

ROBERT ANDREATA SANTOS

**Desenvolvimento de plataformas de diagnóstico uniplex e multiplex para
infecção com arbovírus utilizando proteínas recombinantes**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências com ênfase em Microbiologia.

Março/2021

ROBERT ANDREATA SANTOS

**Desenvolvimento de plataformas de diagnóstico uniplex e multiplex para
infecção com arbovírus utilizando proteínas recombinantes**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção do título
de Doutor em Ciências com ênfase em Microbiologia.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira

Versão Corrigida

Março/2021

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)

Andreatta Santos, Robert

Desenvolvimento de plataformas de diagnóstico uniplex e multiplex para infecção com arbovírus utilizando proteínas recombinantes / Robert Andreatta Santos; orientador Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira. -- São Paulo, 2021.

117 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Epidemiologia. 2. Dengue. 3. Zika. 4. Chikungunya. 5. Diagnóstico Sorológico. I. de Souza Ferreira, Prof. Dr. Luís Carlos, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Robert Andreata Santos

Título da Dissertação/Tese: Desenvolvimento de plataformas de diagnóstico uniplex e multiplex para infecção com arbovírus utilizando proteínas recombinantes

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-000
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 17 de outubro de 2019.

PARECER 1452/CEPSH

CAAE nº 22874419.1.0000.5467

Protocolo CEPSH-ICB nº 1508/19

O Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB, em 16/10/2019, **APROVOU** o projeto intitulado: "**Desenvolvimento de plataformas de diagnóstico uniplex e multiplex para infecção com arbovírus utilizando proteínas recombinantes**", dos pesquisadores: **Robert Andreatta Santos e Luís Carlos de Souza Ferreira**.

Caberá aos pesquisadores, em conformidade com a Resolução CNS nº 466/2012: 1) elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final) conforme modelo constante no site: www2.icb.usp.br/icb/cepsb; 2) desenvolver o projeto conforme metodologia apresentada; 3) manter em arquivo sob sua guarda (impresso ou digital), por até 5 anos após conclusão da pesquisa, toda documentação relacionada a pesquisa; 4) encaminhar os resultados para publicação; 5) justificar ao CEP, via Plataforma Brasil, interrupção do projeto ou a não publicação de resultados; 6) finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste projeto. O primeiro relatório deverá ser enviado, via Plataforma Brasil, até **16/10/2020**.

Atenciosamente,

Profa. Dra. **CAMILA SQUARZONI DALE**
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Desenvolvimento de plataformas de diagnóstico uniplex e multiplex para infecção com arbovirus utilizando proteínas recombinantes*", registrado sob o protocolo nº **47/2017**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **01/06/2017** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Luis Carlos de Souza Ferreira**

- Departamento: *Microbiologia*

- Membros da Equipe: *Aléxia Adrienne Venceslau Brito Carvalho (Estagiário), Robert Andreato Santos (Pós-graduando), Lennon Ramos Pereira (Pós-graduando), Denicar Lina Nascimento Fabris Maeda (Pós-graduando), Rúbens Prince dos Santos Alves (Pós-graduando), Samuel Santos Pereir*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www.icb.usp.br/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Development of uniplex and multiplex diagnostic platforms for arbovirus infection using recombinant proteins*", protocol nº **47/2017**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **6/1/2017** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Luis Carlos de Souza Ferreira**

- Team members: *Aléxia Adrienne Venceslau Brito Carvalho (Trainee), Robert Andreato Santos (Graduate Student), Lennon Ramos Pereira (Graduate Student), Denicar Lina Nascimento Fabris Maeda (Graduate Student), Rúbens Prince dos Santos Alves (Graduate Student), Samuel Sant*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Mus musculus</i>	<i>Balb/c</i>	<i>Macho/male</i>	<i>6-8 semanas/weeks</i>	250

São Paulo, 30 de junho de 2017.



Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP



Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento
Secretário CEUA-ICB/USP



**Uso de animais
para experimentação**



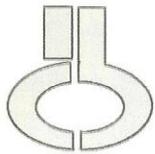
DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que

Robert Andreato Santos

participou do Curso “Uso de Animais em Experimentação” com carga horária total de 10 horas, em formato ensino a distância, realizado pela Comissão de Biotérios do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 15 de maio de 2020
Comissão de Biotérios
ICB USP



Certificado



Certificamos que Robert Andreatta Santos participou do Treinamento em Biossegurança realizado no Departamento de Microbiologia/ICB-USP, no dia 01 de Abril de 2014, com carga horária total de 8 horas.

Gabriel Padilla

Prof. Dr. Gabriel Padilla
Responsável pelo Treinamento

Tatiana Alves dos Reis

Tatiana Alves dos Reis
Técnica Responsável pelo Treinamento



Declaro, para os devidos fins, que

Robert Andreata Santos

concluiu o Curso "Armazenamento, Manuseio e Descarte de Produtos Químicos",
realizado no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 31 maio 2017
(Declaração válida por 5 anos)

Helayne Freitas
Presidente da Comissão de Resíduos Químicos

Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt
Diretor do ICB

Dedico este trabalho

Às minhas famílias de sangue e de vida,
por sempre acreditarem, torcerem e me apoiarem.

À minha esposa Carla,
Por todo amor, carinho, paciência, ânimo
e apoio incondicional nos momentos difíceis.

À Deus, por todo o cuidado e proteção.

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Luís pela orientação, confiança, paciência, exemplo de conduta, dedicação e profissionalismo. Sinto-me grato pela oportunidade de aprendizado e formação com uma pessoa que respeito e admiro. Muito obrigado pelos ensinamentos nos campos da ciência e da vida.

À profa. Dra. Rita pelo acolhimento no laboratório, compartilhamento de experiências, todo o apoio, incentivo e momentos de risada.

À minha esposa Carla, por segurar minha mão nessa montanha russa que é o desenvolvimento e a conclusão de uma tese de doutorado. Por todo o amor, carinho, preocupação, dedicação, conselhos, cuidados e ajuda na minha caminhada. Ter te encontrado nesse percurso da minha vida foi o maior presente que recebi e adjetivos não são suficientes para demonstrar o quanto você é importante e especial para mim. Te amo e sou muito grato por todo dia poder compartilhar a vida contigo.

Aos meus pais Inêz e José Jackson, ao meu irmão José Roberto e toda a grande família, os mais importantes da minha vida, que estarão ao meu lado em todos os momentos e que sempre me desejam meu sucesso. Todo o trabalho teve altos e baixos, mas sem dúvida vocês foram a força que me ajudou a superar todas as dificuldades. Vocês são a base e o alicerce de tudo o que sou. Nada faria sentido sem vocês e nenhuma alegria tão plena!

Ao Eduardo Gimenes e a Gisele Santana, por toda a ajuda, preocupação e amizade, sendo indispensáveis à realização deste projeto. A amizade que desenvolvemos nesse período nunca será esquecida! Muito obrigado.

Aos meus irmãos da família HC, que me recebem sempre de braços abertos, dando alegria a cada novo reencontro e não permitindo que a distância seja empecilho para irmandade. Vocês são exemplo de família de vida e estão guardados no meu coração. Admiro cada um de vocês e me sinto lisonjeado por presenciar o crescimento e conquistas de cada um. “Não precisa ter conta sanguínea, é preciso ter sempre um pouco mais de sintonia”.

Aos meus companheiros e amigos do LDV, com os quais compartilhei não só o trabalho, como a vida. Não chegaria até aqui sem a ajuda de todos vocês! Em especial aos amigos do grupo Arbovírus (Marianna, Mônica, Samuel, Rúbens, Lennon, Aléxia, Éric e Sammy) e do grupo HPV (Natiely, Mariângela, Karine, Luana, Bruna, Carol e Jamile). Contem sempre comigo!

À Deus, por permitir a caminhada até aqui. Por ter um olhar especial por mim, me proporcionando aventuras maravilhosas e sempre aliviando as dificuldades da vida.

“Develop an attitude of gratitude, and give thanks for everything that happens to you, knowing that every step forward is a step toward achieving something bigger and better than your current situation.”

Brian Tracy

Este trabalho foi realizado sob orientação do Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira, no Centro de Vacinas e Terapias Gênicas (CEVAT-GENE4), no Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (processo 2016/23560-0) e do Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (processo 88881.130787/2016-01 (88887.137920/2017-00)).

Desenvolvimento de plataformas de diagnóstico uniplex e multiplex para infecção com arbovírus utilizando proteínas recombinantes.

Robert Andreatta Santos¹, Luís Carlos de Souza Ferreira²

^{1,2} Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas, Instituto de Ciências Biomédicas II, Universidade de São Paulo, Brasil.

randreatta@usp.br¹, lcsf@usp.br²

RESUMO

Os vírus Dengue (DENV), Zika (ZIKV) e Chikungunya (CHIKV) são arbovírus evidentes no cenário internacional atual que apresentam dificuldade na geração de dados epidemiológicos acurados. Tal fato ocorre devido à grande semelhança dos sintomas clínicos compartilhados pelas doenças, além da elevada reação cruzada observada entre alguns desses vírus quando avaliados em testes de diagnóstico sorológico. A disponibilidade de testes sorológicos sensíveis, específicos e de baixo custo contra esses vírus ainda é limitada no país. Diante disso, o presente projeto teve por objetivo desenvolver plataformas de diagnóstico sorológico uniplex (ELISA) e multiplex (Luminex), baseadas em formas recombinantes de proteínas DENV, ZIKV e CHIKV. Após avaliação *in silico*, porções da proteína não estrutural 1 (NS1) de DENV e ZIKV (denominadas Δ NS1 ZIKV e Δ NS1 DENV1-4), e da proteína 2 do envelope (E2) de CHIKV (denominada E2.1 CHIKV) apresentaram baixa homologia entre si e com as mesmas regiões de vírus próximos a DENV, ZIKV e CHIKV, sendo escolhidas como antígenos de diagnóstico. As proteínas foram implementadas nas plataformas de sorodiagnóstico, as quais foram otimizadas e validadas com a utilização de painéis de soros humanos fornecidos por colaboradores. Todos os testes gerados na plataforma de ELISA apresentaram valores de sensibilidade e especificidade iguais ou superiores aos testes atualmente disponíveis no mercado, com destaque para o teste ELISA ZIKV, o qual proporcionou uma parceria público privada que culminou na aprovação da sua comercialização pela ANVISA. Resultados similares foram observados com a implementação dos antígenos à plataforma Luminex, corroborando o potencial dos antígenos desenvolvidos. O sucesso do desenvolvimento do presente projeto salienta a importância do estudo e do desenvolvimento de metodologias diagnósticas, bem como ilustra de forma clara como a pesquisa acadêmica pode ser feita em sintonia com empresas voltadas para o desenvolvimento de tecnologias na área da saúde.

Palavras-Chave: Epidemiologia, Dengue, Proteínas recombinantes, Diagnóstico Sorológico, Chikungunya, Zika.

Development of uniplex and multiplex diagnostic platforms for arbovirus infection using recombinant proteins

Robert Andreato Santos¹, Luís Carlos de Souza Ferreira²

^{1,2}Laboratory of Vaccine Development, Institute of Biomedical Sciences II,
University of São Paulo, Brazil.
randreato@usp.br¹, lcsf@usp.br²

ABSTRACT

The Dengue (DENV), Zika (ZIKV) and Chikungunya (CHIKV) viruses are arboviruses evident in the current international scenario that present difficulties in the generation of accurate epidemiological data. This fact occurs due to the great similarity among the clinical symptoms shared by the diseases, in addition to the high cross reaction observed among some of these viruses when evaluated by serological diagnostic tests. The availability of sensitive, specific and low-cost serological tests against these viruses is still limited in Brazil. Therefore, this project aimed to develop uniplex (ELISA) and multiplex (Luminex) serological diagnosis platforms, based on recombinant forms of DENV, ZIKV and CHIKV proteins. After *in silico* evaluation, portions of the non-structural protein 1 (NS1) of DENV and ZIKV (called Δ NS1 ZIKV and Δ NS1 DENV1-4), and of the envelope protein 2 (E2) of CHIKV (called E2.1 CHIKV) presented low homology among themselves and with the same regions of viruses close to DENV, ZIKV and CHIKV, being chosen as diagnostic antigens. The proteins were implemented on the serodiagnosis platforms, which were optimized and validated using human serum panels provided by collaborators. All tests generated on the ELISA platform showed sensitivity and specificity values equal to or higher than the tests currently available on the market, with emphasis on the ELISA ZIKV test, which provided a public-private partnership that culminated in the approval of its commercialization by ANVISA. Similar results were observed with the implementation of the antigens to the Luminex platform, corroborating the potential of the developed antigens. The success of the development of this project highlights the importance of studying and developing diagnostic methodologies, as well as illustrate clearly how academic research can be done in tune with companies focused on the development of technologies in the health area.

Keywords: Epidemiology, Dengue, Recombinant proteins, Serological diagnosis, Chikungunya, Zika.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Análise de sequência e determinação de epítomos de células B na proteína NS1 ZIKV	45
Figura 2. Caracterização da NS1 e Δ NS1 recombinantes de ZIKV	48
Figura 3. Purificação das proteínas recombinantes Δ NS1 de DENV 1, 2, 3 e 4.....	50
Figura 4. Análise da antigenicidade das proteínas Δ NS1 de DENV 1, 2, 3 e 4.....	51
Figura 5. Adsorção prévia de soros com as proteínas Δ NS1 de DENV 1, 2, 3 e 4 ..	52
Figura 6. Avaliação da reatividade de soros ZIKV ⁺ e DENV ⁺ por meio da tecnologia de termoforese	54
Figura 7. Determinação do reagente ideal para a etapa de sensibilização	56
Figura 8. Determinação do tempo ideal de incubação na etapa de bloqueio	56
Figura 9. Determinação da concentração ideal no pool de proteína Δ NS1 DENV, utilizado na etapa de adsorção.....	57
Figura 10. Determinação da concentração ideal do anticorpo secundário	58
Figura 11. Determinação do reagente cromógeno ideal utilizado na etapa de revelação.....	58
Figura 12. Determinação do reagente de bloqueio ideal	59
Figura 13. Determinação do reagente ideal utilizado na diluição do pool de Δ NS1 dos 4 sorotipos de Dengue e dos soros testados	60
Figura 14. Ensaio de ELISA para determinação do reagente ideal utilizado na diluição do anticorpo secundário	60
Figura 15. Ensaio de ELISA para determinação de resquícios de reatividade cruzada entre a proteína Δ NS1 ZIKV e soros contendo anticorpos contra DENV e YFV	61
Figura 16. Determinação da curva ROC do teste ELISA ZIKV e distribuição de amostras validadas	62
Figura 17. Determinação da curva ROC do teste ELISA DENV e distribuição de amostras validadas	64
Figura 18. Teste de expressão das bactérias transformadas com o plasmídeo E2CHIKV	66
Figura 19. Comparação de expressão e análise da solubilidade da proteína E2 de CHIKV	67
Figura 20. Purificação da proteína E2 por cromatografia de afinidade ao níquel	68
Figura 21. Purificação da proteína recombinante E2.1 de CHIKV	69

Figura 22. Determinação da curva ROC do teste ELISA CHIKV e distribuição de amostras validadas	70
Figura 23. Controle de qualidade da sensibilização da proteína Δ NS1 DENV1 em ensaios na plataforma Luminex.....	72
Figura 24. Obtenção da condição ótima para ensaios envolvendo a proteína Δ NS1-DENV1	73
Figura 25. Controle de qualidade da sensibilização da proteína Δ NS1 DENV1	75
Figura 26. Avaliação da sensibilização das proteínas Δ NS1 via detecção de soros humanos sabidamente positivos para DENV 1	76
Figura 27. Avaliação da presença de IgG total EDIII em soros ZIKV positivos colhidos sequencialmente	77
Figura 28. Avaliação da presença de IgG total Δ NS1 específicos em soros ZIKV positivos, colhidos sequencialmente	78
Figura 29. Avaliação da presença de IgG1 Δ NS1 específicos em soros ZIKV positivos colhidos sequencialmente	80
Figura 30. Avaliação da presença de IgG3 Δ NS1 específicos em soros ZIKV positivos colhidos sequencialmente	81
Figura 31. Avaliação da presença de IgA Δ NS1 específicos em soros ZIKV positivos colhidos sequencialmente	82
Figura 32. Avaliação da presença de IgG total Δ NS1 específicos em soros brasileiros colhidos de áreas endêmicas	83
Figura 33. Avaliação da presença de IgG total Δ NS1 e E2.1 específicos em amostras de soros de pacientes brasileiros colhidos em áreas endêmicas.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de reagentes comerciais que foram testados	37
Tabela 2. Número de amostras provenientes da Coorte cedida pelo Dr. Albert Ko..	39
Tabela 3. Número de amostras provenientes da Coorte cedida pelo Dr. Edison Durigon.....	39
Tabela 4. Número de amostras provenientes dos Dr. Paolo Zanotto e Dra. Patrícia Jungmann.....	40
Tabela 5. Número de amostras do painel contra DENV1 cedido pelo Dr. Jean-Claude Manuguerra	42
Tabela 6. Número de amostras do painel contra ZIKV cedido pelo Dr. Jean-Claude Manuguerra	42
Tabela 7. Número de amostras do painel contra CHIKV cedido pelo Dr. Paolo Zanotto	42
Tabela 8. Epítomos conformacionais identificados na região C-Terminal da proteína NS1 ZIKV	46
Tabela 9. Análise da avidéz e da amplitude de ligação de soros ZIKV ⁺ e DENV ⁺ quando associados à proteína Δ NS1 ZIKV	55
Tabela 10. Representação das <i>beads</i> utilizadas para a sensibilização das proteínas Δ NS1 ZIKV e DENV1-4.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

‰: porcentagem

+LR: razões de verossimilhança positiva

-LR: razões de verossimilhança negativa

°C: graus celsius

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Arbovírus: *Arthropod born vírus*

BSA: Albumina do soro bovino

C: Proteína do capsídeo

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

CHIKV: Vírus Chikungunya

CIBU: *Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence*

DENV: Vírus da Dengue

DENV1-4: Vírus dengue do sorotipo 1 a 4

DO: densidade ótica

E: Proteína do envelope

E1: Proteína do envelope 1

E2: Proteína do envelope 2

EDAC: *1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)*

EDIII: Subdomínio 3 da proteína de envelope

EDTA: *Ethylenediamine tetraacetic acid*

ELISA: *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*

Fi: Fração insolúvel

Fs: Fração solúvel

g: Gravidade

ICB: Instituto de Ciências Biomédicas

IFA: Imunofluorescência

IgA: Imunoglobulina A

IgG: imunoglobulina G

IgG1-3: Imunoglobulina G de subclasse 1-3

IgM: Imunoglobulina M

IPTG: *Isopropil β -D-1 tiogalactopiranosideo*

JEV: Vírus da Encefalite Japonesa

Kb: Quilobase
kDa: quilodalton
LDV: Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas
M: molar
MAYV: Vírus Mayaro
MFI: Mediana de fluorescência
mg: miligrama
mL: mililitro
mM: milimolar
N: Normal
ng: nanograma
nm: nanômetro
nm: nanometros
NS: *Nonstructural protein*
NS: Proteína não estrutural
NS1-5: Proteína não estrutural 1 a 5
NsP: *Nonstructural Protein*
OMS: Organização Mundial de Saúde
OPAS: Organização Pan-americana de Saúde
OPD: *o-Phenylenediamine*
PAGE: *polyacrylamide gel electrophoresis*
PBS: salina tamponada fosfatada
PBS-T: PBS + 0,05% de Tween 20 %
PCR: *polymerase chain reaction* (reação de polimerase em cadeia)
PDB: *Protein data bank*
PE: Pernambuco
pH: potencial hidrogeniônico
PMSF: *phenylmethanesulfonylfluoride*
prM: proteína precursora de membrana
PRNT: *Plaque reduction neutralization test*
RNA: ácido ribonucléico
ROC: *Receiver Operating Characteristics*
R-PE: anticorpos conjugados a ficoeritrina recombinante
rpm: rotações por minuto

SCZ: Síndrome Congênita de ZIKV

SDS: sodium dodecyl sulfate (dodecil sulfato de sódio)

S-NHS: *N-hydroxysulfosuccinimide*

T0: Tempo 0 hora

T18: Tempo 18 horas

T4: Tempo 4 horas

TA: Temperatura ambiente

TCLE: Termo de consentimento livre e esclarecido

TMB: *Tetramethylbenzidine*

USP: Universidade de São Paulo

VNO: Vírus do Nilo Oriental

VNT: *Viral neutralization*

YFV: Vírus da Febre Amarela

ZIKV: Vírus da Zika

µg: micrograma

µL: microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
2. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS.....	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1. Comitê de Ética	31
3.2. Análises de bioinformática e clonagem das proteínas Δ NS1 de ZIKV e DENV	31
3.3. Expressão e purificação das proteínas recombinantes Δ NS1 de ZIKV e DENV em linhagens de <i>E.coli</i>	32
3.4. Expressão e purificação das proteínas E2 e E2.1 de CHIKV em linhagens de <i>E. coli</i>	34
3.5. Teste de ELISA com reagentes produzidos <i>in-house</i>	35
3.6. Protocolo de marcação da proteína Δ NS1 ZIKV com RED-tris-NTA.....	36
3.7. Protocolo de termoforese com a proteína Δ NS1 ZIKV	36
3.8. Validação da padronização do teste de ELISA a partir de amostras de murinos.....	37
3.9. Padronização do teste de ELISA no formato do KIT para a comercialização	37
3.10. Teste de Eficiência (proteína Líquida X proteína Liofilizada).....	38
3.11. Validação da padronização do teste de ELISA a partir de amostras Padrão.....	38
3.12. Sensibilização de <i>beads</i> magnéticas para plataforma Luminex.....	40
3.13. Teste multiplex com <i>beads</i> sensibilizadas	41
3.14. Validação da padronização do teste Multiplex a partir de amostras Padrão.....	41
3.15. Cálculos de valores estatísticos e curvas ROC	43
4. RESULTADOS.....	44
4.1. Escolha da proteína de Δ NS1 de ZIKV e DENV	44
4.2. Teste da proteína Δ NS1 ZIKV em ensaio de ELISA com reagentes produzidos <i>in-house</i>	55
4.3. Padronização do teste baseado na Δ NS1 de ZIKV	58
4.4. Especificidade e Sensibilidade	61

4.5. Padronização do teste baseado na Δ NS1 de DENV.....	63
4.6. Escolha da proteína de CHIKV E2.1	65
4.7. Padronização do ELISA CHIKV.....	70
4.8. Utilização das proteínas Δ NS1 DENV e ZIKV na plataforma multiplex ...	71
4.9. Utilização da proteína E2.1 na plataforma multiplex.....	83
5. DISCUSSÃO.....	86
6. CONCLUSÕES.....	95
7. REFERÊNCIAS	96
8. ANEXOS.....	106
8.1. Anexo 1: Aprovação do kit ELISA ZIKV pela ANVISA.....	106
8.2. Anexo 2: Publicação com primeira autoria compartilhada	107
8.3. Anexo 3: Publicação com primeira autoria.....	108
8.4. Anexo 4: Publicação com primeira autoria.....	109
8.5. Anexo 5: Publicação como coautor	110
8.6. Anexo 6: Publicação como coautor	111
8.7. Anexo 7: Publicação como coautor	112
8.8. Anexo 8: Publicação como coautor	113
8.9. Anexo 9: Publicação como coautor	114
8.10. Anexo 10: Publicação como coautor	115
8.11. Anexo 11: Publicação como coautor	116
8.12. Anexo 12: Publicação como coautor	117

1. INTRODUÇÃO

A presença de doenças virais acometendo humanos é datada desde a antiguidade, porém o termo arbovírus (do inglês *arthropod born vírus*) somente passou a ser empregado em 1881, quando o Dr. Carlos Finlay propôs a transmissão do vírus da Febre Amarela (YFV) por mosquitos (CHAVES-CARBALLO, 2005). Dentre esses vetores destacam-se os mosquitos do gênero *Aedes*, responsáveis pela transmissão de três das arboviroses de maior importância epidemiológica no cenário nacional e mundial da atualidade, causadas pelos vírus: Dengue (DENV), Zika (ZIKV) e Chikungunya (CHIKV). Pertencentes à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, os DENV e ZIKV apresentam parentesco com outros vírus emergentes como o YFV, o vírus da encefalite japonesa (JEV) e o vírus do Nilo Ocidental (VNO) (LINDENBACH; RICE, 2007; TOGNARELLI et al., 2016). Esses vírus são caracterizados por possuir genoma constituído de um RNA de fita simples, com orientação positiva que codifica 3 proteínas estruturais (C, prM e E), que constituirão a partícula viral formada, e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5), que estão envolvidas na replicação viral e evasão do sistema imunológico dos hospedeiros (FERNANDEZ-GARCIA et al., 2009; FAYE et al., 2014).

O CHIKV, por sua vez, pertence à família *Togaviridae* e gênero *Alphavirus*, possuindo parentesco com outros arbovírus de importância nacional, como o vírus Mayaro (MAYV) (DE FIGUEIREDO; FIGUEIREDO, 2014). O CHIKV é caracterizado por possuir genoma também de simples e com orientação positiva, sendo seu tamanho de 11,8 kb (KHAN et al., 2002). Esse vírus apresenta eficiência de replicação extremamente elevada em *Aedes albopictus* quando comparado com outros vetores do mesmo gênero (TSETSARKIN et al., 2007). Seu genoma codifica 3 proteínas estruturais principais (C, E1 e E2), que constituirão a partícula viral, e quatro proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4) que estão envolvidas na replicação viral no hospedeiro (WEAVER; LECUIT, 2015).

Além de transmitidos por vetores *Aedes*, DENV, ZIKV e CHIKV também possuem origens semelhantes a partir de primatas não humanos (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952; TSETSARKIN; CHEN, 2011; VASILAKIS et al., 2011). O DENV atualmente consiste em umas das arboviroses de maior relevância econômica e epidemiológica, atingindo um número estimado de 390 milhões de infecções por ano, sendo que destas aproximadamente 96 milhões apresentam algum grau de

severidade que levam para cerca de 30 mil mortes anuais (BHATT et al., 2013; STAHL et al., 2013; CONSTENLA; GARCIA; LEFCOURT, 2015).

O ZIKV teve sua primeira infecção em humanos registrada na década de 60 em Uganda (MOORE et al., 1975; HAMEL et al., 2015). Em 2007 foi documentado o primeiro surto de infecções associadas ao ZIKV na ilha de Yap na Micronésia, com cerca de 73% da população infectada (DUFFY et al., 2009; IOOS et al., 2014). Na América o primeiro surto registrado ainda está em curso no Brasil, sendo estimado pelo Ministério da Saúde a ocorrência de 440.000 a 1.300.000 casos suspeitos somente no período de maio a dezembro de 2015 (IOOS et al., 2014; HENNESSEY; FISCHER; STAPLES, 2016). Em escala global, 75 países reportaram transmissão do ZIKV por mosquitos desde 2007 e atualmente o Brasil já possui mais de 2.000 casos confirmados de Síndrome Congênita de ZIKV (SCZ) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007).

A emergência do CHIKV tem registros iniciais no continente africano, com primeiro caso reportado em 1879, seguido de vários surtos e epidemias isoladas e posterior disseminação para ilhas do Oceano Índico e Ásia (WEAVER; LECUIT, 2015). Em 2016, o CHIKV se disseminou para as Américas, tendo sido reportado em 51 países americanos, e causou cerca de 135 mortes, decorrentes de 121 mil infecções confirmadas, sendo dessas 120 mortes apenas no Brasil (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). O risco de surgimento de novos surtos ou manutenção de endemias em regiões que contenham o mosquito transmissor demanda o controle epidemiológico das regiões afetadas, de forma a estabelecer planos de combate à infecção pelo CHIKV e outras arboviroses.

Os efeitos deletérios causados por DENV, CHIKV e ZIKV em quadros mais acentuados são bastante característicos. A dengue em sua forma mais grave apresenta um quadro marcante de hemorragia, com uma redução acentuada no nível de plaquetas e em alguns casos também de leucócitos (MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009), enquanto a CHIKV apresenta casos semelhantes à artrite que podem perdurar durante meses devido à permanência dos vírus nas articulações (LUM; NG, 2015). A infecção pelo ZIKV é autolimitada em adultos, com raras exceções (encefalite aguda), mas foi identificado como potencial causador de microcefalia em bebês de mães que contraíram o vírus durante a gravidez (BRASIL et al., 2016; DRIGGERS et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2016). Contudo, a grande maioria dos quadros clínicos iniciais são semelhantes, com sintomas variáveis e sem

especificidade clínica clara, o que torna a diferenciação dessas doenças dependente da evolução clínica do paciente e de exames laboratoriais. No entanto, dados epidemiológicos, prospectivos e retrospectivos, são incompletos pela falta de testes de diagnóstico sorológico específicos para essas arboviroses em postos de saúde.

A existência de elevada reação cruzada foi relatada para arboviroses quando avaliadas em testes de diagnósticos sorológicos (ALLWINN et al., 2002; MANSFIELD et al., 2011). Tais reações ocorrem devido à grande semelhança antigênica presente nos arbovírus, principalmente entre os *Flavivirus*, e que se tornam frequentes durante as fases de infecções agudas. Durante esse período ocorrem expansões clonais de linfócitos B produtores de anticorpos que, por muitas vezes, apresentam reatividade cruzada frente a outros arbovírus e patógenos não virais (PAPA; KARABAXOGLU; KANSOUZIDOU, 2011; PRIYAMVADA et al., 2016).

A alternativa utilizada à sorologia consiste na utilização de técnicas de diagnóstico molecular, as quais são capazes de detectar o material genético viral no sangue de pessoas infectadas até 14 dias após a infecção (CDC, 2016). A detecção do ZIKV já foi comprovada em primatas não humanos no Brasil (FAVORETTO et al., 2016), porém, como já observado para DENV e o próprio ZIKV, o quadro virêmico dessas espécies, assim como em humanos, é transiente (HANLEY et al., 2014; OSUNA et al., 2016). Portanto, a sorologia se faz necessária tanto em casos em que há necessidade de se conhecer o estado imunológico prévio dos pacientes, assim como para o monitoramento de contato de primatas não humanos de zonas urbanas ou não urbanas com arbovírus. Tais fatos limitam a utilização dos testes moleculares como única ferramenta de diagnóstico durante períodos de epidêmicos ou mesmo em regiões endêmicas para DENV, ZIKV e CHIKV.

Frequentemente, pela reduzida disponibilidade de testes sorológicos específicos, utilizam-se testes de neutralização de placas virais (PRNT) em associação com diagnósticos moleculares específicos. O PRNT, apesar de ser considerado como padrão ouro para a soroconversão, consiste em uma técnica de elevado custo, trabalhosa, que necessita uma semana para gerar resultados e também sofre com a reatividade cruzada de anticorpos, particularmente, em amostras de pacientes oriundos de regiões endêmicas (HALSTEAD; ROJANASUPHOT; SANGKAWIBHA, 1983; MANSFIELD et al., 2011). De fato, mesmo resultados baseados em PRNT demandam avaliação crítica de possíveis casos falso-positivos e/ou falso-negativos. Além disso, já foi relatado que infecções prévias por outros

Flavivirus aumentam a reatividade cruzada de anticorpos IgM (LANCIOTTI et al., 2008). Assim, o desenvolvimento de testes de diagnóstico sorológico específicos para arboviroses se mostra de extrema importância. Para isto, a geração de antígenos adequados para tal aplicação representa uma etapa limitante, devendo-se evitar regiões conservadas entre diferentes vírus.

A utilização de proteínas recombinantes no desenvolvimento de testes sorológicos é uma prática difundida (CUZZUBBO et al., 2001; BALAMURUGAN et al., 2010). De fato, a proteína NS1 de DENV é base para a confecção de testes laboratoriais, como os testes imunocromatográficos de captura de antígeno ou de anticorpos (CUZZUBBO et al., 2001). Os testes imunocromatográficos são amplamente distribuídos, sendo utilizados como ferramentas de diagnóstico conclusivo em regiões endêmicas. Contudo, com o recente espalhamento de novos *Flavivirus*, como o ZIKV, a utilização da sequência completa dessa proteína se tornou motivo de questionamento na comunidade científica, já que sua conservação entre *Flavivirus* pode gerar resultados potencialmente errôneos (MULLER; YOUNG, 2013; GYURECH et al., 2016; MATHEUS et al., 2016). Dessa forma, se faz necessária a reformulação dos antígenos base para o diagnóstico sorológico de tais doenças, seja pela fragmentação dos antígenos não estruturais atualmente utilizados, seja pela utilização de outras proteínas virais que confirmam maior especificidade às respostas sorológicas detectáveis em indivíduos infectados.

As glicoproteínas do envelope viral também apresentam certo nível de conservação entre *Flavivirus*, visto que o processo de invasão celular nesses vírus é semelhante. Contudo, regiões responsáveis pela ligação viral às células susceptíveis apresentam grande variação, mesmo entre vírus semelhantes e do mesmo gênero (PRIYAMVADA et al., 2016). As diferenças observadas nos receptores reconhecidos por cada vírus refletem os diferentes reservatórios e sítios de replicação entre eles. Um exemplo interessante é representado pela permanência do ZIKV (NICASTRI et al., 2016), mas não do DENV em sêmen humano. Tais subdomínios de receptores virais foram caracterizados para DENV (DENV EDIII), ZIKV (ZIKV EDIII) e CHIKV (CHIKV E2) e possuem baixa similaridade entre si, o que os torna potenciais candidatos a antígenos discriminatórios para testes sorológicos entre as infecções causadas pelos três vírus.

Contudo, mesmo com a obtenção de bons antígenos discriminatórios para infecções causadas por esses três vírus, deve-se levar em conta a disponibilidade e

acessibilidade aos testes desenvolvidos quando se pensa na aplicação em estudos epidemiológicos, particularmente quando delineados para uso em condições de campo. Testes com um alto valor tecnológico agregado ficam concentrados nos grandes centros e não surtem o efeito desejado quando se busca utilizá-los em países de dimensões continentais, como o Brasil, onde regiões inteiras com menor poder aquisitivo podem ser prejudicadas pela falta de disponibilidade de testes diagnósticos de alta qualidade. Necessita-se, portanto, de testes precisos padronizados com metodologias simples e acessíveis, mas não menos robustas.

Diante dessa situação, destaca-se o ensaio imunoenzimático, popularmente conhecido como ELISA (do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*). A plataforma de ELISA foi inicialmente descrita em 1971 pelos pesquisadores Eva Engvall and Peter Perlman (ENGVALL; PERLMANN, 1971), tendo se popularizado devido à sua simplicidade, praticidade, robustez e baixo custo. A técnica consiste na detecção de anticorpos ou antígenos de forma direta ou indireta por meio da utilização de anticorpos conjugados a enzimas que, após terem suplementação com seus respectivos substratos, emitem sinais detectados por leitores de densidade ótica (DO). Desde a década de 80, testes de ELISA têm sido desenvolvidos (ZHANG et al., 2015) para detecção de anticorpos ou antígenos do DENV e, mais recentemente, também para ZIKV ou CHIKV (MARRERO-SANTOS et al., 2013; MENDOZA et al., 2019). Além disso, a plataforma de ELISA é padronizada em todos os laboratórios da Rede Nacional de Laboratórios de Saúde Pública do Brasil, sendo utilizada no diagnóstico de leptospirose, sífilis, HIV, YFV e mesmo DENV. Assim, pode-se considerar a plataforma de ELISA como uma das técnicas laboratoriais com maior potencial de aplicação para políticas públicas em território nacional.

Por outro lado, com o intuito de melhorar a confiabilidade ou mesmo a praticidade da realização de testes diagnósticos, não se pode deixar de lado a contínua evolução de técnicas e metodologias, dada a possibilidade de se tornarem obsoletas. Um exemplo característico pode ser dado pelo desenvolvimento do PCR em tempo real quantitativo que, após ser desenvolvido, permitiu a detecção individual confiável de variados patógenos em uma mesma reação, o que tornou os métodos baseados em PCR convencional obsoletos. No campo da sorologia uma situação semelhante poderá ocorrer em função do contínuo desenvolvimento de novas tecnologias de detecção multiplex, as quais permitem que o diagnóstico de diferentes doenças possa ser feito em uma mesma reação. Apesar de mais custosas, tais

técnicas podem apresentar vantagens econômicas quando aplicadas de modo simultâneo a diversos patógenos, demandando menores quantidades de material para teste, com economia de tempo, amostras e dinheiro.

Diante do exposto, o presente projeto tem por objetivo contribuir para a geração de novas metodologias de diagnóstico sorológico específicas e de baixo custo, por meio da adaptação das plataformas de ELISA e Luminex às proteínas estruturais e não estruturais de DENV, ZIKV, e CHIKV, de forma a proporcionar um melhor monitoramento epidemiológico desses vírus no país.

2. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

O presente projeto tem por objetivo desenvolver plataformas de diagnóstico sorológico para infecções por DENV, ZIKV e CHIKV. O trabalho está baseado na obtenção de formas recombinantes de porções de proteínas não estruturais (Δ NS1 de DENV e ZIKV) e estruturais (E2.1 de CHIKV) que serão aplicadas em plataformas de diagnóstico uniplex (ELISA) e multiplex (Luminex). Para que tal objetivo fosse alcançado, as seguintes etapas experimentais foram definidas:

1. Expressar as proteínas recombinantes estruturais e não estruturais de DENV, ZIKV e CHIKV (Δ NS1 ZIKV, Δ NS1 DENV1-4 e E2.1) em sistema de expressão heterólogo baseado em *Escherichia coli* e purificá-las por técnica de cromatografia de afinidade ao níquel, de forma a obtê-las solúveis e com capacidade antigênica preservada.
2. Padronizar o uso das proteínas Δ NS1 ZIKV, Δ NS1 DENV1-4 e E2.1 como antígenos de fase sólida em plataforma de ELISA de forma a detectar a presença de anticorpos específicos para cada tipo viral;
3. Padronizar o uso das proteínas Δ NS1 ZIKV, Δ NS1 DENV1-4 e E2.1 como antígenos de fase sólida em plataforma multiplex, baseada na tecnologia Luminex, de forma a tornar viável a detecção de anticorpos direcionados contra 3 arbovírus distintos de forma precisa, específica e simultânea;
4. Avaliar a funcionalidade dos testes diagnósticos desenvolvidos em condição experimental empregando amostras de soro de camundongos previamente infectados e imunizados;
5. Validar os testes diagnósticos desenvolvidos frente a uma biblioteca de soros humanos datados de diferentes anos e provenientes de diferentes localidades com registro de infecção por arboviroses, de forma a obter valores de sensibilidade e especificidade dos ensaios, assim como obter aprovação para a comercialização dos testes desenvolvidos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Comitê de Ética

As amostras de soros humanos utilizadas e todos os procedimentos envolvendo manuseio de soro humano foram previamente aprovadas por submissão via plataforma Brasil para o Comitê de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, sob protocolo de número CAAE 22874419.1.0000.5467. Todos os indivíduos que forneceram os soros testados no trabalho assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) juntamente aos respectivos projetos sob os quais as amostras foram coletadas, informando por escrito da utilização das amostras coletas com fins de interesse científico.

Os experimentos utilizando animais (camundongos BALB/c) foram conduzidos de acordo aos Princípios Éticos da Experimentação Animal estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, sendo amparados pelo protocolo nº 47/2017 aprovado junto a Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

3.2. Análises de bioinformática e clonagem das proteínas Δ NS1 de ZIKV e DENV

O desenho dos fragmentos Δ NS1 utilizados nesse trabalho foram baseados na utilização de ferramentas de bioinformática quanto aos níveis de hidrofobicidade e modelagens assumidas após produção em células bacterianas.

Os perfis de hidrofobicidade foram realizados por análises seguindo algoritmo descrito previamente (PARKER; GUO; HODGES, 1986). A análise foi realizada utilizando o software web IEDB Analysis Resource com base na predição de epítomos lineares para células B seguida de predição de hidrofobicidade de Parker.

A modelagem dos fragmentos selecionados utilizou as ORFs completas das sequências de proteínas representativas da proteína NS1 ZIKV, as quais foram utilizadas para guiar a modelagem de homologia da Δ NS1 ZIKV. As sequências com menos de 95% de identidade foram selecionadas de cada subtipo e modeladas com o programa YASARA (KRIEGER; VRIEND, 2014) com 10 iterações PSI-Blast (E-Value de 0,01). Considerando três estados de oligomerização, vinte modelos foram baixados do Protein Data Bank (PDB - <http://www.rcsb.org/pdb/>), tendo cinco alinhamentos de seqüência por modelo. A modelagem foi definida para baixa velocidade com dez extensões de terminal, amostrando 50 loops terminais. As simulações foram realizadas em um ambiente BioLinux e as estruturas produzidas

foram verificadas quanto à consistência no servidor PDBSum com a opção Gerar (disponível em <https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/pdbsum/>). Análises PROCHECK da qualidade estereoquímica da estrutura de proteína modelada também foram gravadas. Os cálculos relativos da área de superfície acessível foram feitos usando as estruturas modeladas com o servidor GETAREA e comparado à visualização da superfície com o programa YASARA (disponível em <http://curie.utmb.edu/getarea.html>). Os modelos foram corrigidos e submetidos a uma simulação de dinâmica molecular de 1 ns em caixa cheia de água e, após a minimização de energia, a estrutura de saída foi salva para a análise.

Os epítomos de célula B descontinuados foram preditos usando o software Discotope (HASTE ANDERSEN; NIELSEN; LUND, 2006). A visita do módulo YASARA foi utilizada para mapear nas estruturas modeladas dos epitopos encontrados pelo servidor IEDB. Os alinhamentos estruturais foram realizados para avaliar a superposição proteína Δ NS1 sobre a cristalografia da NS1 DENV2, no qual os escores de RMSD entre os modelos e as regiões dos epítomos foram produzidos.

Após a seleção dos fragmentos da região C-terminal das proteínas NS1, os genes que codificam para as proteínas do ZIKV (GenBank nº: ALU33341), do DENV1 (GenBank nº: AHF50491.1), do DENV2 (GenBank nº: 288848), do DENV3 (GenBank nº: AFN80339.1), e do DENV4 (GenBank nº: AEX09561.1) foram desenhados e sintetizados comercialmente junto ao vetor de expressão pET28a (GenScript, USA). As sequências foram desenhadas para a utilização dos sítios de restrição utilizados pelas enzimas *Bam*HI e *Xho*I, sendo as construções obtidas confirmadas por análise de sequenciamento. Maiores informações sobre as construções estão sob sigilo de patente, de acordo com o pedido nº: BR102016011318-0.

3.3. Expressão e purificação das proteínas recombinantes Δ NS1 de ZIKV e DENV em linhagens de *E.coli*

Linhagens de *E. coli* capazes de expressar as proteínas Δ N-NS1 de ZIKV (BL21 (DE3)-RIL)e DENV1-4 (BL21 (DE3)) foram transformadas com os plasmídeos que codificam as respectivas proteínas seguindo protocolos já estabelecidos no laboratório (SAMBROOK; W RUSSELL, 2001). Após a transformação, testes de expressão em pequena escala foram feitos induzindo o crescimento das colônias transformadas em meio TB suplementado com 50 μ g/mL do antibiótico canamicina até a fase estacionária de crescimento. Em seguida foi feita a indução da produção

proteica adicionando-se ao meio 0,5 mM de isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) (SAMBROOK; W RUSSELL, 2001), por 18h, sob agitação constante de 200 rpm, a uma temperatura de 18°C. Após a indução, as bactérias foram lisadas por sonicação. O lisado resultante foi centrifugado (10.000 x g por 30 min a 4 °C) e as frações solúveis (sobrenadante) e insolúveis (precipitado) separadas e coletadas. À fração insolúvel foi adicionado tampão B (8 M ureia; 0,1 M Tris; 0,5 M NaCl; pH 8.5). A solubilização desta fração foi realizada por 18 h a 4°C, sendo posteriormente a solução centrifugada (10.000 x g por 30 min a 4 °C) e o sobrenadante coletado (Fi). Amostras antes (T0) e após (T18) indução, bem como alíquotas das frações solúveis (Fs) e insolúveis (Fi), foram desnaturadas a 100 °C por 5 min e, em seguida, submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida e ensaio de western blot empregando anticorpo anti-HisTag (AMORIM et al., 2010).

As linhagens de *E. coli* que melhor expressaram as proteínas de interesse, foram cultivadas em maior escala (750 mL de meio TB) e induzidas de acordo ao protocolo padronizado nos ensaios de expressão. Ao final da indução a cultura foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 min, o sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspenso em 100mL tampão A (0,1 M Tris; 0,5 M NaCl; pH 8.5). A solução obtida foi homogeneizada e posteriormente lisada por pressão em equipamento APLAB-10 (Artepeças, São Paulo, Brasil). O extrato obtido foi centrifugado por 50 min, 10.000 rpm à 4 °C, e o sobrenadante armazenado e clarificado em membrana de nitrocelulose de 0,22 µm. O extrato proteico solúvel (Δ NS1 ZIKV) foi purificado de forma automatizada em equipamento AKTA – AVANT (GE Healthcare Life Sciences) utilizando a técnica de cromatografia de afinidade ao níquel (CAN), em coluna HisTrap 5ml (GE Healthcare Life Sciences), sendo a eluição feita com concentrações crescentes de imidazol (0M a 1M). Para as proteínas insolúveis (Δ NS1 DENV1-4) os corpúsculos de inclusão contendo as proteínas de interesse foram solubilizados em tampão B contendo ureia a 8M e submetidos a procedimento de renaturação in vitro de acordo ao descrito previamente (AMORIM et al., 2010), seguido da purificação com CAN. Ao final da etapa de purificação, as amostras fracionadas foram reunidas e a presença da proteína de interesse confirmada por eletroforese em gel de SDS-PAGE. As proteínas que se apresentaram contaminadas após purificação por CAN, como a Δ NS1 ZIKV, foram submetidas a um segundo passo de purificação por técnica de gel filtração. A análise e quantificação da proteína purificada foi realizada por eletroforese

em gel de SDS-PAGE 15% utilizando curva padrão de Albumina do Soro Bovino (BSA) comercial e ensaios de western blot empregando anticorpo monoclonal anti-HisTag.

3.4. Expressão e purificação das proteínas E2 e E2.1 de CHIKV em linhagens de *E. coli*

Células da linhagem BL21 (DE3) de *E. coli* recombinante, previamente transformadas com os plasmídeos das proteínas E2 ou E2.1 de CHIKV foram cultivadas e induzidas com adição de 0,5 mM de IPTG, por 4 h, sob agitação constante de 200 rpm, em uma temperatura de 37°. A massa celular obtida foi ressuspensas em tampão 1 (0,01 M Tris, 0,01 M EDTA, 0,1 M NaCl, pH 8,0 - 1:20 p / v) e centrifugada a 6000 rpm a 4 °C por 20 min. Este processo foi repetido duas vezes. O sedimento resultante foi ressuspensão em Tampão 2 (0,01 M Tris, 0,05 M EDTA, 0,1 M NaCl, 0,01 M PMSF e pH 7,5) e, posteriormente, as células foram mecanicamente rompidas no equipamento APLAB-10 (Artepeças, São Paulo, Brasil), com 3 ciclos de 5 min (3 min com pressão de 600 bar e 2 min sem pressão), para obtenção do extrato proteico, o qual foi então submetido a centrifugação por 30 min a 10.000 rpm, à 4 °C. A fração insolúvel foi submetida a um processo de lavagem, sendo primeiro suspensa em Tampão 3 (NaH₂PO₄ 0,5 M, EDTA 0,05 M, NaCl 0,2 M, Ureia 0,5 M, TritonX a 1% - 100, pH 6,0 - 1:20 w / v), sonicado com 2 ciclos de 90 segundos e centrifugado por 30 min, 10.000 rpm a 4°C. Continuando o processo de lavagem, o sedimento resultante foi suspenso em tampão 4 (0,05 M NaH₂PO₄, 0,001 M EDTA, 1 M NaCl, pH 6,0 - 1:20 p / v), sonicado com 2 ciclos de 90 segundos e centrifugado por 30 min, 10.000 rpm a 4°C. Assim, após a lavagem, os corpos de inclusão foram solubilizados em tampão 5 (0,01 M Tris, 0,1 M NaH₂PO₄, 0,1 M NaCl, 8 M ureia pH 8,0 - 1:20 p / v) e clarificados com um filtro de 0,20 um para purificação por afinidade cromatografia em coluna HisTrap (5 ml) em equipamento AKTA - AVANT ou FPLC (GE Healthcare Life Sciences) previamente equilibrado com tampão 6 (0,001 M Tris, 0,1 M NaH₂PO₄, 0,1 M NaCl, 8 M Ureia pH 7,5). Após a passagem da amostra pela coluna, outra lavagem foi realizada com tampão de equilíbrio (Tampão 6), sendo as proteínas E2 ou E2.1 recombinantes eluídas com Tampão 7 (Tris 0,001 M, NaH₂PO₄ 0,1 M, NaCl 0,1 M, Ureia 8 M, Imidazol 1 M, pH 7,5) adicionado a um gradiente crescente de concentração de imidazol (0,05 M a 1 M). Ao final das etapas de purificação, a presença da proteína de interesse foi confirmada por SDS.

A renaturação da proteína foi realizada após a remoção do agente desnaturante usando o processo de diálise em série onde o tampão 8 (tampão de fosfato 0,05 M, NaCl 0,25 M e ureia, pH 7,5) foi usado em concentrações decrescentes de ureia (6M, 4M, 2M, 1M finalmente 0M). Para melhor estabilidade da proteína, 10% de glicerol foi adicionado ao Tampão 8 nas concentrações de 2 M, 1 M e 0 M de Ureia.

3.5. Teste de ELISA com reagentes produzidos *in-house*

Os testes foram iniciados utilizando um protocolo *in-house* com reagentes produzidos no próprio laboratório contando com as etapas de sensibilização, bloqueio, adsorção, marcação com o anticorpo primário e secundário e revelação da placa. A sensibilização foi realizada com o antígeno Δ NS1 ZIKV na concentração de 200ng/poço, diluídos no tampão carbonato/bicarbonato (pH 9,6) ou solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,5), à 37°C, durante 1 h, para comparação do melhor reagente. O reagente padrão utilizado para as etapas de bloqueio e anticorpo primário e secundário foi composto por PBS acrescido de 5% de leite desnatado (Molico®), 1% de Albumina Sérica Bovina (BSA, SIGMA®) e 0,05% de Tween 20 (Synth®). Para a avaliação da condição de bloqueio utilizou-se o reagente padrão com variações nos tempos de incubação entre 1 h a 37 °C ou 1 h a 37 °C seguida por 16h (Por uma noite) a 4 °C.

Com o início dos experimentos de especificidade notou-se a necessidade de utilização das proteínas Δ NS1 DENV1-4 para remoção do remanescente de anticorpos que reagiram de forma cruzada, em uma etapa de pré-adsorção. Assim, antes da exposição das proteínas Δ NS1 ZIKV sensibilizadas nas placas de ELISA aos soros dos pacientes, tais soros foram incubados com as proteínas Δ NS1 DENV1-4 (2.200 ng/poço), em reagente padrão, à 37°C por 1 h. O anticorpo secundário (Anti-IgG Humano marcado com Peroxidase, SIGMA®) foi testado de acordo com sua concentração e diluído 1:3000, 1:4000 e 1:5000 no reagente padrão, sofrendo incubações à 37°C por 1 h. Por fim, foram testados os cromógenos a serem utilizados na etapa de revelação das reações das placas, sendo os reagentes OPD e TMB avaliados após exposição por 15 min, ao abrigo de luz, com parada da reação feita com ácido Sulfúrico (H₂SO₄) a 0,2 N. Após o procedimento de revelação as placas foram lidas imediatamente em espectrofotômetro (Multiscan MS- Labsystems) calibrado em um comprimento de onda de 490nm para testes realizados com OPD e 450 nm para os reagentes do tipo TMB.

3.6. Protocolo de marcação da proteína Δ NS1 ZIKV com RED-tris-NTA

A marcação das proteínas Δ NS1 ZIKV para leitura no equipamento Monolith (NanoTemper, Germany) foi realizada por kit fabricado pela mesma empresa e seguiu as instruções do fabricante. Após ressuspensão de todos os reagentes do kit, 200 nM da proteína Δ NS1 ZIKV foram misturados em volume 1:1 com a solução contendo 100 nM de marcadores para a cauda de histidina presente na proteína. Após 30 min de incubação em temperatura ambiente (TA), como forma de diminuição de sinais de ruído, a mistura foi centrifugada por 10 min, a 15,000 g, 4 °C, para a remoção de quaisquer complexos de agregados formados durante a marcação. Então, a proteína apresentou-se marcada e pronta para ser aplicada em experimentos de termoforese.

3.7. Protocolo de termoforese com a proteína Δ NS1 ZIKV

Após a preparação de proteínas Δ NS1 ZIKV fluorescentes, foram seguidas as instruções do fabricante para a realização do ensaio de termoforese com soros ZIKV+ ou DENV+. Inicialmente, 16 tubos utilizados para reações de PCR foram separados para a utilização com cada ligante (soros ZIKV+ ou DENV+), sendo preenchidos a partir do segundo tubo com 10 μ l de PBS-Tween 0,05% (PBS-T). Em seguida, 20 μ l da solução de ligantes (soros previamente diluídos na proporção 1:10 em PBS-T) foram adicionados no primeiro poço e diluídos serialmente na proporção 1:2 em todos os poços restantes, sendo descartados os últimos 10 μ l de solução. Após a preparação das diferentes concentrações de ligante, quantidades idênticas de proteínas Δ NS1 ZIKV previamente marcadas foram adicionadas em 10 μ l de solução a todos os poços. A interação dos antígenos marcados com os anticorpos foi promovida por incubação em TA por 30 min e rapidamente lida em aparelho Monolith NT.115 (NanoTemper, Germany). Todos os cálculos de dispersão das curvas obtidas, bem como os valores de EC₅₀ aqui apresentados foram calculados pelo software integrado ao equipamento.

Para reações contendo a metodologia de adsorção, o mesmo protocolo foi utilizado com adição de uma etapa de incubação dos soros diluídos 1:10 com 2200 ng de proteínas Δ NS1 DENV1-4, por 30 min, à 37 °C. Após a incubação os soros foram diluídos conforme descrito no protocolo.

3.8. Validação da padronização do teste de ELISA a partir de amostras de murinos

A utilização dos soros hiperimunes produzidos em camundongos foi feita com o intuito de se obter valores iniciais de especificidade dos testes gerados. Para a padronização inicial do teste com o Δ NS1 ZIKV foram utilizadas ascites hiperimunes produzidas a partir de infecções por DENV (número de referência no *gene bank* D00346.1), CHIKV (número de referência no *gene bank* AF339485.1), YFV (número de referência no *gene bank* X03700.1) ou ZIKV (número de referência no *gene bank* KF383035.1), gentilmente cedidos pelo Dr. Amadou Alpha Sall do Instituto Pasteur de Dakar, para os ensaios de detecção. Tais ascites foram utilizadas substituindo os soros de humanos, de forma a detectar se anticorpos gerados contra as proteínas NS1 nativas são capazes de reconhecer os fragmentos recombinantes gerados no trabalho.

3.9. Padronização do teste de ELISA no formato do KIT para a comercialização

Para a aprovação do teste desenvolvido pelos órgãos reguladores nacionais foi necessária a mudança dos reagentes utilizados no ELISA feito “*In-house*” para soluções contendo estabilizantes e de produção certificada. Para tanto, nesta etapa foram iniciados os estudos para o preparo do Kit de detecção de IgG para Zika que correspondesse as análises obtidas no teste *In-house* (utilizado como teste padrão), porém que mantivesse sua estabilidade para ser comercializado. Os testes foram realizados a partir de diversos tampões comerciais provenientes de diversos fornecedores (Tabela 1).

Tabela 1. Lista de reagentes comerciais que foram testados.

Nome Comercial	Código	MARCA
SyntheticBlocking	4150	Ken-en-Tec /Dinamarca
Stabil Plus	4530	Ken-en-Tec /Dinamarca
AssayDiluent	4660	Surmodics / USA
HRP Stabilizer	4800	KPL / USA
WellChampion	4900	Ken-en-Tec /Dinamarca
ELISA MultiBuster	5230	Ken-en-Tec /Dinamarca
TMB		Ken-en-Tec /Dinamarca

A sensibilização foi realizada com o antígeno Δ NS1 ZIKV na concentração de 200ng/poço, diluídos no tampão carbonato/bicarbonato à 37°C durante 1 h. O bloqueio foi realizado com os reagentes Synthetic Blocking e WellChampion, conforme instruções do fabricante. Para a diluição do soro, foi testado o reagente comercial Stabil Plus, ELISA MultiBuster e os reagentes PBS 1X e PBS-Tween à 0,05% incubados por 1 h a 37 °C. O conjugado foi diluído nos reagentes comerciais Assay Diluent (4660), HRP Stabilizer (4800) e os reagentes PBS 1X e PBS-Tween à 0,05% incubados por 1 h a 37 °C. Por último, o cromógeno TBM foi adicionado na etapa de revelação e incubados por 15 min no escuro seguido pela parada da reação com ácido Sulfúrico (H₂SO₄) a 0,2 N. A placa foi lida imediatamente após o término da reação no espectrofotômetro em um comprimento de onda de 450nm.

3.10. Teste de Eficiência (proteína Líquida X proteína Liofilizada)

Após toda a padronização do teste, incluindo o uso de reagentes e otimização máxima do protocolo, um novo teste com o objetivo de substituir a forma líquida da proteína purificada se fez necessário, visto a instabilidade da mesma se não armazenada a -80 °C, o que seria inviável para um kit comercial.

A proteína Δ NS1 dos 4 sorotipos de dengue foi congelada, liofilizada (LABCONCO, USA) e armazenada à temperatura ambiente (TA). Para a realização do teste de viabilidade, o mesmo protocolo foi utilizado, com mudança apenas na forma em que as proteínas utilizadas na adsorção foram armazenadas. O teste consistiu na realização da adsorção em um conjunto de 4 soros (1 amostra ZIKV+ DENV- e 3 amostras ZIKV- DENV+). A proteína líquida foi diluída no tampão PBS-Tween 0,05%, em uma concentração de 22ng/ul de cada sorotipo de Dengue e a proteína liofilizada, em mesma concentração, foi ressuspensa em água destilada e agitada até obter a homogeneidade completa da solução. Ambas as etapas de adsorção permaneceram incubadas por 1 h a 37°C.

3.11. Validação da padronização do teste de ELISA a partir de amostras Padrão

Após a determinação dos melhores reagentes, temperaturas, concentração de proteína e anticorpo marcado, o teste ELISA ZIKV foi submetido a validação de sua metodologia utilizando um painel de amostras não comercial de soro humano originários da Bahia, gentilmente cedidos pelo Dr. Albert Ko (Universidade de Yale). O grupo de amostras foi composto por 224 amostras de pacientes, sendo 34 positivos

para o DENV em fase convalescente (previamente triadas por RT-PCR), 40 amostras de indivíduos vacinados para febre amarela e negativos para Zika e Dengue e, por fim, 65 amostras ZIKV positivas em fase aguda e convalescente (amostras coletadas de gestantes que deram luz a bebês portadores ou não de SCZ, previamente triadas por PRNT₉₀) e 85 amostras provenientes de região endêmica, mas sem positividade para ZIKV (Tabela 2).

Tabela 2. Número de amostras provenientes da Coorte cedida pelo Dr. Albert Ko.

Grupo de amostras	Número de Amostras
Dengue – confirmado por RT-PCR	34
Vacinados para febre amarela	40
ZIKV positivas (gestantes)	65
ZIKV negativos de região endêmica	85
Total	224

Para a avaliação do teste ELISA DENV1-4 foram utilizadas amostras gentilmente cedidas pelo Dr. Edison Durigon (Universidade de São Paulo), as quais consistiram em 601 amostras de gestantes acompanhadas pelo Hospital Universitário da Universidade de São Paulo. As amostras foram previamente checadas para neutralização viral pela metodologia de VNT (do inglês *Viral Neutralization*), sendo 183 amostras consideradas positivas para a presença de anticorpos neutralizantes contra DENV e 418 consideradas negativas para a presença de anticorpos contra DENV (Tabela 3).

Tabela 3. Número de amostras provenientes da Coorte cedida pelo Dr. Edison Durigon.

Grupo de amostras	Número de Amostras
Dengue positivas	183
Dengue negativas	418
Total	601

Em relação à avaliação do teste ELISA CHIKV foram utilizadas 15 amostras CHIKV positivas, previamente caracterizadas por PRNT, gentilmente cedidas pelo Dr.

Paolo Zanotto, bem como 48 amostras não caracterizadas, mas oriundas da região endêmica de Pernambuco, gentilmente cedidas pela Dra. Patrícia Jungmann (Tabela 4).

Tabela 4. Número de amostras provenientes dos Dr. Paolo Zanotto e Dra. Patrícia Jungmann.

Grupo de amostras	Número de Amostras
Chikungunya positivas	15
Amostras de região endêmica	48
Total	63

3.12. Sensibilização de *beads* magnéticas para plataforma Luminex

Para a sensibilização de proteínas às *beads* foi utilizado o protocolo de fábrica estabelecido pela BIORAD e distribuído juntamente com as *beads*. Todo o material fica acondicionado à 4 °C e passa por um período de 30 min para acondicionamento à temperatura ambiente (TA). Um total de $1,25 \times 10^6$ *beads* (100 μ l da solução estoque) foi transferido para tubos de sensibilização, os quais foram postos em contato com ímã magnético e deixados em repouso por 2 min para permitir a atração das *beads*. Com a fixação das *beads* nas paredes dos tubos, todo o líquido de armazenamento foi removido com o auxílio de uma pipeta com ponteira de ponta fina, com posterior adição de 100 μ l de tampão de lavagem e agitação média em vórtex por 30 seg. As *beads* foram então novamente fixadas às paredes dos tubos com o auxílio de ímã magnético, após a qual todo o tampão de lavagem foi removido. Foram então adicionados 80 μ l de tampão de ativação de *beads*, juntamente com 10 μ l de solução de S-NHS (N-hydroxysulfosuccinimide) e EDAC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)), ambas previamente preparadas na concentração de 50 mg/mL. As *beads* foram então protegidas da luz e permaneceram em rotação de 700 rotações por minuto (rpm) por 20 min a TA (Thermomixer, EPPENDORF). Após o período de incubação as *beads* foram lavadas por 3x com tampão PBS em pH 7,4 e ressuspensas em 100 μ l de solução contendo 2 μ g, 5 μ g ou 10 μ g de proteína. As *beads* foram vortexadas e o volume da solução foi elevado para 500 μ l e posto para incubação por 2 h em mixer com rotação de 20 rpm. Com a incubação finalizada, as *beads* foram lavadas com 500 μ l de PBS em pH 7,4 e acondicionadas em 250 μ l de tampão de bloqueio, no qual permaneceram 30 min em TA e agitação de 700 rpm. Após a etapa de bloqueio as

beads foram então ressuspensas em 500 µl de solução de armazenagem, contadas em contador de células (BIORAD) e armazenadas a 4 °C até uso.

3.13. Teste multiplex com *beads* sensibilizadas

Para realização dos testes de reconhecimento das proteínas acopladas às *beads*, bem como a avaliação da reatividade das mesmas em reação com os soros humanos, os mesmos protocolos foram utilizados. Primeiramente, 1.250 *beads*/poço, previamente acopladas com seus respectivos antígenos, são reunidas em um mix único, homogeneizadas e adicionadas em poço de placas de 96 poços (ProcartaPlex, ThermoFisher). As placas foram acondicionadas na parte magnética da lavadora de placas (BIOPLEX PRO II- BIORAD) por 2 min antes da remoção de todo o líquido do poço, com adição posterior do anticorpo de reconhecimento das proteínas conjugado a ficoeritrina (R-PE) (a qual permite leitura sem a adição de substrato) diluído em PBS contendo 0,05% de Tween (PBST) e incubação por 30 min a TA em 700 rpm. Quando utilizados soros humanos a etapa anterior consistiu na adição dos mesmos em diluições de 200x, 400x ou 1000x em PBST. Após a incubação, as placas foram mantidas em ímã magnético por 2 min com posteriores 3 ciclos de lavagem e adição de anticorpos anti-humanos conjugados à R-PE (quando foram utilizadas amostras humanas) diluídos em PBST para a concentração de 2 ng/mL, com incubação por 30 min a TA, em 700rpm. Passado o tempo de incubação, os poços foram novamente lavados e as *beads* ressuspensas em 125 µl de PBST e levadas para leitura em aparelho BIOPLEX 200 (BIORAD).

3.14. Validação da padronização do teste Multiplex a partir de amostras Padrão

Ainda durante a determinação dos melhores reagentes, condições e parâmetros a serem avaliados, o teste Multiplex baseado na tecnologia Luminex foi submetido a validação pela avaliação de um painel de soros gentilmente cedido pelo Dr. Jean-Claude Manuguerra (Instituto Pasteur da França). Tal painel conteve 15 amostras de soro convalescentes triadas durante à fase aguda por qRT-PCR como positivas contra DENV1, bem como 15 amostras negativas controle (Tabela 5).

Tabela 5. Número de amostras do painel contra DENV1 cedido pelo Dr. Jean-Claude Manuguerra.

Grupo de amostras	Número de Amostras
Dengue positivas	15
Dengue negativas	15
Total	30

Com o avanço da padronização, foram feitas também análises com amostras confirmadas com qRT-PCR contra ZIKV e coletadas de forma sequencial após o início dos sintomas. No total foram acompanhados 12 pacientes, com um total de 62 amostras analisadas (Tabela 6).

Tabela 6. Número de amostras do painel contra ZIKV cedido pelo Dr. Jean-Claude Manuguerra.

Grupo de amostras	Número de Amostras
Pacientes	12
Coletas sequenciais	62
Total	62

Por fim, foi validado o teste Multiplex padronizado com a proteína E2.1 de CHIKV. Para isso, foram novamente utilizados os soros positivos para a presença de anticorpos neutralizantes contra CHIKV, gentilmente cedidos pelo Dr. Paolo Zanotto, juntamente com duas amostras sabidamente positivas para anticorpos contra ZIKV e duas amostras sabidamente positivas para anticorpos contra DENV (Tabela 7).

Tabela 7. Número de amostras do painel contra CHIKV cedido pelo Dr. Paolo Zanotto.

Grupo de amostras	Número de Amostras
CHIKV positivas	15
CHIKV negativas	4
Total	19

3.15. Cálculos de valores estatísticos e curvas ROC

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa GraphPad Prism (© GraphPad Software, San Diego, CA, USA) 6, usando análise de variância ANOVA com subsequente teste de comparação múltipla de Bonferroni. A significância estatística foi considerada quando $p < 0,05$.

Para o cálculo das curvas ROC, bem como os parâmetros derivados da curva (área sob a curva, razões de verossimilhança e valores preditivos e positivos), foi utilizado o programa Medcalc (© MedCalc Software Ltd, Acaciaaan, Ostend, Belgium), de acordo com DeLong e colaboradores (DELONG; DELONG; CLARKE-PEARSON, 1988).

4. RESULTADOS

4.1. Escolha da proteína de NS1 de ZIKV e DENV

A existência de elevada reação cruzada foi relatada entre os arbovírus quando avaliados em testes de diagnósticos sorológicos (ALLWINN et al., 2002; MANSFIELD et al., 2011). Tais reações ocorrem devido à grande semelhança antigênica presente nos arbovírus, principalmente entre os *Flavivirus*, e são frequentes durante infecções agudas. Durante esse período ocorrem expansões clonais de linfócitos B produtores de anticorpos que, por muitas vezes, apresentam reatividade cruzada (PAPA; KARABAXOGLU; KANSOUZIDOU, 2011; PRIYAMVADA et al., 2016).

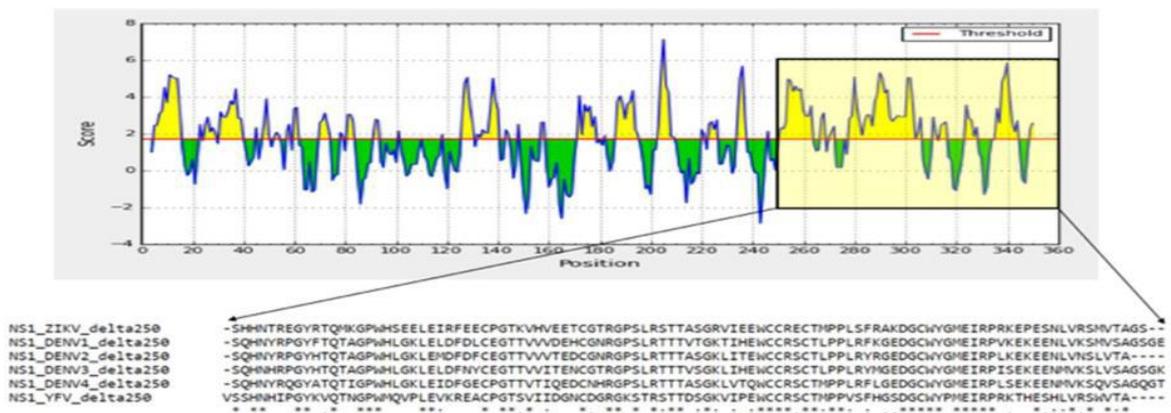
A utilização de proteínas recombinantes no desenvolvimento de testes sorológicos já é bastante difundida (CUZZUBBO et al., 2001; BALAMURUGAN et al., 2010). De fato, a proteína NS1 de DENV é base tanto para testes laboratoriais como para testes imunocromatográficos de captura de antígenos ou de anticorpos (CUZZUBBO et al., 2001). Os testes imunocromatográficos são amplamente distribuídos, sendo utilizados como ferramentas de diagnóstico conclusivo em regiões endêmicas. Contudo, com o espalhamento de outros *Flavivirus* como o ZIKV pelo mundo, a utilização da sequência completa dessa proteína se tornou motivo de questionamento pela comunidade científica, já que sua conservação entre o gênero gera resultados potencialmente errôneos (MULLER; YOUNG, 2013; GYURECH et al., 2016; MATHEUS et al., 2016). Assim, na tentativa de selecionar um antígeno baseado na proteína NS1, sua sequência completa foi submetida a análises de bioinformática com objetivo de evidenciar regiões que atendem aos critérios citados anteriormente.

Como a hidrofobicidade consiste em um fator limitante na produção de antígenos recombinantes, sobretudo em sistemas procariotos baseados em *E. coli* (BANEYX; MUJACIC, 2004; SAHDEV; KHATTAR; SAINI, 2007), a sequência de aminoácidos da proteína NS1 ZIKV foi utilizada para determinação do perfil de hidrofobicidade de Parker (Figura 1a). Com esta análise foi possível observar uma região que apresentou maior proporção de epítomos lineares com caráter hidrofílico. Adicionalmente, para avaliar a homologia da referida região da NS1 do ZIKV, e outros *Flavivirus*, uma comparação das sequências de aminoácidos entre as proteínas NS1 dos vírus DENV1-4 e YFV, as quais apresentaram elevado grau de homologia (64.4%, 66.3%, 61.4%, 63.4% e 61.4%, respectivamente, para os DENV 1, 2, 3, 4 e YFV) foi realizada. Este resultado está de acordo ao descrito por XU e colaboradores (2016), o qual destacou o domínio β -pregueado (resíduos de aminoácidos 182–352) como um

dos mais conservados em análise comparativa da NS1 ZIKV com a de outros 73 Flavivírus.

Foi feita então uma análise de predição de epítomos descontínuos para linfócitos B, comparando a sequência e estrutura das regiões C-terminais das proteínas NS1 ZIKV e NS1 DENV2 (Figura 1b). De forma surpreendente, nesta análise foram encontrados seis epítomos conformacionais (Tabela 8 e Figura 1b) presentes somente na proteína NS1 do ZIKV, os quais estão concentrados na região C-terminal da proteína. De forma semelhante, Song e colaboradores (2016) também demonstraram elevado grau de conservação entre as proteínas NS1 do ZIKV, DENV e WNV, entretanto, a região C-terminal da proteína do ZIKV, que se apresenta na região β -pregueada da NS1, retém características físico-estruturais distintas como, o perfil eletrostático de superfície, que a diferencia dos demais vírus analisados. Deste modo, a região C-terminal da NS1 ZIKV consiste em potencial alvo para produção de um antígeno recombinante para implementação em ensaios de sorodiagnóstico para o ZIKV, sendo a região C-terminal, denominada aqui como Δ NS1 ZIKV, selecionada para as próximas etapas do trabalho.

A)



B)

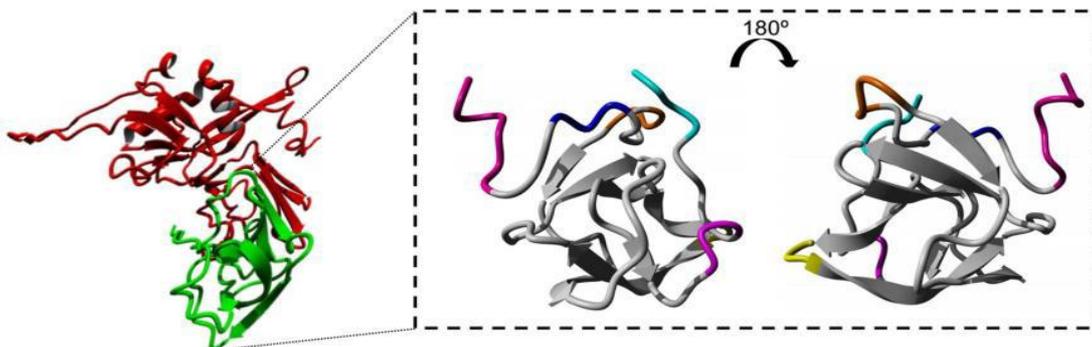


Figura 1. Análise de sequência e determinação de epítomos de células B na proteína NS1 ZIKV.

A) Representação do perfil de hidrofobicidade da proteína NS1 ZIKV e alinhamento da sequência de

aminoácidos de sua região C-terminal, que apresentou maior conteúdo hidrossolúveis, com as regiões correspondentes à sequência da NS1 dos DENVs (1, 2, 3 e 4) e YFV. As porções amarelas do gráfico (acima da linha de corte) indicam regiões hidrofílicas, sendo que as porções coloridas em verdes (abaixo da linha de corte) indicam regiões hidrofóbicas. B) Representação estrutural do tipo fita da proteína NS1 ZIKV e destacado em verde a sua região C-Terminal (aa 251-352) denominada Δ NS1. Os epítomos de células B conformacionais determinados por análise computacional, tendo por base a sequência da NS1, estão destacados nas estruturas representadas no quadro tracejado, sendo indicados por cores (Ver tabela 8).

