



## **INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS**

**MESTRADO PROFISSIONAL EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS**

# **OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE APTÂMEROS PARA A DETECÇÃO DO ANTÍGENO NS5 DO VÍRUS ZIKA**

**ALESSANDRA ALVES ABALO**

**Rio de Janeiro**

**2019**

## **INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS**

**Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos**

**ALESSANDRA ALVES ABALO**

### **OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE APTÂMEROS PARA A DETECÇÃO DO ANTÍGENO NS5 DO VÍRUS ZIKA**

Texto de dissertação apresentado ao Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos

**ORIENTADORES: Dr. Sotiris Missailidis**

**Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Corrêa Argondizzo**

**Rio de Janeiro**

**2019**

***Ao autor e consumidor da  
minha fé, que me acompanha e me  
guia em todos os dias,  
à Deus dedico esta dissertação.***

***Ao meu esposo Ubiratan e aos  
nossos filhos Daniel e Amanda,  
pela compreensão e pelo apoio na  
elaboração deste trabalho, que  
ocupou muitas e preciosas horas  
de convivência familiar.***

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, que me sustentou em todos os momentos, me conduzindo até essa conquista, dentre muitas outras que ainda virão.

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

À equipe do MPTI, ao coordenador do mestrado profissional Dr. José Procópio, às queridas secretárias Zaíra e Miriam, pela dedicação e carinho apresentados, e aos diversos professores das disciplinas cursadas, pelo conhecimento e experiência transmitidos.

Aos meus colegas da querida turma do MPTI-2017, pelas horas compartilhadas, pelo espírito de união e companheirismo, e pela fundamental colaboração nas difíceis horas de estudo.

Ao meu querido orientador Dr. Sotiris Missailidis, pelo auxílio, pelos conselhos e, em especial, pelo profundo conhecimento compartilhado. Efcharistó!

À minha querida orientadora Dra. Ana Paula Corrêia Argondizzo, pelo exemplo de dedicação ao trabalho, pela atenção dispensada nas orientações experimentais e pela preciosa ajuda nas sugestões e correções na escrita.

À Doutoranda Liliane Moraes, pelo carinho, boa vontade, atenção e aconselhamentos que me sustentaram em muitos momentos, além da valiosa ajuda na condução de muitas atividades laboratoriais.

Ao Doutor Dílson Silva, pelo grande auxílio durante o desenvolvimento do trabalho, além das valiosas sugestões de caráter pessoal e profissional.

À Mestre Ethel Valdez, pela colaboração sempre carinhosa durante a elaboração desse trabalho.

À todos os colegas de trabalho do LATAM, pela colaboração e apoio prestados, além da espíritosidade e da alegria transmitidas pelo grupo. E em especial à querida Milena, que sempre me atendeu com muito carinho e boa vontade, esclarecendo todas as minhas dúvidas e me auxiliando sempre que possível com muito cuidado e dedicação.

Às equipes do LATER e do LAMAM de BioManguinhos, pelo acolhimento de todos, pela colaboração, auxílio e apoio direto ou indireto em todos os experimentos por lá realizados.

À coordenação da Central Analítica Professora Fernanda Coutinho, do Instituto de Química da UERJ, por terem gentilmente cedido o fluorímetro Cary Eclipse (Agilent) para a realização de diversos ensaios de fluorimetria.

Aos meus maravilhosos pais e amigos, Dayse da C. Alves e Paulo S. F. Alves, que sempre foram e serão minha fonte de inspiração e de incentivo para prosseguir, com seus exemplos de amor, fé, perseverança, responsabilidade e respeito.

À toda minha família, ao meu amado marido Ubiratan, aos nossos amados filhos Daniel e Amanda, e em especial à minha tia e madrinha Yolanda B. da Costa Filha (*in memoriam*), que sempre acreditaram e torceram pelo meu sucesso profissional e pessoal.

À todos os meus amigos e demais pessoas aqui não mencionadas, mas que direta ou indiretamente colaboraram de alguma forma para a estruturação e conclusão dessa dissertação.

