poderia ter sofrido para que sua infecção causasse tal alteração. Recentemente análises filogenéticas evidenciaram que uma substituição de aminoácidos (serina em asparagina, S139N) na proteína da membrana precursora viral exacerbou sintomas em camundongos. A mutação S139N, provavelmente surgiu em 2013 na Polinésia Francesa, antes do vírus saltar para o Brasil em 2015. Como observado em humanos previamente, *In vitro*, essa mudança de aminoácidos tornou o vírus mais infeccioso

para células progenitoras neurais de ratos e promoveu apoptose. A terrível seqüela da infecção durante a gravidez poderia, portanto, ser o resultado de uma mutação viral simples (21). No entanto outros fatores podem ter um papel relevante pois foi observado um aumento na adaptação para o uso de codons humanos no ZIKV asiático, o que facilitaria sua replicação (22).

A microcefalia consiste numa malformação congênita que afeta o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC). O desenvolvimento do SNC em humanos inicia na fase de gastrulação, em torno do 14º dia embrionário, quando ocorre um espessamento da membrana ectodérmica, que dará origem à placa neural. A partir daí, dois grandes processos vão correr de forma sequencial, a formação do tubo neural e o desenvolvimento do prosencéfalo (6,16,23,24).

A fase de proliferação neuronal é complexa e ampla, ocorre durante o 2º e 4º mês de gestação. Nesta fase temos não somente a proliferação neuronal, como também se inicia a geração das células radiais gliais. Esta fase se prolonga do 5º mês até o fim do 1º ano de vida, quando ocorre a proliferação glial. O processo inicial é caracterizado por células tronco da matriz germinativa que se dividem de forma simétrica, formam as unidades proliferativas neuronais-gliais, que se distribuem na zona periventricular. Após esta fase, inicia-se uma divisão assimétrica, na qual cada célula tronco dá origem a outra célula tronco e a uma célula neuronal pós-mitótica. Essa divisão assimétrica determina o tamanho da unidade proliferativa (6,23,24)

Os neurônios pós-mitóticos migram ao longo das glia radiais para formar as várias camadas do córtex cerebral. Cerca de 1/3 dos neurônios não usa o arcabouço da glia radial e migra de forma tangencial na direção cortical (6).

As alterações do desenvolvimento do córtex cerebral apresentam-se como um grupo de malformações distintas e com patogênese ainda não bem definida. Entre as

malformações corticais, um subconjunto de patologias tem sido associado a alterações na migração celular e à neurodiferenciação. Além das alterações na migração celular e neurodiferenciação, devem-se considerar outros fatores na patogênese das malformações corticais, tais como a proliferação celular, a morte celular, o crescimento e o desenvolvimento intracortical pós-migração e a formação dos axônios e dendritos (6,23,24).

1.3.2 Diagnóstico da microcefalia

A associação observada entre a infecção fetal pelo ZIKV e a ocorrência de microcefalia ao nascer tem elevado a importância de um diagnóstico preciso dessa malformação. A medida do perímetro cefálico ao nascer abaixo de dois desvios-padrão da média para a idade gestacional tem sido usada para o diagnóstico clínico de microcefalia. Apesar de ser um método simples e relativamente confiável para diagnóstico, a simples medida do perímetro cefálico pode não refletir um cérebro anormalmente pequeno e não oferece dados para evidenciar um formato anormal do crânio. Também é importante uma análise de proporcionalidade do perímetro cefálico em relação às outras medidas de crescimento do recém-nascido, como peso e comprimento, pois isso é importante na definição da suspeita sobre a etiologia da microcefalia (6,25–27). Apesar de ser uma medida objetiva, um estudo que verificou a variação entre diferentes observadores evidenciou diferenças de mais de 2 cm em 5% delas. Assim, é necessário o treinamento do pessoal que executa a medida e quando essa for limítrofe ou anormal, deve ser repetida (6,28).

Na presença de formas anormais de crânio por características familiares, genéticas ou pela modelação do crânio decorrente do processo de nascimento, a medida do perímetro cefálico pode ser enganosa e não refletir uma redução do tecido cerebral. Uma das sugestões para reduzir os diagnósticos errôneos de microcefalia

seria a repetição das medidas após um ou mais dias do nascimento, especialmente na presença de cavalgamento de suturas ao nascer juntamente com medidas limítrofes (5,19-22).

1.3.3 Diagnóstico diferencial etiológico das microcefalias

A patogênese da microcefalia é heterogênea, inclui de causas genéticas a fatores ambientais. Portanto, qualquer fator que possa interferir a proliferação e a diferenciação celular, pode induzir a microcefalia. Esses fatores podem afetar não somente o desenvolvimento do cérebro mas também comprometer outros sistemas (6).

As microcefalias congênitas adquiridas podem ser causadas por infecções maternas de diversos patógenos como, toxoplasmose, citomegalovírus, herpes vírus, sífilis, rubéola e a recentemente descrita a infecção por ZIKV. Exposição a drogas ou substâncias tóxicas e carências nutricionais também são fatores que podem causar microcefalia (6,25). Microcefalias congênitas genéticas podem estar associadas a doenças cromossômicas ou a determinados genes, como na microcefalia autossômica recessiva (29). Por sua vez, as microcefalias pós-natais são aquelas em que a criança nasce com perímetro cefálico normal, há uma desaceleração do crescimento craniano com o tempo, podendo ocorrer por fatores genéticos ou patológicos (25). Dada a importância adquirida pelo ZIKV devido a ser o agente causador de uma síndrome congênita tão grave e devido ao fato dele mostrar reatividade cruzada com o DENV (29), tornou-se imperativo o desenvolvimento de sistemas diagnósticos moleculares eficientes, rápidos e específicos.

1.4 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial da infecção por ZIKV baseia-se principalmente em testes de biologia molecular e sorológicos (30,31). A amplificação do RNA viral através da *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) pode ser feita em diversos materiais biológicos, como soro, leque, líquido amniótico, saliva e urina (32,33).

Devido à reatividade cruzada entre *Flavivirus*, a interpretação dos testes sorológicos para ZIKV, como Elisa IgM e IgG, hoje requerem uma validação pelo teste de redução de placas por soroneutralização (*Plaque-Reduction Neutralization Test* ou PRNT) (30).

O PRNT é muito usado no contexto de pesquisa básica e aplicada mas no entanto é laborioso, gasta muito tempo e não é prático no contexto clínico diagnóstico de saúde pública.

1.5 Mapeamento de epitopos

A identificação e uso de imunógenos em sistemas biológicos, *in vivo* são de grande importância na área da imunologia. Contudo a descoberta e, subsequentemente, o desenvolvimento de métodos para os sintetizar se tornou cada vez mais aplicada e explorada com um forte componente de uso de bioinformática para predição de potenciais moléculas de interesse (34–36). Esta área de pesquisa teve um forte incentivo em 1990, quando Ronald Frank apresentou no 21th *European Peptide Symposium* uma nova metodologia, rápida e eficaz, que consistia na síntese paralela de peptídeos múltiplos em membranas constituídas de celulose, logo após

esta apresentação o primeiro artigo abordando a técnica de *spot-synthesis* foi publicado (36–38).

O mapeamento de epítomos é fundamental na compreensão da interação entre os peptídeos e a ativação de resposta imune. Os epítomos são distinguidos conforme o tipo celular que os reconhece e processa a proteína alvo, como por exemplo, células dendríticas, macrófagos, linfócitos B e T por meio da apresentação por MHC de classe II (39). Epítomos podem ser lineares ou conformacionais, sendo os lineares dispostos linearmente em uma proteína (estrutura primária), já os conformacionais estão ligadas as estruturas secundárias, terciárias e quaternárias das proteínas (39,40). A técnica de mapeamento de epítomos possui inúmeras e importantes aplicações, como no desenvolvimento de bioensaios para o estudo das interações entre ligante e receptor.

O método também se aplica no desenvolvimento de kits diagnósticos baseados na tecnologia ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Também esta técnica pode se desdobrar no desenvolvimento de novas vacinas e melhoria de vacinas já existentes (39,40). Desta forma a produção de segmentos proteicos, peptídeos sintéticos, visa mimetizar o sistema de processamento e apresentação de antígenos, apresentando apenas regiões determinantes no reconhecimento do dado patógeno e direcionando a resposta de acordo com a estratégia empregada (36).