Tabela 8. Epítomos conformacionais identificados na região C-Terminal da proteína NS1 ZIKV.

Epítopo	Região *	Sequência	Cor #
1	251-258	SER-HIS-HIS-ASN-THR-ARG-GLU	Rosa
2	261-263	THR-GLN-MET	Azul
3	268-271	HIS-SER-GLU-GLU	Laranja
4	302-304	ALA-SER-GLY	Amarelo
5	340-342	PRO-GLU-SER	Magenta
6	348-351	MET-VAL-THR-ALA	Ciano

*

As regiões são numeradas de acordo a sequência de aminoácidos da proteína NS1 ZIKV inteira; # Ver Figura 1b.

Para testar a especificidade dos anticorpos contra os epítomos alvo neste domínio proteico, geramos um antígeno recombinante, expresso em plataforma bacteriana baseada em *E. coli* (Figura 2a). Adicionalmente, com o intuito de testar a especificidade do fragmento da proteína Δ NS1 em relação às formas recombinantes inteiras, foram produzidas as proteínas NS1 de ZIKV e de DENV2, com alta pureza (> 95%), também em *E. coli* (Figura 2a). A avaliação inicial da especificidade da proteína Δ NS1 ZIKV em Ensaio Imunoenzimático (ELISA) foi feita em comparação com a proteína NS1 DENV, contando com a utilização de soros de origem murina, infectados com DENV, YFV ou CHIKV, conforme descrito nos itens 1.5 e 1.6 (Figura 2b). Em tal teste observou-se que a proteína Δ NS1 ZIKV possuía reatividade significativamente reduzida quando detectada com soros DENV⁺ em relação à proteína NS1 DENV, além de ser reconhecida de forma mais eficiente por soros ZIKV⁺ e não possuir reatividade cruzada com soros YFV⁺ e CHIKV⁺.

Tais resultados motivaram a análise da proteína Δ NS1 ZIKV frente a soros de humanos infectados naturalmente por DENV, em comparação com as proteínas NS1

de DENV e ZIKV (Figura 2c). Para tanto, amostras de soro de oito indivíduos infectados por DENV antes da entrada de ZIKV na América do Sul foram utilizadas. Esses soros apresentaram reatividade cruzada significativamente menor com a proteína Δ NS1 de ZIKV quando comparada com a NS1inteira (Figura 2c), o que indicou que a reatividade cruzada de anticorpos em pacientes infectados com DENV e ZIKV pode ser superada.

Com o intuito de melhor compreender a natureza da ligação específica dos anticorpos na proteína Δ NS1 ZIKV, bem como validar os dados obtidos nas análises de bioinformática, analisamos a reação de amostras de soro com proteínas nas formas nativas ou após desnaturação por calor em placas de ELISA preparadas com Δ NS1 ZIKV, DENV NS1 ou ZIKV NS1 (Figura 2d e 2e). A desnaturação dos antígenos reduziu drasticamente a reatividade dos anticorpos de indivíduos previamente infectados com ZIKV ou com ZIKV e DENV simultaneamente. Além disso, a detecção específica de anticorpos específicos de ZIKV com Δ NS1 foi perdida após a desnaturação do antígeno, demonstrando a necessidade da integridade estrutural das proteínas para a detecção específica dos anticorpos. Em resumo, os resultados obtidos indicaram que os anticorpos anti-NS1 específicos contra epítomos conformacionais agrupados na região C-terminal da proteína NS1 ZIKV conferem a especificidade sorológica requerida para distinguir infecções por ZIKV em regiões hiperendêmicas por DENV, como no Brasil.

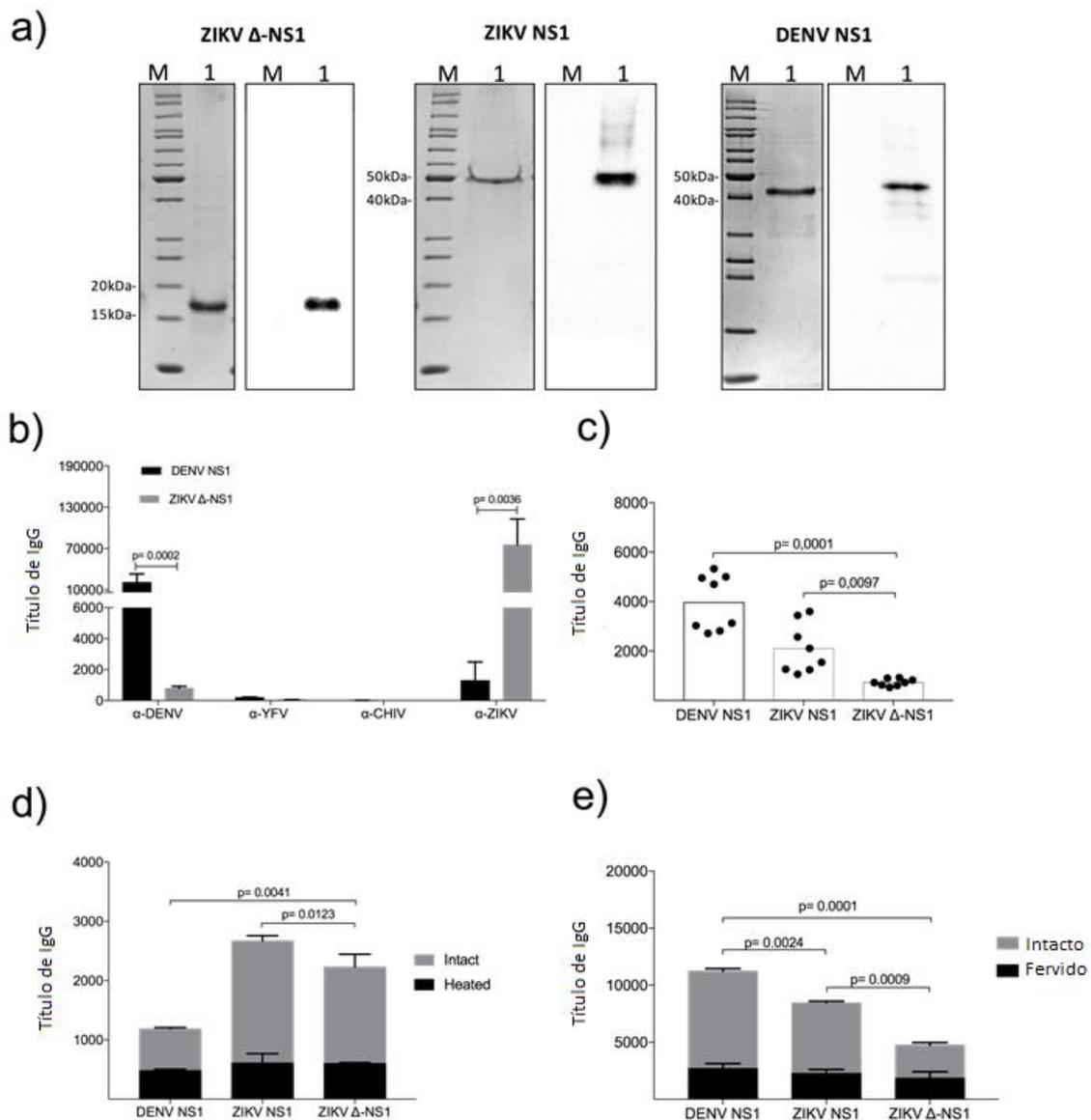


Figura 2. Caracterização da NS1 e Δ NS1 recombinantes de ZIKV. (a) coloração com Comassie blue (painéis esquerdos) e western blots (painéis direito) que representam 1 μ g de Δ NS1 purificado e ZIKV NS1 e DENV2 NS1 inteiros; (b) Reação de DENV2 NS1 purificado e ZIKV Δ NS1 com soros agrupados criados em camundongos infectados com DENV, YFV, CHY e ZIKV (duas duplicatas diferentes, barra de erro, ou seja, ANOVA bidirecional com pós-teste de Bonferroni); (c) Reação de soros humanos imunes coletados de indivíduos previamente infectados por DENV com DENV2 NS1, ZIKV NS1 e Δ NS1 ($n = 8$; barra de erro; s.d., ANOVA de dois sentidos com pós-teste de Bonferroni). Reação de ZIKV + (d) e ZIKV + DENV + (duas duplicatas diferentes, barra de erro, semi-ANOVA bidirecional com teste pós-teste Bonferroni) (e) anticorpos séricos ($n = 1$) com DENV NS1, ZIKV NS1 e Δ NS1 (duas duplicatas diferentes, barra de erro, sem, ANOVA bidirecional com pós-teste Bonferroni). Os experimentos foram reproduzidos de forma independente pelo menos duas vezes.

Contudo, mesmo com a maior especificidade sorológica conferida pela proteína Δ NS1 ZIKV, a mesma não demonstrou ser capaz de eliminar totalmente a reatividade cruzada com anticorpos específicos para outros *Flavivirus*, especialmente em indivíduos previamente infectados com o DENV (Figura 2c), o que poderia resultar em uma alta taxa de resultados falso-positivos. Assim, a alternativa para resolução destes quadros consistiu na depleção dos anticorpos de reatividade cruzada, por meio da adsorção dos mesmos com as proteínas Δ NS1 DENV1-4. Tal técnica foi utilizada anteriormente como forma de aumentar a especificidade de ensaios sorológicos para outros patógenos, incluindo *Borrelia burgdorferi* (agente causador da doença de Lyme, cujos ensaios de sorodiagnóstico baseados em ELISA dão reação cruzada com bactérias do gênero *Treponema*) e helmintos (*Fasciola*, a qual apresenta reatividade cruzada com o *Schistosoma mansoni*) (MAGNARELLI et al., 1991; NOURELDIN; EL-SHINNAWY; ABOU ELENIN, 2000).

Para a utilização da técnica de adsorção, as proteínas Δ NS1 de DENV1-4 foram obtidas após transformação da linhagem de *E. coli* BL21(DE3), com posterior indução da expressão das proteínas alvo a 18°C, conforme descrito no item 3.3. A Figura 3 demonstra que todas as proteínas Δ NS1 DENV1-4 foram expressas com sucesso após renaturação por diluição pulsada, a partir da fração insolúvel do extrato bacteriano.

A antigenicidade das proteínas purificadas foi também avaliada por ensaios de ELISA, sendo todas reconhecidas por soro de indivíduo previamente infectado por DENV, além de preservarem epítomos conformacionais termolábeis em sua estrutura (Figura 4). Tais resultados permitiram o seguimento dos estudos, visto que as proteínas obtidas preservaram características antigênicas compatíveis à sua utilização na depleção de anticorpos de reatividade cruzada com DENV.

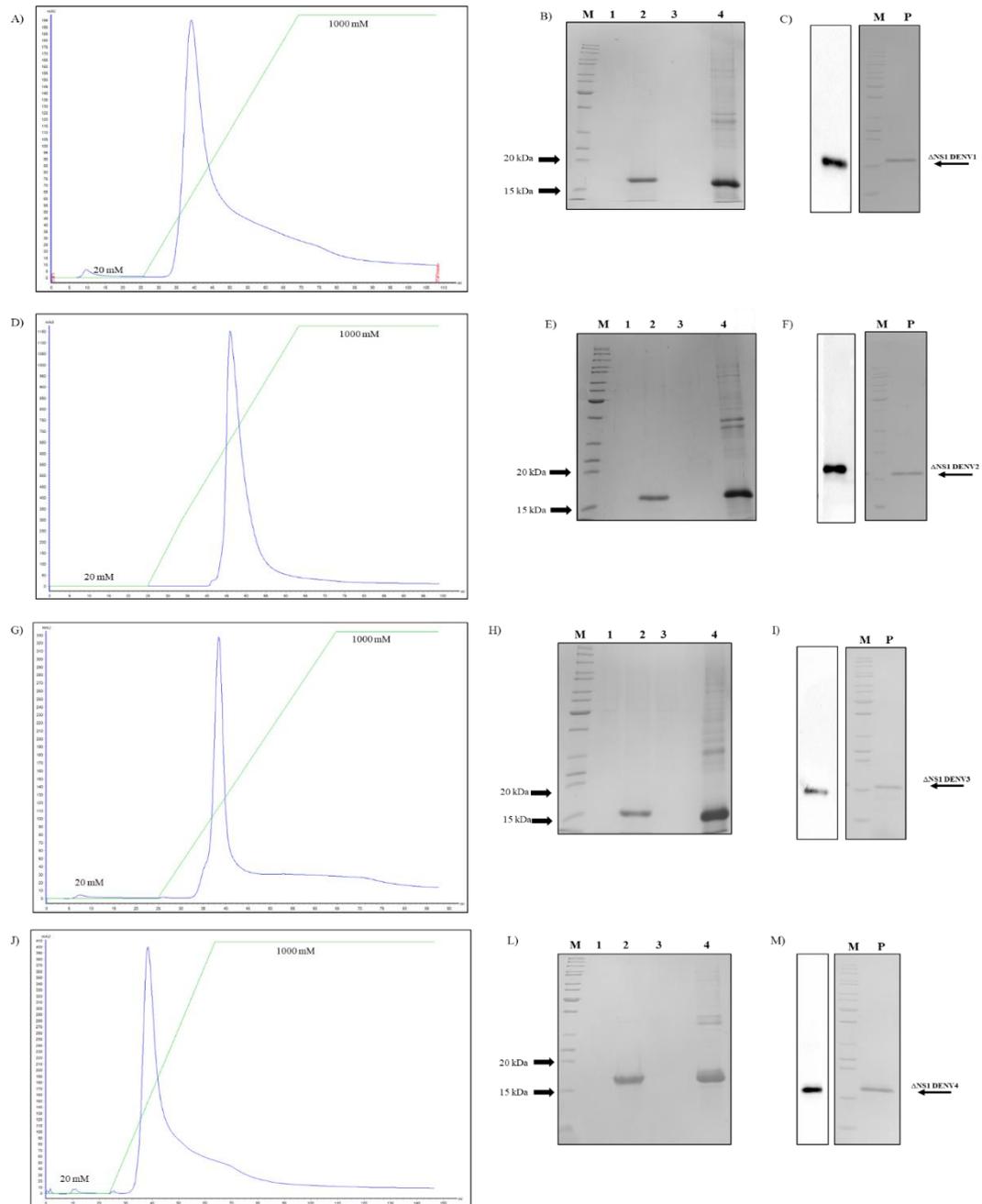


Figura 3. Purificação das proteínas recombinantes Δ NS1 de DENV 1, 2, 3 e 4. As proteínas Δ NS1 dos DENVs1-4 foram purificadas por cromatografia de afinidade ao níquel. Alíquotas das proteínas purificadas foram submetidas a gel de eletroforese para avaliação da pureza, posteriormente transferidas para membranas de nitrocelulose e detectadas com anticorpos mono específicos para cada DENV. (A, D, G, J) Cromatogramas das eluições das proteínas Δ NS1 dos vírus Dengue (1, 2, 3 e 4, respectivamente) (B, E, H, L) Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15% correspondentes ao step de 20mM, ao pico do cromatograma, ao Flowthrough e ao extrato proteico solubilizado em tampão contendo 8M. (C, F, I, M) Imunoensaio de detecção por Western blot das proteínas purificadas. Descrição: (M) Marcador de massa molecular, (1) Alíquota correspondente ao step de 20mM do cromatograma, (2) Alíquota correspondente pool da proteína purificada (3) Flowthrough, (4) Extrato proteico solúvel diluído em tampão C, (P) Proteína purificada.

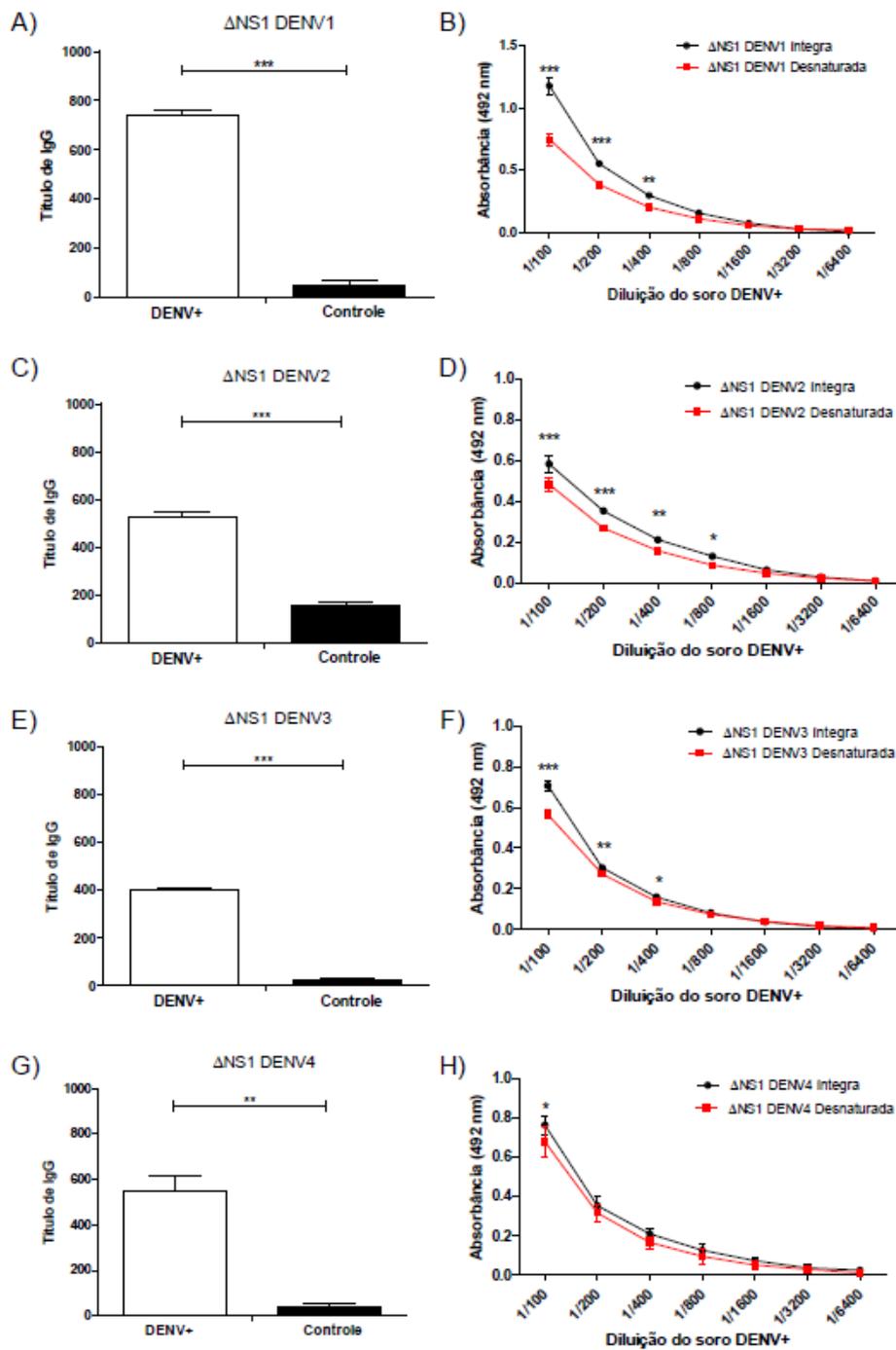


Figura 4. Análise da antigenicidade das proteínas ΔNS1 de DENV 1, 2, 3 e 4. (A, C, E e G) Ensaio de ELISA empregando as proteínas ΔNS1 recombinantes correspondentes aos DENV 1, 2, 3 e 4 como antígenos de fase sólida, sendo avaliada a reatividade com amostras de soros humanos controles, sabidamente positivos ou negativos, para infecção por DENV. (B, D, F e H) Amostras das proteínas ΔNS1 DENV, submetidas ou não à desnaturação (aquecimento a 100 °C por 10 min. seguido de choque térmico à 0 °C), foram analisadas por ELISA quanto à sua reatividade com soro de paciente previamente infectado pelo DENV. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (Test t ou One-way ANOVA com post-test Bonferroni's).

Após a obtenção das proteínas ΔNS1 DENV1-4 em sua forma purificada, iniciamos os ensaios com adsorção dos anticorpos responsáveis pela reação cruzada remanescente observada nos testes anteriores. Para isso, ensaios de ELISA utilizando a proteína ΔNS1 ZIKV como antígeno de fase sólida foram realizados com a adição de uma etapa a ser realizada com os soros testados, na qual 22ng/μl de cada proteína ΔNS1 DENV1-4 foi incubada com os soros testados, conforme descrito no item 3.5 e demonstrado na Figura 5a. Ao avaliar a eficiência da estratégia de adsorção foi possível observar a eliminação da reatividade cruzada presente em amostras (ZIKV⁺DENV⁺ e ZIKV⁻DENV⁺) oriundas de indivíduos previamente infectados por DENV (Figura 5b). Além disso, foi observado que a reatividade de soros ZIKV⁺DENV⁻ permaneceu intacta quando utilizada ou não a adsorção, bem como a reatividade dos soros ZIKV⁺DENV⁺ sofreu redução significativa, porém, permanecendo positiva no teste (Figura 5b). Portanto, pôde-se concluir que a estratégia utilizada aumenta a especificidade do teste e não afeta a sensibilidade do mesmo, como demonstrado no ensaio de detecção de anticorpos IgG direcionados ao ZIKV.

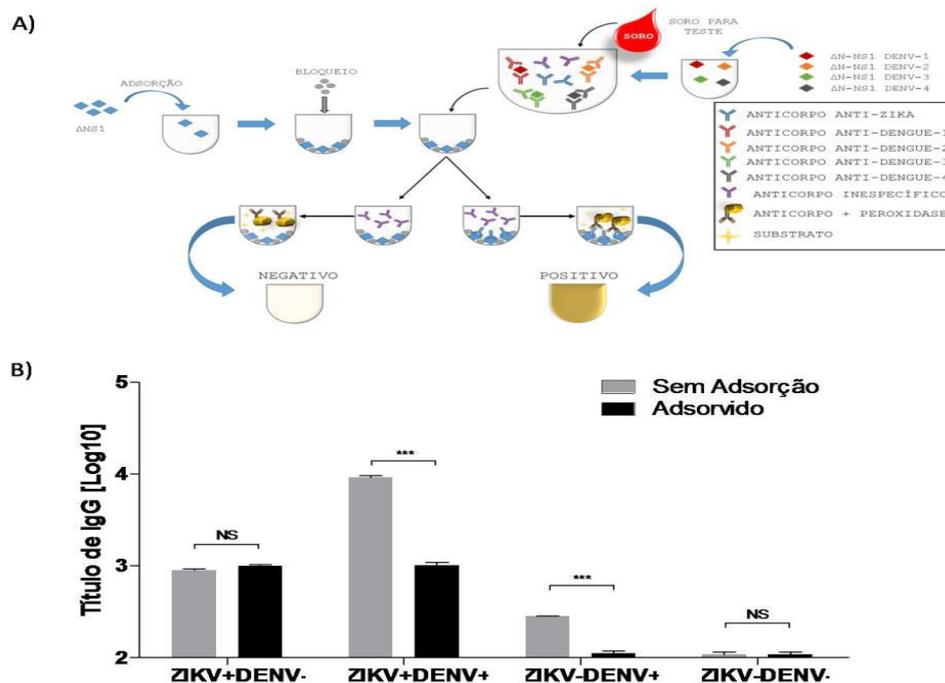


Figura 5. Adsorção prévia de soros com as proteínas ΔNS1 de DENV 1, 2, 3 e 4. A) Esquema ilustrativo do ensaio de ELISA utilizando a proteína ΔNS1 ZIKV como antígeno de fase sólida e amostras de soro pré-adsorvidas com as proteínas ΔNS1 referentes aos DENV 1, 2, 3 e 4. B) Reatividade de amostras de soro, provenientes de indivíduos infectados pelo ZIKV e/ou DENV (conforme indicado na figura), pré-adsorvidas ou não com uma mistura das proteínas ΔNS1 referentes aos DENV 1, 2, 3 e 4. Os resultados foram expressos em título de anticorpos IgG médio anti-ΔNS1 ZIKV (Barras) ± DP. Descrição: NS, Não significativo; *** p<0,001 (Unpaired t test).

Para responder se a redução dos níveis de reatividade observados nos testes de ELISA se deu pela diminuição da quantidade de anticorpos livres para ligação na proteína Δ NS1 ZIKV ou devido ao sequestro de anticorpos inespecíficos que possuíam altos níveis de afinidade, utilizamos a metodologia de termoforese, aplicada pelo equipamento Monolith NT.115 (NanoTemper, Germany). O princípio da termoforese permite a identificação e quantificação de interações biomoleculares formadas pelo complexo antígeno / anticorpo. Gradientes microscópicos de temperatura são aplicados e a movimentação e mudança das moléculas é detectada de forma precisa, permitindo-se estabelecer constantes de dissociação entre o antígeno e os ligantes testados. Assim, como dupla validação do antígeno e da metodologia desenvolvida nesse trabalho, foram avaliadas as interações da proteína Δ NS1 ZIKV contra soros positivos ou negativos contra ZIKV, por meio de uma técnica mais sensível.

O protocolo da termoforese consiste na marcação fluorescente dos ligantes utilizados (item 3.6) e utilização dos mesmos em concentrações fixas que são expostas a concentrações decrescentes de ligantes (item 3.7). De acordo com a interação ligante / proteína, as proteínas movem-se diferentemente, sendo a mudança de fluorescência diretamente proporcional à quantidade de ligante associado aos antígenos marcados. A figura 6 demonstra a ligação de anticorpos sabidamente positivos apenas para ZIKV ou DENV à proteína Δ NS1 em sua conformação nativa ou após tratamento térmico a 100 °C por 15 min. Curvas foram geradas a partir da interação das diferentes diluições das amostras de soros ZIKV ou DENV contra os antígenos testados, sendo suas amplitudes indicativas de maior ou menor ligação entre os antígenos e os anticorpos (Tabela 9). Observou-se que a perda de conformação estrutural leva a um maior reconhecimento das proteínas pelos anticorpos presentes nas amostras de soro, como medido pela tecnologia de termoforese (cores verde-claro para soros ZIKV⁺ e vermelho claro para DENV⁺) (Figuras 6a e 6b, respectivamente). Conforme esperado, valores semelhantes foram observados quando as curvas de reconhecimento dos soros ZIKV⁺ e DENV⁺ foram sobrepostas, visto que o nível de sensibilidade da termoforese excede o observado em ensaios de ELISA (Figura 6c). Contudo, após a aplicação da metodologia de adsorção nos soros DENV⁺, os valores de ligação entre anticorpos foram drasticamente reduzidos, permitindo uma clara diferenciação entre soros ZIKV⁺ e DENV⁺ (Figura 6c).

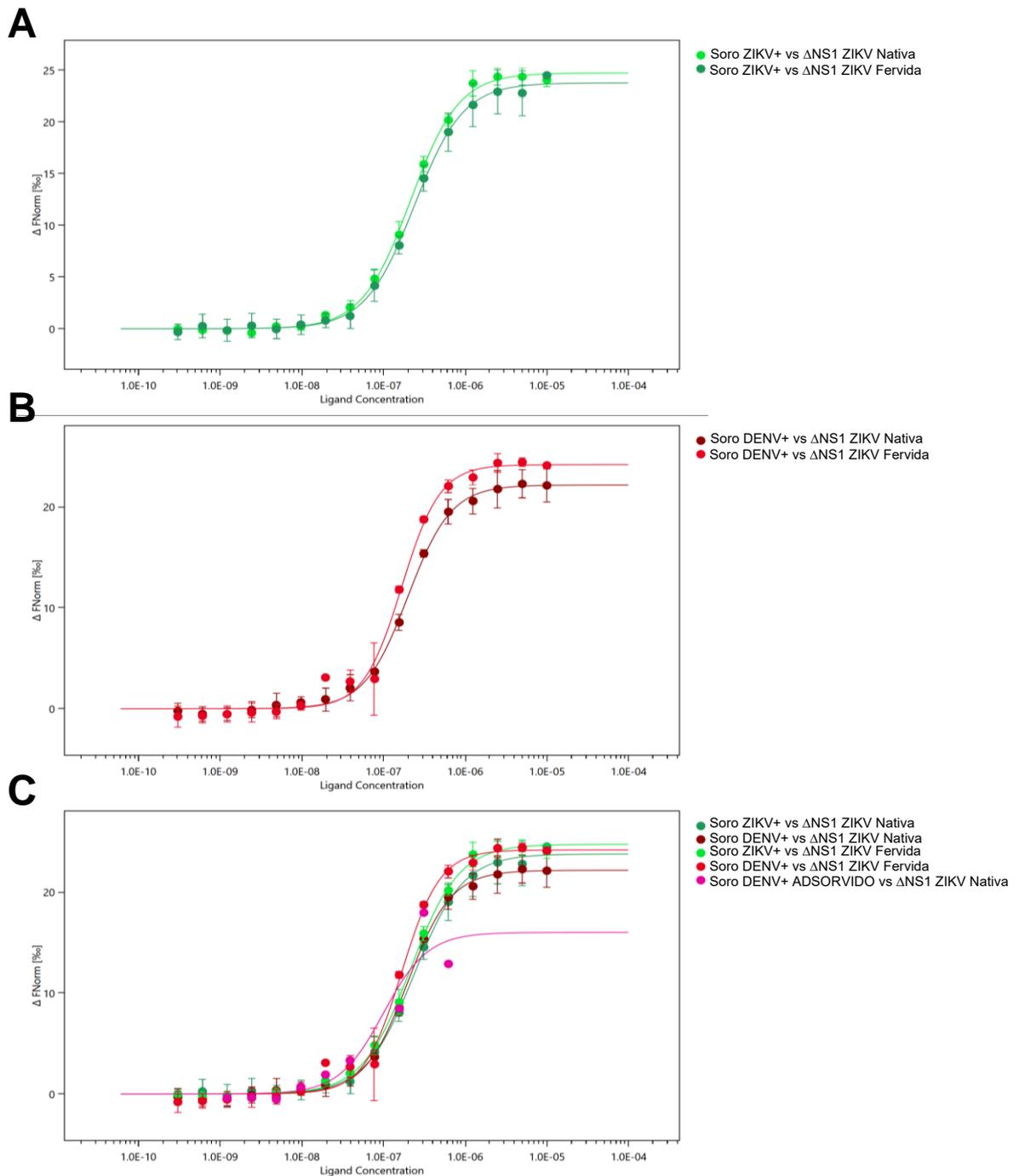


Figura 6. Avaliação da reatividade de soros ZIKV⁺ e DENV⁺ por meio da tecnologia de termoforese. Para a confirmação da utilização do protocolo de adsorção, proteínas Δ NS1 ZIKV tiveram a região his-tag marcada por fluorocromo fornecido juntamente com o aparelho Monolith NT.115 (NanoTemper, Brasil) e foram expostas a soros ZIKV⁺ ou DENV⁺ diluídos serialmente em log2. (A) Avaliação da reatividade de soro ZIKV⁺ contra a proteína Δ NS1 ZIKV nas conformações nativa ou desnaturada. (B) Avaliação da reatividade de soro DENV⁺ contra a proteína Δ NS1 ZIKV nas conformações nativa ou desnaturada. (C) Comparação das reatividades obtidas com os soros ZIKV⁺ e DENV⁺ e avaliação do protocolo de adsorção de anticorpos inespecíficos. Todos os soros foram inicialmente diluídos 10x antes do início dos experimentos.

Para responder se o protocolo de adsorção sequestra a maior parte dos anticorpos inespecíficos presentes nas amostras e captura anticorpos com maior avidéz de ligação com a proteína Δ NS1, foram calculados os níveis de EC50 de ligação de amostras ZIKV⁺ e DENV⁺ às proteínas Δ NS1 ZIKV (Tabela 9). A escolha de cálculo dos níveis de EC50 em detrimento dos valores de Kd ocorreu devido à incapacidade em considerar múltiplos sítios de ligação de anticorpos à proteína na fórmula de cálculo de Kd. O mesmo não ocorre quando se calcula valores de EC50 baseados na equação e coeficiente de Hill. Não foram observadas grandes variações entre os níveis de EC50 encontrados frente à reação da proteína Δ NS1 ZIKV em suas conformações nativa ou desnaturada contra os soros DENV⁺ e ZIKV⁺, sendo os níveis de amplitude das curvas semelhantes. Do mesmo modo, após o protocolo de adsorção realizado no soro DENV⁺, não foram observadas alterações significantes nos níveis de EC50. Assim, a primeira das hipóteses levantadas mostrou-se verdadeira no sentido de que a redução da reatividade cruzada entre soros DENV⁺ e a proteína Δ NS1 ZIKV se deve à redução de anticorpos inespecíficos contra o antígeno, mas não pela captura dos anticorpos com maior avidéz.

Tabela 9. Análise da avidéz e da amplitude de ligação de soros ZIKV⁺ e DENV⁺ quando associados à proteína Δ NS1 ZIKV.

	Δ NS1 ZIKV nativa		Δ NS1 ZIKV Fervida	
	EC ₅₀	Amplitude*	EC ₅₀	Amplitude*
Soro ZIKV⁺	2,3817x10 ⁻⁷	23,76	2,1379x10 ⁻⁷	24,72
Soro DENV⁺	1,9838x10 ⁻⁷	22,14	1,6755x10 ⁻⁷	23,76
Soro DENV⁺ Adsorvido	9,9888x10 ⁻⁸	16,00	-	-

* Amplitudes das curvas geradas nos experimentos da Figura 6.

4.2. Teste da proteína Δ NS1 ZIKV em ensaio de ELISA com reagentes produzidos *in-house*

Os primeiros testes realizados *in-house* tinham como objetivo validar amostras sabidamente conhecidas com reagente produzidos no próprio laboratório e, para isso, os resultados dos testes de ELISA foram classificados de acordo com a sua densidade óptica (DO). A etapa de sensibilização contou com o uso de dois reagentes

responsáveis pela diluição da proteína Δ NS1 ZIKV, sendo eles o tampão carbonato/bicarbonato, pH 9,6 e o PBS 1x, pH 7,5. O tampão carbonato/bicarbonato mostrou-se mais eficiente por manter a DO de amostras negativas para ZIKV e positivas para DENV menores do que aquelas comparadas com o reagente PBS 1 x, como mostrado na Figura 7.

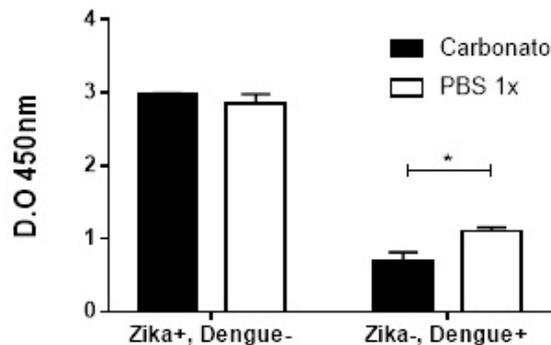


Figura 7. Determinação do reagente ideal para a etapa de sensibilização. Foram utilizados 2 soros, um ZIKV⁺/DENV⁻ e outro soro ZIKV⁻/DENV⁺, na presença das soluções Carbonato e PBS 1x com Δ NS1-ZIKV [200 ng/poço] e incubados por um intervalo de tempo de 1 h, à 37°C.

Com o reagente de sensibilização *in-house* estabelecido, a próxima etapa consistiu na avaliação do melhor reagente de bloqueio dos sítios inespecíficos dos poços das placas de ELISA sensibilizados com a proteína Δ NS1 ZIKV. Para tanto, o reagente padrão foi incubado, após o período de sensibilização, entre 1 h e 16 hs, conforme descrito no item 3.5. Não foram observadas diferenças significativas entre ambos os protocolos, conforme demonstrado na Figura 8, apenas uma redução na reatividade de soros ZIKV⁺ quando as placas foram bloqueadas por 16 h.

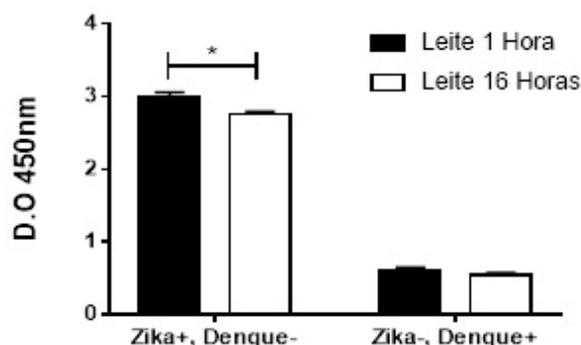


Figura 8. Determinação do tempo ideal de incubação na etapa de bloqueio. Foram utilizados um soro ZIKV⁺/DENV⁻ e outro ZIKV⁻/DENV⁺. Os experimentos foram realizados com incubação das placas por 1 h, à 37°C, ou durante 1 h à 37°C com posterior período de incubação de 16h, à 4°C.