# ÍNDICE

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
Vírus Zika e epidemiologia .....	11
Biologia Molecular e bioquímica do ZIKV.....	13
A proteína NS5 de Zika .....	19
Aptâmeros .....	23
Espectroscopia de fluorescência .....	28
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>32</b>
Objetivo geral .....	32
Objetivos específicos .....	32
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
Obtenção da proteína recombinante NS5 (483-718 aa) de ZIKV .....	33
Seleção de aptâmeros capazes de se ligar a proteína rNS5z (483-728 aa).....	34
Clonagem das sequências de ADN capazes de reconhecerem os alvos .....	36
Seleção e confirmação dos clones recombinantes em <i>Escherichia coli</i> .....	37
Sequenciamento nucleotídico e análise preditiva da estrutura secundária .....	37
Espectroscopia de fluorescência .....	37
Obtenção dos anticorpos policlonais anti-rNS5z (483-718 aa) .....	38
Ensaio Imunoadsorção enzimática - ELISA .....	39
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>41</b>
Seleção de aptâmeros capazes de se ligar a proteína rNS5z (483-718 aa).....	41
Espectroscopia de fluorescência .....	48
Ensaio Imunoadsorção enzimática - ELISA.....	70
<b>DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS</b> .....	<b>76</b>
<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>80</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>82</b>

## **ABREVIATURAS**

BALB/c – Bagg -Albino C

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay (ensaio de imunoabsorbância por ligação enzimática)

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

HBsAg – Antígeno de superfície do vírus da Hepatite B

MonoAChBsAg – Anticorpo contra Antígeno de superfície do vírus da Hepatite B recombinante

IgG – Imunoglobulina G

kDa – quilodalton

LAEAN – Laboratório de Experimentação Animal

LATAM – Laboratório de Tecnologia de Anticorpos Monoclonais

LATER – Laboratório de Tecnologia de Recombinantes

Mabs – monoclonal antibodies (anticorpos monoclonais)

MPTI – Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológico

PCR – Polymerase Chain Reaction (reação da polimerase em cadeia)

pH – Potencial de Hidrogênio

RNA – Ácido ribonucleico

RdRp – RNA replicase

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

VDTEC – Vice Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico

## RESUMO

O vírus ZIKA (ZIKV) pertence ao gênero *Flavivirus* e a infecção por este, pode causar quadros febris e de *rash* cutâneo semelhante a doenças causadas por outros vírus da mesma família, sendo também associado à microcefalia em recém nascidos. O RNA do ZIKV apresenta polaridade positiva, sendo traduzido em uma poliproteína, posteriormente processada, resultando na formação de três proteínas estruturais e sete não estruturais (NS). A NS5 é uma RdRp que sintetiza o RNA viral através de um mecanismo de síntese *de novo* e está localizado principalmente no núcleo. Os aptâmeros são fragmentos de DNA/RNA obtidos através de um processo de seleção e enriquecimento *in vitro* chamado Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial (SELEX). Eles têm alta capacidade de reconhecimento, afinidade e especificidade aos alvos para os quais foram selecionados. O objetivo deste trabalho foi selecionar e avaliar aptâmeros específicos para detectar a proteína rNS5z de ZIKV para uso em teste de diagnóstico. Para a seleção dos aptâmeros foi utilizada uma biblioteca de ssDNA e as técnicas de seleção (SELEX) foram realizadas em microplaca ou em coluna HiTrap NHS (*GE Healthcare*), sendo a proteína alvo recombinante NS5 (483-718 aa) de Zika vírus (rNS5z) imobilizada nestas. Após retirada do material não ligado e a eluição das sequências de ssDNA ligadas ao alvo com NaCl e NaSCn, as amostras foram dessalinizadas e amplificadas por PCR. Este ciclo foi repetido sete vezes (seleção em placa) ou dez vezes (seleção em coluna), e as amostras dessalinizadas foram submetidas a PCR dsDNA usando *primers* específicos. Cada amostra foi clonada no vetor pCR2.1 TOPO e transformado em *Escherichia coli* TOP10. Clones foram selecionados e os plasmídeos recombinantes extraídos, quantificados e sequenciados. As sequências dos aptâmeros foram alinhadas e as estruturas secundárias avaliadas no programa mfold. Para caracterizar as afinidades de ligação dos aptâmeros ao alvo, foi empregada a técnica de espectroscopia de fluorescência titulando a rNS5z com os aptâmeros nas temperaturas de 25°C e 37°C, para definir a natureza da ligação. Os dados da fluorescência foram tratados e analisados seguindo a Teoria de Stern-Volmer de forma a gerar os gráficos e as constantes de afinidade. A seguir foi estabelecida uma ordem de afinidades para a seleção das moléculas que serão utilizadas no desenvolvimento do projeto. As mesmas titulações foram repetidas com albumina sérica humana (HSA), usada como controle, para determinar a especificidade e competição dos aptâmeros selecionados. A interação dos aptâmeros com rNS5z e HSA foram analisados subsequentemente com ELISA. Os ensaios de ELISA foram realizados em placa modificada, utilizando cinco aptâmeros modificados (-NH<sub>2</sub>) imobilizados como agentes de captura. Um anticorpo policlonal de camundongo contra rNS5z foi utilizado como agente de detecção. Para detecção de sinal foi utilizado um anticorpo monoclonal anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase revelado com TMB. Os resultados, expressos com base na leitura da densidade ótica (D.O.) em espectrofotômetro com filtro de 450 nm, demonstraram que a proteína rNS5z pode ser detectada de forma confiável em uma concentração de 200 ng/mL. O ensaio ELISA também foi realizado com HSA diluído em tampão de ligação na presença (ou ausência) de rNS5z nas mesmas condições descritas acima. Foi verificado que não houve redução na sensibilidade do ensaio de captura da rNS5z na presença de HSA, para os aptâmeros modificados (-NH<sub>2</sub>) que foram testados. A proteína rNS5z também foi detectada pelos mesmos aptâmeros modificados quando diluída em 100% de soro humano, embora o valor de densidade ótica obtido para soro humano sem a proteína também tenha sido elevado. E como a IgG é a principal imunoglobulina do sangue, respondendo por cerca de 70 a 75% do total de imunoglobulinas, o mesmo ensaio foi realizado utilizando um anticorpo conjugado anti-