Aqui cabe esclarecer que apesar dos epítomos reconhecidos por imunoglobulinas serem principalmente conformacionais, por uma questão de praticidade, iniciamos este trabalho utilizando oligopeptídeos lineares de 15 amino ácidos de comprimento com uma sobreposição de cinco amino ácidos, os quais podem em princípio conter sequencias reconhecidas pela resposta humoral. Este enfoque também permitiu a prova de conceito da tecnologia implementada no laboratório durante esta fase deste trabalho.

1.6 Bioinformática

Diversos algoritmos são utilizados para a determinar potenciais epítomos, com base nas sequências dos antígenos. Este tipo de análise envolve cálculos baseados em tabelas de valores de propriedades biofísicas dos vinte aminoácidos que possibilitam calcular a probabilidade de ocorrência na superfície de proteínas ou como parte de estruturas secundárias. Os algoritmos mais difundidos, são validados contra bases de dados de epítomos determinados experimentalmente e comparados aos índices de acerto de cada predição (41).

O mapeamento de epítomos lineares ou conformacionais, se baseia em algoritmos que determinam scores por meio de análises das diferentes características da proteína alvo, como hidrofobicidade, flexibilidade, acessibilidade, e estrutura secundária (41–43). Como esclarecido acima, a predição de epítomos por métodos computacionais pode servir como base para o desenvolvimento de vacinas e testes diagnósticos. Muitos autores já utilizam ferramentas para a determinação de epítomos por métodos computacionais, inclusive no contexto ZIKA (41–43).

2 Justificativa

O seguinte projeto visa o mapeamento de epítomos das proteínas do vírus Zika, pelo método de *Spot-synthesis*, um experimento rápido, eficiente e crucial, pois permite um melhor entendimento na relação entre as proteínas antigênicas e a ativação da resposta imune. O mapeamento de epítomos tem diversas aplicações, a partir desta técnica poderemos desenvolver novos testes diagnósticos ou novas vacinas, como também, melhorar a eficácia de vacinas já existentes. Com os experimentos de mapeamento de epítomos podemos também determinar o perfil de resposta ao vírus do grupo analisado, e no desenvolvimento de novos métodos

diagnósticos do vírus. É importante ressaltar que os grupos de amostras aqui testados fazem parte de alguns trabalhos importantes já estão publicados, foram interpretados através do prisma da imunovirologia.

3 Objetivos

- Mapeamento de epitopos das proteínas do ZIKV e observação de possíveis padrões de reconhecimento antigênico produzidos pela população estudada.

3.1 Objetivos específicos

- Inferir a transmissão materno fetal de anticorpos.
- Evidenciar potenciais epitopos nas proteínas do ZIKV.

4 Materiais e métodos

4.1 Coleta de amostras

As amostras foram classificadas, catalogadas com nome, data de nascimento, sexo, data e hora da coleta e número de amostra, também para cada paciente foi gerado um banco de dados com toda a sintomatologia relatada.

A coleta das amostras foi feita por sistemas de tubos à vácuo, com período de garrote igual ou inferior a 1 minuto; em tubo seco, sem aditivos, 5 ml, com ou sem gel separador (tampa amarela ou vermelha), após observada a retração do coágulo as amostras foram centrifugadas à 3000 rpm por 10 minutos (44,45).

As amostras utilizadas neste trabalho, possuem positividade para IgG contra ZIKV, determinada por ELISA (Coôrte de Sergipe) e positividade para o vírus em urina e saliva determinadas por PCR (Coôrte Zika Jundiaí), já foi demonstrado que a detecção do ZIKV na urina e saliva, ocorre no período convalescente da doença, portanto foram selecionadas as amostras de mães e bebês de Jundiaí para os experimentos (46).

Para um controle negativo nos experimentos, foi utilizado um soro humano naïve (Sigma Aldrich, Germany), para verificar e subtrair reações inespecíficas dos anticorpos com alguns peptídeos na membrana.

4.2 Síntese de peptídeos em membrana – spot synthesis

A técnica de spot synthesis foi utilizada no intuito de obtermos uma grande variação no número de diferentes peptídeos. O uso de equipamentos de automação, permite uma redução no tamanho e número dos spots (35–38). Para esta etapa de síntese de membranas, contei com a colaboração do Prof. Dr. Carlos Francisco Sampaio Bonafé, docente da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), e com o Prof. Carlos Chavez Delphin Olorteghi da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Como informado anteriormente no texto, foram construídas matrizes de peptídeos sobrepostos com 15 e cinco aminoácidos de offset (sobreposição), derivados das sequências das proteínas do ZIKV, numa membrana de celulose. O acoplamento dos peptídeos foi realizado por meio de automação (ASP-222, Intavis). O ciclo de acoplamento é iniciado pela ligação do C-terminal do peptídeo a membrana de celulose, enquanto a porção N-terminal permanece não ligada.

Cerca de 50 nmol de cada peptídeo foram sintetizados no suporte de celulose por meio da técnica de química de aminoácidos Fmoc-L. Foi realizada também a acetilação N-terminal dos peptídeos para aumentar a sua estabilidade. Após a montagem das sequências peptídicas, os grupos protetores de cadeia lateral foram removidos por tratamento com ácido trifluoroacético (35–38).

Após realizado o acoplamento dos peptídeos, a membrana está apta para os testes. Primeiro é necessário realizar um passo de saturação da membrana, durante

a noite com tampão de bloqueio. Realizada a etapa do bloqueio o conjunto de peptídeos ligados à membrana é incubado com o soro teste diluído 1:100 durante 2h. A detecção dos anticorpos que se ligaram aos peptídeos é detectada utilizando um anticorpo anti-humano conjugado com fosfatase alcalina diluído a 1:2000 durante 1 hora (35–38).

Para a revelação dos anticorpos, adiciona-se um substrato de fosfatase, o fosfato de 5-bromo-4 cloro 3 indolilo (BCIP) e o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Sigma), que gera um precipitado azul ao ligar-se com o peptídeo-anticorpo (35–38).

4.2.1 Regeneração de membranas

As membranas podem ser reutilizadas até 50 vezes após o uso, para isso são submetidas a um tratamento de regeneração, que consiste em algumas lavagens com reagentes. As membranas são tratada com 3 vezes lavagens durante 10 min com dimetilformamida (DMF), seguido por outras 3 lavagens de 10 min cada com reagente A (ureia 8M + SDS a 1% + 2-mercaptoetanol a 0,1%) e mais 3 Lavagens de 10 min cada com reagente B (etanol/água/ácido acético nas proporções 50:40:10 vol/vol/vol). Como controle é efetuado um teste com o conjugado, ou seja, após o bloqueio da membrana o conjugado é incubado (35–38).

4.3 Enzyme-Linked Immunosorbment Assay (ELISA)

Este método é usado para detecção e ou quantificação de uma proteína (anticorpo ou antígeno) num fluido biológico por meio do uso de um marcador neste trabalho teve os testes de ELISA tiveram papel na triagem dos pacientes que apresentam IgG positivo para ZIKV, com essa resposta podemos utilizar as amostras no mapeamento de epítomos (46).

4.3.1 ELISA IgG

O protocolo para a detecção de anticorpos IgG, foi desenvolvido pelo instituto Pasteur de Dakar, Senegal, e inicia-se pela sensibilização a placa com 100 µl por poço de anticorpos IgG contra o antígeno pesquisado, diluído em solução tampão de diluição, conforme seu respectivo título, cobrir a placa com papel alumínio e incubar por 1 hora à 37 °C. Após a adição de 100 µl do antígeno pesquisado por poço, diluído com tampão de diluição, seguindo seu respectivo título, cobrir a placa e incubar por 1 hora à 37 °C. No próximo passo deve-se adicionar as amostras a serem testadas, 100 µl por poço, diluídas com tampão de diluição. O passo seguinte é a adição do conjugado, 100 µl por poço e por fim adicionar, 100 µl por poço, do revelador e incubar em temperatura ambiente por 2 min se usar TMB, ou 30 min se usar ABTS (47,48).

4.4 PCR Real-time

O PCR Real-Time é um método eficaz, pois é rápido, sensível e específico para a detecção de ZIKV em fase inicial (aguda) da infecção enquanto há replicação viral intensa, viremia, viruria ou enquanto houver vírus em fluídos corpóreos ou outros tecidos acessíveis. O método de PCR Real-Time foi utilizado para triagem das amostras obtidas para a confirmação da eventual presença de ácidos nucleicos virais e com isto determinar melhor a fase da infecção e também auxilia na elucidação de eventuais reações cruzadas durante infecção aguda com outros vírus da família *Flaviviridae* nos testes de ELISA utilizando IgM (31).