A próxima etapa consistiu na avaliação da quantidade de proteínas ΔNS1 DENV1-4 necessária para garantir a eliminação de quaisquer reatividades cruzadas. Para isso, a adsorção das amostras com as proteínas ΔNS1 DENV1-4 foi realizada em duas concentrações diferentes: 5,5 ng/μl e 22 ng/μl (Figura 9). Os resultados apresentaram uma diferença significativa na DO das amostras ZIKV⁻/DENV⁺, sendo observados valores até 3 vezes menores quando adsorvidas com uma maior quantidade de proteínas (22 ng/μl). Assim, a concentração de 22 ng/μl de cada proteína ΔNS1 DENV se mostrou ideal para a adsorção dos soros de DENV⁺ que fosse capaz de eliminar a reação cruzada com este vírus.

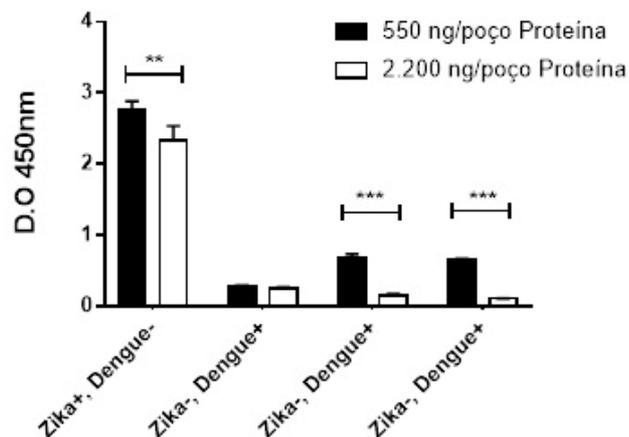


Figura 9. Determinação da concentração ideal no pool de proteína ΔNS1 DENV, utilizado na etapa de adsorção. Foram utilizados um soro ZIKV⁺/DENV⁻ e três soros ZIKV⁻/DENV⁺. As 4 amostras foram diluídas com o pool contendo os 4 sorotipos de ΔNS1 DENV nas concentrações de 500 ng/poço e 2.200 ng/poço de cada sorotipo (2.000 ng/poço e 8.800 ng/poço no total, respectivamente) e incubados por 1 h, à 37°C.

Com a sensibilização, o bloqueio e a adsorção padronizados, partimos para a avaliação das quantidades de anticorpo Anti-IgG humano conjugado à peroxidase ideais para manter o custo/benefício do teste atrelado com sua eficiência. Para isso foram avaliadas as proporções do reagente Sigma A0170 nas proporções de 1:3000, 1:4000 e 1:5000, diluídos em reagente padrão (Figura 10). Por conta de níveis de auto reatividade e permanência de amostras fracamente positivas muito próximas ao limiar de detecção foi escolhida a proporção de 1/4000 para o prosseguimento dos ensaios.

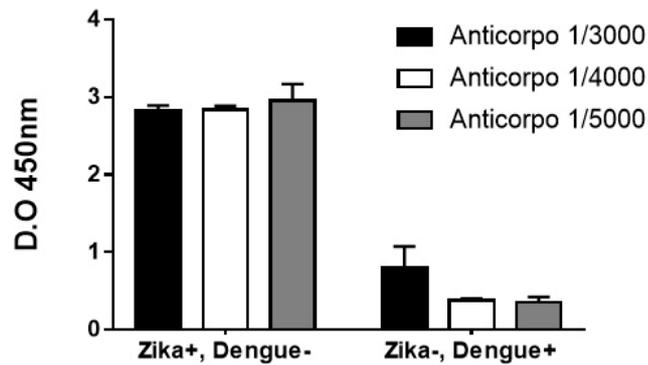


Figura 10. Determinação da concentração ideal do anticorpo secundário. Foram utilizados um soro ZIKV⁺/DENV⁻ e um soro ZIKV⁻/DENV⁺, em diferentes concentrações do anticorpo (1:3000, 1:4000, 1:5000) na reação, diluídos em reagente padrão e incubados 1h a 37°C.

Por fim foram testados os cromógenos utilizados na revelação dos ensaios de ELISA. Ambos podem ser obtidos comercialmente, sendo o reagente OPD lido em um comprimento de onda de 490 nm, e o reagente TMB lido em comprimento de onda de 450 nm em aparelhos espectrofotômetros (Figura 11). Após os testes observou-se uma melhor adequação do reagente TMB ao teste desenvolvido, visto a maior reatividade frente a amostras positivas conhecidas. Assim, o TMB foi o cromógeno de escolha para o prosseguimento dos estudos.

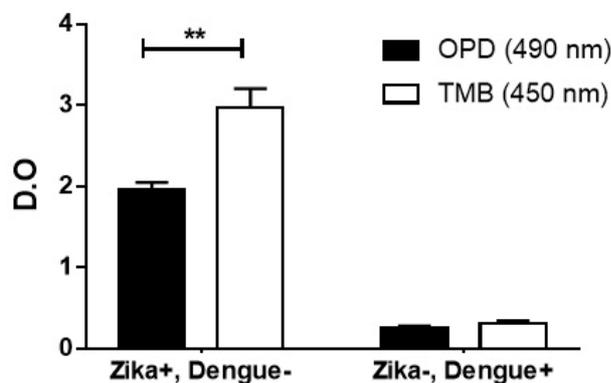


Figura 11. Determinação do reagente cromógeno ideal utilizado na etapa de revelação. Foram utilizados um soro ZIKV⁺/DENV⁻ e um soro ZIKV⁻/DENV⁺ na presença dos reagentes OPD (leitura em um comprimento de onda de 490 nm) e TMB (leitura em um comprimento de onda de 450 nm) ambos incubados durante 10 min no escuro, seguido da parada da reação com Ácido Sulfúrico (H₂SO₄) à 2 N (OPD) ou 0,2 N (TMB).

4.3. Padronização do teste baseado na ΔNS1 de ZIKV

Com o intuito de levar o kit diagnóstico desenvolvido à aprovação das entidades regulamentadoras, a padronização do teste de ELISA precisou também levar em

conta a utilização de reagentes comerciais otimizados e estáveis. Para isso, após a padronização do teste *in-house*, foram feitos testes com diversos reagentes estabilizados, utilizando as mesmas amostras, para a escolha dos que mantivessem a reatividade do teste sem alterações após a modificação.

O reagente de sensibilização escolhido, tampão carbonato/bicarbonato, pH 9,6, o cromógeno TMB e o ácido sulfúrico à 0,2 N foram mantidos nessa nova etapa por apresentar resultados satisfatórios de controle e estabilidade. Contudo, todas as etapas que envolviam o uso do reagente padrão tiveram que ser substituídas por reagentes comerciais.

A etapa de bloqueio contou com a avaliação de 2 reagentes, sendo eles o Well Champion (Kem-Em-Tek) e o Syntetic Blocking (Kem-Em-Tek). A utilização dos reagentes foi feita de acordo com o protocolo preconizado pelos fabricantes. Quando comparados, ambos os reagentes não diferiram significativamente em resultado, como demonstrado na Figura 12, o que levou à escolha do reagente Well Champion, devido ao menor preço do produto e ao protocolo de utilização se adaptar de forma melhor às condições de trabalho do laboratório.

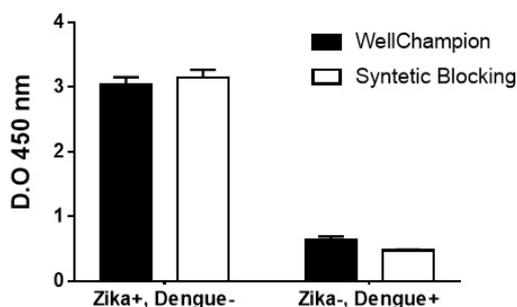


Figura 12. Determinação do reagente de bloqueio ideal. Foram utilizados um soro ZIKV⁺/DENV⁻ e um ZIKV⁻/DENV⁺. As placas foram incubadas separadamente com o reagente Well Champion e Syntetic Blocking durante 1 h a 37°C.

A etapa de adsorção do primeiro Anticorpo, contou com o uso de 4 reagentes distintos: o PBS-Tween 0,05 %, o PBS 1 x, o ELISA Multi Buster (Kem-Em-Tek) e o Stabil Plus (Kem-Em-Tek). Todos os reagentes foram utilizados para diluir as proteínas ΔNS1 DENV1-4 para a concentração de 22 ng/μl e então designados a diluir os soros na concentração de 1/100. Como demonstrado na Figura 13, o reagente que foi capaz de manter as amostras ZIKV⁺/DENV⁻ com maior valor de detecção em DO e as amostras ZIKV⁻/DENV⁺ com menor valor de detecção em DO foi o reagente PBS-Tween 0,05 %. Assim o PBS-Tween 0,05 % foi escolhido para o prosseguimento dos

testes, tanto pelo valor do produto, quanto pelos ótimos resultados apresentados. Os demais produtos apresentaram um incremento nos valores tanto para as amostras ZIKV⁺DENV⁻, quanto para as amostras ZIKV⁻DENV⁺, e não foram utilizados no desenvolvimento do teste.

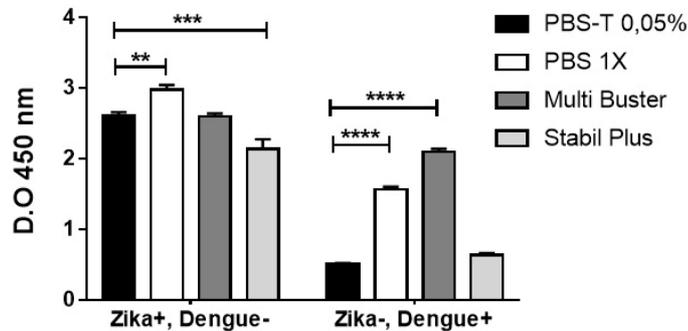


Figura 13. Determinação do reagente ideal utilizado na diluição do pool de ΔNS1 dos 4 sorotipos de Dengue e dos soros testados. Foram utilizados um soro ZIKV⁺/DENV⁻ e um soro ZIKV⁻/DENV⁺ que foram diluídos na proporção 1:100 em 4 diferentes soluções, sendo eles: PBS-Tween 0,05%, PBS 1x e os reagentes comerciais Multi Buster e Stabil Plus, na concentração de 2.200 ng/poço da proteína ΔNS1 de DENV dos 4 sorotipos, incubados por 1 h à 37°C.

Finalmente, foram testados 4 reagentes a serem utilizados para realizar a diluição do anticorpo conjugado à peroxidase (Sigma, A0170), sendo eles o PBS-Tween 0,05 %, o PBS 1 x, HRP Stabilizer (Kem-Em-Tek) e Assay Diluent (Kem-Em-Tek) (Figura 13). Aqueles que mais se aproximaram ao valor real das DOs das amostras foram o PBS-Tween 0,05 % e o reagente HRP Stabilizer, como demonstrado na Figura 14. O reagente comercial HRP Stabilizer foi então escolhido por manter a reatividade das amostras ZIKV⁺/DENV⁻ elevada em detrimento das amostras ZIKV⁻/DENV⁺, as quais apresentaram reatividade reduzida em relação ao PBS-Tween 0,05 %.

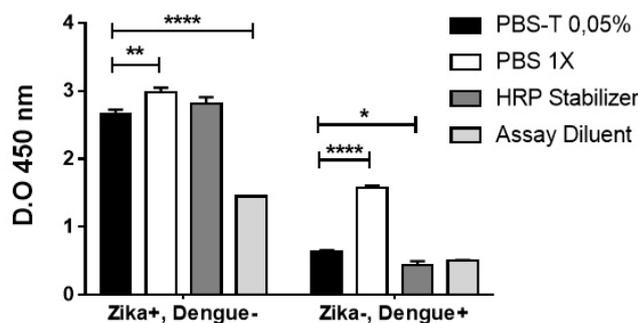


Figura 14. Ensaio de ELISA para determinação do reagente ideal utilizado na diluição do anticorpo secundário. Foram utilizados um soro ZIKV⁺/DENV⁻ e um soro ZIKV⁻/DENV⁺, e o anticorpo

secundário foi diluído na concentração de 1:4000 na presença de 4 soluções diferentes, sendo eles: PBS-Tween 0,05 %, PBS 1 x e os reagentes comerciais HRP Stabilizer e Assay Diluent, incubados por 1 h a 37°C.

Após todos os testes, o kit diagnóstico baseado na proteína Δ NS1 ZIKV foi definido com a seguinte conformação: **Tampão Carbonato/Bicarbonato** como reagente de sensibilização, **Wellchampion (Kem-Em-Tek)** como reagente de Bloqueio, **PBS-Tween 0,05%** como reagente de diluição do 1º anticorpo, **HRP Stabilizer (Kem-Em-Tek)** como reagente de diluição do anticorpo conjugado, utilizado na diluição 1:4000, **TMB** como cromógeno e o **ácido Sulfúrico à 0,2 N** como reagentes de parada.

4.4. Especificidade e Sensibilidade

Após a padronização dos componentes do kit ELISA ZIKV, deu-se início ao processo de validação do mesmo. A primeira etapa consistiu na determinação de possíveis resquícios de reatividade cruzada contra o antígeno Δ NS1 ZIKV quando avaliado contra um maior número de amostras contendo anticorpos contra outros Flavivírus. Inicialmente, um grupo de 74 amostras contendo soros convalescentes de pacientes positivos para DENV por qRT-PCR (34 amostras) e soros convalescentes de pessoas vacinadas contra YFV (40 amostras) foram testadas pelo kit ELISA (Figura 15). Foi verificado que tanto as amostras positivas contra DENV, quanto as amostras positivas contra YFV não apresentaram níveis de reatividade suficientes para serem consideradas positivas, mostrando a capacidade do teste em eliminar a reação cruzada não somente contra DENV, mas também contra YFV.

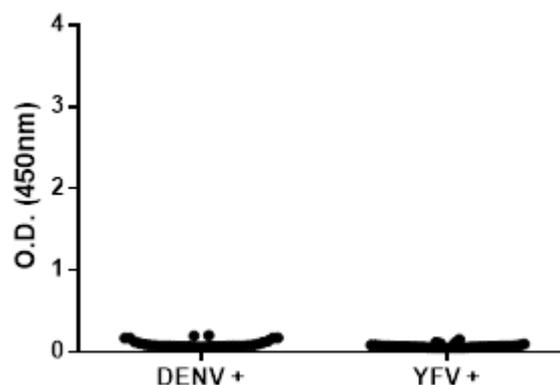


Figura 15. Ensaio de ELISA para determinação de resquícios de reatividade cruzada entre a proteína Δ NS1 ZIKV e soros contendo anticorpos contra DENV e YFV. Foram avaliadas 34

amostras contendo anticorpos contra DENV e 40 amostras contendo anticorpos contra YFV. As soluções e condições utilizadas no ensaio foram padronizadas no item 4.3.

Como segunda etapa no processo de validação do kit ELISA desenvolvido, iniciaram-se os ensaios visando a determinação dos valores de sensibilidade e especificidade do teste. Para isso, foi realizada uma análise comparativa entre as metodologias de ELISA, aqui descrita, e o PRNT (PRNT₉₀), considerado teste padrão ouro para o diagnóstico de Zika vírus. As amostras utilizadas na validação estão compreendidas em uma coorte de mães e bebês acompanhadas pelo Dr. Albert Ko (FIOCRUZ Salvador e Universidade de Yale) e foram por ele gentilmente cedidas. No total 150 amostras foram testadas por PRNT, sendo 85 caracterizadas como negativas para ZIKV e 65 caracterizadas com positivas para ZIKV.

A avaliação das amostras pelas duas metodologias apresentou resultados semelhantes (Figura 16). O kit ELISA ZIKV mostrou sensibilidade de 92,31% e especificidade de 92,94% quando as análises por PRNT foram consideradas verdadeiras (Figura 16a), sendo adotado um ponto de corte de 0,206 de DO. Tais valores associados a valores preditivos positivo e negativo de 90,90 e 94,95, respectivamente, bem como razões de verossimilhança positiva (+ LR, do inglês *Positive Likelihood*) e negativas (- LR do inglês *Negative Likelihood*) de 13,08 e 0,083, respectivamente, indicam o sucesso do teste aqui desenvolvido em diferenciar amostras positivas ou negativas contra ZIKV (Figura 16a). Nessas condições foram detectadas 5 amostras falso negativas e 6 amostras falso positivas dentro das 150 amostras analisadas (Figura 16b).

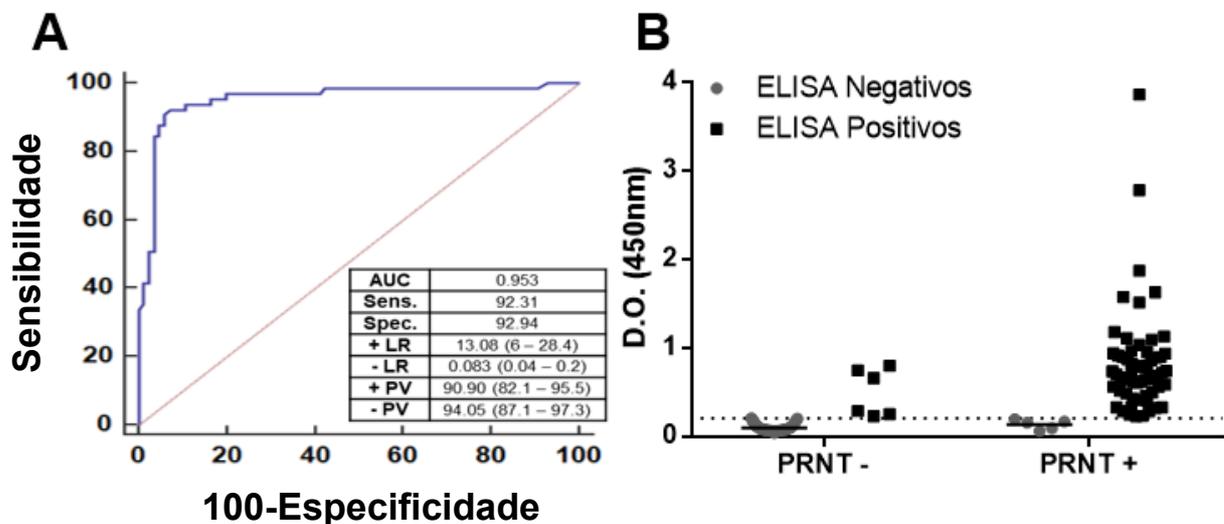


Figura 16. Determinação da curva ROC do teste ELISA ZIKV e distribuição de amostras validadas. Para o cálculo da curva ROC, 150 amostras de soro selecionadas da coorte foram avaliadas por PRNT90 contra ZIKV. (A) Curva ROC obtida após avaliação pelo ELISA ZIKV das amostras validadas por PRNT90. A determinação estatística foi realizada pelo software MedCalc, de acordo com DeLong e colaboradores (DELONG; DELONG; CLARKE-PEARSON, 1988). O valor de corte foi definido como 0,206 de DO. (B) Distribuição de amostras validadas por PRNT90 negativas e positivas após a avaliação pelo ELISA ZIKV.

Com a conclusão da validação do kit ELISA ZIKV, a tecnologia foi transferida para a empresa ADVAGEN/BIOTECH, conforme acordado com o licenciamento da patente juntamente com a Universidade de São Paulo. Como validação por parte da empresa, novamente foram otimizadas as soluções do ensaio, realizados testes de repetitividade, reprodutibilidade e estabilidade acelerada. Por fim, todo o processo de desenvolvimento levou o kit a um patamar compatível com a submissão para análise pela ANVISA, visando sua comercialização. O pedido foi aceito e o produto registrado até 03/06/2029, sob numeração 8.14.720-6 (ANEXO 1).

4.5. Padronização do teste baseado na Δ NS1 de DENV

Com a conclusão do desenvolvimento do kit ELISA ZIKV, as proteínas Δ NS1 DENV1-4 previamente produzidas para servirem como agente de adsorção foram utilizadas como antígeno de fase sólida na padronização do kit ELISA DENV. Para essa etapa foram utilizados todos parâmetros e soluções adotadas no desenvolvimento do kit ELISA ZIKV, incluindo a metodologia de adsorção, sendo essa feita com 22 ng/ μ l de proteína Δ NS1 ZIKV. A sensibilização das placas com 4 antígenos distintos sofreu alteração apenas na quantidade individual de cada Δ NS1 DENV1-4, sendo definida a massa de 100 ng de cada antígeno por poço, visto que por experiências prévias do laboratório, quantidades excessivas de proteína influenciam negativamente os resultados obtidos, devido à saturação dos poços.

As amostras analisadas foram gentilmente cedidas pelo Dr. Edison Luiz Durigon (Laboratório de Virologia Celular e Molecular, ICB/USP) e compreendem parte de uma amostragem de parturientes atendidas no Hospital Universitário da USP. No total foram avaliadas 601 amostras (Figura 17) previamente caracterizadas por um ensaio equivalente ao PRNT₉₀, mas baseado na observação dos efeitos citopáticos causados pela infecção viral em monocamadas de células imortalizadas e denominado VNT (do inglês *Virus Neutralization*). Como pode ser observado na Figura 17a, a análise das amostras pelo kit ELISA DENV gerou um resultado de 77,6 % de sensibilidade e de 89 % de especificidade quando calculada a curva ROC. As razões de verossimilhança positiva e negativa apresentaram valores de 7,05 e 0,25, respectivamente, sendo acompanhadas de valores preditivos positivos e negativos de 75,5 e 90,1, respectivamente. Das 183 amostras consideradas positivas para DENV pelo ensaio de VNT, 41 não foram detectadas pelo kit ELISA DENV, enquanto que 46 amostras consideradas negativas foram detectadas dentro de um total de 418 amostras (Figura 17b).

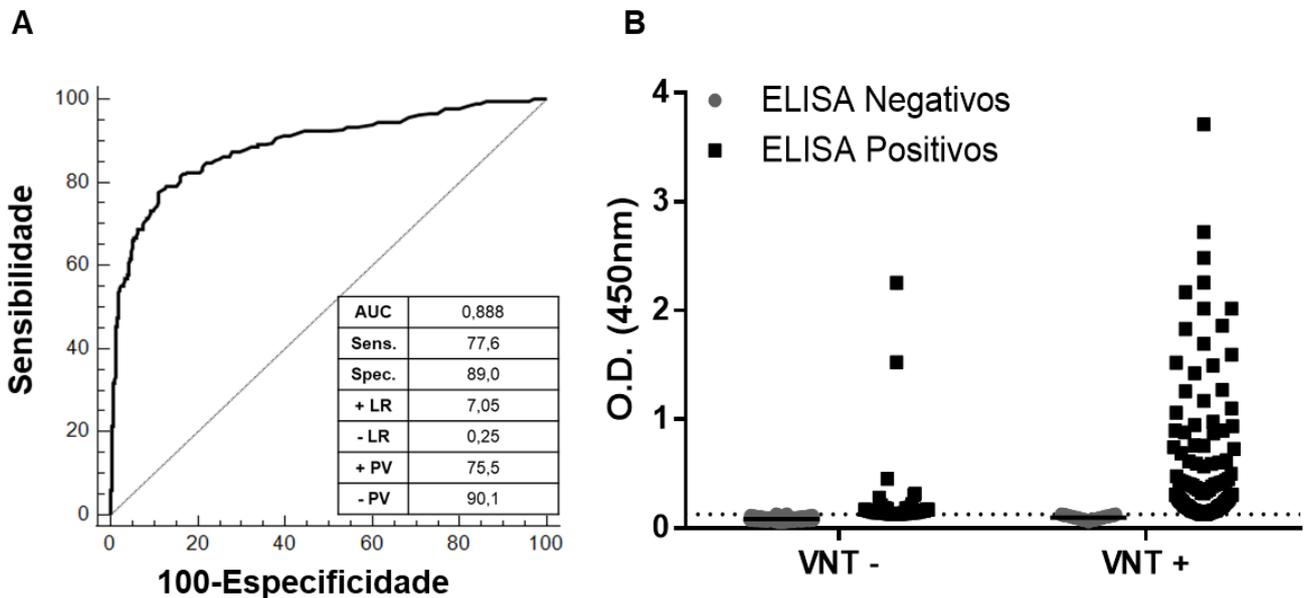


Figura 17. Determinação da curva ROC do teste ELISA DENV e distribuição de amostras validadas. Para o cálculo da curva ROC, 601 amostras de soro selecionadas da coorte foram avaliadas por CPE-VNT contra DENV1-4. (A) Curva ROC obtida após avaliação pelo ELISA DENV das amostras validadas por CPE-VNT. A determinação estatística foi realizada pelo software MedCalc, de acordo com DeLong e colaboradores (DELONG; DELONG; CLARKE-PEARSON, 1988). O valor de corte foi definido como 0,128 de DO. (B) Distribuição de amostras validadas por PRNT₉₀ negativas e positivas após a avaliação pelo ELISA ZIKV.

No geral, todos os parâmetros avaliados apresentaram redução quando comparados com os valores ótimos do kit ELISA ZIKV, porém, principalmente quando se leva em conta os valores de sensibilidade e especificidade, os resultados aqui obtidos enquadram o kit como tendo um valor comercial favorável. Outro fator que deve ser levado em consideração é a amostragem avaliada, visto que não há como definir quando ocorreram as infecções de DENV, já que tais amostras não eram oriundas de quadros agudos de infecção por DENV. Assim, a padronização do kit ELISA DENV foi considerada concluída, mas com necessidade de reavaliação de amostras melhor caracterizadas, ou mesmo com modificação dos antígenos avaliados, de forma a melhorar os valores de sensibilidade e especificidade obtidos.

4.6. Escolha da proteína de CHIKV E2.1

Com a produção padronizada completa do kit ELISA ZIKV e padronização parcial do kit ELISA DENV, deu-se então início às tentativas de produção da proteína E2 do envelope do CHIKV. A sequência de gene sintético codificando a totalidade da proteína E2 de CHIKV foi obtida comercialmente e avaliada em sistema de expressão heterólogo, baseado em *E. coli*, assim como as proteínas Δ NS1 ZIKV e DENV.

Após o recebimento do plasmídeo contendo o gene sintético foram feitas transformações em 3 linhagens distintas de *E. coli* (DE3, roseta e Arctic), as quais apresentam características únicas para a expressão de proteínas heterólogas. As bactérias foram transformadas com sucesso e posteriormente avaliadas em testes de expressão da proteína E2 CHIKV. Baseado na experiência do laboratório, em que a rapidez do metabolismo celular bacteriano interfere diretamente na renaturação proteica, foram estabelecidas as condições de indução da produção das proteínas a 18 °C, por 16 h (Figura 18a), ou a 37 °C, por 4 h (Figura 18b).

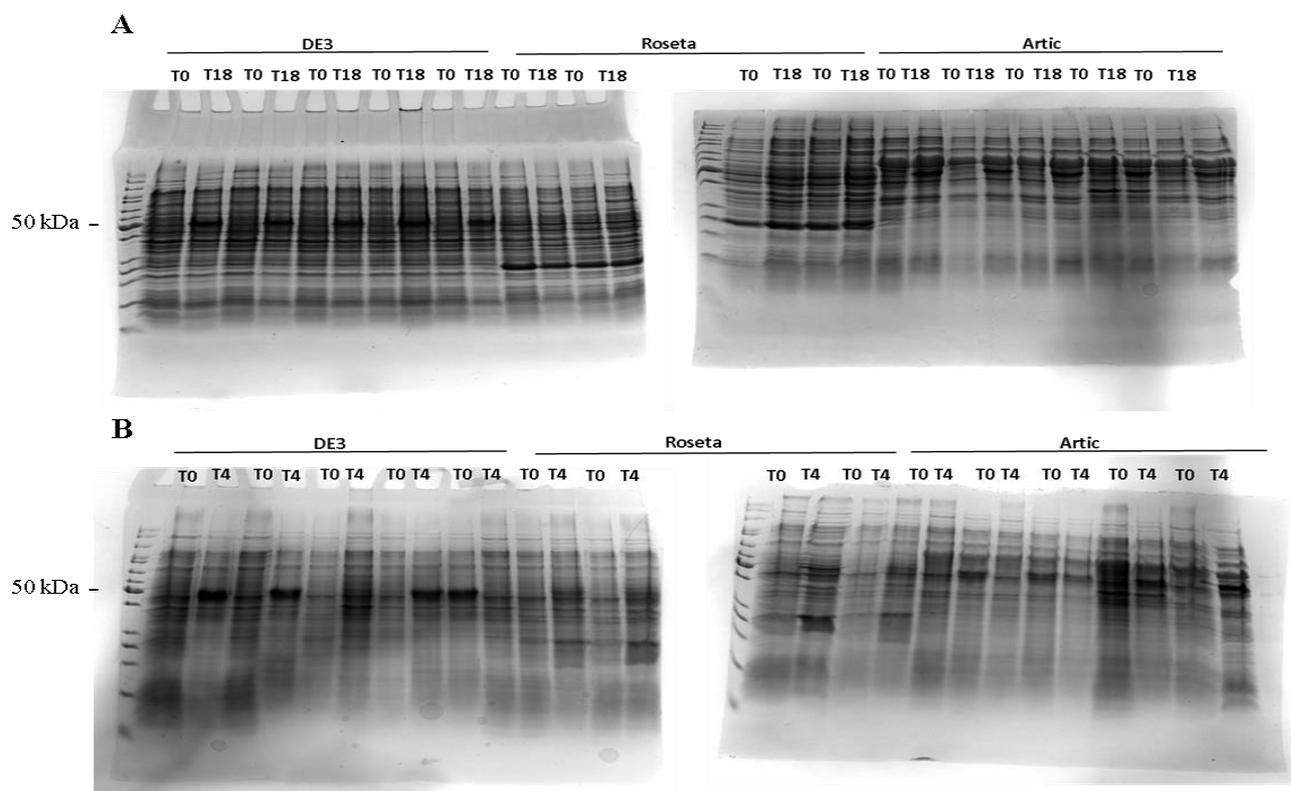


Figura 18. Teste de expressão das bactérias transformadas com o plasmídeo E2CHIKV. Cinco clones de cada linhagem bacteriana (DE3, Roseta e Arctic) foram selecionados após transformação com o plasmídeo E2CHIKV. Os clones selecionados foram cultivados até a fase estacionária e posteriormente induzidos com a adição de 500 mM de IPTG, em uma temperatura de (A) 18°C por 16 h ou de (B) 37°C por 4 h. Em ambos os processos foram coletadas alíquotas representativas dos extratos proteicos de forma anterior (T0) e posterior à indução (T4 e T18). Após corrida em gel de poliacrilamida a 15% as bandas proteicas características puderam ser observadas.

A análise dos perfis eletroforéticos permitiu observar o aparecimento de uma banda proteica de 45~50 kDa, apenas nos extratos celulares referentes às linhagens DE3 e Arctic, sendo as condições de tempo e temperatura equivalentes quanto à produção da proteína (Figuras 18a e 18b). Os clones que melhor expressaram a proteína E2 foram novamente analisados em testes de expressão adicionada à avaliação dos extratos solúvel e insolúvel obtidos após a lise celular (Figuras 19a e 19b). Tanto a linhagem Arctic (Figura 19a) quanto a linhagem DE3 (Figura 19b) apresentaram níveis semelhantes de expressão da proteína E2 em ambas as condições de indução, sendo essa concentrada quase que em sua totalidade nas frações insolúveis do extrato bacteriano.

Por motivos de facilitação dos processos de produção e purificação, utilizou-se a linhagem DE3 induzida por 4 h à 37°C. Tal escolha se deu pelo fato de a linhagem Arctic apresentar chaperonas que dificilmente são separadas das proteínas de interesse em apenas uma etapa de cromatografia, fato que não ocorre com a linhagem DE3. Além disso, a escolha de um menor tempo de indução reduz o tempo e o custo do processo quando levado em conta o possível escalonamento da produção, com consequência redução do custo final do produto.

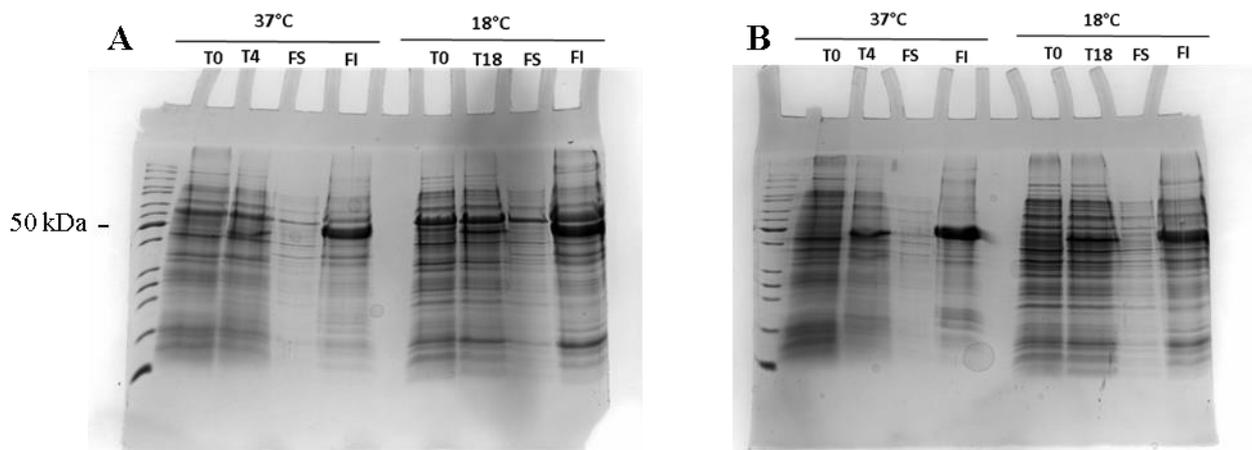


Figura 19. Comparação de expressão e análise da solubilidade da proteína E2 de CHIKV. Os clones com a maior produção da proteína E2 das linhagens (A) Arctic e (B) DE3 foram selecionados. Ambos os clones foram cultivados até a fase estacionária e posteriormente induzidos com a adição de 500 mM de IPTG, em uma temperatura de 18°C por 16 h, ou 37°C por 4 h. Após as induções as bactérias foram lisadas por sonicação e tiveram os extratos solúvel e insolúvel coletados. Aliquotas representativas dos extratos proteicos de forma anterior (T0) e posterior à indução (T4 ou T18) foram coletados e avaliados em gel de acrilamida a 15%.

Procedeu-se com a purificação em pequena escala da proteína E2 produzida em *E. coli* DE3 após indução de 100 mL de cultura bacteriana à 37°C, por 4 h. Após a indução as células foram lisadas por sonicação, sendo a fração insolúvel separada e solubilizada em tampão fosfato de sódio contendo 500 mM de NaCl, 8M de Ureia e 20% de glicerol, por 16 h, 4 °C. Após solubilização as proteínas foram renaturadas por diluição pulsada em tampão bis-tris-propano contendo 300 mM de NaCl e purificadas por cromatografia de afinidade ao níquel (Figura 20a). As frações de eluição obtidas após a purificação foram analisadas por SDS-PAGE (Figura 20b e 20c), onde não

foram observadas bandas correspondentes à proteína E2, somente a presença de diversos contaminantes celulares.

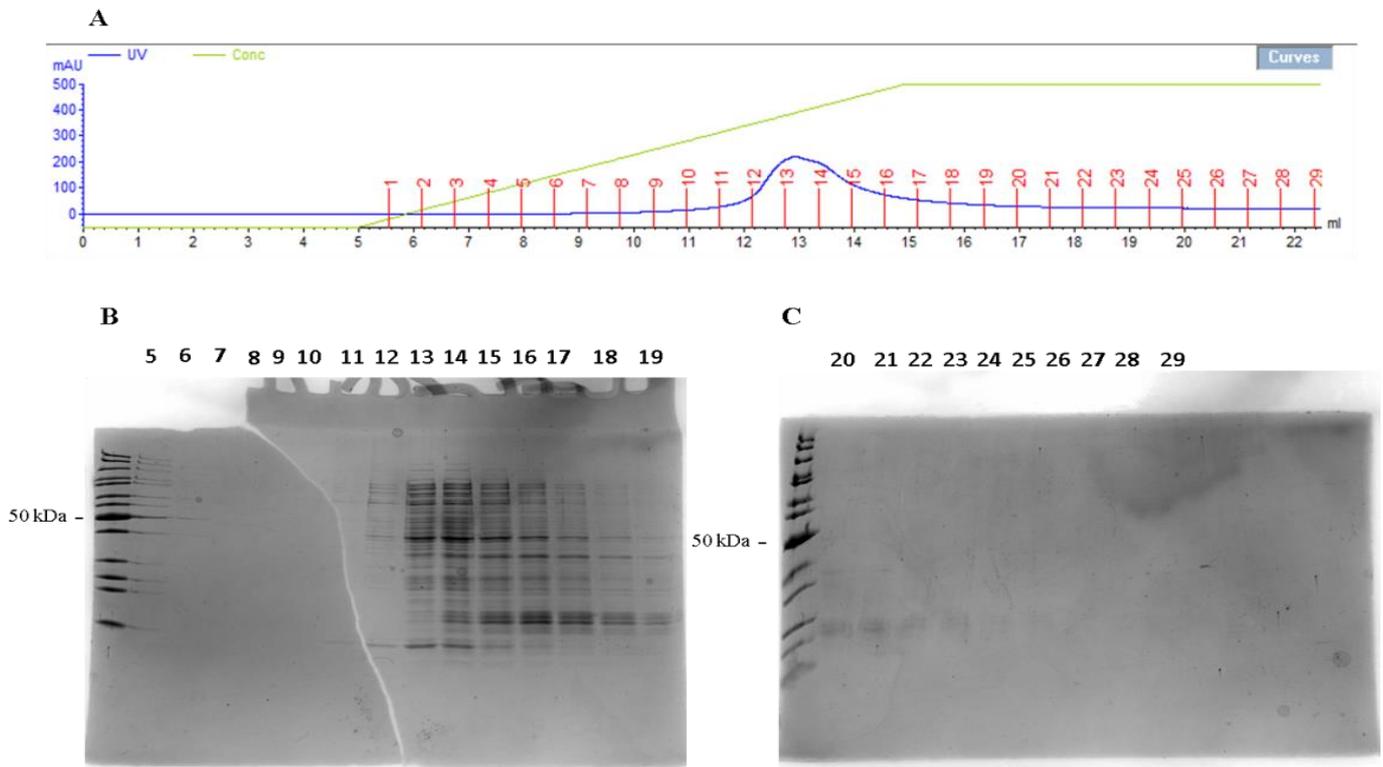


Figura 20. Purificação da proteína E2 por cromatografia de afinidade ao níquel. O clone da linhagem DE3 com a maior produção proteica foi selecionado, cultivado e induzido com a adição de 500 mM de IPTG, em uma temperatura de 37°C por 4 h. Após a indução as bactérias foram lisadas por sonicação, sendo o extrato insolúvel solubilizado em tampão contendo ureia, com posterior renaturação e purificação por cromatografia de afinidade ao níquel, em coluna HiTrapFF de 5mL. Para a purificação foi utilizado um gradiente de eluição de 0 a 100% de tampão B contendo imidazol, no intervalo de dois volumes de coluna (10 mL) (A). Foram coletadas frações de 0,6 mL, as quais tiveram padrões de bandas analisados em gel de poliacrilamida a 15% (B e C).