IgG humano para revelação, mostrando interação inespecífica dos aptâmeros selecionados para IgG humano.

## Abstract

Zika virus (ZIKV) belongs to Flavivirus and its infection can cause fever and cutaneous rash similarly to diseases caused by other viruses of the same family, but also associated with microcephaly in infants. The RNA of the ZIKV presents positive polarity, and is translated in a polyprotein, which is subsequently processed, resulting in the formation of three structural proteins and seven non-structural proteins (NS). The NS5 is an RdRp that synthesises the viral RNA using a mechanism of *de novo* synthesis, localized primarily in the nucleus. Aptamers are DNA/RNA fragments with high recognition capacity, affinity and specificity for the targets they are selected against. They can be produced by selection *in vitro* using the method of systematic evolution of ligands by exponential enrichment, named SELEX. The objective of this work was to select and evaluate specific aptamers for the detection of the rNS5z protein of the ZIKV, for use in a diagnostic assay development. For the selection of the aptamers, a ssDNA library was used, and the selection techniques (SELEX) were executed on ELISA plates or affinity chromatography columns HiTrap NHS (GE Healthcare), where the NS5 recombinant protein target (483-718 aa) of the Zika virus (rNS5z) was immobilized. After removal of the non-bound material and the elution of the binding sequences of ssDNA, using NaCl and NaSCn, the samples were desalted and amplified by PCR. This cycle was repeated seven times (selection in microplate) or ten times (selection in column), and the desalted samples were submitted to a final double stranded PCR, using specific primers. Each sample was cloned in the pCR2.1 TOPO vector and transformed in *Escherichia coli* TOP10. Clones were selected and the recombinant plasmids extracted, quantified and sequenced. The sequences of the aptamers were aligned and the secondary structures evaluated using the mfold program. To characterise the affinities of the binding of the aptamers to their target, the fluorescence spectroscopy technique was employed, utilizing rNS5z and titrations with aptamers, at 25°C and 37°C in order to characterize the mechanism of the interaction. The fluorescence data were analysed using the Stern-Volmer model, in order to establish an order of binding affinities of the aptamers and select the molecules with the highest affinities for further development. The same titrations were repeated with Human Serum Albumin (HSA), used as a control, to determine the specificity of the selected aptamers. The interaction of the aptamers with the rNS5z and HSA were subsequently analysed using ELISA. Assays of ELISA were realized in modified microplates, utilizing five aptamers modified (-NH<sub>2</sub>) immobilized as capture agents and a mouse polyclonal antibody against rNS5z was used as a detection agent. An anti-mouse monoclonal IgG conjugated with horseradish peroxidase and revealed with TMB was used for the signal detection. The results, expressed based on the optic density reading (O.D.) in a plate reader with filter at 450nm, demonstrate that the rNS5z protein can be detected in a consistent form at a concentration of 200 ng/mL. The ELISA assay was also repeated using HSA diluted in binding buffer, in the presence or absence of rNS5z, in the same conditions described above. It was verified that there was no reduction in the sensibility of the rNS5z capture assay in the presence of HSA, for the modified (-NH<sub>2</sub>) aptamers tested. The rNS5z protein was also detected by the same aptamers when diluted in 100% human serum, although the optical density value obtained with human serum alone was also high. As IgG is the principal immunoglobulin in blood, responding for about 70-75% of the total of immunoglobulins, the same assay was realized using a conjugated anti-human IgG for detection, showing a non-specific interaction of the selected aptamers with human IgG.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Vírus Zika e epidemiologia