4.5 Bioinformática

As proteínas codificadas pelo genoma do ZIKV foram modeladas, por meio da ferramenta ITASSER, uma plataforma que permite modelar proteínas a partir das suas

sequências de aminoácidos. Para pesquisar similaridades nas sequências utilizadas para a construção da membrana, foi utilizada a ferramenta BLAST, que consiste em um programa que busca similaridades nas sequências primárias das proteínas e nucleotídeos (49).

Para a predição de epitopos, determinação de área de acessibilidade e estrutura secundária das proteínas foram utilizados os programas, BEIPRED e NetSurfP, que são baseados em cálculos de acessibilidade da superfície da proteína, os valores obtidos são calculados através da combinação dos scores de propensão dos resíduos na proximidade espacial e os números de possível interação da proteína com o solvente (50,51).

Também foi utilizada neste estudo a ferramenta PyMOL, para evidenciar os epitopos nas estruturas das proteínas (52).

5 Resultados

5.1 Mapeamento

O mapeamento de epitopos foi realizado em duas membranas de celulose, contendo os spots de pentadecapeptídeos do vírus. Ao todo são 719 spots, que compreendem o genoma completo do ZIKV, incluindo as proteínas estruturais e não-estruturais do vírus, com uma disposição de 15 aminoácidos com *offset* de 5 peptídeos. As amostras de soro escolhidas, após a triagem por ELISA e PCR, foram testadas contra a membrana, gerando um sinal quantificado por digitalização delimitada por campos pelo programa Totallab Quant (Nonlinear Inc., Durham NC, USA), modo spot array.

5.2 Amostras Jundiaí (grupo I)

Foram coletadas amostras de mães e recém-nascidos (RN) em acompanhamento médico em período convalescente da infecção por ZIKV.

As amostras selecionadas para este trabalho apresentaram positividade para ZIKV em PCR Real time em urina e saliva.

Tabela 1: tabela com a sintomatologia dos pacientes de Jundiaí.

Amostras	Idade	Sintomatologia	PCR ZIKV urina e saliva	Ultrassom fetal
Mãe 87	29	Nega	Positivo	Normal
Mãe 128	15	Cefaleia, mialgia e artralgia	Positivo	Normal
RN	Peso (g)	Tamanho (cm)	Microcefalia	Soro PCR ZIKV
RN 87	3010	50	Negativo	Negativo
RN 128	3430	51	Negativo	Negativo

Os resultados obtidos foram analisados individualmente mães e bebês e comparados, por meio da subtração dos resultados obtidos na resposta dos bebês dos valores obtidos nas respostas das mães, no intuito de avaliar as diferenças nas respostas, o que nos permite avançar no entendimento da interação e transmissão materno-fetal dos anticorpos.

5.2.1 Amostras 87 mãe e filho

O primeiro par de amostras analisado foi o da mãe e RN 87, amostras pertencentes a Coorte Zika Jundiaí, as quais recebi por meio de colaboração com o Prof. Dr. Saulo Duarte Passos, da Faculdade de Medicina de Jundiaí. Além das amostras cedidas, o Prof. Saulo também me forneceu os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes.

A paciente 87 acompanhada durante a gestação, tinha 29 anos de idade e apresentou uma gravidez de risco, pois desenvolveu diabetes gestacional. Em anamnese a mãe 87 não relatou sintomatologia clínica sugestiva de arbovirose.

O teste de RT-PCR no soro mostrou-se negativo, já o RT-PCR realizado na urina da paciente teve resultado positivo, indicando que a paciente está em um período de convalescência da infecção, pois o ZIKV é encontrado na urina em um período após a viremia primária, pois as partículas virais podem ser detectadas por maior período de tempo na urina do que no soro (32,53–55), por isso essa paciente foi selecionada como candidata para o experimento de spot-synthesis.

O RN 87 apresenta peso e tamanho normais, sem sinais de microcefalia e o teste de RT-PCR no soro se mostrou negativo.

Gráfico 1. Mapeamento dos potenciais epitopos da proteína poliproteína do ZIKV, com a amostra de uma mãe em período convalescente da doença, coletada em Jundiá. Os dados apresentados foram normalizados em numa escala de 0 a 1 (eixo Y) após a subtração de valores de “background” obtidos de spots minimamente reativos, que se mostraram próximos à intensidade da membrana fora dos spots, também após subtração dos valores obtidos no controle negativo, que consiste num soro humano naïve. A linha vermelha tracejada representa um corte, para evidenciar as sequências de peptídeos que obtiveram as maiores densidades nos spots. Abaixo do gráfico se encontra uma representação esquemática do posicionamento dos spots, em relação a poliproteína do ZIKV e para cada uma das unidades sua quantidade de aminoácidos, seguindo a ordem de localização na membrana.

A amostra da paciente 87 mostrou-se muito reativa em diversos spots, após a subtração do background e do resultado do teste com o soro naíve humano. Pode se observar uma grande resposta contra as proteínas estruturais do ZIKV, proteínas estas as quais até o momento não possuem registro da sua capacidade de imunogenicidade, com isso este teste mostra essas proteínas que compõem a estrutura do virion com uma alta capacidade imunogênica, que ainda não foi explorada a fundo até o momento.

Outras proteínas, ainda não descritas como imunogênicas também se mostraram reativas nesta amostra, como poderemos melhor observar no gráfico 2.

Gráfico 2. Potenciais epítomos reconhecidos pela amostra 87 da mãe.

No gráfico 2, podemos observar quais foram os peptídeos melhor sucedidos no mapeamento, após o corte na densidade de 0,7. Esses resultados evidenciam que na resposta da mãe 87 podemos ver reação tanto com peptídeos encontrados nas proteínas estruturais, quanto nas não-estruturais, proteínas as quais não é esperada

uma típica reação imune, proteínas não-estruturais 2A, 2B, 3, 4A e 4B se mostraram potencialmente reativas com a amostra da mãe 87.

Gráfico 3. Mapeamento dos potenciais epitopos da proteína poliproteína do ZIKV, com a amostra de um RN em período convalescente da doença, coletada em Jundiá. Os dados apresentados foram normalizados em uma escala de 0 a 1 (eixo Y) após a subtração de valores de “background” obtidos de spots minimamente reativos, que se mostraram próximos à intensidade da membrana fora dos spots e subtração do controle negativo, que consiste em um soro humano naïve.

Pode-se observar uma resposta parecida do RN 87 com sua mãe, evento já esperado, pois esses anticorpos presentes no RN são transmitidos pela mãe, durante a gestação e no período de amamentação (56).

Na resposta do RN, existe um alto pico de densidade nos spots correspondentes às proteínas estruturais do vírus, com o spot de maior reatividade na proteína C, a qual constitui o capsídeo viral.

Observa-se também o padrão parecido com a resposta da mãe, com spots reativos nas proteínas não-estruturais 2, 3 e 4.

Gráfico 4. Potenciais epítomos reconhecidos pela amostra 87 RN.

Gráfico 5. O gráfico acima ilustra a subtração das respostas da mãe e do seu filho, os resultados evidenciaram uma maior reatividade das matrizes de peptídeos com amostra da mãe do que com a do seu filho recém-nascido (RN), pois podemos ver que mesmo após a subtração das respostas, a mãe ainda possui alguma reatividade contra as matrizes e peptídeos, resposta já esperada pela transmissão dos anticorpos da mãe para o feto.

Outro tipo de análise comparativa realizada foi a subtração da resposta do RN da resposta da mãe, com isso podemos observar uma maior resposta da mãe contra os peptídeos, o que já é esperado sendo que somente uma porcentagem dos anticorpos são transmitidos para o feto (imunização passiva), evidenciado gráfico 5 (56).

5.2.2 Amostras 128 mãe e filho

O segundo par de amostras analisado foi o da mãe e RN 128, amostras pertencentes também a Coorte Zika Jundiaí.

A paciente 128 foi acompanhada durante a gestação, tinha apenas 15 anos de idade sendo assim foi incluída no grupo de risco gestacional, pelo fato de possuir pouca idade. Em anamnese a mãe 128 apresentou cefaleia, mialgia e artralgia, sintomas característicos de arbovirose (57).

O teste de RT-PCR no soro desta paciente também mostrou-se negativo, o RT-PCR realizado na urina da paciente teve resultado positivo, indicando também que a paciente 128 também passava pelo período de convalescência da infecção durante a coleta (32,53–55).

Durante a avaliação física e sintomatológica do RN 128, o neonato também apresentou normalidade em seu peso e tamanho, e não apresentou sinais de microcefalia. O teste de RT-PCR no soro teve resultado negativo.