Após os testes aqui demonstrados, diferentes condições de expressão e purificação foram testadas e nenhuma obteve sucesso ao purificar a proteína E2 CHIKV, com degradação durante o processo de produção. A utilização de inibidores proteases mostrou-se ineficiente e não surtiu efeito nos protocolos de purificação. Assim, optou-se por modificar o gene codificador da proteína, dando preferência para regiões que apresentam maior solubilidade, com o intuito de se obter proteínas concentradas na fração solúvel dos extratos celulares. A referida proteína teve o protocolo de produção e purificação padronizado em um trabalho de mestrado

conduzido no Laboratório de Desenvolvimento de vacinas, cujo objetivo foi avaliar o potencial vacinal do antígeno contra infecções causadas por CHIKV (BRITO-CARVALHO, 2019), sendo a proteína nomeada E2.1.

O protocolo de produção da proteína E2.1 manteve os parâmetros aqui descritos, sendo a fração insolúvel do lisado celular tratada com diversas lavagens, as quais foram seguidas pela purificação das proteínas ainda que desnaturadas em solução contendo 8M de ureia, por afinidade ao níquel (Figura 21). Como pode ser observado na Figura 21a, mesmo na presença de 8M de ureia, alguns contaminantes ainda se ligam na coluna de níquel e são eluídos em um pico secundário inicial com o aumento do gradiente da concentração de imidazol. Contudo, após a finalização do procedimento de purificação, nota-se uma grande discrepância entre a presença dos contaminantes em relação à proteína E2.1 (Figura 21b), a qual apresenta cerca de 26kDa devido à remoção de regiões de interação hidrofóbica. Portanto, a proteína E2.1 foi considerada apta para utilização no desenvolvimento do teste proposto no presente projeto.

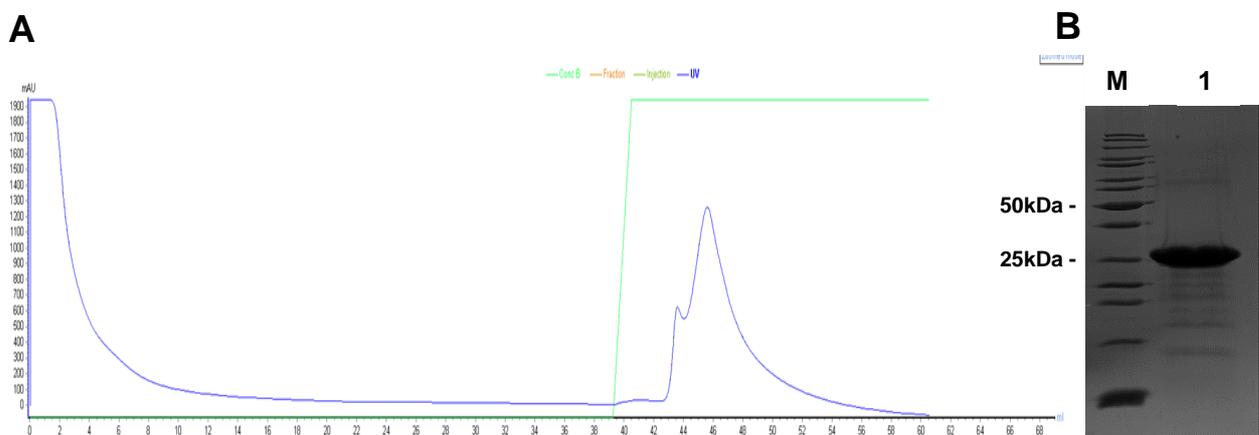


Figura 21. Purificação da proteína recombinante E2.1 de CHIKV. O clone da linhagem DE3 contendo o plasmídeo codificador para a proteína E2.1, previamente padronizado e armazenado no laboratório foi cultivado e induzido com a adição de 500 mM de IPTG, em uma temperatura de 37°C por 4 h. Após a indução as bactérias foram lisadas por variação de pressão seguida de sonicação, sendo o extrato solúvel insolúvel solubilizado em tampão contendo ureia, com posterior purificação por cromatografia de afinidade ao níquel, em coluna HiTrapFF de 5mL. Para a purificação foi utilizado um gradiente de eluição de 0 a 100% de tampão B contendo imidazol, no intervalo de dois volumes de coluna (10 mL) (A). Foram coletadas frações de 0,6 mL, as quais tiveram padrões de bandas analisados após corrida em gel de poliácridamida a 15% (B). Após a purificação a proteína seguiu para um procedimento de renaturação por diálise, no qual as concentrações de ureia foram reduzidas gradativamente até 0 M.

4.7. Padronização do ELISA CHIKV

De modo semelhante ao ocorrido com a validação do teste ELISA DENV, foram utilizadas as soluções finais padronizadas para o kit ELISA ZIKV, de forma a economizar, tempo, reagentes e, principalmente, amostras. A validação da proteína E2.1 de CHIKV encontrou dificuldades, visto que a grande maioria dos soros disponibilizados foram reservados para as etapas iniciais de padronização das proteínas de ZIKV e DENV. Além disso, a ausência de técnicas de manipulação e neutralização com o CHIKV no laboratório dificultou a validação de amostras adicionais, o que concentrou todos os esforços em conseguir amostras caracterizadas por pesquisadores parceiros.

Tais dificuldades nos levaram a iniciar os processos de validação do ELISA CHIKV com o uso de 15 amostras PRNT⁺ para CHIKV gentilmente cedidas pelo prof. Dr. Paolo Zanotto (ICB – USP), consideradas controle positivo, e 48 amostras não caracterizadas de região endêmica para CHIKV, gentilmente cedidas pela Dra. Patrícia Jungmann (Recife – PE), consideradas como controle negativo (Figura 22). A análise das amostras em curva ROC após procedimento de ELISA CHIKV apresentou sensibilidade de 93,33% e especificidade de 83,33% quando o ponto de corte do ensaio foi considerado 0,766, (Figura 22a), sendo apenas 2 amostras PRNT⁺ não reconhecidas e 5 amostras endêmicas reconhecidas (Figura 22b). Os valores de DO observados nas 5 amostras endêmicas detectadas foram elevados, o que pode indicar uma prévia exposição ao CHIKV. Mesmo com valores de sensibilidade e especificidade próximos ao ótimo, o ponto de corte estabelecido pela curva ROC, ainda se demonstrou muito alto, impedindo a detecção de duas amostras PRNT⁺, o que indica que um novo esforço para selecionar um painel de amostras sabidamente positivas ou negativas é necessário.

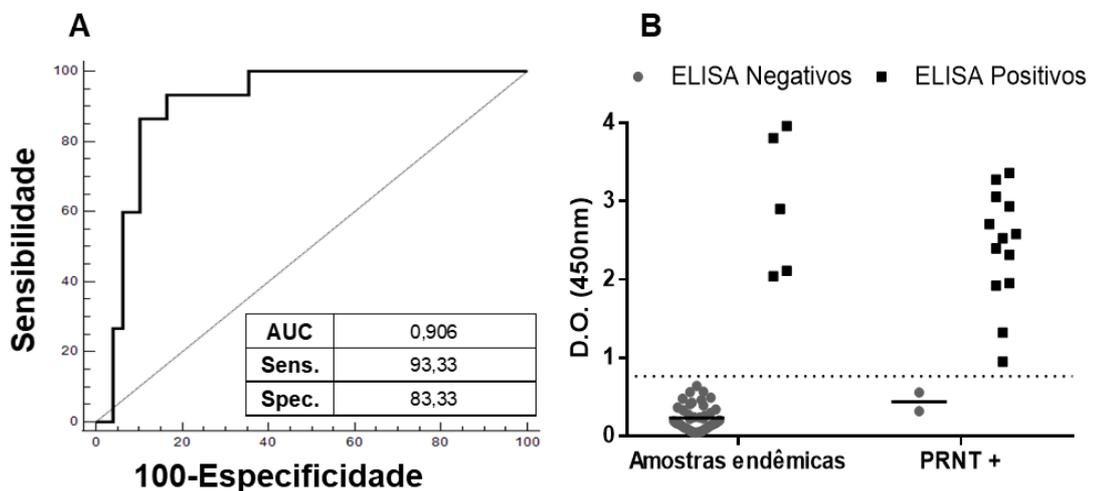


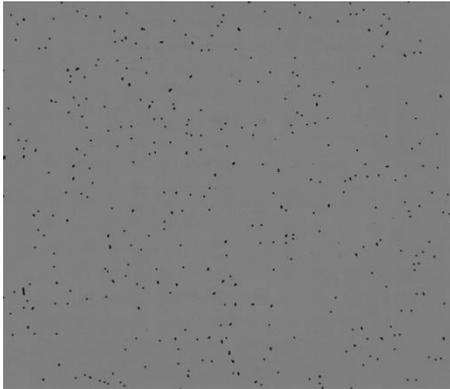
Figura 22. Determinação da curva ROC do teste ELISA CHIKV e distribuição de amostras validadas. Para o cálculo da curva ROC, 15 amostras de soro selecionadas da coorte foram avaliadas por PRNT90 contra ZIKV e 48 amostras oriundas de região endêmica foram avaliadas por ELISA. (A) Curva ROC obtida após avaliação por ELISA CHIKV de amostras validadas por PRNT90 ou oriundas de região endêmica. A determinação estatística foi realizada pelo software MedCalc, de acordo com DeLong e colaboradores (DELONG; DELONG; CLARKE-PEARSON, 1988). O valor de corte foi definido como 0,766 de DO. (B) Distribuição das amostras testadas após a avaliação pelo ELISA CHIKV.

4.8. Utilização das proteínas Δ NS1 DENV e ZIKV na plataforma multiplex

Após à padronização dos reagentes e ensaios de ELISA utilizando as proteínas Δ NS1 ZIKV e Δ NS1 DENV e E2.1 de CHIKV, demos início à avaliação do comportamento das proteínas produzidas na plataforma multiplex, utilizando a tecnologia Luminex. Para tal, foi realizada uma parceria com o grupo de pesquisa liderado pelo Dr. Jean-Claude Manuguerra, da Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence (CIBU) do Instituto Pasteur da França, o qual possui excelência na área, com diversos trabalhos publicados utilizando a tecnologia Luminex. Com o intuito de avaliar a potencial das proteínas Δ NS1, realizei estágio de 2 meses no CIBU para padronização inicial e avaliação das possíveis dificuldades encontradas com a tecnologia utilizando antígenos gerados pelo grupo de pesquisa do LDV.

Como padronização da tecnologia, foi primeiramente avaliada a capacidade de ligação das proteínas às *beads* magnéticas utilizadas no ensaio Luminex. Idealmente, as *beads* são recobertas por 50 μ g de proteína como forma de aumentar ao máximo a sensibilidade do teste, porém tal metodologia se mostrou inviável devido às concentrações das proteínas levadas para o CIBU, o que demandou adaptações. Para isso, a avaliação inicial de sensibilização consistiu no emprego de 2 μ g, 5 μ g e 10 μ g de proteína Δ NS1 DENV1 com *beads* de mesma numeração e na mesma condição, visto que haviam amostras de soro humano positivos para DENV 1 como controle. Uma vez completo o protocolo de sensibilização, as *beads* foram quantificadas e avaliadas quanto à agregação, como pode ser observado na Figura 23a. Após contagem e validação foi dado início ao primeiro controle de qualidade do lote de *beads* gerado, utilizando-se anticorpos anti-his em diferentes diluições, como observado na Figura 23b. Como padrão de detecção dos anticorpos ligados às proteínas foram utilizados anticorpos monoclonais ligados à Ficoeritrina recombinante (R-PE).

A



B

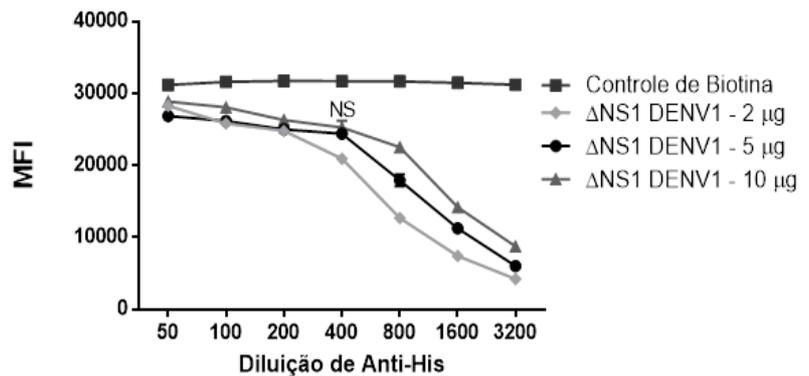


Figura 23. Controle de qualidade da sensibilização da proteína Δ NS1 DENV1 em ensaios na plataforma Luminex. Após a sensibilização da proteína Δ NS1 DENV1 em *beads* magnéticas, foram feitos testes para a avaliação da qualidade do produto gerado. (A) Avaliação de agregação em microscópio óptico utilizado para contagem das *beads* sensibilizadas. (B) Detecção da cauda de histidina presente nas proteínas por meio de anticorpo monoclonal conjugado à R-PE, em concentrações decrescentes. Quantidades absolutas de antígeno durante a sensibilização (2 μ g, 5 μ g dialisadas ou não e 10 μ g) foram testadas. A leitura das fluorescências foi feita em aparelho BIO-PLEX 200.

Como pode-se observar na Figura 23b, não houve diferença estatística entre as sensibilizações com diferentes quantidades de proteína, o que, aliado ao conhecimento prévio do CIBU levou à escolha da concentração absoluta de proteína 5 μ g como a sensibilização a ser utilizado nas etapas seguintes. Para a realização do controle de qualidade utilizando amostras de soros humanos positivos e negativos para a infecção por DENV 1, foram também avaliadas as diluições a serem feitas no soro, de forma a obter o sinal ótimo de detecção e o ruído do ensaio, bem como a necessidade de diálise prévia das proteínas para a obtenção de uma melhor sensibilização, como forma de padronização do ensaio. Assim, 16 amostras positivas e negativas para infecção por DENV1 foram avaliadas nas diluições 1:200, 1:400 e 1:1000 e testadas diante de *beads* sensibilizadas com 5 μ g de proteína Δ NS1 DENV1 na forma dialisada ou não. Adicionalmente, se tratando da avaliação de amostras oriundas de serem humanos em uma tecnologia de alta sensibilidade, foram utilizadas *beads* acopladas com uma proteína humana não relacionada, como forma de controle negativo pelo qual todas as amostras foram divididas, gerando valores de razão como resultado dos experimentos, conforme observado na Figura 24a.

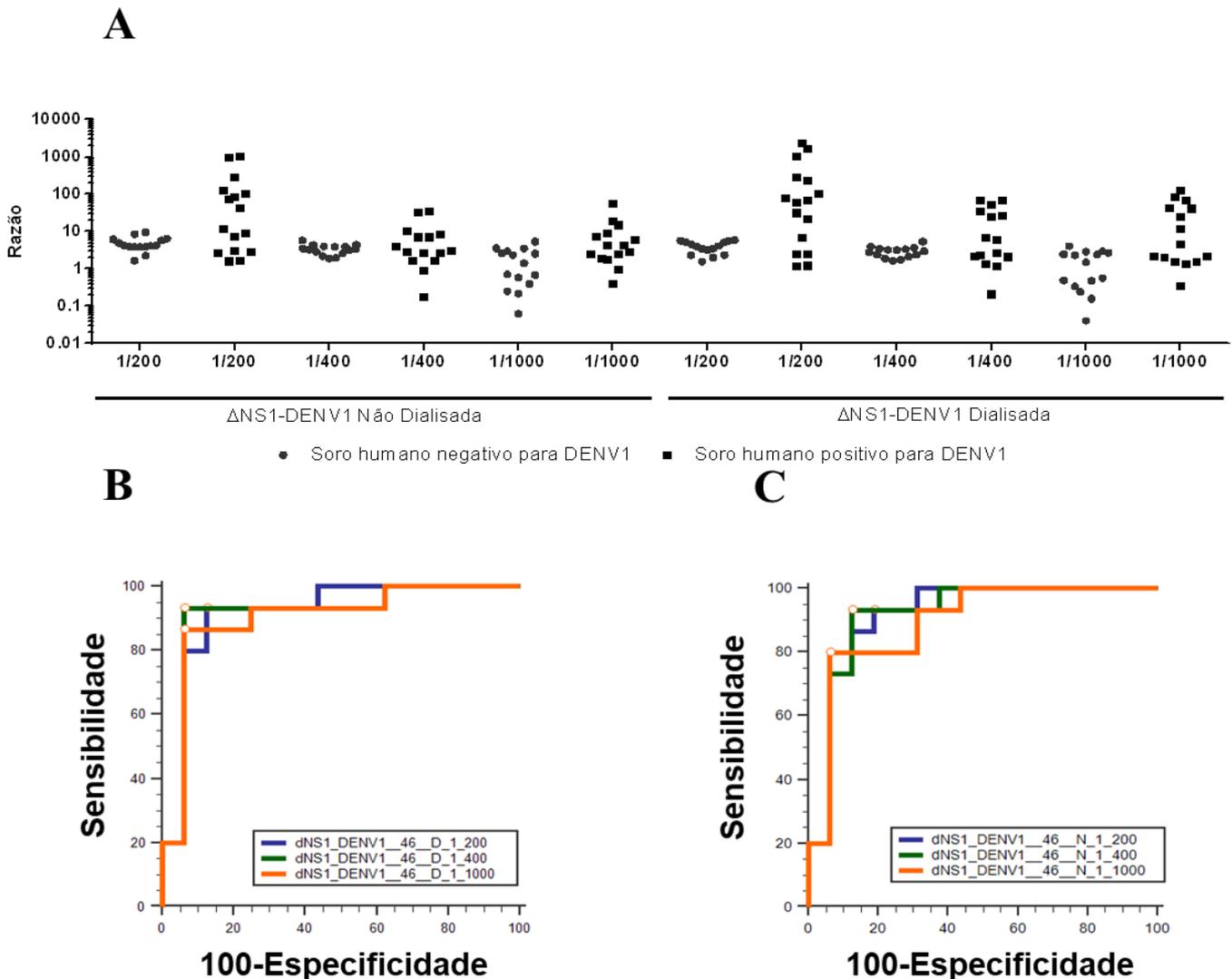


Figura 24. Obtenção da condição ótima para ensaios envolvendo a proteína ΔNS1-DENV1. (A) Para a determinação da condição ótima foram avaliados os parâmetros de necessidade de diálise das proteínas de forma prévia à sensibilização, bem como a diluição das amostras durante o procedimento de detecção das *beads* acopladas. Amostras foram testadas as diluições 1/200, 1/400 e 1/1000, conforme protocolo estabelecido no CIBU. Os mesmos mixes de *beads* contendo 5 μg da proteína ΔNS1-DENV,1 normal ou dialisada, foram utilizados para avaliar a performance de cada diluição. A detecção dos anticorpos ligados às proteínas foi feita com anticorpo R-PE e lida em aparelho BIOPLEX-200. (B e C) Gráficos de curva ROC foram gerados no programa MEDCALC após a avaliação da razão gerada em cada experimento. São demonstradas as diferenças entre as diluições das amostras quando os antígenos são ou não dialisados.

Os resultados obtidos com a análise das amostras conhecidas permitiram a geração de duas curvas ROC para o ensaio em padronização, sendo uma representativa da sensibilização feita com a proteína ΔNS1 DENV1 dialisada (Figura

24 b) e outra com a proteína contendo resquícios de imidazol (Figura 24 c). A análise das curvas obtidas na primeira etapa de padronização permitiu definir que a condição inicial para a implementação das proteínas Δ NS1 em ensaios multiplex seria com 5 μ g de proteínas dialisadas de forma prévia à sensibilização, com detecção por soros humanos diluídos 400 vezes.

Após a obtenção dos parâmetros primários a serem utilizados nos ensaios, foi dado início à sensibilização das proteínas Δ NS1 ZIKV e DENV 2-4. Com o intuito de se obter um painel multiplex em que amostras sejam avaliadas contra todas as proteínas ao mesmo tempo, foram escolhidas diferentes numerações de *beads* para se realizar a sensibilização, conforme indicado pelo fabricante (Tabela 10). A sensibilização das proteínas Δ NS1 restantes foi obtida com êxito após diálise e não apresentou agregações de *beads* (Figura 25a). Contudo, ao se realizar o primeiro teste de controle de qualidade observou-se diferentes níveis de reatividade entre às diferentes proteínas, o que indica distintas capacidades de sensibilização por cada Δ NS1 (Figura 25b).

Tabela 10. Representação das *beads* utilizadas para a sensibilização das proteínas Δ NS1 ZIKV e DENV1-4.

Proteínas	BEADS N°
Δ NS1 DENV1	46
Δ NS1 DENV2	44
Δ NS1 DENV3	45
Δ NS1 DENV4	63
Δ NS1 ZIKV	64

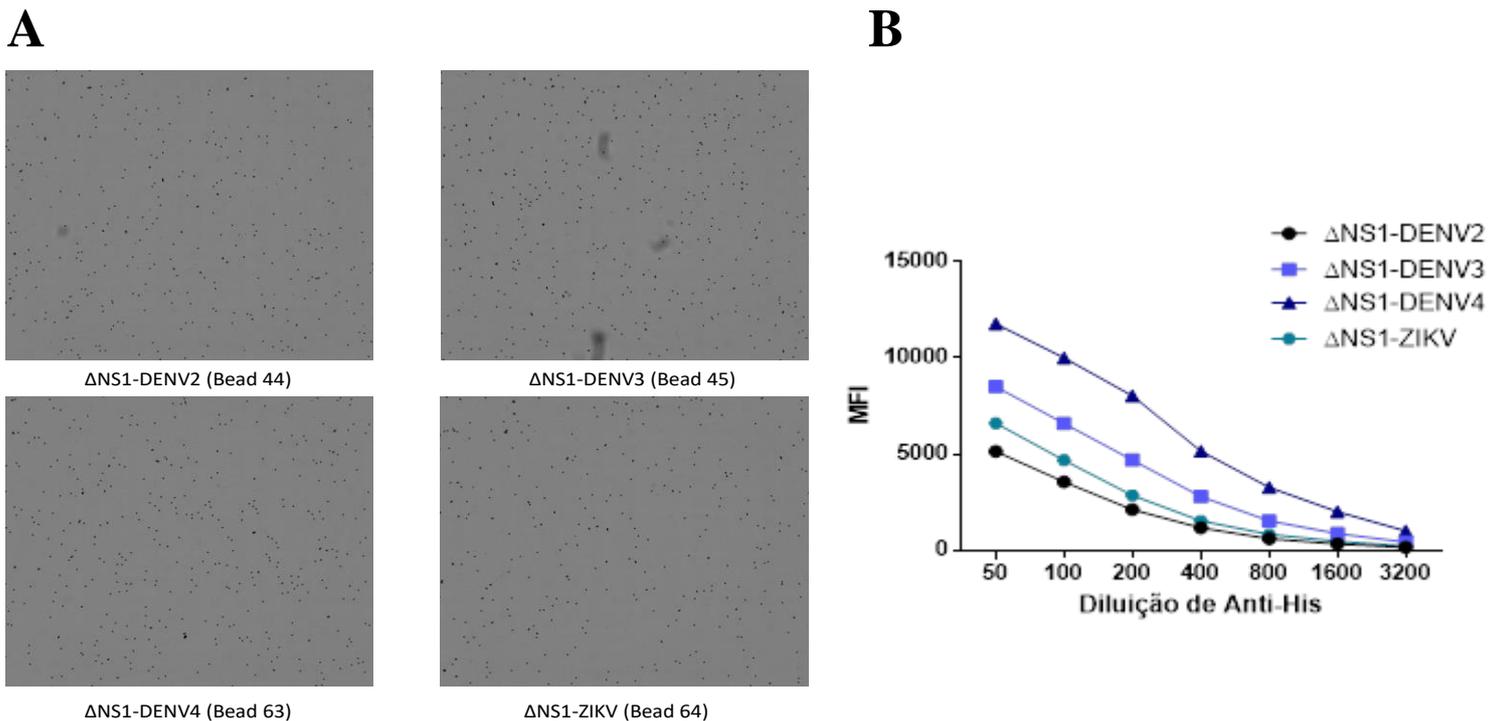


Figura 25. Controle de qualidade da sensibilização da proteína Δ NS1 DENV1. (A) avaliação de agregação e quantificação por microscopia ótica após contagem das *beads* acopladas com as proteínas Δ NS1-DENV2, Δ NS1-DENV3, Δ NS1-DENV4 e Δ NS1-ZIKV. (B) Detecção da cauda de histidina presente nas proteínas por meio de anticorpo monoclonal conjugado à R-PE, em concentrações decrescentes. Quantidades absolutas de antígeno durante a sensibilização (2 μ g, 5 μ g dialisadas ou não e 10 μ g) foram testadas. A leitura das fluorescências foi feita em aparelho BIO-PLEX 200.

Devido ao curto período de estágio realizado no CIBU e para aproveitar o material já utilizado, decidiu-se dar prosseguimento com a análise de amostras humanas, mesmo com os diferentes níveis de reatividade obtidos. Assim, com um conjunto multiplex de análise voltado para a detecção das proteínas Δ NS1 de ZIKV e DENV1-4, foram novamente analisadas as amostras DENV1 positivas para a avaliação de antigenicidade das proteínas de DENV, bem como da possível reação cruzada obtida pela proteína Δ NS1 ZIKV.

Conforme demonstrado na Figura 26a, as proteínas Δ NS1 DENV2 e 4 foram capazes de reconhecer amostras DENV positivas de forma semelhante à proteína Δ NS1 DENV1. A proteína Δ NS1 DENV3 apresentou ruído elevado, não sendo capaz de diferenciar as amostras positivas das negativas dentro do conjunto de amostras testado. Assim, concluiu-se de forma preliminar que a sorotipagem de amostras contendo anticorpos contra DENV não foi possível com a tecnologia desenvolvida até

o momento, optando-se em análises posteriores em diferenciar soros positivos para DENV apenas contra outros Flavivírus, de forma a evitar reação cruzada.

As *beads* contendo as proteínas Δ NS1 ZIKV foram testadas em conjunto no ensaio multiplex ou sozinhas (grupo denominado Monoplex), de forma a avaliar a capacidade do ensaio multiplex funcionar com a adsorção necessária para elevar a especificidade do teste de ELISA (Figura 26a). Os resultados mostraram que a utilização da Δ NS1 ZIKV em associação ou não com as demais proteínas não gera interferentes na reatividade obtida contra os soros testados, sendo os soros DENV1 positivos parcialmente detectados após o teste. Como forma de avaliar a capacidade de detecção das amostras DENV positivas por parte das proteínas Δ NS1 ZIKV foram gerados gráficos de curva ROC para o teste padrão ouro estabelecido no CIBU e o teste com a Δ NS1 ZIKV (Figuras 26b e c). A análise das curvas ROC com tendência de reta diagonal permite inferir a incapacidade dos testes em reconhecer de forma fidedigna as amostras testadas, como pode ser observado no teste padrão ouro (Figura 26 b) e parcialmente no teste Δ NS1 ZIKV (Figura 26 c). Assim, observou-se uma reação cruzada parcial com as proteínas Δ NS1 ZIKV quando avaliadas contra amostras positivas para anticorpos contra DENV1.

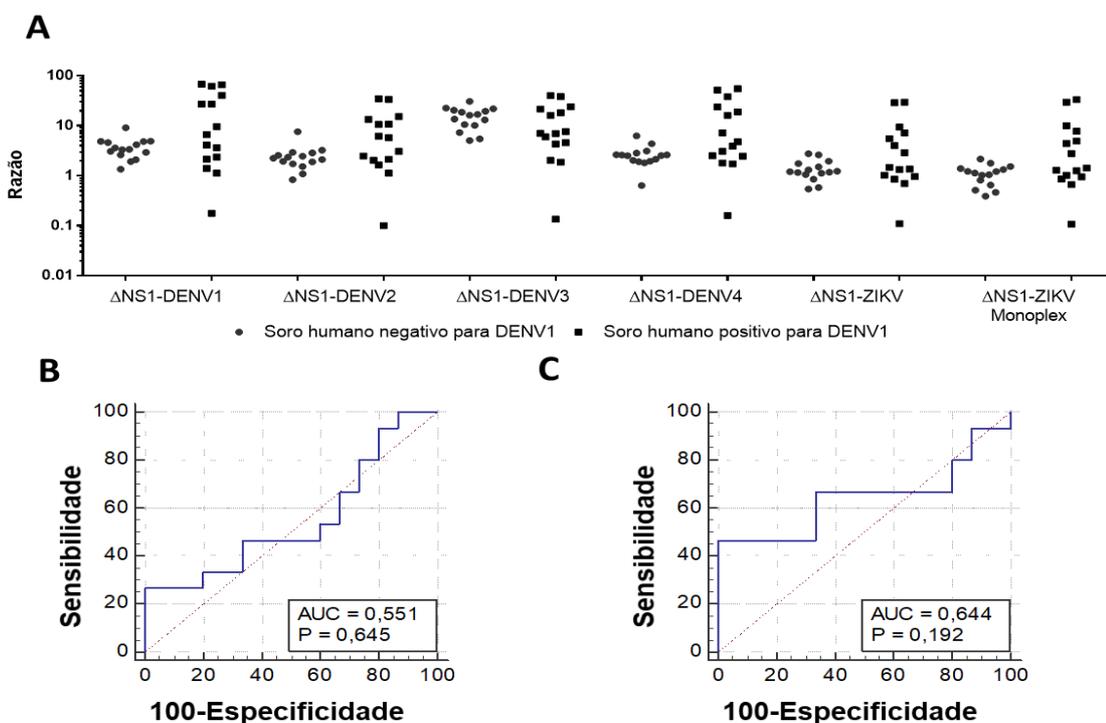


Figura 26. Avaliação da sensibilização das proteínas Δ NS1 via detecção de soros humanos sabidamente positivos para DENV 1. Para a avaliação da reatividade das proteínas Δ NS1 acopladas com as *beads*, ensaios multiplex foram realizados utilizando-se amostras de soro de humanos sabidamente positivos para DENV1 (A). A avaliação da reação cruzada no reconhecimento da proteína

Δ NS1 ZIKV levou à geração de gráficos de curva ROC para a comparação entre o método padrão ouro estabelecido no CIBU (B) e o reconhecimento da proteína Δ NS1 ZIKV (C).

Após o teste de amostras sabidamente positivas para DENV1 com o conjunto multiplex inicialmente estabelecido, foi dado início à última etapa da visita técnica ao CIBU, a qual consistiu no teste do mesmo painel de *beads* contra amostras oriundas da Guiana Francesa coletadas sequencialmente após detecção de infecção por ZIKV. O objetivo inicial da análise foi descobrir se as amostras reconheceriam as proteínas Δ NS1 acopladas às *beads*, pois, de forma interessante, mesmo após positivas por qRT-PCR para ZIKV, as amostras não reconhecem as proteínas EDIII padronizadas pelo CIBU (Figura 27).

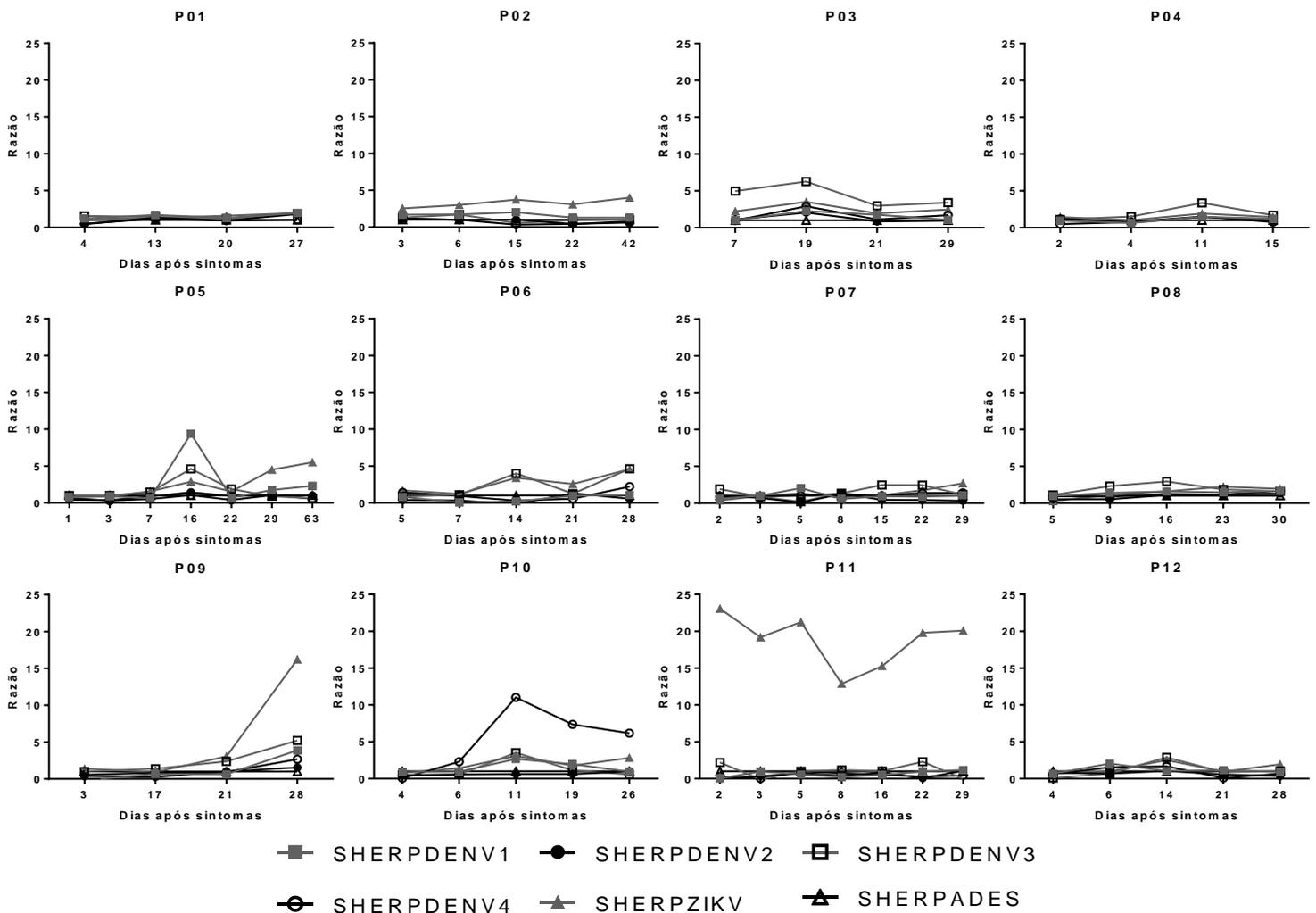


Figura 27. Avaliação da presença de IgG total EDIII em soros ZIKV positivos colhidos sequencialmente. Para a avaliação da presença de anticorpos IgG contra as proteínas EDIII fusionadas ou não à proteína SHERPADES (SHERPADES DENV1-4 e SHERPADES,

respectivamente), ensaios multiplex foram realizados utilizando-se amostras de soro de humanos sabidamente positivas para ZIKV. Amostras oriundas da Guiana Francesa foram incubadas com mixes contendo as proteínas citadas, conforme descrito na legenda. Os anticorpos ligados às proteínas foram detectados por anticorpos conjugados à ficoeritrina recombinantes, conforme descrito no item 3.13. Cada paciente é representado por um gráfico (P1-P12), sendo cada ponto de coleta interligado por linha para cada antígeno.