A epidemia causada pelo Zika vírus (ZIKV) na América, declarada como emergência de saúde pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em fevereiro de 2016, chamou a atenção internacional pelos casos de microcefalia em neonatos e da Síndrome de Guillain-Barré em adultos, além de outros distúrbios neurológicos associados à infecção pelo vírus (página eletrônica da OMS, maio de 2017). O ZIKV pertence ao gênero *Flavivirus*, que inclui mais de 50 vírus transmitidos por artrópodes (arbovírus). O vírus da febre amarela (YFV), a partir do qual o gênero foi denominado, foi o primeiro vírus descrito como causador de uma doença transmitida por artrópodes. Dentre os flavivírus, pode-se destacar ainda os quatro sorotipos do vírus da dengue (DENV), o vírus que causa a encefalite japonesa (JEV), o vírus da Febre do Nilo Ocidental (WNV), e o vírus causador da encefalite transmitida por carrapatos (TBEV), que causam arboviroses em populações de diversos países (Barrows et al., 2018).

O genoma do ZIKV é composto por uma molécula de ácido ribonucleico (ARN) de sentido positivo de 11 kb de comprimento que contém uma estrutura *cap*, mas não possui uma cauda poli A. O ARN codifica uma estrutura de leitura aberta longa, que é traduzida em uma poliproteína, cuja sequência subsequentemente processada por proteases virais e do hospedeiro em três proteínas estruturais (C, prM/M e E), e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Ye et al., 2016).

O ZIKV foi isolado em 1947 na Floresta Ziika, em Uganda (Boyer, Calvez, Chouin-Carneiro, Diallo, & Failloux, 2018) e permaneceu como uma doença tropical negligenciada até novembro de 2015, quando casos de microcefalia que surgiram no Brasil estiveram associados a uma epidemia de ZIKV vários meses antes (Boyer et al., 2018).

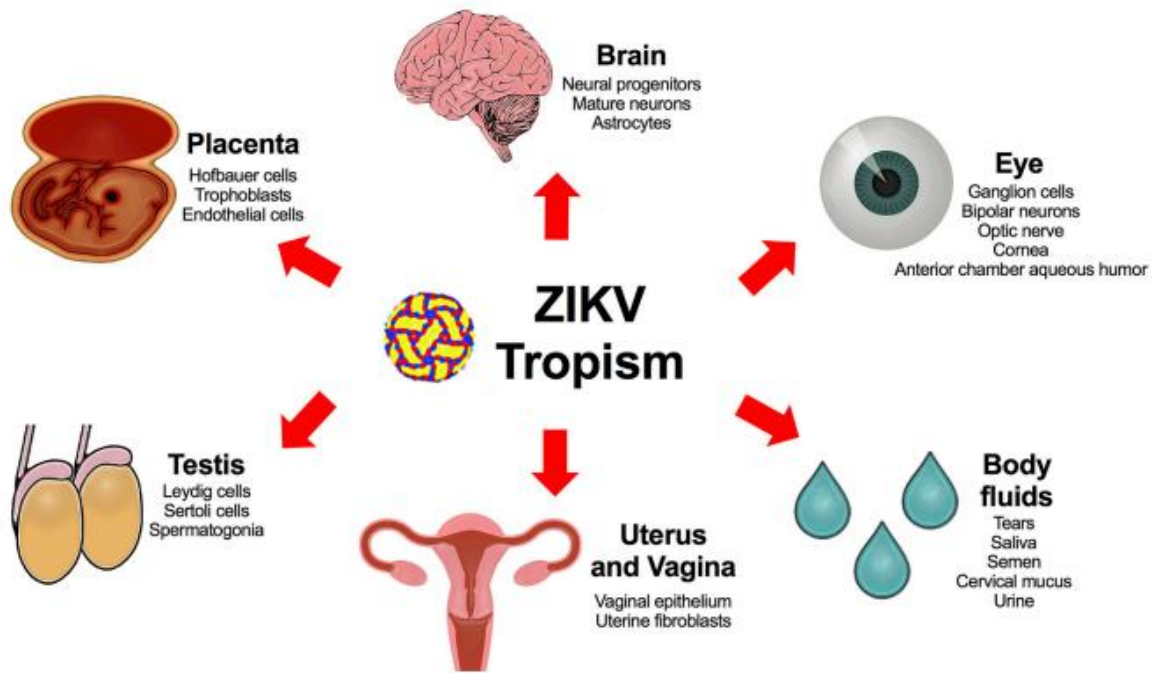
Um estudo de caso detectou e sequenciou o genoma do vírus Zika em amostras líquidas amnióticas de duas gestantes brasileiras cujos fetos foram diagnosticados com microcefalia (Calvet et al., 2016), e múltiplos modelos de infecção *in vivo* e *in vitro* demonstraram que a infecção pelo ZIKV pode prejudicar o desenvolvimento neurológico (de Araújo et al., 2016)(Mlakar et al., 2016)(Brasil et al., 2017). Uma publicação recente sugere que a alteração em um único aminoácido (S139N) na proteína estrutural de cepas americanas do ZIKV (prM), aumenta infectividade em células progenitoras neurais humanas e de camundongos e a patogenicidade em