Gráfico 6. Mapeamento dos potenciais epítomos da proteína poliproteína do ZIKV, com a amostra da mãe 128 em período convalescente da doença, coletada em Jundiá. Os dados apresentados foram normalizados em uma escala de 0 a 1 (eixo Y) após a subtração de valores de “background” obtidos de spots minimamente reativos, que se mostraram próximos à intensidade da membrana fora dos spots e subtração do controle negativo.

Mapeamento de epítomos com a amostra da mãe 128, mostra uma alta reatividade contra os peptídeos na membrana, com mais spots reativos que na amostra testada anteriormente.

Essa maior reatividade, pode se dar ao fato de que essa paciente apresentou um maior título de anticorpos contra o vírus, mas não é possível afirmar se é essa a causa da maior reatividade pois não foi possível realizar a titulação dos anticorpos das amostras, pelo fato de que para realizar o mapeamento de epítomos foi necessário um grande volume das amostras, impossibilitando a execução de testes complementares para a verificação de mais dados das amostras.

Gráfico 7. Potenciais epítomos reconhecidos pela amostra 128 mãe.

Após aplicado o cutoff, podemos visualizar melhor os peptídeos mais reativos contra a amostra de soro da mãe 128.

Pode-se observar uma alta reatividade com as proteínas estruturais e não-estruturais, com diversos spots obtendo alta reatividade nas proteínas não-estruturais 1, 2A e 2B, 3, 4A e 4B e 5.

Das proteínas estruturais apenas houve alta reatividade nas proteínas C e E, que está evidenciado no gráfico 7. Esse tipo de resposta é interessante, pois até o momento, os mapeamentos que vem sendo realizados para o melhor entendimento da resposta imune dos hospedeiros contra o ZIKV, focam nas proteínas não-estruturais, como por exemplo a proteína NS1 (58).

A partir destes resultados, mais estudos devem ser realizados para o melhor entendimento da resposta imune dos hospedeiros contra as proteínas estruturais do ZIKV.

Gráfico 8. Mapeamento dos potenciais epitopos da proteína poliproteína do ZIKV, com a amostra de um RN em período convalescente da doença, coletada em Jundiá. Os dados apresentados foram normalizados em uma escala de 0 a 1 (eixo Y) após a subtração de valores de “background” obtidos de spots minimamente reativos, que se mostraram próximos à intensidade da membrana fora dos spots, e subtração do controle negativo.

Uma resposta parecida pode ser observada também com a amostra do RN 128, com alta reatividade contra as proteínas estruturais quanto contra as não-estruturais. Após a realização do cutoff, ficou evidenciado na resposta do RN 128, uma reatividade dos anticorpos contra as matrizes de peptídeos que compõem as proteínas, não-estruturais 1, 2A e B, 3, 4A e 5, e contra as matrizes que compõem as proteínas estruturais C e E, apresentado no gráfico 8.

A resposta observada na mãe 128 e no RN 128 é bem similar, evidenciando também a transmissão de anticorpos da mãe para o RN, o mesmo tipo de análise de subtração dos valores de densidade obtidos na resposta do RN, dos valores obtidos da densidade dos spots na resposta dos anticorpos da mãe contra as matrizes de peptídeos, evidenciado no gráfico 9.

Gráfico 9. Potenciais epítomos reconhecidos pela amostra 128 RN.

Gráfico 10. O gráfico acima ilustra a subtração das respostas da mãe e do seu filho, os resultados evidenciaram uma maior reatividade das matrizes de peptídeos com amostra da mãe do que com a do seu filho recém-nascido (RN), pois podemos ver que mesmo após a subtração das respostas, a mãe ainda possui alguma reatividade contra as matrizes e peptídeos.

5.3 Pool de mães e filhos (grupo II)

Os gráficos abaixo mostram os resultados obtidos dos mapeamentos de epitopos com pools de amostras de mães e seus bebês, que apresentaram positividade de IgG em ELISA para ZIKV.

As amostras as quais foram utilizadas nesse pool provêm de Sergipe, durante o período de surto de ZIKV na região, no início de 2016. Clinicamente, as mães apresentaram sintomatologia típica de arboviroses e após o teste de ELISA constatou-se que as pacientes haviam entrado em contato com o vírus, pois apresentaram positividade somente para IgG contra ZIKV.

Gráfico 11. Mapeamento dos potenciais epitopos da proteína poliproteína do ZIKV, reconhecidos pelo pool de amostras de mães IgG positivas para o vírus Zika, coletadas em Sergipe durante o período de surto de ZIKV em 2016. Os dados apresentados foram normalizados em uma escala de 0 a 1 (eixo Y) após a subtração de valores de “background” obtidos de spots minimamente reativos, que se mostraram próximos à intensidade da membrana fora dos spots, e subtração do controle negativo.

O padrão de resposta observado no mapeamento utilizando o pool de amostras de mães IgG positivas para ZIKV, é similar a resposta observada nas outras amostras já testadas, evidenciado no gráfico 11.

Na análise de dados antes de realizar a normalização dos mesmos, a densidade observada nos spots foi muito mais alta, provavelmente devido ao maior título de anticorpos presente na amostra.

Pelo fato do volume das amostras analisadas ser baixo, não foi possível a realização da titulação dos anticorpos. Portanto, para evitar reações prozona que podem ocorrer devido a um alto título de anticorpos presentes na amostra de soro é desproporcional em relação à quantidade de antígeno do teste, gerando resultados falso-negativos (59), foi utilizado um baixo volume das cinco amostras que compõem os pools da mãe e do RN, aproximadamente 5 μ L de cada amostra e após a realização foi executada a diluição das mesmas em 1:100.

Gráfico 12. Potenciais epítomos reconhecidos pelo pool de amostras das mães IgG positivas contra ZIKV.

A gráfico 12 mostra os *spots* mais intensos na membrana após o cutoff realizado, novamente obtendo resposta nas mesmas regiões já observadas, com o spot mais intenso na proteína NS3, e com diversos spots novamente muito intensos nas proteínas estruturais do ZIKV.

As proteínas estruturais do ZIKV vêm se mostrando altamente reativas no modelo experimental utilizado neste trabalho, isso pode ocorrer devido a exposição destas proteínas na estrutura do vírus, sendo assim as primeiras proteínas a serem reconhecidas pelos anticorpos produzidos pelos pacientes, refletindo assim no reconhecimento dos peptídeos na membrana.

Gráfico 13. Mapeamento dos potenciais epitopos da proteína poliproteína do ZIKV, reconhecidos pelo pool de amostras dos bebês IgG positivos para o vírus Zika, coletadas em Sergipe durante o período de surto de ZIKV em 2016. Os dados apresentados foram normalizados em uma escala de 0 a 1 (eixo Y) após a subtração de valores de “background” obtidos de spots minimamente reativos e subtração do controle negativo.

Gráfico 14. Potenciais epítomos reconhecidos pelo pool das crianças IgG positivas contra ZIKV.

Nos gráficos 13 e 14, estão evidenciados os resultados do mapeamento com o pool de amostras das crianças, as quais são filhos das mulheres das amostras utilizadas nos gráficos 11 e 12.

No intuito de verificar reações cruzadas nas respostas obtidas com as amostras IgG positivas para ZIKV, foi realizado um pool de amostras IgG positivas para DENV e cruzado contra as proteínas de ZIKV sintetizadas na membrana, ilustrado no gráfico 15.

Após avaliado o padrão de resposta obtido com as amostras positivas para DENV, foi realizado também uma comparação entre os epítomos encontrados na somatória das amostras ZIKV positivas e as amostras DENV positivas, evidenciado nas figuras 20, 21 e 22, situada no tópico seguinte.

5.4 Pool de amostras IgG positivas para DENV

Gráfico 15. Mapeamento de epitopos realizado com um pool de amostras IgG positivas para DENV, esse experimento tem a finalidade de evidenciar reações cruzadas dos anticorpos anti-DENV, contra as matrizes de peptídeos de ZIKV.

5.5 Análise da somatória das respostas obtidas nas amostras

Gráfico 16. Potenciais epitopos da poliproteína do ZIKV, após somatória e normalização das amostras testadas.

Gráfico 17. Spots que obtiveram maior densidade nos spots após somatória das amostras.

Gráfico 18. Gráfico comparativo entre as respostas das amostras IgG positivas para ZIKV e IgG positivas para DENV.

5.6 Predição de epítopos e modelagem por homologia

Foi realizada uma predição de epítopos lineares e estrutura secundária para as proteínas que se mostraram mais promissoras nos experimentos de mapeamento.