Assim, as amostras foram avaliadas quanto à presença de IgG total Δ NS1 específico contra todas as proteínas sensibilizadas (Figura 28), sendo os sinais mensurados contra as proteínas Δ NS1 DENV1-4 unidos, visto a prévia observação de que não foi possível detectar de forma específica anticorpos contra apenas um sorotipo (Figura 26a).

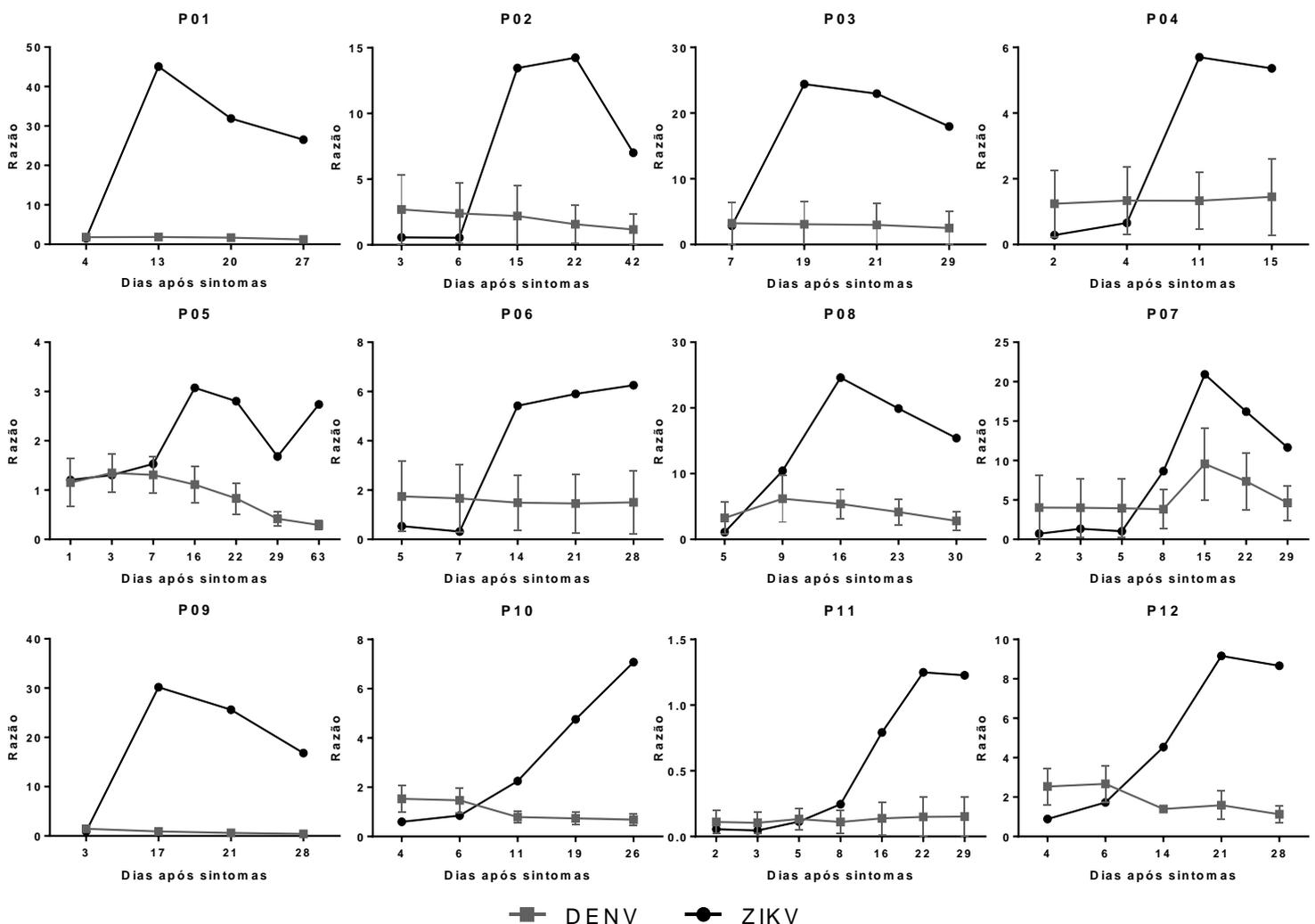


Figura 28. Avaliação da presença de IgG total Δ NS1 específicos em soros ZIKV positivos, colhidos sequencialmente. Para a avaliação da presença de anticorpos IgG contra as proteínas Δ NS1, ensaios multiplex foram realizados utilizando-se amostras de soro de humanos sabidamente positivas para ZIKV, após confirmação por qRT-PCR. Amostras oriundas da Guiana Francesa foram

incubadas com mixes contendo as proteínas Δ NS1 ZIKV e Δ NS1 DENV1-4. Os anticorpos ligados às proteínas foram detectados por anticorpos conjugados a ficoeritrina recombinantes, conforme descrito no item 3.13. Cada paciente é representado por um gráfico, sendo cada ponto de coleta interligado por linha para cada antígeno.

Os resultados da Figura 28 mostraram que somente as proteínas Δ NS1 ZIKV foram reconhecidos por anticorpos ZIKV específicos, com reação cruzada mensurável apenas entre a proteína Δ NS1 ZIKV e amostras de soro DENV1 positivas, sendo tal reação cruzada não observada quando avaliadas as proteínas Δ NS1 DENV contra amostras ZIKV positivas. Além disso, apesar da clara diferenciação entre a detecção da proteína Δ NS1 ZIKV e as proteínas Δ NS1 DENV, os níveis de sinal apresentados ainda foram considerados baixos, o que indica que há a possibilidade de melhor o teste desenvolvido.

Como tentativa de encontrar novos marcadores com potencial de melhor a clareza do quadro imunológico ZIKV específico, também foram avaliadas diferentes subclasses de IgG contra o painel multiplex gerado. Para isso, devido à indisponibilidade comercial de marcadores subclasses específicas diretamente conjugadas com R-PE, foram feitas análises com anticorpos conjugados apenas à biotina, com posterior adição de estreptavidina. A Figura 29 representa as mesmas amostras e painel testado, mas com a detecção de IgG1 ZIKV específico dos soros colhidos. Quando comparados os valores de IgG total e IgG1 observa-se grande semelhança, demonstrando predominância desta subclasse de anticorpos durante o período inicial da infecção por ZIKV. Também de forma semelhante ao observado com a detecção de IgG total, nota-se o aumento dos níveis de detecção de acordo com as coletas sequenciais, bem como a detecção quase que exclusiva de apenas Δ NS1 ZIKV em todas as amostras.

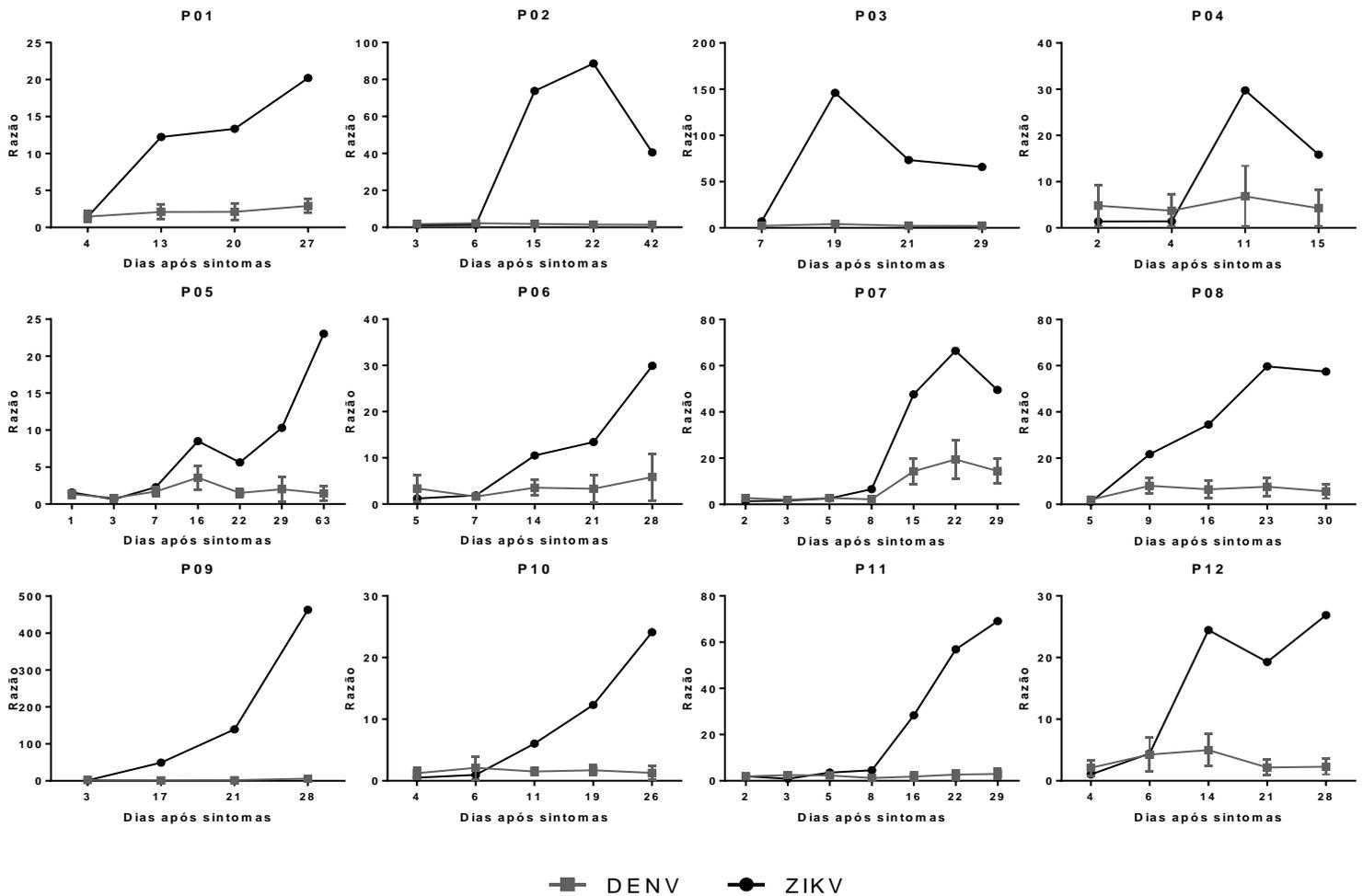


Figura 29. Avaliação da presença de IgG1 ΔNS1 específicos em soros ZIKV positivos colhidos sequencialmente. Para a avaliação da presença de anticorpos IgG1 contra as proteínas ΔNS1, ensaios multiplex foram realizados testes utilizando-se amostras de soro de humanos sabidamente positivas para ZIKV, após confirmação por qRT-PCR. Amostras oriundas da Guiana Francesa foram incubadas com misturas contendo as proteínas ΔNS1 ZIKV e ΔNS1 DENV1-4. Os anticorpos ligados às proteínas foram detectados por anticorpos conjugados à biotina, seguidos de revelação por adição de estreptavidina, conforme descrito no item 3.13. Cada paciente é representado por um gráfico, sendo cada ponto de coleta interligado por linha para cada antígeno.

Para a detecção de marcadores indicativos de infecção aguda, como alternativa ao ensaio de IgM, avaliou-se a presença de anticorpos da subclasse IgG3 nos soros. A Figura 30 mostra uma grande redução da quantidade de anticorpos dessa subclasse quando comparados com IgG total ou IgG1, o que indica uma produção baixa e possivelmente transitória de tal subclasse em decorrência da infecção por ZIKV. Devido aos baixos níveis de detecção e também ao pequeno tempo de observação após infecção, foram observadas amostras em que não houve distinção entre os níveis de IgG3 ZIKV e DENV específicos, porém o padrão de

aumento de detecção de acordo com a coleta sequencial de amostras se manteve conforme às detecções anteriores.

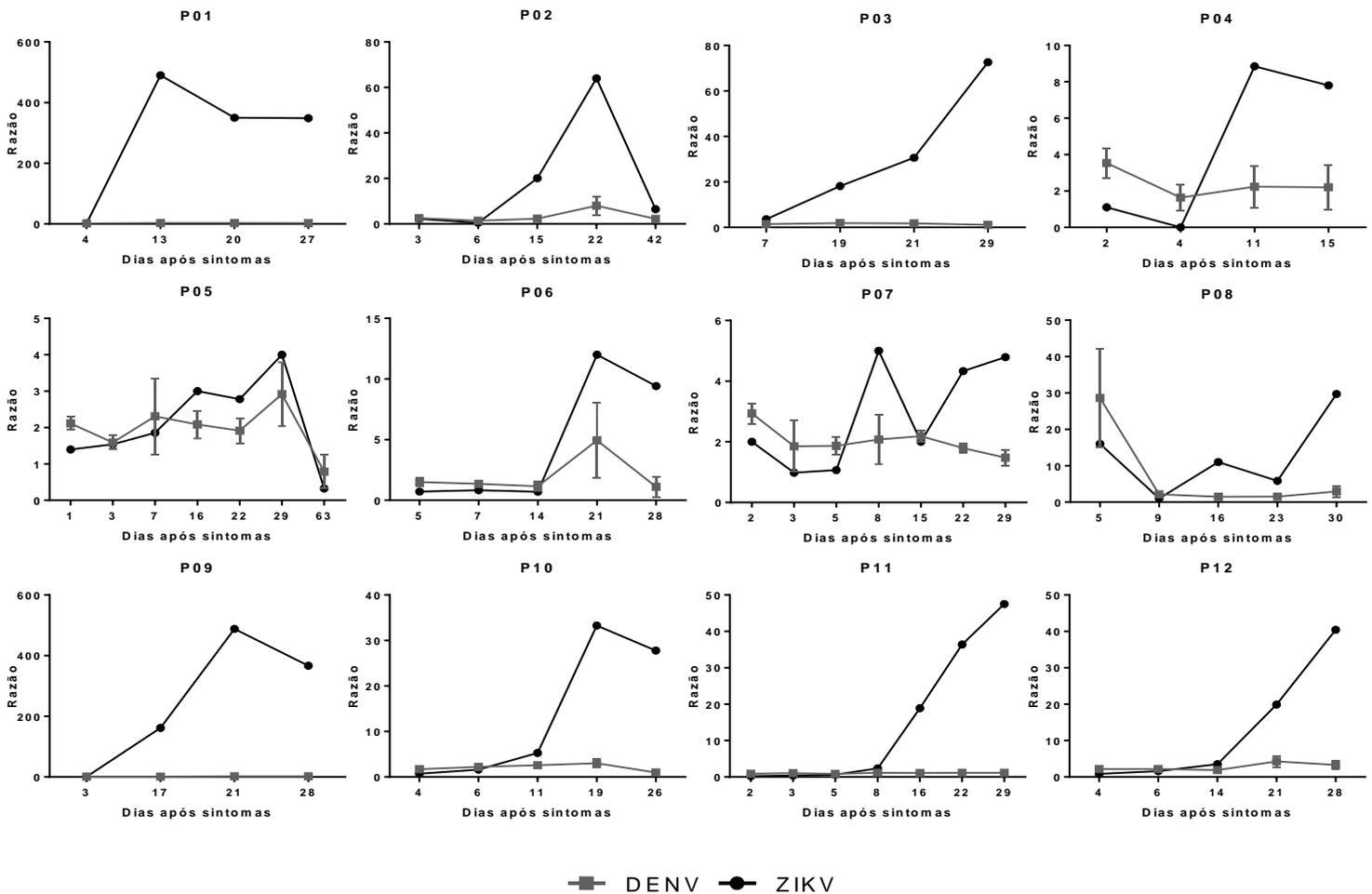


Figura 30. Avaliação da presença de IgG3 ΔNS1 específicos em soros ZIKV positivos colhidos sequencialmente. Para a avaliação da presença de anticorpos IgG3 contra as proteínas ΔNS1, ensaios multiplex foram realizados utilizando-se amostras de soro de humanos sabidamente positivas para ZIKV, após confirmação por qRT-PCR. Amostras oriundas da Guiana Francesa foram incubadas com mixes contendo as proteínas ΔNS1 ZIKV e ΔNS1 DENV1-4. Os anticorpos ligados às proteínas foram detectados por anticorpos conjugados à biotina, seguidos de revelação por adição de estreptavidina, conforme descrito no item 3.13. Cada paciente é representado por um gráfico, sendo cada ponto de coleta interligado por linha para cada antígeno.

A última classe de imunoglobulina avaliada foi IgA, visto que já foi relatada a replicação e presença de ZIKV em mucosas. A Figura 31 contém os resultados obtidos após a detecção de IgA e demonstra níveis mínimos detectáveis e sem nenhuma distinção clara entre as diferentes proteínas testadas, já que grande parte das reações, mesmo durante as coletas sequenciais, permaneceram em níveis de ruído.

Dessa forma a detecção de IgA foi descartada como potencial diagnóstico para a plataforma testada.

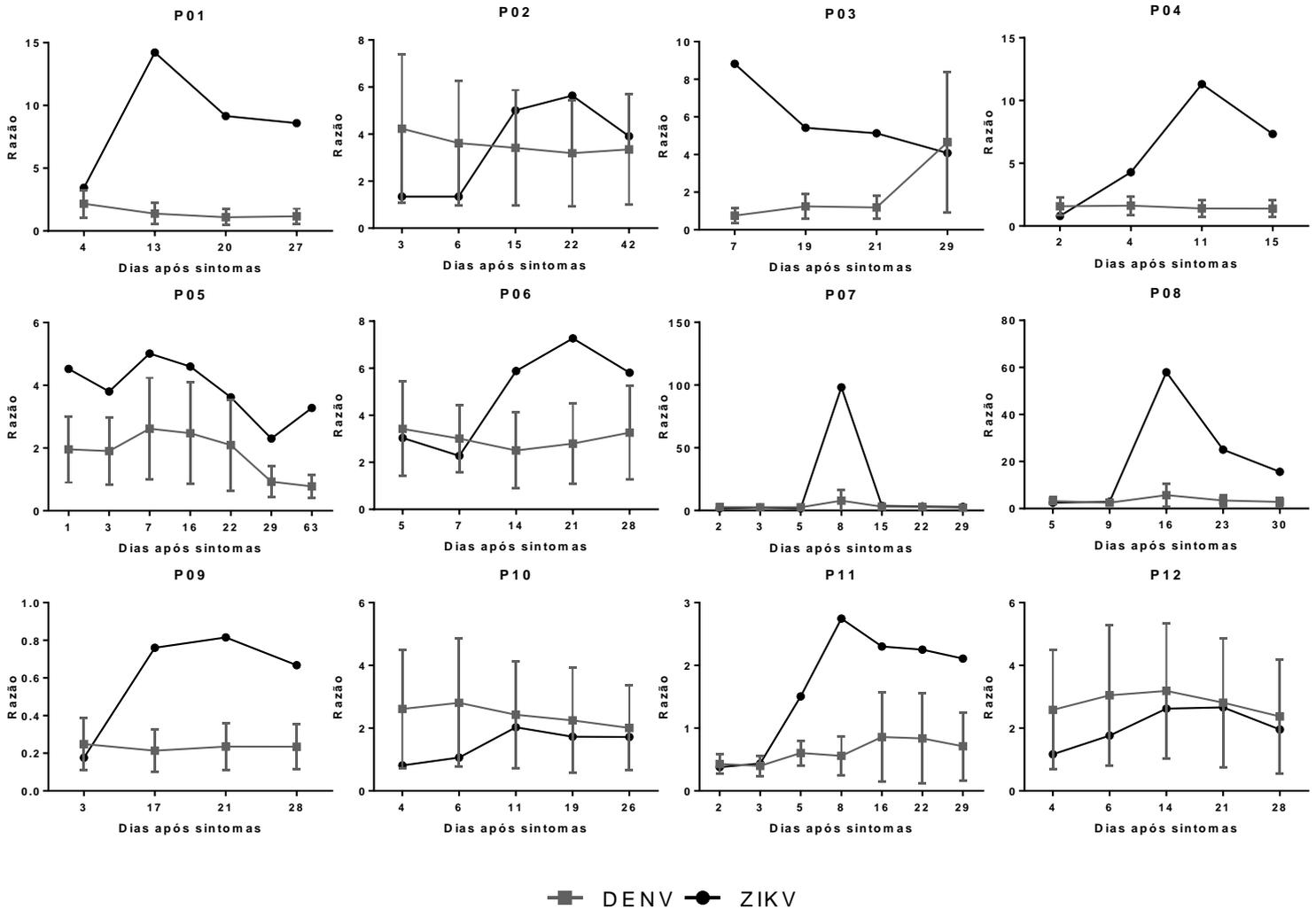


Figura 31. Avaliação da presença de IgA ΔNS1 específicos em soros ZIKV positivos colhidos sequencialmente. Para a avaliação da presença de anticorpos IgG contra as proteínas ΔNS1, ensaios multiplex foram realizados utilizando-se amostras de soro de humanos sabidamente positivas para ZIKV, após confirmação por qRT-PCR. Amostras oriundas da Guiana Francesa foram incubadas com mixes contendo as proteínas ΔNS1 ZIKV e ΔNS1 DENV1-4. Os anticorpos ligados às proteínas foram detectados por anticorpos conjugados à biotina, seguidos de revelação por adição de estreptavidina, conforme descrito no item 3.13. Cada paciente é representado por um gráfico, sendo cada ponto de coleta interligado por linha para cada antígeno.

Como última análise feita na plataforma multiplex, foram avaliadas amostras de soros providas de pacientes brasileiros encaminhadas com o intuito de validar a metodologia desenvolvida para utilização em território nacional. Devido à indisponibilidade de amostras com PRNT positivo apenas para DENV no momento do

estágio no CIBU, foram avaliadas apenas amostras DENV⁺ e ZIKV⁺ (amostras 1, 2 e 3) ou DENV⁻ e ZIKV⁺ (amostras 4, 5 e 6), como pode ser observado na Figura 32. Como esperado, as amostras 1, 2 e 3 que apresentam anticorpos contra DENV e ZIKV foram detectadas por ambos os antígenos, sendo a variação entre os níveis de detecção à baixa quantidade de anticorpos presentes nas amostras (Figura 32a). As amostras 4, 5 e 6 que apresentam apenas anticorpos contra ZIKV foram detectadas especificamente pela proteína Δ NS1 ZIKV e apenas níveis basais de detecção contra as proteínas Δ NS1 DENV1-4 foram observados (Figura 32b). A variação nos valores basais contra DENV observada na amostra 6 foi considerada normal e levada em conta no cálculo do ponto de corte Razão 3 do ensaio.

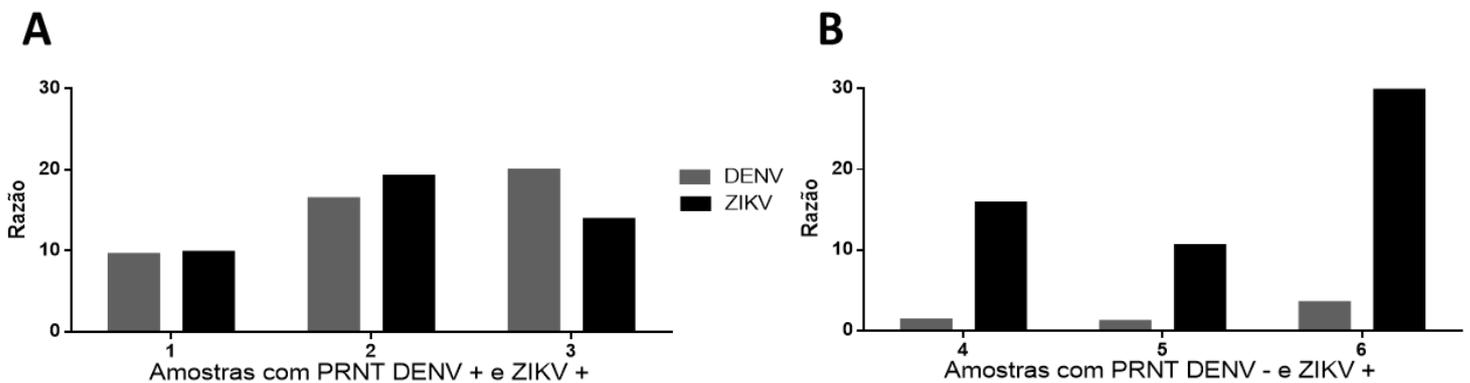


Figura 32. Avaliação da presença de IgG total Δ NS1 específicos em soros brasileiros colhidos de áreas endêmicas. Para a avaliação da presença de anticorpos IgG contra as proteínas Δ NS1, ensaios multiplex foram realizados utilizando-se amostras de soro de humanos colhidos de residentes de áreas endêmicas. Amostras DENV⁺ ZIKV⁺ (1, 2 e 3) e DENV⁻ ZIKV⁺ (4, 5 e 6) foram avaliadas quanto ao perfil sorológico específico contra as proteínas Δ NS1 ZIKV e Δ NS1 DENV1-4. Cada barra demonstra a reatividade adquirida as proteínas Δ NS1 no ensaio multiplex.

4.9. Utilização da proteína E2.1 na plataforma multiplex

Como última padronização a ser realizada no presente projeto de doutorado, aplicamos a tecnologia Luminex à proteína E2.1 de CHIKV. Os ensaios foram feitos no LDV, seguindo as mesmas especificações previamente estabelecidas com as proteínas Δ NS1 ZIKV e Δ NS1 DENV1-4, mas sem a inclusão da proteína humana SHERPADES, a qual foi utilizada a partir da Figura 24 como padrão para a obtenção dos valores de razão. Assim, a análise das amostras contendo anticorpos contra DENV, ZIKV e CHIKV está representada por mediana da fluorescência (MFI) e não por Razão.

A escassez de amostras validadas, juntamente com o período de pandemia, limitou a quantidade de resultados obtidos com a tecnologia Luminex associada à proteína E2.1, porém, os resultados obtidos demonstram o potencial dessa proteína ao ser inserida na plataforma multiplex. Um total de 19 amostras foram avaliadas, sendo 15 delas oriundas de regiões endêmicas para DENV, ZIKV e CHIKV, mas validadas por PRNT contra CHIKV, e 4 amostras positivas para DENV ou ZIKV (Figura 33). As amostras foram avaliadas contra um mix de *beads* sensibilizadas com as proteínas Δ NS1 ZIKV (Figura 33a), Δ NS1 DENV1-4 (Figura 33b) ou E2.1 CHIKV (Figura 33c). Devido às amostras CHIKV⁺ serem oriundas de regiões endêmicas, mas por não terem sido caracterizadas previamente quanto à presença de anticorpos contra DENV e ZIKV por PRNT, não é possível afirmar que a detecção observada contra a Δ NS1 ZIKV (Figura 33a) ou contra as Δ NS1 DENV1-4 são oriundas de reatividade cruzada. Ao se observar a clara distinção da detecção de amostras CHIKV⁺ pela proteína E2.1 em relação às amostras DENV⁺ e ZIKV⁺ (Figura 33c), pode-se inferir altos níveis de especificidade, porém, devido à pequena amostragem das amostras CHIKV⁻, não foi possível calcular curvas ROC com valores confiáveis.

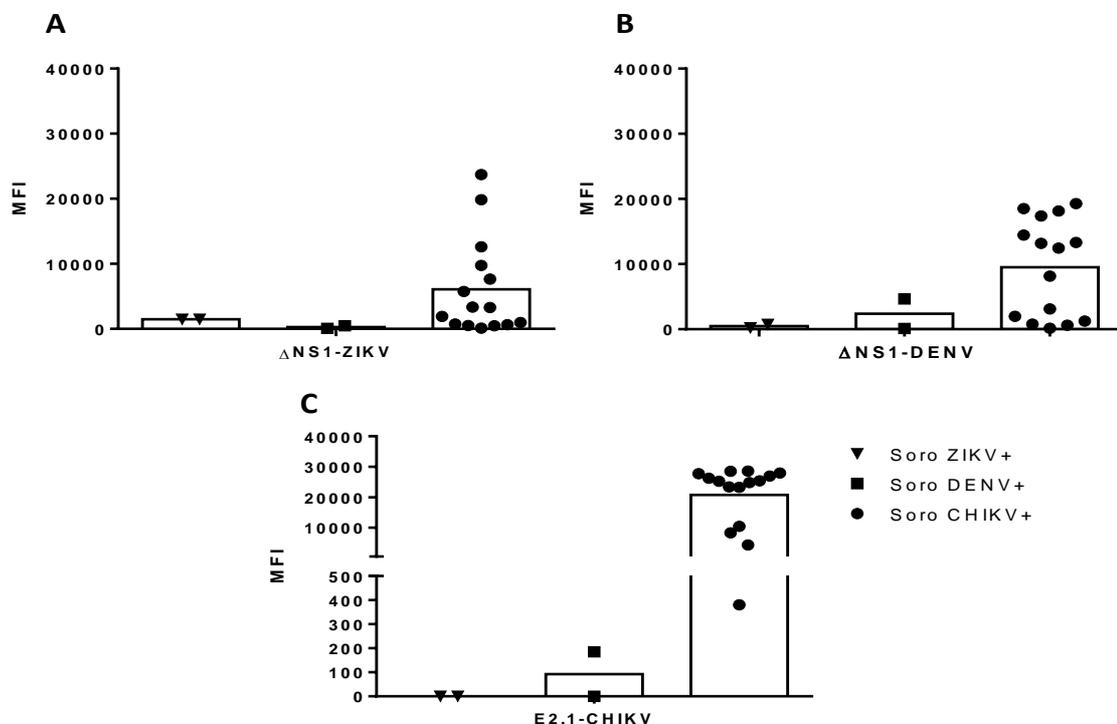


Figura 33. Avaliação da presença de IgG total Δ NS1 e E2.1 específicos em amostras de soros de pacientes brasileiros colhidos em áreas endêmicas. Para a avaliação da presença de anticorpos IgG contra as proteínas Δ NS1 e E2.1, ensaios multiplex foram realizados utilizando-se 19 amostras de soro de humanos colhidos de residentes de áreas endêmicas, sendo estas denominadas como ZIKV⁺,

DENV⁺ ou CHIKV⁺, conforme descrito na legenda. (A) níveis de detecção observados contra a proteína Δ NS1 ZIKV. (B) níveis de detecção observados contra a proteína Δ NS1 DENV1-4. (C) níveis de detecção observados contra a proteína E2.1 CHIKV.

Em resumo, mesmo sem os resultados em forma de curva ROC, pode-se observar o excelente potencial da utilização da proteína E2.1 inserida em plataforma multiplex. Adicionalmente, pode-se considerar a implementação da tecnologia multiplex no LDV bem sucedida, sendo apenas necessária a otimização dos ensaios e a inclusão de proteínas humanas para controle de auto reatividade, conforme realizado durante estágio no CIBU da França.

5. DISCUSSÃO

A falta de um método confiável e acessível para o diagnóstico sorológico de infecções por arbovírus, com destaque para os vírus DENV, ZIKV e CHIKV, representa um dos principais obstáculos para estudos epidemiológicos em regiões endêmicas, como no Brasil. A reatividade cruzada de anticorpos contra proteínas estruturais e não estruturais, particularmente entre DENV e ZIKV constitui um desafio tecnológico relevante, mas passível de ser superado quando corretamente abordado. Os resultados do presente projeto demonstram que as predições observadas com as ferramentas de bioinformática foram bem sucedidas na detecção de epítomos com maior possibilidade de diferenciar anticorpos direcionados contra ZIKV em detrimento de outros Flavivírus. De mesmo modo, regiões semelhantes de DENV1-4 foram capazes de diferenciar amostras positivas de negativas, ainda que com um menor nível de sucesso quando comparadas com os resultados obtidos com o ZIKV. Adicionalmente, resultados promissores foram obtidos na diferenciação de amostras positivas para CHIKV. Quando avaliados em ensaios multiplex, com exceção de uma pequena detecção de amostras positivas para DENV por parte da proteína Δ NS1 ZIKV, as performances observadas em ELISA foram mantidas, reafirmando o potencial aplicado dos antígenos gerados. Desta forma, o presente estudo contribui para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico para detecção de respostas de anticorpos específicos contra ZIKV, DENV e CHIKV, com perspectivas de aplicações epidemiológicas em pacientes previamente infectados por esses vírus.

A utilização da proteína NS1 em testes diagnósticos foi introduzida em 2006, com a detecção antigênica para infecção aguda por DENV (PEELING et al., 2010). A proteína também foi utilizada, posteriormente, como alternativa a partículas virais na detecção de anticorpos específicos. Nesse cenário, a introdução do ZIKV como causador de SCZ gerou alerta para a necessidade de desenvolvimento de métodos sorológicos que fossem capazes de identificar especificamente vírus antigenicamente parecidos, já que foram relatados casos de falso positivos da doença durante o surto (GYURECH et al., 2016). Tal alerta levou a relatos conflitantes sobre a especificidade dos testes sorológicos de DENV baseados em NS1 (MATHEUS et al., 2016; FELIX et al., 2017). Contudo, mesmo com testes baseados na proteína NS1 ZIKV (MATHEUS et al., 2016), acredita-se que a utilização da proteína NS1 inteira leve à reatividade cruzada com amostras de soros provenientes de regiões endêmicas para DENV.

Nesse contexto, nossos resultados demonstraram que o antígeno recombinante Δ NS1, que abrange a extremidade C terminal da proteína NS1, concentre a maioria dos epítomos conformacionais da proteína e permita uma especificidade maior na detecção de anticorpos gerados durante a infecção. Tal fato é suportado pela identificação de epítomos conformacionais presentes na proteína, capazes de serem reconhecidos por linfócitos B. De fato, observamos uma reatividade maior de amostras de soro positivas para DENV com a proteína NS1 de ZIKV quando comparado aos resultados obtidos com a proteína Δ NS1. Uma possível explicação para o aumento na especificidade sorológica em ensaios baseados na Δ NS1 de ZIKV poderia estar relacionada com diferenças de cargas eletrostáticas de superfície na proteína de ZIKV em relação aos ortólogos de DENV (SONG et al., 2016). Essa possibilidade se mostra promissora frente ao fato que a conservação na sequência de aminoácidos nessa reunião se mostra superior ao encontrado em outros domínios das proteínas NS1. No entanto, estudos adicionais baseados em experimentos de mutagênese sítio-dirigida devem ser feitos para que se possa apontar resíduos de aminoácidos específicos que levam à maior especificidade da Δ NS1 em ensaios sorológicos em relação à proteína NS1 de ZIKV.

Apesar do aumento de especificidade observado em ensaios de ELISA feitos com a Δ NS1 ZIKV, a presença de indivíduos expostos frequentemente ao DENV e com altos níveis de anticorpos exigiu um artifício adicional para que alcançássemos uma maior especificidade, mesmo para amostras de soro provenientes de regiões hiper endêmicas. De fato, a elevada imunogenicidade da proteína NS1 de DENV se relaciona com mecanismos de escape imunológico do vírus durante o curso da infecção (HU et al., 2011). Como alternativa ao desenho de um novo antígeno e todas as possíveis implicações relacionadas à produção dos mesmos em conformação estável, optou-se pela técnica de pré-adsorção das amostras de soro. Essa técnica, criada na década de 1980, permite o aumento da especificidade do teste sem a redução da sensibilidade (FAWCETT; O'BRIEN; DOUGHTY, 1989). Para isso foram utilizados os antígenos Δ NS1 DENV1-4, construídos de forma semelhante à Δ NS1 ZIKV, e que, portanto, têm uma maior probabilidade de compartilhar parátomos contra anticorpos que promovem reação cruzada residual. Tal procedimento permitiu uma redução adicional da reatividade cruzada de anticorpos contra DENV com a Δ NS1 de ZIKV. Esse resultado foi confirmado por termoforese com a demonstração da remoção

de reatividade cruzada de anticorpos voltados para esses antígenos, tenham eles maior ou menor afinidade à proteína Δ NS1 de ZIKV.

Atualmente não há relatos sobre o desempenho dos testes sorológicos comercialmente disponíveis para infecções causadas pelo ZIKV em regiões endêmicas de DENV. Tais testes são baseados na proteína NS1 de DENV (HUZLY et al., 2016; MATHEUS et al., 2016). No Brasil, assim como em vários outros países tropicais, a incidência de DENV pode ultrapassar os 90% em populações específicas, como em diversas regiões do nordeste brasileiro (RODRIGUEZ-BARRAQUER et al., 2011). A descoberta de um antígeno ZIKV que aumenta a especificidade dos testes sorológicos sem reduzir a sensibilidade dos ensaios terá, portanto, um impacto significativo em estudos epidemiológicos de larga escala voltados para o estabelecimento de políticas de intervenção em saúde pública nessas áreas. Diante disso, o processo de validação do kit ELISA ZIKV foi considerado prioridade pelo grupo de pesquisa no qual a presente tese está inserida. A otimização e o escalonamento da produção e purificação do antígeno Δ NS1 ZIKV foram feitos com a aplicação da Metodologia de Superfície de Resposta (MSR), com modificações em múltiplas variáveis, como temperatura, tempo e concentração de IPTG, o que permitiu a validação das condições ótimas de produção (KANNO et al., 2020). O sucesso no desenvolvimento de um novo kit sorológico para ZIKA com desempenho superior aos kits disponíveis no mercado, incluindo aprovação pela ANVISA, representou uma conquista e um aprendizado importante. Essa trajetória também ilustra de forma clara como a pesquisa acadêmica pode ser feita em sintonia com empresas voltadas para o desenvolvimento de tecnologias na área da saúde (ver Anexo 1).