modelos de camundongos (Yuan et al., 2017), mas a relevância dessa variação para a microcefalia humana observada nas Américas continua indeterminada. Por fim, um estudo de caso-controle encontrou um aumento do risco de microcefalia associada à infecção congênita por ZIKV (Sarno et al., 2016), passando a ser considerado, dentre os arbovírus amplamente distribuídos, como um fator de risco significativo para malformações congênitas humanas.

Embora a maioria das infecções seja transmitida pelo mosquito, o ZIKV também pode ser transmitido diretamente, pessoa a pessoa, através do contato sexual, ou verticalmente, da mãe para o feto (Petersen, Jamieson, Powers, & Honein, 2016). Isso também destaca o ZIKV dos demais flavivírus, pois surge a partir de então uma preocupação significativa e inesperada de saúde pública (Foy et al., 2011; Mansuy et al., 2016).

A infecção pelo vírus Zika geralmente é assintomática, e mesmo as sintomáticas são leves e assemelham-se às aquelas observadas com o vírus da dengue e que já foram classicamente descritas, tais como erupção cutânea, febre, artralgia, conjuntivite, mialgia, dor de cabeça e dor retro-orbital (Petersen et al., 2016). Houve ainda relatos de hematoespermia e sintomas assemelhando-se à prostatite após infecção; e o ARN viral, assim como o vírus foram detectados no sêmen de homens semanas após o desaparecimento dos sintomas agudos (Musso et al., 2015).

Estudos em humanos e modelos animais (camundongos e primatas não humanos) detectaram o ZIKV em células da placenta, em células progenitoras neurais e em neurônios maduros. Além disso, o ZIKV é capaz de infectar tecidos oculares, incluindo córnea, retina neurosensorial e e nervo óptico, bem como o humor aquoso da câmara anterior. O ZIKV também tem como alvo células do trato reprodutivo, incluindo espermatogonias, células de Sertoli e células de Leydig (no testículo de camundongos), espermatozoides (amostras de camundongos e humanos) e epitélio vaginal (ratos) e fibroblastos uterinos (infecção *in vitro* de amostras humanas). O extenso tropismo resulta na detecção de ZIKV em vários fluidos corporais, incluindo líquido conjuntival ou lágrimas (ratos humanos), saliva (primatas não humanos e humanos), sêmen (camundongos, primatas não humanos, e humanos), muco cervical (humanos), lavagens vaginais (camundongos e humanos) e urina (primatas não humanos e humanos). (Figura 1)



**Figura 1.1.1:** Tropicismo tecidual do ZIKV. Esquema retirado de *Miner and Diamond, 2017*

O diagnóstico clínico de infecção por Zika Vírus pode ser realizado por um médico. O resultado pode ser confirmado por meio de exames laboratoriais de sorologia e de biologia molecular, ou com o teste rápido desenvolvido para arboviroses, que pode detectar de forma indiscriminada infecções causadas pelos vírus Zika, dengue e chikungunya (ZDC). A sorologia é feita pela técnica de PCR, e os exames estão disponíveis no Sistema Único de Saúde (SUS).