Esse tipo de análise foi realizado no intuito de uma comparar a resposta observada nos experimentos e a resposta sugerida pela predição de epitopos. Com a predição de estrutura secundária é possível obter por meio de modelagens por homologia das proteínas, observar a nível estrutural superfície e estrutura das proteínas do vírus, nos permitindo um melhor entendimento do motivo da ligação destes anticorpos dos pacientes nos peptídeos de ZIKV.

Nas proteínas estruturais do vírus, pode-se observar muitas regiões de alto score de probabilidade de ser um potencial epítopo, devido a sua acessibilidade ao solvente e sua estrutura secundária, que permite a acessibilidade de anticorpos (41–43).

Figura 5. Modelagem por homologia das proteínas não-estruturais do ZIKV. As cores na superfície das proteínas evidenciam os resultados de predição dos epitopos (em azul), região onde se sobrepõe o resultado da membrana e a predição (em roxo), região onde está o peptídeo reativo, resultante da ligação contra os anticorpos anti-ZIKV na membrana (em vermelho), região do peptídeo reativo, resultante da ligação dos anticorpos anti-DENV (em verde), a região onde se sobrepõe o peptídeo reativo contra os anticorpos anti-ZIKV e anti-DENV (em laranja) e a região onde se sobrepõe a resposta dos anticorpos anti-DENV com a predição de epitopos (em ciano). Em superior na figura estão situadas as modelagens que evidenciam as superfícies das proteínas, em (A) pode-se observar a NS1 do ZIKV, em (C) a proteína NS3 e em (E) a proteína NS5. Na parte inferior da figura podemos ver as modelagens das proteínas evidenciando as estruturas das mesmas, em (B) a proteína NS1, em (D) a proteína NS3 e em (F) a proteína NS5.

Nas proteínas não-estruturais, algumas regiões das proteínas as quais obtiveram alto score de probabilidade de reconhecimento se sobrepõem com a resposta observada na membrana, como evidenciado na figura 5.

A proteína NS1 possui uma região onde ocorre essa sobreposição, na predição de estrutura secundária a proteína se apresenta com uma estrutura composta por uma espiral (coil), exposta ao solvente.

As proteínas NS2A, NS2B, NS4A e NS4B, possuem algumas regiões as quais se mostraram com alto potencial de reconhecimento na predição de epitopos, mas as mesmas não reagiram tão bem na membrana, sendo assim, essas proteínas não se mostram interessantes do ponto de vista imunogênico.

A proteína NS3 se mostra também com grande potencial imunogênico, com diversas regiões de alta acessibilidade ao solvente e altos scores de probabilidade de reconhecimento. Algumas regiões na NS3 se mostram reativas na membrana e que se sobrepõem com a predição de epitopos.

Foram identificadas também regiões as quais obtiveram alta reatividade na membrana, mas não cruzaram com a predição de epitopos. Por fim vamos olhar a proteína NS5, a qual se mostrou altamente reativa na membrana, e com diversas regiões que se mostram com um alto score de probabilidade de epitopos. Podemos observar também uma sobreposição na resposta do pool soros com IgG anti-DENV com a resposta dos soros anti-ZIKV, mostrando uma possível região de reação cruzada dos anticorpos contra ZIKV e contra DENV.

Algumas regiões obtiveram alta reatividade contra as matrizes de peptídicas os soros anti-ZIKV e anti-DENV, mas não obtiveram alto score de probabilidade na predição de epitopos.

Uma região da NS5 obteve alta reatividade com o pool anti-DENV e alto score de probabilidade na predição, mas sem reação cruzada com os soros anti-ZIKV.

Figura 6. Modelagem por homologia das proteínas estruturais do ZIKV. As cores na superfície das proteínas evidenciam os resultados de predição dos epitopos (em azul), região onde se sobrepõe o resultado da membrana e a predição (em roxo), região onde está o peptídeo reativo, resultante da ligação contra os anticorpos anti-ZIKV na membrana (em vermelho), região do peptídeo reativo, resultante da ligação dos anticorpos anti-DENV (em verde), a região onde se sobrepõe o peptídeo reativo contra os anticorpos anti-ZIKV e anti-DENV (em laranja) e a região onde se sobrepõe a resposta dos anticorpos anti-DENV com a predição de epitopos (em ciano e amarelo na proteína E).

Nas proteínas estruturais, as proteínas C e E se mostraram muito reativas nos modelos experimentais utilizados. A proteína C possui duas regiões as quais obtiveram uma alta reatividade na membrana e alto score de probabilidade na predição de epitopos. Foi observada alta reatividade dos soros anti-ZIKV e anti-DENV. Como esperado, a proteína E mostra-se também muito reativa contra os soros dos pacientes testados.

6 Discussão e conclusão

A primeira proteína a ser mapeada pela ordem de síntese da membrana foi a proteína não-estrutural 1 (NS1), esta possui uma função multifatorial de virulência para o ZIKV (60), sendo assim foi escolhida como a primeira a ser analisada. No entanto temos dados preliminares sob análise das demais proteínas estruturais e não estruturais do ZIKV. A proteína NS1 é bem conservada entre os flavivírus. Ela contém 12 cisteínas, é glicosilada de forma semelhante a outras proteínas não-estruturais do vírus (61).

A NS1 glicosilada, associa-se aos lípidios formando um homodímero no interior das células, necessário para a replicação viral tardia na infecção. Além dessa função a NS1 é também secretada no espaço extracelular como uma partícula de lipoproteína hexamérica, que está envolvida na evasão imune e patogênese pela interação com componentes tanto do sistema imune inato quanto adaptativo, bem como de outros fatores do hospedeiro (60,62). O principal marcador antigênico da infecção viral é a NS1, em combinação com outros marcadores, como biomarcador para a detecção precoce da infecção pelo DENV. A sequência codificadora NS1 é suspeita de ser um dos principais fatores genéticos subjacentes das diversas consequências clínicas das infecções causadas por *Flavivírus* (mais de 70 membros). Contudo, pouco se sabe sobre a NS1 do ZIKV, que apresenta uma relação com patogênese aparentemente diferente quando comparada com outros *Flavivírus* (60–64).

A proteína NS1 dos Flavivírus possui três domínios distintos, são eles, o domínio um, constituído por uma cadeia N-terminal β -barril (" β -roll") hidrofóbica localizado entre o aminoácido 1 até o 29 da proteína, o domínio dois, constituído de uma asa alfa/beta localizada entre os aminoácidos 38 e 151 e uma porção C-terminal β -pregueada central contendo uma extensa folha beta, localizado entre os

aminoácidos 181 e 352. Possui doze cisteínas invariantes que formam seis ligações dissulfeto por monômero (63).

Os segmentos que intervalam esses domínios (30-37 e 152-180) formam um subdomínio “conector”, é formado de 3 cadeias de folhas (“ β sheet”) que liga a asa aos domínios central β -barril e β -pregueada (63).

A unidade fundamental é um dímero plano em forma de cruz, formado através das malhas β -entrelaçadas de ponta a ponta. Na face interna do dímero, o domínio β -barril e a alça adjacente formam uma superfície hidrofóbica. A face externa do dímero é polar e contém os locais de glicosilação. No hexâmero NS1, três dímeros se juntam com as faces polares glicosiladas apontadas para fora e as faces hidrofóbicas apontadas para dentro de modo que possam interagir com moléculas lipídicas na partícula de lipoproteína NS1 secretada (63).

Ao olharmos para a subtração das intensidades relativas das mães dos bebês, observamos um padrão de reconhecimento parecido para o domínio dois, mas com uma menor intensidade de sinal obtida, isso provavelmente ocorre pelo fato da transmissão de anticorpos da mãe para os bebês, via transplacentária por volta de 90% do total de anticorpos no soro da mãe para o bebê (65), e também via amamentação onde a predominância de anticorpos transmitidos é da classe IgA e uma pequena parte é da classe IgG e IgM (65,66).

As proteínas NS2A, NS2B, NS4A e NS4B não se mostraram de muito interesse no caráter de resposta imunológica do hospedeiro contra no modelo experimental utilizado neste trabalho. Portanto não serão extensamente explanadas nesta dissertação, mais estudos são necessários para observar o comportamento da resposta de mais amostras contra essas proteínas do ZIKV.

A proteína NS3 exerce uma crucial função para a replicação do ZIKV, função esta que possui características enzimáticas, que realizam a catalize e processamento da poliproteína do vírus. Ainda não é clara a causa da proteína NS3 abrigar estas várias capacidades catalíticas na poliproteína viral, entretanto a conservação deste arranjo através do gênero *Flaviviridae* sugere alguma relevância funcional (62).