Estudos epidemiológicos baseados na validação sorológica de amostras retrospectivas são necessários para que possamos alcançar um melhor entendimento das infecções geradas por ZIKV, visto que o registro de novos surtos apresentou uma queda acentuada nos últimos anos. Nesse sentido, durante o desenvolvimento do trabalho de tese, participei de estudos, conduzidos por outros grupos de pesquisa, relacionados a características decorrentes da infecção pelo ZIKV (KAM et al., 2017; CAIRES-JÚNIOR et al., 2018). Em um desses estudos, diversos mediadores imunológicos se mostraram mais elevados em pacientes que apresentaram ou não complicações neurológicas decorrentes da infecção por ZIKV (KAM et al., 2017). Alterações foram observadas em gestantes infectadas pelo ZIKV que transportavam fetos com malformações e em bebês com deformidades congênitas (KAM et al.,

2017). O estudo também sugeriu ligações entre a presença de células do sistema imunológico e a neuro patogênese com a identificação de possíveis biomarcadores para identificação prognóstica da evolução da infecção pelo ZIKV, o que permitiria melhorar o manejo clínico e potenciais tratamentos em futuros surtos. Tais observações somente foram possíveis devido a validação sorológica de parte da amostragem do trabalho, visto que estas não apresentavam viremia detectável no momento da coleta.

Em outro estudo demonstrou-se que lesões observadas na CZS em células progenitoras neurais (NPCs) entre gêmeos dizigóticos e monozigóticos são dependentes da composição genética do indivíduo (CAIRES-JÚNIOR et al., 2018). A análise excluiu um modelo monogênico para explicar a resistência ou a suscetibilidade aumentada ao desenvolvimento de CZS e os dados mostraram que as NPCs derivadas de gêmeos não afetados e afetados pela CZS possuem assinaturas de expressão de genes de desenvolvimento neural significativamente diferentes entre si, sugerindo que a CZS possa ser um distúrbio multifatorial. Neste trabalho todos os pacientes envolvidos no estudo tiveram a confirmação do diagnóstico sorológico para ZIKV por meio do teste de ELISA descrito na presente tese de doutorado.

Adicionalmente, participei de estudos sobre a biologia do ZIKV, sua compartimentalização no organismo e tempo de permanência no corpo dos indivíduos infectados (OLIVEIRA et al., 2018). Neste estudo, conduzido em parceria com o Laboratório de Virologia Clínica e Molecular (LVCM) do ICB, foram detectadas alterações nas citocinas do ambiente genital masculino, o que, associado com a presença de partículas de ZIKV infectantes no citoplasma e flagelo de espermatozoides e em células espermáticas imaturas adicionou evidências da transmissão sexual de ZIKV. Foi também sugerida uma compartimentação independente das populações de ZIKV nos sistemas reprodutivo e urinário após avaliação de sequências consenso e variantes de nucleotídeos únicos dentro do hospedeiro. Além disso, com a coleta regular de soros sabidamente positivos para ZIKV, foram encontrados anticorpos direcionados contra o antígeno Δ NS1 ZIKV após um ano de infecção, novamente validando a capacidade de utilização do ensaio para estudo retroativos de amostras de soros em busca de anticorpos contra ZIKV.

O monitoramento sorológico de gestantes para a presença de anticorpos contra ZIKV mostra-se particularmente relevante para avaliação de riscos em futuras gestações e para a aplicação de uma possível vacina voltada para a prevenção da

doença. No presente estudo aplicamos o teste ELISA ZIKV em amostras de sangue de mulheres que deram à luz a crianças com e sem SCZ, sem conhecimento prévio do histórico de infecções, mas residentes de região endêmica para DENV. O PRNT foi utilizado como teste padrão ouro para a avaliação sorológica, mesmo sofrendo com comprovada reatividade cruzada com amostras de sangue colhidas de pessoas infectadas com diferentes flavivírus (MANSFIELD et al., 2011). No entanto, mesmo em situações como essa, o PRNT fornece informações cruciais sobre a presença de anticorpos com capacidade neutralizante contra o vírus. Existem dúvidas sobre os fatores de risco potenciais associados a danos ao desenvolvimento fetal em gestantes infectadas pelo ZIKV e a presença de anticorpos contra DENV pode ser um deles, visto que foi relatado o aumento da replicação do ZIKV tanto em condições *in vitro* como *in vivo* (DEJNIRATTISAI et al., 2016; PAUL et al., 2016). Embora o número de amostras testadas seja insuficiente para tirar conclusões gerais sobre o papel dos anticorpos contra DENV na SCZ, a disponibilidade de um teste sorológico capaz de medir especificamente a resposta de anticorpos ao ZIKV representa uma ferramenta muito útil para futuros estudos baseados em coortes maiores.

Com o desenvolvimento e aprovação do kit ELISA ZIKV finalizado pela ANVISA, esforços foram direcionados para a validação do kit ELISA DENV, já que as proteínas NS1 DENV1-4 se mostraram estáveis nas condições previamente estabelecidas. A escolha por manter apenas a diferenciação entre as infecções de DENV e ZIKV foi feita devido a inviabilidade de tempo para se realizar a tentativa de caracterização da sorotipagem de amostras de DENV dentro do presente projeto. Apesar dos valores de sensibilidade e especificidade (77,6 % e 89 %, respectivamente) serem inferiores aos atingidos pelo kit ELISA ZIKV, os valores encontrados são próximos aos kits de ELISA para a detecção de IgG contra DENV disponíveis comercialmente (RODRIGUEZ-MANZANO et al., 2018). Além disso, observações não publicadas feitas pelo nosso grupo indicam que os níveis de anticorpos direcionados contra a proteína NS1 tendem a reduzir com o passar do tempo, quando analisadas amostras coletadas de forma sequencial. Essa observação indica que uma redução na detecção de amostras positivas pode ocorrer caso a exposição ao DENV tenha acontecido há vários anos. Desta forma, como muitas amostras testadas foram colhidas de pessoas oriundas de região endêmica e sem caracterização prévia de possíveis infecções, os reais níveis de sensibilidade e especificidade apresentados

pelo kit ELISA DENV desenvolvidos pelo nosso grupo podem ser maiores do que os aqui detectados.

Mesmo sem a caracterização do momento de exposição ao DENV, a coorte analisada permitiu a validação do kit ELISA DENV. Novamente, a avaliação de amostras colhidas de gestantes após o parto se revelou importante, dada a grande proximidade do DENV ao ZIKV, bem como os sinais e sintomas neurológicos observados em infecções por DENV (TASSARA et al., 2017; ESTOFOLETE et al., 2019; KHAN; BHATTI, 2020). Tais características neurológicas do DENV nunca foram associadas à transmissão vertical do vírus, a qual já foi demonstrada ter potencial para causar complicações durante a gravidez e no período neonatal (ARRAGAIN et al., 2016). Tais desdobramentos da infecção por DENV poderão ser estudados por meio de acompanhamento de coortes pela metodologia gerada no presente estudo. Portanto, a geração de ferramentas tecnológicas se mostrou importante também pelas perspectivas de estudos científicos a serem realizados a partir da sua utilização.

Outro estudo desenvolvido por mim durante o desenvolvimento do presente projeto foi a validação de testes diagnósticos baseados em NS1, disponíveis comercialmente para DENV. Em geral, não se dispõe de testes que avaliem a reatividade cruzada frente a anticorpos ou proteínas gerados durante a infecção por esses vírus, o que pode levar à liberação de resultados falsos positivos. No estudo foram avaliados testes produzidos para a detecção da proteína NS1 DENV presente no soro de pacientes infectados, dentre os quais foi detectada reatividade cruzada contra proteínas recombinantes e produzidas *in vitro* após infecção de células imortalizadas. Os resultados foram confirmados com a análise de soros de pacientes em fase aguda para infecção por ZIKV, contendo a NS1 ZIKV em sua forma nativa (ANDREATA-SANTOS et al., 2020). Tal observação salienta a importância do estudo e do desenvolvimento de metodologias diagnósticas, assim como a necessidade de revalidação de produtos já disponibilizados comercialmente.

A terceira etapa de validação do presente projeto consistiu na exposição da proteína E2.1 a soros sabidamente positivos ou oriundos de regiões endêmicas. Apesar das diferenças clínicas entre os sintomas mais graves das infecções de CHIKV, infecções brandas não são facilmente diferenciadas das infecções por *Flavivirus* (como DENV e ZIKV) ou outros *Alphavirus*, como o MAYV (NATRAJAN; ROJAS; WAGGONER, 2019), o qual já foi reportado em infecções e em mosquitos na região Centro-Oeste do Brasil (ZUCHI et al., 2014; SERRA et al., 2016). Portanto, a

validação de novos testes de diagnóstico laboratorial é importante para a diferenciação destas doenças. Infelizmente, durante o desenvolvimento do projeto, não foi possível obter amostras contendo anticorpos contra outros *Alphavírus*, o que permitiu apenas uma caracterização parcial do ELISA CHIKV em relação à reação cruzada. Contudo, os valores de sensibilidade e especificidade obtidos com as amostras testadas foram animadores, visto que a caracterização dos testes sorológicos na plataforma de ELISA voltados para a detecção de anticorpos contra CHIKV na literatura se mostram inferiores aos testes desenvolvidos para DENV, com valores de sensibilidade variando em torno de 52 % a 88% e valores de especificidade entre 73 % a 96% (PRAT et al., 2014). Por tais motivos, o teste de PRNT ainda é considerado o padrão ouro no diagnóstico das infecções por CHIKV. Nesse sentido, a utilização da proteína E2 se mostra essencial no desenvolvimento de kits diagnóstico contra CHIKV, visto que já foi demonstrada uma maior sensibilidade da proteína E2 quando comparada com a proteína E1 (CHO et al., 2008). Assim, mesmo com a necessidade de uma nova testagem, sobretudo com uma amostragem de soros contendo anticorpos contra MAYV, o presente estudo representa uma contribuição importante para a obtenção de testes de diagnóstico nacionais que funcionem de forma igual ou superior aos testes importados disponibilizados no mercado.

Uma vez finalizadas as validações dos testes em plataforma de ELISA, deu-se início à padronização do teste utilizando as proteínas Δ NS1 ZIKV e DENV1-4 na plataforma de diagnóstico multiplex previamente descrita por pesquisadores do Instituto Pasteur (CAO-LORMEAU et al., 2016; AUBRY et al., 2017). A caracterização preliminar trouxe à tona as dificuldades previstas pelo teste padronizado na condição de ELISA, já que a região C terminal da proteína NS1 reduz drasticamente a reatividade cruzada, mas não a extingue, como ficou claro pela reatividade observada no ensaio Luminex, o qual apresenta maior sensibilidade que o ELISA. Assim, observou-se reação cruzada entre amostras DENV positivas com a proteína Δ NS1 de ZIKV, mas não no sentido contrário, já que as amostras sabidamente positivas para ZIKV testadas mostraram-se positivas apenas para ZIKV. Quando avaliadas as amostras DENV positivas frente aos antígenos DENV notou-se um fenômeno parecido com o observado para ZIKV. As amostras sabidamente positivas para DENV1 apresentaram um maior reconhecimento pela proteína Δ NS1 DENV em detrimento das demais, porém todas as amostras foram reconhecidas por todas as proteínas dos

diferentes sorotipos, impedindo assim uma detecção sorotipo específica por meio da metodologia utilizada.

A avaliação de subclasses de imunoglobulinas permitiu a observação do comportamento da resposta imunológica humoral frente à infecção por ZIKV. A presença majoritária de IgG1 específico foi previamente observada em infecções virais causadas por adenovírus (MURPHY et al., 2009) e influenza (JULKUNEN et al., 1985), mas contrastam com outras infecções virais como sarampo (TOPTYGINA; PUKHALSKY; ALIOSHKIN, 2005). Tais variações de produção de subclasses de IgG foram determinadas como únicas para cada antígeno e, em geral, não se correlacionam com a capacidade neutralizante dos anticorpos.

Como tentativa de aprimorar a detecção de anticorpos presentes em condições de infecções agudas, foi avaliada a presença de IgG3 específico, conforme demonstrado em estudo epidemiológico comparativo entre DENV e ZIKV (RODRIGUEZ-BARRAQUER et al., 2019). Classicamente, a detecção de doenças na fase aguda é feita pela presença de anticorpos IgM específicos no soro de pacientes, porém, tal detecção nem sempre é passível de ser realizada de forma específica e sensível, sendo necessários métodos de inativação e/ou depleção de IgG que acabam inviabilizando os ensaios. Nossos resultados mostraram a aplicabilidade da detecção de IgG3 em amostras de fase aguda da infecção por ZIKV. No entanto, estudos adicionais deverão ser feitos no sentido de permitir um maior acompanhamento de cada caso, com a avaliação do aumento da reatividade com o tempo após infecção, bem como a redução da mesma após 6 meses.

Foi também avaliada a possibilidade de utilização da Imunoglobulina IgA na detecção precoce da infecção. Tal avaliação mostrou-se necessária devido à sabida replicação do DENV (RODRIGUEZ-BARRAQUER et al., 2019) e do ZIKV (RODRIGUEZ-BARRAQUER et al., 2019) em mucosas do corpo, como também no leite materno (ARRAGAIN et al., 2016; CALVET et al., 2018; REGLA-NAVA et al., 2019). Até o momento nenhuma transmissão de mãe para filho por amamentação foi documentada, o que demonstra a capacidade neutralizante de tais anticorpos. No entanto, não encontramos nenhum padrão específico de detecção para fases iniciais da infecção, o que leva à possibilidade de detecção e neutralização apenas das proteínas estruturais dos vírus, ou mesmo por impedimento estérico das partículas virais. Assim, análises posteriores com diferentes antígenos são necessárias para

definir o real valor da detecção do IgA sérico como marcador de infecções contra ZIKV e DENV.

Por razões descritas no item 4.9, a validação da padronização da proteína E2.1 foi feita em momentos diferentes e com acesso à diferentes painéis de soro. Contudo, de forma semelhante ao observado na padronização do ELISA CHIKV, resultados promissores foram observados, visto que a avaliação de amostras positivas tanto para DENV quanto para ZIKV apresentou valores reduzidos, mesmo sem a normalização dos resultados frente a uma proteína humana padrão. Por outro lado, a não detecção de duas das amostras sabidamente positivas contra CHIKV pode também ter sido ocasionada pela não normalização do ensaio às condições previamente estabelecidas com as proteínas Δ NS1 ZIKV e DENV1-4. Assim, a finalização da padronização dos ensaios multiplex juntamente com a validação conjunta de todos os antígenos aqui gerados ainda é considerada uma prioridade para a continuidade desse estudo.

Outro fator importante para o aperfeiçoamento dos ensaios multiplex com os antígenos aqui descritos foi a utilização limitada desses promissores antígenos na tecnologia Luminex, algo que deverá ter continuidade em futuro próximo. Apenas dois trabalhos foram relatados com a utilização dessas regiões em ensaios multiplex, sendo um baseado na detecção dessas proteínas por meio de PCR Multiplex em mosquitos infectados (GLUSHAKOVA et al., 2019) e outro baseado na detecção de anticorpos contra arboviroses em soros coletados de macacos africanos (RAULINO et al., 2021). Outros relatos descrevem a utilização da tecnologia em amostras humanas, mas com diferentes antígenos, como os padronizados pelo Instituto Pasteur (CAO-LORMEAU et al., 2016; AUBRY et al., 2017). Contudo, a utilização dos antígenos Δ NS1 ZIKV e DENV1-4 e E2.1 poderá ser explorada de forma inovadora no campo de diagnóstico sorológico das arboviroses. Desta forma, embora parcial, a incorporação e validação desses antígenos na tecnologia Luminex abre perspectivas promissoras para novos estudos.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos na presente tese de doutorado demonstraram que foi possível obter os antígenos derivados das proteínas NS1 de DENV e ZIKV, bem como os fragmentos Δ NS1 ZIKV, Δ NS1 DENV1-4 e E2.1 CHIKV, previstos no projeto inicial. A antigenicidade, funcionalidade e imunogenicidade dos fragmentos Δ NS1 e E2.1 foram preservadas e mostraram-se compatíveis com a aplicação em ensaios sorológicos para DENV, ZIKV e CHIKV.

Os testes de ELISA ZIKV, DENV e CHIKV, quando avaliados com painéis de soro de pacientes oriundos de regiões endêmicas e comparadas com o atual teste padrão ouro para a detecção de anticorpos contra *Flavivirus* (PRNT), mostraram valores de sensibilidade e especificidade semelhantes ou superiores aos resultados obtidos com os testes atualmente disponíveis comercialmente. Como consequência, o teste ELISA ZIKV teve sua comercialização aprovada pela ANVISA e encontra-se disponível no mercado.

De modo semelhante, os antígenos produzidos se mostraram compatíveis com a plataforma Luminex. As condições ótimas de sensibilização das *beads* utilizadas pela tecnologia foram estabelecidas e as misturas de *beads* foram avaliadas frente a painéis de soros oriundos de regiões endêmicas ou não, sendo identificados desafios a serem superados para a completa padronização de um kit multiplex.

A implementação da tecnologia Luminex no LDV também pôde ser considerada um sucesso. A produção de resultados de forma independente e confiável dentro da Universidade de São Paulo significa a aquisição de mais uma metodologia a ser utilizada em projetos científicos futuros.

Diante do apresentado, permite-se afirmar que o potencial identificado nas proteínas Δ NS1 e E2.1 produzidas durante o projeto é grande, permitindo a geração de métodos sorológicos discriminatórios e, conseqüentemente, parcerias entre a academia e empresas, permitindo a disseminação do conhecimento gerado em forma de produtos que terão impacto na sociedade.

7. REFERÊNCIAS

- ALLWINN, R. et al. Cross-reactivity in flavivirus serology: new implications of an old finding? **Medical microbiology and immunology**, v. 190, n. 4, p. 199–202, mar. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12005333>>.
- AMORIM, J. H. et al. Refolded dengue virus type 2 NS1 protein expressed in *Escherichia coli* preserves structural and immunological properties of the native protein. **Journal of Virological Methods**, v. 167, n. 2, p. 186–192, ago. 2010.
- ANDREATA-SANTOS, R. et al. Specificity of NS1-based immunochromatographic tests for dengue virus with regard to the Zika virus protein. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 95, p. 276–278, jun. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1201971220302289>>.
- ARRAGAIN, L. et al. Vertical Transmission of Dengue Virus in the Peripartum Period and Viral Kinetics in Newborns and Breast Milk: New Data. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, p. piw058, 19 out. 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jpids/article-lookup/doi/10.1093/jpids/piw058>>.
- AUBRY, M. et al. Zika Virus Seroprevalence, French Polynesia, 2014–2015. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 4, p. 669–672, abr. 2017. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/23/4/16-1549_article.htm>.
- BALAMURUGAN, V. et al. Recombinant protein-based viral disease diagnostics in veterinary medicine. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 10, n. 6, p. 731–753, 9 set. 2010. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/erm.10.61>>.
- BANEYX, F.; MUJACIC, M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 11, p. 1399–1408, 4 nov. 2004. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nbt1029>>.
- BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504–7, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3651993&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
- BRASIL, P. et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro - Preliminary Report. **The New England journal of medicine**, p. [Epub ahead of print], 2016.
- BRITO-CARVALHO, A. A. V. **DESENVOLVIMENTO DE NOVAS ESTRATÉGIAS VACINAIS CONTRA O VÍRUS CHIKUNGUNYA UTILIZANDO A PROTEÍNA**

ESTRUTURAL 2 (E2). 2019. Universidade de São Paulo, 2019.

CAIRES-JÚNIOR, L. C. et al. Discordant congenital Zika syndrome twins show differential in vitro viral susceptibility of neural progenitor cells. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 475, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29396410>>.

CALVET, G. A. et al. Study on the persistence of Zika virus (ZIKV) in body fluids of patients with ZIKV infection in Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 49, 22 dez. 2018. Disponível em: <<https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-018-2965-4>>.

CAO-LORMEAU, V.-M. et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. **The Lancet**, v. 387, n. 10027, p. 1531–1539, abr. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673616005626>>.

CDC. Guidance for U.S. Laboratories Testing for Zika Virus Infection. <http://www.cdc.gov/zika/laboratories/lab-guidance.html>, v. November, p. 1–12, 2016.

CHAVES-CARBALLO, E. Carlos Finlay and yellow fever: triumph over adversity. **Military Medicine**, v. 170, n. September 2004, p. 881–885, 2005.

CHO, B. et al. Expression and Evaluation of Chikungunya Virus E1 and E2 Envelope Proteins for Serodiagnosis of Chikungunya Virus Infection. **Yonsei Medical Journal**, v. 49, n. 5, p. 828, 2008. Disponível em: <<https://eymj.org/DOIx.php?id=10.3349/ymj.2008.49.5.828>>.

CONSTENLA, D.; GARCIA, C.; LEFCOURT, N. Assessing the Economics of Dengue: Results from a Systematic Review of the Literature and Expert Survey. **PharmacoEconomics**, 6 jun. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26048354>>. Acesso em: 19 jun. 2015.

CUZZUBBO, A. J. et al. Use of Recombinant Envelope Proteins for Serological Diagnosis of Dengue Virus Infection in an Immunochromatographic Assay. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 8, n. 6, p. 1150–1155, 1 nov. 2001. Disponível em: <<http://cvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/CDLI.8.6.1150-1155.2001>>.

DE FIGUEIREDO, M. L. G.; FIGUEIREDO, L. T. M. Emerging alphaviruses in the americas: Chikungunya and mayaro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 6, p. 677–683, 2014.

DEJNIRATTISAI, W. et al. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-

- dependent enhancement of infection with zika virus. **Nature Immunology**, v. 17, n. 9, p. 1102–1108, 23 set. 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/ni.3515>>.
- DELONG, E. R.; DELONG, D. M.; CLARKE-PEARSON, D. L. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. **Biometrics**, v. 44, n. 3, p. 837–45, set. 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3203132>>.
- DICK, G. W. .; KITCHEN, S. .; HADDOW, A. . Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509–520, set. 1952. Disponível em: <[http://trstmh.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1016/0035-9203\(52\)90042-4](http://trstmh.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1016/0035-9203(52)90042-4)>.
- DRIGGERS, R. W. et al. Zika Virus Infection with Prolonged Maternal Viremia and Fetal Brain Abnormalities. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 22, p. 2142–2151, 2016. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1601824>>.
- DUFFY, M. R. et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536–2543, jun. 2009.
- ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, v. 8, n. 9, p. 871–874, set. 1971. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/001927917190454X>>.
- ESTOFOLETE, C. F. et al. Unusual clinical manifestations of dengue disease – Real or imagined? **Acta Tropica**, v. 199, p. 105134, nov. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X19305911>>.
- FAVORETTO, S. et al. **First detection of Zika virus in neotropical primates in Brazil: a possible new reservoir.** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/049395>>.
- FAWCETT, P. T.; O'BRIEN, A. E.; DOUGHTY, R. A. An adsorption procedure to increase the specificity of enzyme-linked immunosorbent assays for lyme disease without decreasing sensitivity. **Arthritis & Rheumatism**, v. 32, n. 8, p. 1041–1044, ago. 1989. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/anr.1780320814>>.
- FAYE, O. et al. Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. 36, 2014.
- FELIX, A. C. et al. Cross reactivity of commercial anti-dengue immunoassays in patients with acute Zika virus infection. **Journal of Medical Virology**, v. 89, n. 8, p.

- 1477–1479, ago. 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jmv.24789>>.
- FERNANDEZ-GARCIA, M. D. et al. Pathogenesis of Flavivirus Infections: Using and Abusing the Host Cell. **Cell Host and Microbe**, v. 5, n. 4, p. 318–328, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2009.04.001>>.
- GLUSHAKOVA, L. G. et al. Multiplexed kit based on Luminex technology and achievements in synthetic biology discriminates Zika, chikungunya, and dengue viruses in mosquitoes. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 418, 14 dez. 2019. Disponível em: <<https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-019-3998-z>>.
- GYURECH, D. et al. False positive dengue NS1 antigen test in a traveller with an acute Zika virus infection imported into Switzerland. **Swiss Medical Weekly**, 9 fev. 2016. Disponível em: <<http://doi.emh.ch/smw.2016.14296>>.
- HALSTEAD, S. B.; ROJANASUPHOT, S.; SANGKAWIBHA, N. Original antigenic sin in dengue. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 32, n. 1, p. 154–6, jan. 1983. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/824120>>.
- HAMEL, R. et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. **Journal of virology**, v. 89, n. 17, p. JVI.00354-15-, 2015.
- HANLEY, K. A. et al. Infection Dynamics of Sylvatic Dengue Virus in a Natural Primate Host, the African Green Monkey. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, n. 4, p. 672–676, 1 out. 2014. Disponível em: <<http://www.ajtmh.org/cgi/doi/10.4269/ajtmh.13-0492>>.
- HASTE ANDERSEN, P.; NIELSEN, M.; LUND, O. Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein 3D structures. **Protein Science**, v. 15, n. 11, p. 2558–2567, nov. 2006. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1110/ps.062405906>>.
- HENNESSEY, M.; FISCHER, M.; STAPLES, J. E. Zika Virus Spreads to New Areas - Region of the Americas, May 2015-January 2016. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 65, n. 3, p. 55–8, 2016.
- HU, D. et al. Kinetics of non-structural protein 1, IgM and IgG antibodies in dengue type 1 primary infection. **Virology Journal**, v. 8, n. 1, p. 47, 2011. Disponível em: <<http://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-8-47>>.
- HUZLY, D. et al. High specificity of a novel Zika virus ELISA in European patients after exposure to different flaviviruses. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 16, p. 30203, 21 abr. 2016. Disponível em:

<<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=21450>>.

IOOS, S. et al. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. **Médecine et maladies infectieuses**, v. 44, n. 7, p. 302–7, jul. 2014.

JULKUNEN, I. et al. Immunoglobulin G subclass antibody responses in influenza A and parainfluenza type 1 virus infections. **Clinical and experimental immunology**, v. 60, n. 1, p. 130–8, abr. 1985. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2988830>>.

KAM, Y.-W. et al. Specific Biomarkers Associated With Neurological Complications and Congenital Central Nervous System Abnormalities From Zika Virus-Infected Patients in Brazil. **The Journal of infectious diseases**, v. 216, n. 2, p. 172–181, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28838147>>.

KANNO, A. I. et al. Optimization and scale-up production of Zika virus Δ NS1 in *Escherichia coli*: application of Response Surface Methodology. **AMB Express**, v. 10, n. 1, p. 1, 31 dez. 2020. Disponível em: <<https://amb-express.springeropen.com/articles/10.1186/s13568-019-0926-y>>.

KHAN, A. H. et al. Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. **Journal of General Virology**, v. 83, n. 12, p. 3075–3084, 2002.

KHAN, N.; BHATTI, J. M. A Case Report on Dengue Encephalitis With Optic Neuropathy. **Cureus**, 6 ago. 2020. Disponível em: <<https://www.cureus.com/articles/32960-a-case-report-on-dengue-encephalitis-with-optic-neuropathy>>.

KRIEGER, E.; VRIEND, G. YASARA View—molecular graphics for all devices—from smartphones to workstations. **Bioinformatics**, v. 30, n. 20, p. 2981–2982, 15 out. 2014. Disponível em: <<https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/btu426>>.

LANCIOTTI, R. S. et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1232–1239, 2008.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. **Fields Virology**, p. 1101–1151, 2007.

LUM, F. M.; NG, L. F. P. Cellular and molecular mechanisms of chikungunya pathogenesis. **Antiviral Research**, v. 120, p. 165–174, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.06.009>>.

- MAGNARELLI, L. A. et al. ANTIBODIES TO BORRELIA BURGDORFERI IN DEER AND RACCOONS. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 27, n. 4, p. 562–568, out. 1991. Disponível em: <<http://www.jwildlifedis.org/doi/10.7589/0090-3558-27.4.562>>.
- MANSFIELD, K. L. et al. Flavivirus-induced antibody cross-reactivity. **Journal of General Virology**, v. 92, n. 12, p. 2821–2829, 1 dez. 2011. Disponível em: <<http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.031641-0>>.
- MARRERO-SANTOS, K. M. et al. Optimization of the Cutoff Value for a Commercial Anti-Dengue Virus IgG Immunoassay. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 20, n. 3, p. 358–362, mar. 2013. Disponível em: <<https://cvi.asm.org/content/20/3/358>>.
- MARTINA, B. E. E.; KORAKA, P.; OSTERHAUS, A. D. M. E. Dengue virus pathogenesis: An integrated view. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 4, p. 564–581, 2009.
- MATHEUS, S. et al. Specificity of Dengue NS1 Antigen in Differential Diagnosis of Dengue and Zika Virus Infection. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 9, p. 1691–1693, set. 2016. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/22/9/16-0725_article.htm>.
- MENDOZA, E. J. et al. Combining anti-IgM and IgG immunoassays for comprehensive chikungunya virus diagnostic testing. **Zoonoses and Public Health**, v. 66, n. 8, p. 909–917, 26 dez. 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/zph.12641>>.
- MOORE, D. L. et al. Arthropod-borne viral infections of man in Nigeria, 1964-1970. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 69, n. 1, p. 49–64, mar. 1975.
- MULLER, D. A.; YOUNG, P. R. The flavivirus NS1 protein: Molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. **Antiviral Research**, v. 98, n. 2, p. 192–208, maio 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166354213000624>>.
- MURPHY, S. L. et al. Diverse IgG subclass responses to adeno-associated virus infection and vector administration. **Journal of Medical Virology**, v. 81, n. 1, p. 65–74, jan. 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jmv.21360>>.
- NATRAJAN, M. S.; ROJAS, A.; WAGGONER, J. J. Beyond Fever and Pain: Diagnostic Methods for Chikungunya Virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57, n. 6, 24 maio 2019. Disponível em: <<https://jcm.asm.org/content/57/6/e00350-19>>.
- NICASTRI, E. et al. Persistent detection of Zika virus RNA in semen for six months after symptom onset in a traveller returning from Haiti to Italy, February 2016.

- Eurosurveillance**, v. 21, n. 32, p. 30314, 11 ago. 2016. Disponível em: <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=22554>>.
- NOURELDIN, M. S.; EL-SHINNAWY, H.; ABOU ELENIN, A. Serum pretreatment with *Schistosoma mansoni* antigens for serological diagnosis of fascioliasis. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v. 30, n. 1, p. 157–68, abr. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10786027>>.
- OLIVEIRA, D. et al. Persistence and Intra-Host Genetic Evolution of Zika Virus Infection in Symptomatic Adults: A Special View in the Male Reproductive System. **Viruses**, v. 10, n. 11, p. 615, 7 nov. 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1999-4915/10/11/615>>.
- OLIVEIRA, D. B. L. et al. Prolonged Shedding of Zika Virus Associated with Congenital Infection. **The New England journal of medicine**, v. 375, n. 12, p. 1202–4, 22 set. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27653589>>.
- OSUNA, C. E. et al. Zika viral dynamics and shedding in rhesus and cynomolgus macaques. **Nature Medicine**, 3 out. 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nm.4206>>.
- PAPA, A.; KARABAXOGLU, D.; KANSOUZIDOU, A. Acute West Nile virus neuroinvasive infections: Cross-reactivity with dengue virus and tick-borne encephalitis virus. **Journal of Medical Virology**, v. 83, n. 10, p. 1861–1865, out. 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jmv.22180>>.
- PARKER, J. M. R.; GUO, D.; HODGES, R. S. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and x-ray-derived accessible sites. **Biochemistry**, v. 25, n. 19, p. 5425–5432, 23 set. 1986. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00367a013>>.
- PAUL, L. M. et al. Dengue virus antibodies enhance Zika virus infection. **Clinical & Translational Immunology**, v. 5, n. 12, p. e117, 16 dez. 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1038/cti.2016.72>>.
- PEELING, R. W. et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 12supp, p. S30–S37, dez. 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrmicro2459>>.
- PRAT, C. M. et al. Evaluation of Commercially Available Serologic Diagnostic Tests for Chikungunya Virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 12, p. 2129–2132, dez. 2014. Disponível em: <<http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/20/12/14->

1269_article.htm>.

PRIYAMVADA, L. et al. Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 28, p. 7852–7857, 12 jul. 2016. Disponível em: <<http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1607931113>>.

RAULINO, R. et al. Multiplex detection of antibodies to Chikungunya, O'nyong-nyong, Zika, Dengue, West Nile and Usutu viruses in diverse non-human primate species from Cameroon and the Democratic Republic of Congo. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 1, p. e0009028, 21 jan. 2021. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0009028>>.

REGLA-NAVA, J. A. et al. Detection of Zika virus in mouse mammary gland and breast milk. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 2, p. e0007080, 11 fev. 2019. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0007080>>.

RODRIGUEZ-BARRAQUER, I. et al. From Re-Emergence to Hyperendemicity: The Natural History of the Dengue Epidemic in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 1, p. e935, 4 jan. 2011. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0000935>>.

RODRIGUEZ-BARRAQUER, I. et al. Impact of preexisting dengue immunity on Zika virus emergence in a dengue endemic region. **Science**, v. 363, n. 6427, p. 607–610, 8 fev. 2019. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aav6618>>.

RODRIGUEZ-MANZANO, J. et al. Improving Dengue Diagnostics and Management Through Innovative Technology. **Current Infectious Disease Reports**, v. 20, n. 8, p. 25, 7 ago. 2018. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11908-018-0633-x>>.

SAHDEV, S.; KHATTAR, S. K.; SAINI, K. S. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 307, n. 1–2, p. 249–264, 29 nov. 2007. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11010-007-9603-6>>.

SAMBROOK, J.; W RUSSELL, D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY**, p. 999, 2001.

SERRA, O. P. et al. Mayaro virus and dengue virus 1 and 4 natural infection in culicids from Cuiabá, state of Mato Grosso, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 1, p. 20–29, jan. 2016. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762016000100020&lng=en&tlng=en>.

SONG, H. et al. Zika virus NS1 structure reveals diversity of electrostatic surfaces among flaviviruses. **Nature structural & molecular biology**, v. 23, n. 5, p. 1–4, 2016.

Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/pj.2016.37%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27088990>>.

STAHL, H.-C. et al. Cost of dengue outbreaks: literature review and country case studies. **BMC public health**, v. 13, n. 1, p. 1048, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24195519>>.

TASSARA, M. P. et al. Neurological manifestations of dengue in Central Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 3, p. 379–382, jun. 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822017000300379&lng=en&tlng=en>.

TOGNARELLI, J. et al. A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. **Archives of Virology**, v. 161, n. 3, p. 665–668, 2016.

TOPTYGINA, A. P.; PUKHALSKY, A. L.; ALIOSHKIN, V. A. Immunoglobulin G Subclass Profile of Antimeasles Response in Vaccinated Children and in Adults with Measles History. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 12, n. 7, p. 845–847, 1 jul. 2005. Disponível em: <<http://cvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/CDLI.12.7.845-847.2005>>.

TSETSARKIN, K. A. et al. A single mutation in Chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 12, p. 1895–1906, 2007.

TSETSARKIN, K.; CHEN, R. Chikungunya virus: evolution and genetic determinants of emergence. **Current opinion in ...**, v. 1, n. 4, p. 310–317, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1879625711000551>>.

VASILAKIS, N. et al. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 7, p. 532–541, 13 jun. 2011. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro2595>>.

WEAVER, S. C.; LECUIT, M. Chikungunya Virus and the Global Spread of a Mosquito-Borne Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 13, p. 1231–1239, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Situation Report - Zika Virus, Microcephaly, Guillain-Barré Syndrome 10 November 2016** Delta. [s.l: s.n.].

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Number of reported cases of chikungunya fever in the Americas , by country or territory 2016 (to week noted) Cumulative cases Epidemiological Week / EW 45 (Updated 11 November 2016)Pan American Health Organization.** [s.l: s.n.].

ZHANG, B. et al. Diagnosing dengue virus infection: rapid tests and the role of micro/nanotechnologies. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 11, n. 7, p. 1745–1761, out. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1549963415001240>>.

ZUCHI, N. et al. Molecular detection of Mayaro virus during a dengue outbreak in the state of Mato Grosso, Central-West Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 6, p. 820–823, 19 ago. 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762014000600820&lng=en&tlng=en>.