Em geral, as infecções pelo ZIKV são autolimitadas e resolvidas em menos de uma semana; no entanto, existem casos documentados de Zika grave em pacientes com outras condições subjacentes (Arzusa-Ortega et al., 2016). Além disso, o Zika tem sido fortemente associado a sequelas neurológicas, mais comumente a Síndrome de Guillain-Barré, mas também meningo-encefalite e mielite (Fontes, dos Santos, & Marchiori, 2016).

## 1.2. **Biologia Molecular e bioquímica do ZIKV**

Os flavivírus compartilham uma estrutura de vírions comum (Barrows et al., 2018), e entre eles a estrutura do DENV e ZIKV são particularmente bem caracterizadas. O vírion maduro do DENV é uma partícula mais ou menos esférica, de diâmetro de aproximadamente 50 nm. O vírion é um revestimento de glicoproteína feito de unidades repetitivas de 180 cópias de proteína de envelope (E), em combinação com

a proteína da membrana viral (M), formando uma superfície de simetria icosaédrica (Kuhn et al., 2002).

Em um elegante trabalho publicado na revista *Nature* (Rey, Heinz, Mandl, Kunz, & Harrison, 1995a), os autores demonstraram que, dos três domínios da proteína E (DI, DII e DIII) dos flavivírus, o laço de fusão localizado na ponta do DII é o responsável pela interação e pela fusão com a membrana celular do hospedeiro, que fica exposto após a remoção do peptídeo (pr) da forma imatura do peptídeo M (prM). Acredita-se ainda que o domínio DIII se ligue aos receptores do hospedeiro (Rey, Heinz, Mandl, Kunz, & Harrison, 1995b).

O ZIKV compartilha muitas semelhanças estruturais com outros membros de seu gênero, como o tamanho das partículas imaturas e maduras (a saber, 60 e 50 nm de diâmetro, respectivamente). No entanto, alguns estudos têm sido elaborados com o objetivo de elucidar as diferenças estruturais do ZIKV que poderiam explicar os padrões de transmissão e tropismo tecidual que não são comumente observados com os demais flavivírus. Dois grupos de pesquisadores (Kostyuchenko et al., 2016a; Xiwei Zheng, Cong Bi, Marissa Brooks, 2015) demonstraram que o padrão de glicosilação da proteína do envelope (E) se mostra mais semelhante ao vírus neurovirulento WNV, tendo como local de glicosilação o resíduo de asparagina 154 (Asn154), enquanto que DENV tem dois, em Asn67 e Asn154. De acordo com os autores, estes têm sido demonstrados como locais importantes para a ligação de receptores específicos da membrana plasmática do hospedeiro, e diferenças no padrão de glicosilação da proteína E de vários flavivírus poderiam explicar diferenças no seu tropismo celular.

Muita ênfase foi colocada na termoestabilidade do ZIKV em comparação com o DENV. Entretanto, não está claro como a termoestabilidade poderia explicar totalmente a capacidade do ZIKV de infectar o trato geniturinário e ainda persistir em várias secreções corporais, tais como muco cervical, esperma e urina (Goo et al., 2016; Xie et al., 2017). Além disso, a estabilidade química pode ser considerada igualmente, ou se não ainda mais importante neste processo. Com o pH variando em torno de 4,4 na vagina, a aproximadamente 7,9 nas Trompas de Falópio (Ng, Mingels, Morgan, Macklon, & Cheong, 2018), pode-se supor que as características estruturais exclusivas do ZIKV toARN-o mais apto a prosperar em condições diversas do pH, como as observadas no trato reprodutivo feminino.

O genoma viral contido dentro do envelope viral forma um complexo junto com a proteína capsidial (C), que juntos formam a ribonucleoproteína viral (RNP). C é uma

proteína dimérica básica de 12 kDa, com distribuição assimétrica de carga, sugerindo que o lado da proteína que tem um alto número de resíduos carregados positivamente interaja com o ARN viral, e o outro lado, que é não-polar, deve interagir com a membrana, e talvez também com a proteína E. Desta forma, presume-se que a composição do interior viral seja de um genoma viral associado com várias centenas de cópias de proteína C (Ma, Jones, Groesch, Kuhn, & Post, 2004).