Nos Flavivirus a proteína NS3 possui um domínio com a função de protease que por sua vez cliva o precursor da poliproteína dos flavivirus de 375 kDa pelo domínio N-terminal da NS3 (62). A clivagem das junções C-prM, prM-E, E-NS1, NS4A-NS4B e também a NS1-NS2A, é realizada por peptidases da célula hospedeira localizada no retículo endoplasmático. As ligações peptídicas entre NS2A-NS2B, NS2B-NS3, NS3-NS4A e NS4B-NS5 são clivadas pela proteína NS3 viral (62,67). Sendo assim, a atividade de protease da NS3 é essencial para a replicação viral e sua inibição é considerada como estratégia de intervenção valiosa para o tratamento de infecções causadas por *Flavivirus* (62,67).

A atividade da NS3 é dependente da associação de uma região de 40 aminoácidos da proteína NS2B, que por sua vez atua como um cofator para a sua ativação, resultando na formação de um complexo heterodimérico, o qual cumpre papel semelhante à uma chaperona, que desempenha papel importante para que a NS3 seja estabilizada (62,67,68).

Algumas regiões da NS3 se mostraram ativas em associação com membrana devido a sequências observadas em predições de estrutura secundária expostas na proteína com alta superfície de acessibilidade absoluta e com estrutura composta por espirais e folhas beta. Estas predições indicam, uma região de alto potencial imunogênico, como evidenciado nos gráficos da somatória das respostas observadas, e nas proteínas ilustradas nas figuras.

A proteína NS5 é a maior e a mais conservada entre os *Flavivirus* e possui três atividades enzimáticas. Em sua região N-terminal, possui atividade de guanililtransferase e S-adenosilmetionina metiltransferase, compreendida em 320 resíduos dessa região. A guanililtransferase é responsável por adicionar uma molécula de GTP (trifosfato de guanosina) na ponta 5' do RNA viral após a atividade de RTP (remover um grupo fosfato) de outra proteína não estrutural do vírus, a NS3. A atividade da NS3 permite que a NS5 forme uma ponte trifosfato capeando o RNA. A enzima S-adenosilmetionina metiltransferase então transfere um grupo metil da S-adenosilmetionina para o sétimo nitrogênio da guanina, completando finalmente o capeamento do RNA genômico (69,70).

Na região C-terminal (entre os resíduos 420 e 900), possui atividade de RNA polimerase RNA-dependente, sendo a responsável pela polimerização do RNA intermediário (senso negativo) que serve de molde para a síntese de outras moléculas de RNA simples fita de senso positivo que serão encapsidadas no vírion (69,70).

Entre os domínios metiltransferase e polimerase, a proteína tem uma sequência de aminoácidos interdomínios que funciona como sinal para localização nuclear, e já foi encontrada no núcleo de células de mamífero infectadas. Essa sequência é reconhecida com alta especificidade pelas subunidades das importinas (β -importina, principalmente) reconhecedoras de sequência de localização nuclear, apesar de toda replicação dos *Flavivirus* acontecer no citosol (69,70).

Nessa região interdomínios, a NS5 também possui uma região de fosforilação pela CK2 (Caseína Quinase II). Mais precisamente, o resíduo de treonina-395. Acredita-se que ambos o sinal de localização nuclear e o sítio de fosforilação pela CK2 sejam formas de regulação da presença da NS5 no citoplasma da célula

infectada, indicando que a atividade da NS5 só é necessária em momentos específicos da infecção, como durante a replicação do RNA genômico (69,70).

Em todos os *Flavivirus*, as proteínas que apresentam atividade de RNA polimerase possuem uma sequência específica de aminoácidos: o motivo Gly-Asp-Asp, típico em RNA polimerases e que constitui o sítio catalítico (69,70).

No modelo experimental utilizado neste trabalho a proteína NS5 se mostrou de grande potencial imunogênico, com algumas regiões reativas na membrana e muitas regiões com alto score de probabilidade na predição de epítomos.

As regiões reativas na membrana mostraram-se na predição de estrutura secundária, como estruturas expostas na proteína com alta acessibilidade absoluta ao solvente e constituídas principalmente por alfa-hélices e em algumas regiões são constituídas por espirais na proteína.

O potencial de reconhecimento imunológico da proteína NS5 já havia sido observado em outros trabalhos (71–73), mais estudos serão realizados na sequência deste trabalho, na tentativa de elucidar melhor os mecanismos imunogênicos das proteínas do ZIKV.

Duas das proteínas não-estruturais do ZIKV se mostraram altamente reconhecidas pelas amostras testadas neste trabalho, as proteínas C e E, já a proteína pr/M não obteve um alto score de probabilidade de epítomos e nem um alto reconhecimento na membrana, portanto não será amplamente explanada neste estudo.

Iniciando pela proteína C do ZIKV, a mesma obteve altos escores de probabilidade de epítomos, isso devido a sua alta exposição e acessibilidade da proteína do capsídeo viral, segundo a predição de estrutura secundária.

No modelo experimental utilizado a proteína C mostrou-se grande candidata para epítomos, uma das sequências peptídicas que compõem a proteína C obteve a maior densidade dentre todos os spots da membrana, e o mais alto score na predição de epítomos. A proteína C do ZIKV é estruturalmente semelhante aos capsídeos de DENV e WNV. Em sua estrutura, podemos encontrar quatro α hélices com uma longa espiral pré- $\alpha 1$ as quais formam dímeros (74). A única espiral pré- $\alpha 1$ longa na proteína contribui para uma associação mais estreita entre a montagem dimérica, tornando então esta estrutura hidrofóbica, característica essa que diverge a proteína C do ZIKV dos capsídeos de DENV e WNV. A proteína C do ZIKV possui ampla capacidade de ligação a diferentes tipos de nucleotídeos, incluindo RNA de cadeia simples ou dupla e DNA. Além disso, a interface altamente carregada positivamente, formada principalmente pela α -hélice 4, é proposta como responsável para ligação de nucleotídeos, especula-se que essa função de ligação de nucleotídeos seja conservada entre outros *Flavivirus* (74).

Embora o papel principal da proteína C seja empacotar o genoma viral para montar novas partículas virais, o mecanismo de como o capsídeo recruta o genoma viral ainda deve ser elucidado (74). Em uma de suas regiões foi observado um alto reconhecimento entre os soros anti-ZIKV e anti-DENV, sendo então possivelmente uma região de reação cruzada contra os vírus. Devido a sua configuração estrutural a proteína C se mostrou altamente interessante no ponto de vista de resposta imune, portanto mais estudos devem ser realizados para um melhor entendimento dos mecanismos de resposta imune dos hospedeiros contra a proteína C do ZIKV.

Por fim a proteína do envelope do ZIKV foi altamente reconhecida tanto pelas amostras de anti-ZIKV quanto pelas amostras anti-DENV, mostrando além de epítomos para o ZIKV, podemos ver uma possível região de reação cruzada entre

DENV e ZIKV, como observado anteriormente na proteína C. A proteína E do ZIKV é responsável por formar o envelope viral e pela entrada do vírus na célula alvo, é uma proteína que também é alvo principal dos anticorpos neutralizantes contra o ZIKV (75). Estruturalmente a proteína E é constituída por 3 domínios. O domínio 1 (DI) é um domínio central responsável por conectar domínios 2 e 3, e nos outros *Flavivirus*, o DI está envolvido também nas alterações conformacionais necessárias para a entrada da partícula viral na célula hospedeira (75). O domínio 2 (DII) é um domínio parecido com um cilindro alongado contendo uma alça de fusão conservada que interage com a membrana endossômica da célula hospedeira, indispensável para a liberação do genoma viral no citoplasma celular (75). E por fim o domínio 3 (DIII) um domínio que está envolvido na ligação aos receptores celulares para a entrada do vírus (75).