8. ANEXOS

8.1. Anexo 1: Aprovação do kit ELISA ZIKV pela ANVISA

Consultas / Produtos para Saúde / Produtos para Saúde

Detalhes do Produto			
Nome da Empresa	ADVAGEN BIOTECH LTDA		
CNPJ	22.565.307/0001-72	Autorização	8.14.720-6
Produto	ZIKA-v IgG		

Apresentação/Modelo
COD: ZVE/192
COD: ZVE/480
COD: ZVE/96
COD: ZVE/960

Nome Técnico	ZIKA
Registro	81472060013
Processo	25351.706085/2018-11
Origem do Produto	<ul style="list-style-type: none"> FABRICANTE: ADVAGEN BIOTECH LTDA - BRASIL
Classificação de Risco	III - Classe III: produtos de alto risco ao indivíduo e ou médio risco à saúde pública
Vencimento do Registro	03/06/2029

8.2. Anexo 2: Publicação com primeira autoria compartilhada



Article

Persistence and Intra-Host Genetic Evolution of Zika Virus Infection in Symptomatic Adults: A Special View in the Male Reproductive System

Danielle B. L. Oliveira ^{1,†}, Giuliana S. Durigon ^{2,‡}, Érica A. Mendes ^{1,†}, Jason T. Ladner ^{3,4,†}, Robert Andreata-Santos ^{1,†}, Danielle B. Araujo ¹, Viviane E. Botosso ⁵, Nicholas D. Paola ¹, Daniel E. L. Neto ¹, Marielton P. Cunha ¹, Carla T. Braconi ¹, Rúbens P. S. Alves ¹, Monica R. Jesus ¹, Lennon R. Pereira ¹, Stella R. Melo ¹, Flávio S. Mesquita ¹, Vanessa B. Silveira ¹, Luciano M. Thomazelli ¹, Silvana R. Favoretto ⁶, Franciane B. Almonfrey ², Regina C. R. M. Abdulkader ², Joel M. Gabrili ^{5,7}, Denise V. Tambourgi ⁵, Sérgio F. Oliveira ⁸, Karla Prieto ^{3,9}, Michael R. Wiley ^{3,9}, Luís C. S. Ferreira ¹, Marcos V. Silva ¹⁰, Gustavo E. Palacios ^{3,‡}, Paolo M. A. Zanotto ^{1,‡} and Edison L. Durigon ^{1,*}

¹ Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP 05508-000, Brazil; danibruna@gmail.com (D.B.L.O.); ericaarmendes@gmail.com (E.A.M.); robert_andreata@hotmail.com (R.A.-S.); daniellebastos@yahoo.com.br (D.B.A.); nicholasdipaola@gmail.com (N.D.P.); danielviro@gmail.com (D.F.L.N.); marieltondospassos@gmail.com (M.P.C.); cabraconi@gmail.com (C.T.B.); rubens.bmc@gmail.com (R.P.S.A.); modrigues4@gmail.com (M.R.J.); lennon_rp@hotmail.com (L.R.P.); stellmelo@gmail.com (S.R.M.); flavio.mesquita@usp.br (F.S.M.); vanessa.silveirabio@gmail.com (V.B.S.); lucnt@usp.br (L.M.T.); lcsf@usp.br (L.C.S.F.); pzanotto@usp.br (P.M.A.Z.)

² Medical School Clinic Hospital, University of São Paulo, São Paulo, SP 05403-000, Brazil; giuliana.durigon@gmail.com (G.S.D.); fran_almonfrey@hotmail.com (F.B.A.); kader@usp.br (R.C.R.M.A.)

³ Center for Genome Sciences, US Army Medical Research Institute of Infectious Diseases, Frederick, MD 21702, USA; jladner@gmail.com (J.T.L.); karla.prieto.ctr@mail.mil (K.P.); michael.r.wiley19.ctr@mail.mil (M.R.W.); gustavo.f.palacios.ctr@mail.mil (G.F.P.)

⁴ The Pathogen and Microbiome Institute, Northern Arizona University, Flagstaff, AZ 86011-4073, USA

⁵ Virology Laboratory, Butantan Institute, São Paulo, SP 05503-900, Brazil; viviane.botosso@butantan.gov.br (V.E.B.); joel.megalegabril@gmail.com (J.M.G.); denise.tambourgi@butantan.gov.br (D.V.T.)

⁶ Pasteur Institute, State Health Department, São Paulo, SP 1103-000, Brazil; srfavoretto@usp.br

⁷ Immunochemistry Laboratory, Butantan Institute, São Paulo, SP 05503-900, Brazil

⁸ Department of Cellular and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP 05508-000, Brazil; sfolivei@gmail.com

⁹ Department of Environmental, Agricultural and Occupational Health, University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE 68198-4388, USA

¹⁰ Institute of Infectology Emílio Ribas e Pontifícia Universidade Católica (PUC-SP), São Paulo, SP 01246-900, Brazil; mvsilva@pucsp.br

* Correspondence: eldurigo@usp.br

† These authors contributed equally for the paper.

‡ These authors contributed equally for the paper.

Received: 22 August 2018; Accepted: 20 October 2018; Published: 7 November 2018



Abstract: We followed the presence of Zika virus (ZIKV) in four healthy adults (two men and two women), for periods ranging from 78 to 298 days post symptom onset. The patients were evaluated regarding the presence of the virus in different body fluids (blood, saliva, urine and semen), development of immune responses (including antibodies, cytokines and chemokines), and virus genetic variation within samples collected from semen and urine during the infection course. The analysis was focused primarily on the two male patients who shed the virus for up to 158 days after the initial symptoms. ZIKV particles were detected in the spermatozoa cytoplasm and

8.3. Anexo 3: Publicação com primeira autoria

International Journal of Infectious Diseases 95 (2020) 276–278



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Infectious Diseases

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

Short communication

Specificity of NS1-based immunochromatographic tests for dengue virus with regard to the Zika virus protein

Robert Andreato-Santos^{a,1}, Samuel Santos Pereira^{a,1}, Lennon Ramos Pereira^a, Alvina Clara Félix^b, Camila Malta Romano^{b,c}, Luís Carlos de Souza Ferreira^{a,*}^a Vaccine Development Laboratory, Microbiology Department, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil^b Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil^c Hospital das Clínicas HCFMUSP (LIM 52), Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 February 2020

Received in revised form 2 April 2020

Accepted 4 April 2020

Keywords:

Immunochromatographic tests

NS1 protein

Dengue

Zika

Cross-reactivity

ABSTRACT

Objectives: This study was performed to determine whether Dengue virus (DENV) immunochromatographic tests can detect and differentiate nonstructural protein 1 (NS1) from each of the four DENV serotypes and do not cross-react with the Zika virus (ZIKV) NS1 protein.

Methods: We compared the specificity of six NS1-based DENV immunochromatographic tests (point of care) in the detection of NS1 proteins from each of the four DENV serotypes and ZIKV. The tests were performed with NS1 proteins produced in mammalian cells. Cross-reactivity was confirmed with a purified recombinant ZIKV NS1 protein and DENV⁺ or ZIKV⁺ human serum samples.

Results: Cross-reaction was observed in 2 out of the 6 evaluated tests using cell culture supernatants containing NS1 protein of each tested virus. Cross-reactivity with ZIKV was confirmed with purified recombinant ZIKV NS1 produced in *Escherichia coli*. Further analyses with serum samples collected from DENV⁺ or ZIKV⁺ patients confirmed the cross-reactivity with ZIKV protein in 2 tests.

Conclusions: The detection of the NS1 protein is the basis for several commercially available serological DENV diagnostic tests. The present results emphasize the relevance of testing specificity of presently available NS1-based DENV serological tests and the need of adjustments of tests that cross-react with the ZIKV protein. Our results are particularly relevant for regions where both viruses are endemically found, as in the case of Brazil.

© 2020 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of International Society for Infectious Diseases. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Dengue virus (DENV) is one of the most epidemiologically relevant arboviruses transmitted to humans. This virus has a wide distribution, with an estimated number of 3.9 billion people at risk of infection in 128 countries and approximately 500,000 cases with more severe forms of the disease (World Health Organization (WHO); Bhatt et al., 2013). The clinical symptoms of this infection are easily confused with symptoms induced by other arboviruses. Thus, the use of specific laboratory tests is essential for the correct diagnosis and patient management, especially in endemic regions for these arboviruses.

The detection of the nonstructural protein 1 (NS1) is the basis of several commercially available DENV serological tests (Cuz-zubbo et al., 2001). Since the NS1 protein is released by infected cells and accumulates in the blood of DENV-positive patients, it is used as a marker of acute infection and can be detected by immunochromatographic tests. However, with the recent spread of Zika virus (ZIKV) in the world, the specificity of these tests may be compromised by the extensive shared similarities between these viruses, consequently, increasing the risks of false-positive results in areas where both viruses circulate (Muller and Young, 2013; Gyurech et al., 2016; Matheus et al., 2016). Thus, in the present study, we compared the specificities of 6 different commercial DENV immunochromatographic tests (5 are widely available in the Brazilian market, whereas 1 is available in other countries). The tests were performed with NS1 proteins expressed by the 4 DENV serotypes and ZIKV using culture supernatants of infected cells, recombinant proteins

* Corresponding author.

E-mail address: lcsf@usp.br (L.C.d.S. Ferreira).¹ These authors contributed equally for this paper.<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.04.012>

1201-9712/© 2020 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of International Society for Infectious Diseases. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

8.4. Anexo 4: Publicação com primeira autoria



Article

Transcutaneous Administration of Dengue Vaccines

Robert Andreato-Santos ¹ , Rúbens Prince dos Santos Alves ¹, Sara Araujo Pereira ¹, Lennon Ramos Pereira ¹, Carla Longo de Freitas ¹, Samuel Santos Pereira ¹, Alexia Adrienne Venceslau-Carvalho ¹, Maria Fernanda Castro-Amarante ¹ , Marianna Teixeira Pinho Favaro ¹, Camila Mathias-Santos ¹, Jaime Henrique Amorim ² and Luís Carlos de Souza Ferreira ^{1,*} 

¹ Vaccine Development Laboratory, Microbiology Department, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo 05508-000, Brazil; robert_andreato@hotmail.com (R.A.-S.); rubens.bmc@gmail.com (R.P.d.S.A.); araujopereirasara@gmail.com (S.A.P.); lennon_rp@hotmail.com (L.R.P.); carla.longofreitas@gmail.com (C.L.d.F.); samuelbiomedicina@usp.br (S.S.P.); alexia_myt@hotmail.com (A.A.V.-C.); mfarante@gmail.com (M.F.C.-A.); favaro.mtp@gmail.com (M.T.P.F.); camilamathias@gmail.com (C.M.-S.)

² Center for Biological and Health Sciences, Federal University of Western Bahia, Bahia 47810-047, Brazil; jaime.henrique.amorim@gmail.com

* Correspondence: lcsf@usp.br; Tel: +55-11-3091-7356

Received: 3 February 2020; Accepted: 3 April 2020; Published: 6 May 2020



Abstract: In the present study, we evaluated the immunological responses induced by dengue vaccines under experimental conditions after delivery via a transcutaneous (TC) route. Vaccines against type 2 Dengue virus particles (DENV2 New Guinea C (NGC) strain) combined with enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) heat-labile toxin (LT) were administered to BALB/c mice in a three-dose immunization regimen via the TC route. As a control for the parenteral administration route, other mouse groups were immunized with the same vaccine formulation via the intradermic (ID) route. Our results showed that mice vaccinated either via the TC or ID routes developed similar protective immunity, as measured after lethal challenges with the DENV2 NGC strain. Notably, the vaccine delivered through the TC route induced lower serum antibody (IgG) responses with regard to ID-immunized mice, particularly after the third dose. The protective immunity elicited in TC-immunized mice was attributed to different antigen-specific antibody properties, such as epitope specificity and IgG subclass responses, and cellular immune responses, as determined by cytokine secretion profiles. Altogether, the results of the present study demonstrate the immunogenicity and protective properties of a dengue vaccine delivered through the TC route and offer perspectives for future clinical applications.

Keywords: transcutaneous immunization; dengue vaccines; heat-labile toxin; adjuvant; intradermic immunization

1. Introduction

Infection with one of the four Dengue virus serotypes (DENV1-4) may cause a spectrum of diseases ranging from an acute, self-limiting febrile illness (DF) characterized mainly by fever, retro-orbital headache, rash, arthralgia, and to more severe, life-threatening, conditions that may include hemorrhagic manifestations, increased vascular permeability, thrombocytopenia, and shock [1–3]. In fact, it is estimated that 3.9 billion people in 128 countries are at risk of infection [2,4]. DENV causes approximately 390 million infections, of which 500,000 cases develop into severe forms, making DENV infection one of the most economically and epidemiologically relevant arthropod-borne diseases

8.5. Anexo 5: Publicação como coautor



ARTICLE

DOI: [10.1038/s41467-017-02790-9](https://doi.org/10.1038/s41467-017-02790-9)

OPEN

Discordant congenital Zika syndrome twins show differential in vitro viral susceptibility of neural progenitor cells

Luiz Carlos Caires-Júnior *et al.*[#]

Congenital Zika syndrome (CZS) causes early brain development impairment by affecting neural progenitor cells (NPCs). Here, we analyze NPCs from three pairs of dizygotic twins discordant for CZS. We compare by RNA-Seq the NPCs derived from CZS-affected and CZS-unaffected twins. Prior to Zika virus (ZIKV) infection the NPCs from CZS babies show a significantly different gene expression signature of mTOR and Wnt pathway regulators, key to a neurodevelopmental program. Following ZIKV in vitro infection, cells from affected individuals have significantly higher ZIKV replication and reduced cell growth. Whole-exome analysis in 18 affected CZS babies as compared to 5 unaffected twins and 609 controls excludes a monogenic model to explain resistance or increased susceptibility to CZS development. Overall, our results indicate that CZS is not a stochastic event and depends on NPC intrinsic susceptibility, possibly related to oligogenic and/or epigenetic mechanisms.

Correspondence and requests for materials should be addressed to M.Z. (email: mazozta@usp.br)
#A full list of authors and their affiliations appears at the end of the paper

8.6. Anexo 6: Publicação como coautor

The Journal of Infectious Diseases

MAJOR ARTICLE



Specific Biomarkers Associated With Neurological Complications and Congenital Central Nervous System Abnormalities From Zika Virus–Infected Patients in Brazil

Yiu-Wing Kam,^{1,4} Juliana Almeida Leite,^{2,4} Fok-Moon Lum,¹ Jeslin J. L. Tan,¹ Bernett Lee,¹ Carla C. Judice,² Daniel Augusto de Toledo Teixeira,² Robert Andreato-Santos,³ Marco A. Vinolo,³ Rodrigo Angerami,⁴ Mariangela Ribeiro Resende,⁵ Andre Ricardo Ribas Freitas,⁶ Eliana Amaral,⁷ Renato Passini Junior,⁷ Maria Laura Costa,⁷ José Paulo Guida,⁷ Clarice Weis Arns,² Luis Carlos S. Ferreira,³ Laurent Rénia,¹ Jose Luiz Proença-Modena,² Lisa F. P. Ng,^{1,8,9} and Fabio T. M. Costa^{2,4}; The Zika-Unicamp Network^c

¹Singapore Immunology Network, Agency for Science, Technology and Research (A*STAR); ²Department of Genetics, Evolution and Bioagents, Institute of Biology, University of Campinas (Unicamp), São Paulo; ³Biomedical Science Institute, Department of Microbiology, University of São Paulo; ⁴Epidemiological Surveillance Section, Hospital of Clinics, Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, Unicamp, Campinas, São Paulo; ⁵Obstetrics and Gynecology Department, School of Medical Sciences, University of Campinas (Unicamp); and ⁶Campinas Department of Public Health Surveillance, Brazil; and ⁷Institute of Infection and Global Health, University of Liverpool, United Kingdom

Background. Zika virus (ZIKV) infections have been linked to different levels of clinical outcomes, ranging from mild rash and fever to severe neurological complications and congenital malformations.

Methods. We investigated the clinical and immunological response, focusing on the immune mediators profile in 95 acute ZIKV-infected adult patients from Campinas, Brazil. These patients included 6 pregnant women who later delivered during the course of this study. Clinical observations were recorded during hospitalization. Levels of 45 immune mediators were quantified using multiplex microbead-based immunoassays.

Results. Whereas 11.6% of patients had neurological complications, 88.4% displayed mild disease of rash and fever. Several immune mediators were specifically higher in ZIKV-infected patients, and levels of interleukin 10, interferon gamma-induced protein 10 (IP-10), and hepatocyte growth factor differentiated between patients with or without neurological complications. Interestingly, higher levels of interleukin 22, monocyte chemoattractant protein 1, TNF- α , and IP-10 were observed in ZIKV-infected pregnant women carrying fetuses with fetal growth-associated malformations. Notably, infants with congenital central nervous system deformities had significantly higher levels of interleukin 18 and IP-10 but lower levels of hepatocyte growth factor than those without such abnormalities born to ZIKV-infected mothers.

Conclusions. This study identified several key markers for the control of ZIKV pathogenesis. This will allow a better understanding of the molecular mechanisms of ZIKV infection in patients.

Keywords. Zika virus; congenital CNS deformities; cytokines and biomarkers.

Zika virus (ZIKV) has reemerged as an important flavivirus that has caused several Zika fever epidemics in various parts of the world. ZIKV was first isolated in 1947 [1] and is typically transmitted by *Aedes* mosquitoes. Since 2007, of 76 countries and territories that have reported evidence of mosquito-borne ZIKV local transmission, 29 countries have reported congenital anomalies, such as microcephaly, possibly associated with

ZIKV infection [2–6]. Most patients remain asymptomatic or suffer from mild symptoms that normally last 2–7 days. Symptoms include fever, arthritis/arthralgia, rash, conjunctivitis, joint pain, and headache [7]. However, there is now evidence of ZIKV with Guillain-Barré syndrome and congenital central nervous system (CNS) abnormalities [8–13]. Therefore, ZIKV infection represents a major public health concern with severe social and economic burden owing to a lack of commercial vaccines or effective antiviral treatments. Treatment is usually symptomatic and pain-relief medicine is the only available option during disease onset. Brazil, hit by the ZIKV epidemics since 2014, accounted >200 000 probable cases of ZIKV infection, with almost 2000 cases of microcephaly in 2015–2016.

Because the mode of transmission of ZIKV and the clinical symptoms caused by ZIKV infection are highly similar to those in multiple arboviruses, including dengue virus (DENV), specific biomarker profiles will be useful for disease prognosis. Based on the current knowledge, DENV and ZIKV are largely similar, but dissimilarities between the 2 viruses (eg, the distinct pattern of E protein glycosylation sites) may have potential effects on viral

Received 19 April 2017; editorial decision 24 May 2017; accepted 26 May 2017; published online May 30, 2017.

*Y. W. K. and J. A. L. contributed equally to this work.

[†]L. F. P. N. and F. T. M. C. contributed equally to this work.

[‡]Members of the Zika-Unicamp Network are listed in the Acknowledgments.

Correspondence: L. F. P. Ng, BSc (Hons), PhD, Laboratory of Microbial Immunity, Singapore Immunology Network, A*STAR, BA Biomedical Grove, 04-06 Immunos, Biopolis, Singapore 139608 (lisa_ng@immunol.a-star.edu.sg).

The Journal of Infectious Diseases® 2017;216:172–81

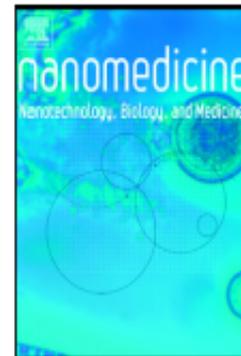
© The Author 2017. Published by Oxford University Press for the Infectious Diseases Society of America. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs licence (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits non-commercial reproduction and distribution of the work, in any medium, provided the original work is not altered or transformed in any way, and that the work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com. DOI: 10.1093/infdis/jix261

8.7. Anexo 7: Publicação como coautor

Journal Pre-proof

Nanovaccine based on self-assembling nonstructural protein 1 boost antibody responses to Zika virus

Marianna Teixeira Pinho Favaro, Monica Josiane Rodrigues-Jesus, Alexia Adrienne Venceslau-Carvalho, Rúbens Prince Dos Santos Alves, Lennon Ramos Pereira, Samuel Santos Pereira, Robert Andreato-Santos, Luis Carlos de Souza Ferreira



PII: S1549-9634(20)30188-X

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2020.102334>

Reference: NANO 102334

To appear in: *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*

Revised date: 29 October 2020

Please cite this article as: M.T.P. Favaro, M.J. Rodrigues-Jesus, A.A. Venceslau-Carvalho, et al., Nanovaccine based on self-assembling nonstructural protein 1 boost antibody responses to Zika virus, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* (2020), <https://doi.org/10.1016/j.nano.2020.102334>

This is a PDF file of an article that has undergone enhancements after acceptance, such as the addition of a cover page and metadata, and formatting for readability, but it is not yet the definitive version of record. This version will undergo additional copyediting, typesetting and review before it is published in its final form, but we are providing this version to give early visibility of the article. Please note that, during the production process, errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

© 2020 Published by Elsevier.

8.8. Anexo 8: Publicação como coautor



Protective Immunity to Dengue Virus Induced by DNA Vaccines Encoding Nonstructural Proteins in a Lethal Challenge Immunocompetent Mouse Model

OPEN ACCESS

Edited by:

Maria A. Deš,

Biological Research Centre, Hungary

Reviewed by:

Appavu K. Sundaram,

Henry M Jackson Foundation for the Advancement of Military Medicine (HJF), United States

Mohammad Monirul Islam,

University of Chittagong, Bangladesh

*Correspondence:

Luis Carlos de Souza Ferreira

lcsf@usp.br

Specialty section:

This article was submitted to Pharmaceutical Innovation, a section of the journal *Frontiers in Medical Technology*

Received: 04 May 2020

Accepted: 30 September 2020

Published: 30 October 2020

Citation:

Aves RPdS, Andreato-Santos R, de Freitas CL, Pereira LR, Fabris-Maeda DJN, Rodrigues-Jesus MJ, Pereira SS, Carvalho AAVB, Sales NS, Peron JPS, Amorim JH and Ferreira LCS (2020) Protective Immunity to Dengue Virus Induced by DNA Vaccines Encoding Nonstructural Proteins in a Lethal Challenge Immunocompetent Mouse Model. *Front. Med. Technol.* 2:558984. doi: 10.3389/fmed.2020.558984

Rúbens Prince dos Santos Alves¹, Robert Andreato-Santos¹, Carla Longo de Freitas², Lennon Ramos Pereira¹, Denicar Lina Nascimento Fabris-Maeda¹, Mônica Josiane Rodrigues-Jesus¹, Samuel Santos Pereira¹, Alexia Adrienne Venceslau Brito Carvalho¹, Natiely Silva Sales¹, Jean Pierre Schatzmann Peron², Jaime Henrique Amorim³ and Luis Carlos de Souza Ferreira^{1*}

¹ Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, ² Laboratório de Interações Neuroimunes, Departamento de Imunologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, ³ Laboratório de Microbiologia, Centro das Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Do Oeste da Bahia, Barreiras, Brazil

Dengue virus represents the main arbovirus affecting humans, but there are no effective drugs or available worldwide licensed vaccine formulations capable of conferring full protection against the infection. Experimental studies and results generated after the release of the licensed anti-DENV vaccine demonstrated that induction of high-titer neutralizing antibodies does not represent the sole protection correlate and that, indeed, T cell-based immune responses plays a relevant role in the establishment of an immune protective state. In this context, this study aimed to further demonstrate protective features of immune responses elicited in immunocompetent C57BL/6 mice immunized with three plasmids encoding DENV2 nonstructural proteins (NS1, NS3, and NS5), which were subsequently challenged with a DENV2 strain naturally capable of inducing lethal encephalitis in immunocompetent mouse strains. The animals were immunized intramuscularly with the DNA vaccine mix and complete protection was observed among vaccinated mice. Vaccine induced protection correlated with the cytokine profiles expressed by spleen cells and brain-infiltrating mononuclear cells. The results confirm the pivotal role of cellular immune responses targeting nonstructural DENV proteins and validate the experimental model based on a DENV2 strain capable of infecting and killing immunocompetent mice as a tool for the evaluation of protective immunity induced by anti-DENV vaccines.

Keywords: mouse model, dengue, nonstructural proteins, DNA vaccines, IFN- γ

8.9. Anexo 9: Publicação como coautor



Enhanced Immune Responses and Protective Immunity to Zika Virus Induced by a DNA Vaccine Encoding a Chimeric NS1 Fused With Type 1 Herpes Virus gD Protein

Lennon Ramos Pereira¹, Rúbens Prince dos Santos Alves¹, Natiely Silva Sales¹, Robert Andreato-Santos¹, Aléxia Adriane Venceslau-Carvalho¹, Samuel Santos Pereira¹, Maria Fernanda Castro-Amarante¹, Mônica Josiane Rodrigues-Jesus¹, Marianna Teixeira de Pinho Favaro¹, Rosa Maria Chura-Chambi², Ligia Morganti² and Luis Carlos de Souza Ferreira^{1*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Jorge Fuentealba,
University of Concepcion, Chile

Reviewed by:

Roberto Lins,
Aggeu Magalhães Institute
(IAM), Brazil
Angel Alejandro Oñate,
University of Concepcion, Chile

*Correspondence:

Luis Carlos de Souza Ferreira
lcsf@usp.br

Specialty section:

This article was submitted to
Pharmaceutical Innovation,
a section of the journal
Frontiers in Medical Technology

Received: 08 September 2020

Accepted: 11 November 2020

Published: 03 December 2020

Citation:

Pereira LR, Alves RPaS, Sales NS, Andreato-Santos R, Venceslau-Carvalho AA, Pereira SS, Castro-Amarante MF, Rodrigues-Jesus MJ, Favaro MTdP, Chura-Chambi FM, Morganti L and Ferreira LCdS (2020) Enhanced Immune Responses and Protective Immunity to Zika Virus Induced by a DNA Vaccine Encoding a Chimeric NS1 Fused With Type 1 Herpes Virus gD Protein. *Front. Med. Technol.* 2:604160. doi: 10.3389/fmed.2020.604160

¹Laboratory of Vaccine Development, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ²Biotechnology Center, Institute of Energy and Nuclear Research (IPEN), São Paulo, Brazil

Zika virus (ZIKV) is a globally-distributed flavivirus transmitted to humans by *Aedes* mosquitoes, usually causing mild symptoms that may evolve to severe conditions, including neurological alterations, such as neonatal microcephaly and Guillain-Barré syndrome. Due to the absence of specific and effective preventive methods, we designed a new subunit vaccine based on a DNA vector (pgDNS1-ZIKV) encoding the non-structural protein 1 (NS1) genetically fused to the Herpes Simplex Virus (HSV) glycoprotein D (gD) protein. Recombinant plasmids were replicated in *Escherichia coli* and the expression of the target protein was confirmed in transfected HEK293 cells. C57BL/6 and AB6 (IFNAR1^{-/-}) mice were i.m. immunized by electroporation in order to evaluate pgDNS1-ZIKV immunogenicity. After two doses, high NS1-specific IgG antibody titers were measured in serum samples collected from pgDNS1-ZIKV-immunized mice. The NS1-specific antibodies were capable to bind the native protein expressed in infected mammalian cells. Immunization with pgDNS1-ZIKV increased both humoral and cellular immune responses regarding mice immunized with a ZIKV NS1 encoding vaccine. Immunization with pgDNS1-ZIKV reduced viremia and morbidity scores leading to enhanced survival of immunodeficient AB6 mice challenged with a lethal virus load. These results give support to the use of ZIKV NS1 as a target antigen and further demonstrate the relevant adjuvant effects of HSV-1 gD.

Keywords: Zika virus, NS1 protein, gD protein, DNA vaccine, HSV-1, flavivirus

INTRODUCTION

Zika virus (ZIKV) is an arthropod-borne virus with a positive single-stranded RNA that codes for three structural and seven non-structural proteins (1). While the ZIKV classical transmission cycle mainly involves *Aedes* mosquitoes (1, 2), intrauterine and sexual transmission routes have also been demonstrated (3). According to the WHO, ZIKV has been reported in more than 80 countries.

8.10. Anexo 10: Publicação como coautor



Article

Intradermal Delivery of Dendritic Cell-Targeting Chimeric mAbs Genetically Fused to Type 2 Dengue Virus Nonstructural Protein 1

Lennon Ramos Pereira ¹, Elaine Cristina Matos Vicentin ², Sara Araujo Pereira ¹,
Denicar Lina Nascimento Fabris Maeda ¹, Rúbens Prince dos Santos Alves ¹,
Robert Andreato-Santos ¹, Francielle Tramontini Gomes de Sousa ³,
Marcio Massao Yamamoto ², Maria Fernanda Castro-Amarante ¹,
Marianna Teixeira de Pinho Favaro ¹, Camila Malta Romano ³, Ester Cerdeira Sabino ³,
Silvia Beatriz Boscardin ² and Luís Carlos de Souza Ferreira ^{1,*}

- ¹ Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo 05508-000, Brazil; lennon_rp@hotmail.com (L.R.P.); araujopereirasara@gmail.com (S.A.P.); denicarlina@usp.br (D.L.N.E.M.); rubens.bmc@gmail.com (R.P.d.S.A.); robert_andreato@hotmail.com (R.A.-S.); mfamarante@usp.br (M.F.C.-A.); favaro.mtp@gmail.com (M.T.d.P.F.)
- ² Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo 05508-000, Brazil; elaine.vicentin@gmail.com (E.C.M.V.); masayama@usp.br (M.M.Y.); sbboscardin@usp.br (S.B.B.)
- ³ Clinical Hospital HCFMUSP, Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, Sao Paulo 05403-000, Brazil; francielletg@gmail.com (F.T.G.d.S.); camismalta@gmail.com (C.M.R.); sabinoec@gmail.com (E.C.S.)
- * Correspondence: lcsf@usp.br; Tel: +55-11-3091-7356

Received: 19 August 2020; Accepted: 22 September 2020; Published: 1 October 2020



Abstract: Targeting dendritic cells (DCs) by means of monoclonal antibodies (mAbs) capable of binding their surface receptors (DEC205 and DCIR2) has previously been shown to enhance the immunogenicity of genetically fused antigens. This approach has been repeatedly demonstrated to enhance the induced immune responses to passenger antigens and thus represents a promising therapeutic and/or prophylactic strategy against different infectious diseases. Additionally, under experimental conditions, chimeric α DEC205 or α DCIR2 mAbs are usually administered via an intraperitoneal (i.p.) route, which is not reproducible in clinical settings. In this study, we characterized the delivery of chimeric α DEC205 or α DCIR2 mAbs via an intradermal (i.d.) route, compared the elicited humoral immune responses, and evaluated the safety of this potential immunization strategy under preclinical conditions. As a model antigen, we used type 2 dengue virus (DENV2) nonstructural protein 1 (NS1). The results show that the administration of chimeric DC-targeting mAbs via the i.d. route induced humoral immune responses to the passenger antigen equivalent or superior to those elicited by i.p. immunization with no toxic effects to the animals. Collectively, these results clearly indicate that i.d. administration of DC-targeting chimeric mAbs presents promising approaches for the development of subunit vaccines, particularly against DENV and other flaviviruses.

Keywords: intradermal; DEC205; DCIR2; dendritic cell; NS1 protein; Dengue virus

1. Introduction

Targeting antigens to dendritic cells (DCs) has been repeatedly demonstrated to improve the immunogenicity of subunit vaccines. DCs are specialized in antigen presentation with functions that include the initiation and regulation of host immune responses. An efficient DC-targeting delivery method relies on the genetic fusion of antigens to monoclonal antibodies (mAbs) that specifically bind to endocytic receptors expressed on the surface of DCs [1–3]. Among various DC types, CD8 α + and

8.11. Anexo 11: Publicação como coautor



Review

Anti-Flavivirus Vaccines: Review of the Present Situation and Perspectives of Subunit Vaccines Produced in *Escherichia coli*

Sergio C. Araujo ¹, Lennon R. Pereira ², Rubens P. S. Alves ², Robert Andreatta-Santos ², Alex I. Kanno ¹, Luis Carlos S. Ferreira ^{2,*} and Viviane M. Gonçalves ^{1,*}

¹ Laboratory of Vaccine Development, Instituto Butantan, São Paulo-SP 05503-900, Brazil; sergio.araujo@butantan.gov.br (S.C.A.); alex.kanno@butantan.gov.br (A.I.K.)

² Laboratory of Vaccine Development, Institute of Biomedical Sciences, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP 05508-000, Brazil; lennon_rp@usp.br (L.R.P.); rpsa7@usp.br (R.P.S.A.); randreatata@usp.br (R.A.-S.)

* Correspondence: lcsf@usp.br (L.C.S.F.); viviane.goncalves@butantan.gov.br (V.M.G.)

Received: 23 July 2020; Accepted: 23 August 2020; Published: 31 August 2020



Abstract: This article aims to review the present status of anti-flavivirus subunit vaccines, both those at the experimental stage and those already available for clinical use. Aspects regarding development of vaccines to Yellow Fever virus (YFV), Dengue virus (DENV), West Nile virus (WNV), Zika virus (ZIKV), and Japanese encephalitis virus (JEV) are highlighted, with particular emphasis on purified recombinant proteins generated in bacterial cells. Currently licensed anti-flavivirus vaccines are based on inactivated, attenuated, or virus-vector vaccines. However, technological advances in the generation of recombinant antigens with preserved structural and immunological determinants reveal new possibilities for the development of recombinant protein-based vaccine formulations for clinical testing. Furthermore, novel proposals for multi-epitope vaccines and the discovery of new adjuvants and delivery systems that enhance and/or modulate immune responses can pave the way for the development of successful subunit vaccines. Nonetheless, advances in this field require high investments that will probably not raise interest from private pharmaceutical companies and, therefore, will require support by international philanthropic organizations and governments of the countries more severely stricken by these viruses.

Keywords: flavivirus; mosquito-borne diseases; subunit vaccines

1. Introduction

Flaviviruses are enveloped and positive-sense single-stranded RNA viruses of the *Flavivirus* genus and *Flaviviridae* family. Most of them are transmitted to their hosts by hematophagous mosquitoes or ticks. However, alternative transmission routes in humans, such as sexual and transplacental transmission, have been described. The distinguishing characteristic of the *Flavivirus* genus is the type I cap (m^7 GpppAmp) at the 5'-end of the genome, which is not seen in viruses of the other genera [1]. The yellow fever virus (YFV) is the prototype of the family, which encompasses other species of viruses that cause important human diseases, such as Dengue virus (DENV), West Nile virus (WNV), Zika virus (ZIKV), and Japanese encephalitis virus (JEV).

Diseases caused by flaviviruses have great health and socioeconomic burden to countries mainly located at tropical and subtropical regions. More than 3 billion people are at risk of JEV infection. DENV infects approximately 390 million people annually. WNV is the most geographically widespread flavivirus since it also affects countries in the Northern hemisphere. The last ZIKV outbreak alarmed the world due to the congenital Zika syndrome, which includes microcephaly. Despite the existence of

8.12. Anexo 12: Publicação como coautor

Kanno et al. *AMB Expr* (2020) 10:1
<https://doi.org/10.1186/s13568-019-0926-y>



ORIGINAL ARTICLE

Open Access



Optimization and scale-up production of Zika virus Δ NS1 in *Escherichia coli*: application of Response Surface Methodology

Alex Issamu Kanno¹ , Luciana Cezar de Cerqueira Leite¹ , Lennon Ramos Pereira²,
 Mônica Josiane Rodrigues de Jesus², Robert Andreatta-Santos² , Rúbens Prince dos Santos Alves²,
 Edison Luiz Durigon³, Luís Carlos de Souza Ferreira² and Viviane Maimoni Gonçalves^{1*}

Abstract

Diagnosing Zika virus (ZIKV) infections has been challenging due to the cross-reactivity of induced antibodies with other flavivirus. The concomitant occurrence of ZIKV and Dengue virus (DENV) in endemic regions requires diagnostic tools with the ability to distinguish these two viral infections. Recent studies demonstrated that immunoassays using the C-terminal fragment of ZIKV NS1 antigen (Δ NS1) can be used to discriminate ZIKV from DENV infections. In order to be used in serological tests, the expression/solubility of Δ NS1 and growth of recombinant *E. coli* strain were optimized by Response Surface Methodology. Temperature, time and IPTG concentration were evaluated. According to the model, the best condition determined in small scale cultures was 21 °C for 20 h with 0.7 mM of IPTG, which predicted 7.5 g/L of biomass and 962 mg/L of Δ NS1. These conditions were validated and used in a 6-L batch in the bioreactor, which produced 6.4 g/L of biomass and 500 mg/L of Δ NS1 in 12 h of induction. The serological ELISA test performed with purified Δ NS1 showed low cross-reactivity with antibodies from DENV-infected human subjects. Denaturation of Δ NS1 decreased the detection of anti-ZIKV antibodies, thus indicating the contribution of conformational epitopes and confirming the importance of properly folded Δ NS1 for the specificity of the serological analyses. Obtaining high yields of soluble Δ NS1 supports the viability of an effective serologic diagnostic test capable of differentiating ZIKV from other flavivirus infections.

Keywords: Zika NS1, Serological diagnosis, *E. coli*, Heterologous protein production, Soluble expression, Response Surface Methodology

Introduction

Zika virus (ZIKV) is a flavivirus transmitted primarily by *Aedes aegypti* mosquitoes. Many cases of microcephaly and other congenital malformations were reported following ZIKV infections during pregnancy (Franca et al. 2016). Most cases are asymptomatic, however, infection of both children and adults can lead to serious neurologic complications, such as Guillain-Barré syndrome or

neuropathy (WHO 2016). The ZIKV infections are normally diagnosed by molecular tests designed to detect viral RNA in the blood or saliva, but the short blood-stream viral detection window limits its utilization. Furthermore, another concern lies in the molecular tests reliability, since recent reports showed 73% of suboptimal sensitivity or specificity among 15 Brazilian laboratories (Fischer et al. 2018) and similar results among European laboratories, which highlights the challenging aspect of the diagnosis.

On the other hand, serological tests do not have the disadvantage of limited window of detection. IgM and IgG antibodies can be detected for months or even years

*Correspondence: viviane.goncalves@butantan.gov.br

¹Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas, Instituto Butantan, Av Vital Brasil, 1500, São Paulo, SP 05503-900, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2019. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.