O genoma flaviviral é composto por ARN de fita positiva contendo uma estrutura cap tipo I em seu final de 5'. O genoma viral codifica uma única poliproteína, que é co- e pós-translacionalmente clivada tanto por proteases virais quanto por proteases hospedeiras, levando à formação de 10 proteínas virais maduras: C, prM, E, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 (Rice et al., 1985). Flanqueando a região codificadora de proteínas do genoma viral estão duas UTR's altamente estruturadas de aproximadamente 100 nucleotídeos no final de 5' do genoma e de 400–700 nucleotídeos do final 3'. A região terminal 5' do genoma pode ser dividida em dois domínios. O primeiro desses domínios está todo dentro do 5' UTR e contém o *stemLoop* ramificado estrutura A (SLA), característica conservada em todo o gênero flavivírus (Lodeiro, Filomatori, & Gamarnik, 2009). O SLA serve como um promotor para a replicação viral, provavelmente através do recrutamento direto da RdRP (NS5) (Ns, Bujalowski, Bujalowski, & Choi, 2017).

Um ou mais fatores da superfície celular do hospedeiro podem ser reconhecidos pelo envelope viral, o que vai permitir, então, a entrada do vírus na célula. Os fatores de superfície celular, tanto de hospedeiros de insetos quanto de mamíferos que se encontram envolvidos no reconhecimento do envelope viral, bem como as mudanças conformacionais observadas nas proteínas durante a entrada do vírus são de grande interesse para o desenvolvimento de potenciais alvos antivirais para vacinas e medicamentos. Os heparan sulfatos foram propostos como fatores de fixação viral para DENV, enquanto proteínas da família do choque térmico foram identificadas como parte do complexo receptor em células de mosquitos (Germi et al., 2002). Pesquisas subsequentes demonstraram que os quatro sorotipos do DENV podem entrar nas células de mamíferos e insetos usando muitos receptores diferentes, e conclusões semelhantes foram encontradas para outros flavivírus (Cruz-Oliveira et al., 2015).

O ZIKV constitui-se num estudo de caso desafiador para o entendimento acerca do mecanismo de entrada viral, e representa uma área de intensa investigação. O

ZIKV pode infectar um subconjunto de monócitos na maioria dos indivíduos (Foo et al., 2017; Michlmayr, Andrade, Gonzalez, & Balmaseda, 2018). No entanto, também é capaz de infectar e atravessar células de tecidos placentários, levando eventualmente a uma grave infecção neural no feto em desenvolvimento (Michlmayr et al., 2018). Em alguns modelos de estudo *in vitro* utilizando células de mamíferos, a proteína AXL foi proposta como um importante receptor para ZIKV (Savidis et al., 2016). No entanto, em outros modelos de estudo, o ZIKV é capaz de infectar células neurais, células progenitoras que não expressam a proteína AXL (-/-) *in vitro*, sendo capaz, inclusive, de causar patogênese em um modelo *in vivo* de camundongo *knockout* para AXL (Wells et al., 2016). Esses resultados demonstram que a proteína AXL pode não ser o único receptor para o ZIKV.

A heterogeneidade do receptor usado pelo ZIKV é consistente com as observações sobre os receptores para DENV. A manifestação de dengue grave tem sido associada à presença de anticorpos anti-DENV não neutralizantes produzidos após a infecção com um sorotipo heterólogo de DENV. Este fenômeno, denominado “*enhancement*” dependente de anticorpo (ADE) (Halstead, 1977), fornece um mecanismo alternativo de entrada do DENV, usando as interações anticorpo-receptor Fc (Guzman, Alvarez, & Halstead, 2013). Esse fenômeno pode não estar restrito somente aos sorotipos de DENV, e o aumento pode ser mediado por anticorpos para flavivírus heterólogos (Low et al., 2015).

Com base nessas observações, surgiu uma hipótese interessante que pode explicar como o ZIKV pode atravessar a barreira placentária, levando a uma infecção fetal grave. No Brasil, gestantes com imunidade pré-existente ao DENV foram infectadas pelo ZIKV, e nessas circunstâncias, os anticorpos heterólogos anti-DENV poderiam aumentar a infecção pelo ZIKV em um subgrupo de células da mãe que expressam o receptor Fc, que ao se inserirem na placenta, expõem o feto ao contato com o ZIKV (Dejnirattisai et al., 2016; Low et al., 2015). No entanto, evidência *in vivo* em primatas e humanos não corroboram esses achados, deixando a questão ainda sem solução (Pantoja et al., 2017; Terzian et al., 2017). A dificuldade em confirmar o ADE em casos humanos pode estar associada ao fato de que o fenômeno só pode ser observado em uma faixa de títulos de anticorpos muito restrita, fazendo com que a questão permaneça em aberto (Leah C. Katzelnick, Lionel Gresh, M. Elizabeth Halloran & Guillermina Kuan, Aubree Gordon, 2015).