Numa breve análise estrutural dos diferentes domínios da proteína E, o domínio 1 contém cerca de 130 resíduos divididos em três segmentos, nos resíduos 1–51, 132–192 e 280–295. O centro do domínio 1 é conformado em uma estrutura beta-barril, ligada a um filamento N-terminal, esse tipo de conformação garante uma característica hidrofóbica, diminuindo então sua acessibilidade absoluta ao solvente nessa região, como observado no método experimental utilizado neste estudo, este domínio não obteve alta reatividade na membrana nem alto score de probabilidade de epitopos. Além desta característica hidrofóbica este domínio possui também uma falta de densidade eletrônica em um sítio de loop com 150 resíduos, garantindo um potencial local de glicosilação (75). O domínio 2 é responsável pela dimerização da proteína E, levando a uma interface díodo estendida, mas interrompida, causando assim, espaços vagos no dímero em ambos os lados do domínio 2. A interface central dos dímeros é constituída por uma hélice alfa-beta e elementos de cadeia J em cada monômero, enquanto a interface de dímero distal é criada principalmente pela

estrutura hidrofóbica do domínio 1, o qual interage com os domínios 2 e 3 (74). No domínio 3 entre resíduos 296-403 exibe uma dobra, onde as folhas alfa-beta e a cadeia D desordenada entram em contato, devido ao loop do monômero da proteína E adjacente, este loop é conhecido como loop de fusão e se situa entre os resíduos 98–109 do domínio 3 da proteína E. Esta estrutura possui ainda a função de realizar a fusão da membrana do vírus com a membrana da célula hospedeira, durante a fase de entrada da partícula viral (74). O trecho onde se situa esse loop é altamente conservado entre os *Flavivirus*, a hipótese mais plausível para explicar essa conservação é devido a esse trecho possuir função indispensável para a infecção viral (74).

Na membrana vemos picos de intensidade em todos os domínios da proteína E, com possíveis regiões reconhecidas pelos anticorpos anti-DENV. Mais amostras serão testadas para a verificação de mais sítios de interação com os anticorpos e a proteína E, afim de definirmos epitopos e também regiões de resposta neutralizante contra o vírus.

O presente trabalho visou triar por meio de algumas amostras que possuem IgG contra o ZIKV, alguns possíveis epitopos lineares nas proteínas virais. Mais estudos serão realizados no intuito de utilizar uma ampla soroteca para que possamos validar as sequências aqui triadas como epitopos para ZIKV, para que possam ser utilizados como testes diagnósticos e afim de entender melhor a resposta imune contra o vírus.

7 Referências bibliográficas

1. Zanluca C, De Melo VCA, Mosimann ALP, Dos Santos GIV, dos Santos CND, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(4):569–72.
2. Iosifidis S, Mallet HP, Leparac Goffart I, Gauthier V, Cardoso T, Herida M. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. Vol. 44, *Medecine et Maladies Infectieuses*. 2014. p. 302–7.

3. Calvet G, Aguiar RS, Melo ASO, Sampaio SA, Filippis I De, Fabri A, et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil : a case study. :653–60.
4. Crill WD, Chang GJ. Localization and characterization of flavivirus envelope glycoprotein cross-reactive epitopes. *J Virol.* 2004;78(24):13975–86.
5. 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. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(1):36.
6. Nunes ML, Carlini CR, Marinowic D, Neto FK, Fiori HH, Scotta MC, et al. Microcephaly and Zika virus: A clinical and epidemiological analysis of the current outbreak in Brazil. Vol. 92, *Jornal de Pediatria.* 2016. p. 230–40.
7. 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).
8. Gatherer D, Kohl A. Zika virus : a previously slow pandemic spreads rapidly through the Americas. 2018;1(2016):269–73.
9. Campos G, Bandeira A, Sardi S. Zika Virus Outbreak, Bahia Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(10):1881.
10. Bogoch II, Brady OJ, Kraemer MUG, German M, Creatore MI, Kulkarni MA, et al. Anticipating the international spread of Zika virus from Brazil. Vol. 387, *The Lancet.* 2016. p. 335–6.
11. Iosifidis S, Mallet HP, Leparc Goffart I, Gauthier V, Cardoso T, Herida M. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. Vol. 44, *Medecine et Maladies Infectieuses.* 2014. p. 302–7.
12. Musso D, Cao-Lormeau VM, Gubler DJ. Zika virus: following the path of dengue and chikungunya? *The Lancet.* 2015;386(9990):243–4.
13. Cugola FR, Fernandes IR, Russo FB, Freitas BC, Dias JLM, Guimarães KP, et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature.* 2016;
14. Oehler E, Watrin L, Larre P, Lastère S, Valour F, Baudouin L, et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome – case report , French Polynesia , December 2013. 2014;1(December 2013):7–9.
15. Zanluca C, De Melo VCA, Mosimann ALP, Dos Santos GIV, dos Santos CND, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015;110(4):569–72.
16. Ventura C V., Maia M, Bravo-Filho V, Góis AL, Belfort R. Zika virus in Brazil and macular atrophy in a child with microcephaly. Vol. 387, *The Lancet.* 2016. p. 228.

17. Hayes EB. Zika virus outside Africa. Vol. 15, *Emerging Infectious Diseases*. 2009. p. 1347–50.
18. Duffy MR, Chen T-H, 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.
19. Cardoso CW, Paploski IAD, Kikuti M, Rodrigues MS, Silva MMO, Campos GS, et al. Outbreak of Exanthematous Illness Associated with Zika , Chikungunya , and Dengue Viruses , Salvador , Brazil. 2015;21(12):2274–6.
20. Staples JE, Dziuban EJ, Fischer M, Cragan JD, Rasmussen SA, Cannon MJ, et al. Interim Guidelines for the Evaluation and Testing of Infants with Possible Congenital Zika Virus Infection — United States, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2016;65(3):63–7.
21. Yuan L, Huang X, Liu Z, Zhang F, Zhu X, Yu J, et al. A single mutation in the prM protein of Zika virus contributes to fetal microcephaly. 2017;106(November):933–6.
22. Freire CC de M, Iamarino A, Neto DF de L, Sall AA, Zanotto PM de A. Spread of the pandemic Zika virus lineage is associated with NS1 codon usage adaptation in humans. 25 de novembro de 2015 [citado 2 de julho de 2018]; Disponível em: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/032839>
23. Caviness V, Takahashi T, Nowakowski R. A small step for the cell , a giant leap for mankind : a hypothesis of neocortical expansion during evolution. 1995;383–8.
24. Greig LC, Woodworth MB, Galazo MJ, Padmanabhan H, Macklis JD. Molecular logic of neocortical development and diversity. *Nat Publ Group*. 2013;14(11):755–69.
25. Vargas JE, Allred EN, D P, Leviton A, Holmes LB. C ongenital microcephaly : Phenotypic features in a consecutive sample of newborn infants. 1992;
26. Dolk H. THE PREDICTIVE VALUE O MICROCEPHALY DURING THE FIRST YEAR F LIFE F R MENTAL RETARDATION A SEVEN YEARS.
27. Whelan MA. Correspondence STANDARDS SUBCOMMITTEE OF THE AMERICAN ACADEMY OF NEUROLOGY AND THE PRACTICE. 2010;
28. Lansing E. THE RELIABILITY OF NEONATAL HEAD CIRCUMFERENCE. 1991;44(1):1027–35.
29. Faheem M, Naseer MI, Rasool M, Chaudhary AG, Kumosani TA, Ilyas AM, et al. Molecular genetics of human primary microcephaly : an overview. *BMC Med Genomics*. 2015;8(Suppl 1):S4.
30. 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. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(8):1232–9.

31. Faye O, Faye O, Diallo D, Diallo M, Weidmann M, Sall AA. Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught Mosquitoes. *Viol J.* 2013;10(1):1.
32. Gourinat A, Connor OO, Calvez E, Goarant C. Detection of Zika Virus in Urine. 2015;21(1):84–6.
33. Musso D, Roche C, Nhan T, Robin E, Teissier A, Cao-lormeau V. Detection of Zika virus in saliva. *J Clin Virol.* 2015;68:53–5.
34. Briand JP, Muller S, Van Regenmortel MHV. Synthetic peptides as antigens: Pitfalls of conjugation methods. *J Immunol Methods.* 1985;78(1):59–69.
35. Volkmer R. Synthesis and application of peptide arrays: Quo vadis SPOT technology. Vol. 10, *ChemBioChem.* 2009. p. 1431–42.
36. Frank R. The SPOT-synthesis technique: Synthetic peptide arrays on membrane supports - Principles and applications. *J Immunol Methods.* 2002;267(1):13–26.
37. Ferreira D, Neto DL. Influence of High Hydrostatic Pressure on Epitope. 2014;27(2):60–74.
38. Hilpert K, Winkler DFH, Hancock REW. Peptide arrays on cellulose support: SPOT synthesis, a time and cost efficient method for synthesis of large numbers of peptides in a parallel and addressable fashion. *Nat Protoc.* 2007;2(6):1333–49.
39. Huseby E, Kappler J, Marrack P. Commentary : TCR – MHC / peptide interactions : kissing-cousins or a shotgun wedding ? 2004;1243–50.
40. Christensen ND, Dillner J, Eklund C, Carter JJ, Wipf GC, Reed CA, et al. Surface Conformational and Linear Epitopes on HPV-16 and HPV-18 L1 Virus-like Particles as Defined by Monoclonal Antibodies. 1996;184:174–84.
41. Sweredoski MJ, Baldi P. BIOINFORMATICS APPLICATIONS NOTE Structural bioinformatics PEPITO : improved discontinuous B-cell epitope prediction using multiple distance thresholds and half sphere exposure. 2018;24(12):1459–60.
42. Trepode NW, Farias CRG De, Barrera J. A pattern-oriented specification of gene network inference processes. *Comput Biol Med.* 2013;43(10):1415–27.
43. Petersen B, Petersen TN, Andersen P, Nielsen M, Lundegaard C. A generic method for assignment of reliability scores applied to solvent accessibility predictions. *BMC Struct Biol.* 2009;9:1–10.
44. Melo MR, Martins AR, Barbosa IV, Romano P, Shcolnik W. Coleta, transporte e armazenamento de amostras para diagnóstico molecular. *J Bras Patol E Med Lab.* 2010;46(5):375–381.
45. Nakashima Y, Hata S, Yasuda T. Blood plasma separation and extraction from a minute amount of blood using dielectrophoretic and capillary forces. *Sens Actuators B Chem.* 2010;145(1):561–569.

46. Bonaldo MC, Ribeiro IP, Lima NS, dos Santos AAC, Menezes LSR, da Cruz SOD, et al. Isolation of Infective Zika Virus from Urine and Saliva of Patients in Brazil. Rothman AL, organizador. PLoS Negl Trop Dis. 24 de junho de 2016;10(6):e0004816.
47. Who. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Bull World Health Organ. 1976;54(2):129–139.
48. Lequin RM. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Clin Chem. 1º de dezembro de 2005;51(12):2415–8.
49. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW. Basic Local Alignment Search Tool. :8.
50. Galgonek J, Vymětal J, Jakubec D, Vondrášek J. Amino Acid Interaction (INTAA) web server. Nucleic Acids Res. 3 de julho de 2017;45(W1):W388–92.
51. Jespersen MC, Peters B, Nielsen M, Marcatili P. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. Nucleic Acids Res. 3 de julho de 2017;45(W1):W24–9.
52. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.
53. Tan SK, Sahoo MK, Milligan SB, Taylor N, Pinsky BA. Stability of Zika virus in urine: Specimen processing considerations and implications for the detection of RNA targets in urine. J Virol Methods. outubro de 2017;248:66–70.
54. Oliveira MI de, Namiyama GM, Cabral GB, Ferreira JL, Taniwaki N, Afonso AMS, et al. Isolation of infectious Zika virus from a urine sample cultured in SIRC cells from a patient suspected of having rubella virus. Rev Inst Med Trop São Paulo [Internet]. 8 de março de 2018 [citado 18 de maio de 2018];60(0). Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652018005000502&lng=en&tlng=en
55. Lamb LE, Bartolone SN, Tree MO, Conway MJ, Rossignol J, Smith CP, et al. Rapid Detection of Zika Virus in Urine Samples and Infected Mosquitos by Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification. Sci Rep [Internet]. dezembro de 2018 [citado 18 de maio de 2018];8(1). Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41598-018-22102-5>
56. Madani G, Heiner DC. Antibody transmission from mother to fetus. Curr Opin Immunol. agosto de 1989;1(6):1157–64.
57. LaBeaud Ad, Bashir F, King CH. Measuring the burden of arboviral diseases: the spectrum of morbidity and mortality from four prevalent infections. Popul Health Metr [Internet]. dezembro de 2011 [citado 18 de maio de 2018];9(1). Disponível em: <http://pophealthmetrics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1478-7954-9-1>
58. Freire MCLC, Pol-Fachin L, Coêlho DF, Viana IFT, Magalhães T, Cordeiro MT, et al. Mapping Putative B-Cell Zika Virus NS1 Epitopes Provides Molecular

- Basis for Anti-NS1 Antibody Discrimination between Zika and Dengue Viruses. *ACS Omega*. 31 de julho de 2017;2(7):3913–20.
59. Liu L-L, Lin L-R, Tong M-L, Zhang H-L, Huang S-J, Chen Y-Y, et al. Incidence and Risk Factors for the Prozone Phenomenon in Serologic Testing for Syphilis in a Large Cohort. *Clin Infect Dis*. 1º de agosto de 2014;59(3):384–9.
 60. Song H, Qi J, Haywood J, Shi Y, Gao GF. BRIEF COMMUNICATIONS Zika virus NS1 structure reveals diversity of electrostatic surfaces among flaviviruses. 2016;23(5):3–6.
 61. LINDENBACH BD, RICE CM. trans-Complementation of Yellow Fever Virus NS1 Reveals a Role in Early RNA Replication. *J VIROL*. 1997;71:10.
 62. Bollati M, Alvarez K, Assenberg R, Baronti C, Canard B, Cook S, et al. Structure and functionality in flavivirus NS-proteins : Perspectives for drug design. *Antiviral Res*. 2010;87(2):125–148.
 63. Brown WC, Akey DL, Konwerski JR, Tarrasch JT, Skiniotis G, Kuhn RJ, et al. Extended surface for membrane association in Zika virus NS1 structure. *Nat Publ Group*. 2016;(July):1–4.
 64. Rastogi M, Sharma N, Singh SK. Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein. *Virol J* [Internet]. dezembro de 2016 [citado 25 de maio de 2018];13(1). Disponível em: <http://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12985-016-0590-7>
 65. Junghans RP. Finally! the Brambell receptor (FcRB): Mediator of transmission of immunity and protection from catabolism for IgG. *Immunol Res*. fevereiro de 1997;16(1):29–57.
 66. Hanson L Å., Korotkova M, Lundin S, HåVersen L, Silfverdal S-A, Mattsby-Baltzer I, et al. The Transfer of Immunity from Mother to Child. *Ann N Y Acad Sci*. abril de 2003;987(1):199–206.
 67. FALGOUT B, MARKOFF L. Evidence that Flavivirus NS1-NS2A Cleavage Is Mediated by a Membrane-Bound Host Protease in the Endoplasmic Reticulum. *J VIROL*. 1995;69:12.
 68. Chambers TJ, Weir RC, Grakoui A, McCourt DW, Bazan JF, Fletterick RJ, et al. Evidence that the N-terminal domain of nonstructural protein NS3 from yellow fever virus is a serine protease responsible for site-specific cleavages in the viral polyprotein. *Proc Natl Acad Sci*. 1º de novembro de 1990;87(22):8898–902.
 69. Qi R, Zhang L, Chi C. Biological characteristics of dengue virus and potential targets for drug design. *Acta Biochim Biophys Sin*. fevereiro de 2008;40(2):91–101.
 70. Hanley KA, Lee JJ, Blaney JE, Murphy BR, Whitehead SS. Paired Charge-to-Alanine Mutagenesis of Dengue Virus Type 4 NS5 Generates Mutants with Temperature-Sensitive, Host Range, and Mouse Attenuation Phenotypes. *J Virol*. 15 de janeiro de 2002;76(2):525–31.

71. Culshaw A, Mongkolsapaya J, Screaton G. The immunology of Zika Virus. *F1000Research*. 19 de fevereiro de 2018;7:203.
72. Wang W, Li G, De Wu, Luo Z, Pan P, Tian M, et al. Zika virus infection induces host inflammatory responses by facilitating NLRP3 inflammasome assembly and interleukin-1 β secretion. *Nat Commun* [Internet]. dezembro de 2018 [citado 20 de junho de 2018];9(1). Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41467-017-02645-3>
73. Reynolds CJ, Suleyman OM, Ortega-Prieto AM, Skelton JK, Bonnesoeur P, Blohm A, et al. T cell immunity to Zika virus targets immunodominant epitopes that show cross-reactivity with other Flaviviruses. *Sci Rep* [Internet]. dezembro de 2018 [citado 20 de junho de 2018];8(1). Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-18781-1>
74. Shang Z, Song H, Shi Y, Qi J, Gao GF. Crystal Structure of the Capsid Protein from Zika Virus. *J Mol Biol*. março de 2018;430(7):948–62.
75. Dai L, Song J, Lu X, Deng Y-Q, 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*. maio de 2016;19(5):696–704.