A adsorção do flavivírus na superfície celular ocorre via interação com fatores de adesão. Subsequentemente, a endocitose mediada por receptor é a via primária através da qual os flavivírus são internalizados (Acosta, Castilla, & Damonte, 2008; Van Der Schaar et al., 2008). Os vírions foram observados através da técnica de microscopia eletrônica, e parecem estar aderidos à invaginações eletrodensas na superfície da célula, consistentes com fossas revestidas de clatrina, tanto em linhagens celulares de mamíferos quanto de mosquitos. Um dos resultados, que mostra a imagem de DENV2 marcado por fluorescência infectando células vivas com clatrina fluorescente, demonstrou que os vírions adsorvidos são inseridos na célula por endocitose revestida com clatrina.

Os flavivírus dentro dos endossomos dependem da ATPase vacuolar celular (vATPase) para depositar seus genomas no citoplasma e conseguir efetivamente infectar uma célula. As vATPases eucarióticas são complexos de proteínas com múltiplas subunidades que bombeiam prótons para o endossoma, resultando na redução do pH endossômico (Forgac, 2007). A acidificação do endossoma causa a fusão dependente do pH da membrana viral com a membrana endossomal. Em resposta à acidificação do endossoma, rearranjos estruturais na proteína E trazem as membranas endossômicas em uma posição suficientemente próxima, de modo que a fusão espontânea com a membrana endossomal celular ocorra, com a liberação subsequente do RNP viral no citoplasma.

Embora o desmonte do RNP viral esteja longe de ser entendida, existe uma proposta de um modelo no qual os ribossomos conduzem a liberação da proteína C do ARN genômico (Laura A. Byk, a Néstor G. Iglesias, a Federico A. De Maio, a Leopoldo G. Gebhard, a Mario Rossi, 2016). Nesse contexto, é importante ressaltar que a infectividade específica da maioria dos flavivírus costuma ser muito baixa, e assim pode se presumir que muitos genomas que entram em uma célula não resultam em uma infecção produtiva. Desta forma, uma fração substancial dos genomas que penetram na célula é degradada, de forma dependente de ubiquitinação. As interações iniciais entre o genoma viral e as proteínas de ligação ao ARN do hospedeiro, que são críticas para determinar o curso da infecção, ainda não foram elucidadas.

O genoma viral possui um único quadro de leitura aberto que é traduzido em uma longa poliproteína. Entretanto, o processamento altamente eficiente, realizado tanto

por proteases virais quanto do hospedeiro, assegura que as proteínas virais maduras sejam produzidas muito rapidamente. O processamento é suficientemente rápido para que ninguém tenha conseguido, até o momento, relatar dados tais como o comprimento total da poliproteína como um único produto durante a infecção.

Os estágios finais do ciclo de vida dos flavivírus incluem a montagem de componentes virais para a formação de novos vírus, a maturação destes em partículas infecciosas e a liberação da célula por secreção. A montagem de flavivírus ocorre no RE, onde os genomas virais se reúnem com as proteínas C, prM e E, e penetram no lúmen do RE, levando as membranas do RE com o vírus em desenvolvimento (Roby, Setoh, Hall, & Khromykh, 2015). Utilizando a técnica de eletrotomografia, foram observados brotamentos no lúmen do RE em ambas as linhagens celulares de mamíferos e mosquitos (Junjhon et al., 2014; Welsch et al., 2009). A coexpressão de prM e E pode iniciar a formação de brotamentos virais na ausência de outras proteínas ou genomas virais, formando partículas semelhantes a vírus (VLPs).

Os flavivírus são inicialmente montados como partículas imaturas, e que amadurecem durante a saída da célula. A estrutura das partículas imaturas de DENV e YFV foi revelada através da técnica de microscopia crioeletrônica, que demonstrou que, em ambos os vírus, pontas formadas pela proteína prM se projetam da superfície, aumentando o diâmetro do vírion para cerca de 60 nm, que é maior do que os vírions maduros, que possuem apenas 50 nm de diâmetro (Y. Zhang et al., 2003). Nas partículas imaturas, as pontas de prM sugerem colaborar para a prevenção da fusão viral prematura com membranas endossômicas durante a saída do vírus. A maturação dos flavivírus começa com a exposição ao ambiente ácido da rede de Golgi e trans-Golgi. Esse baixo pH desencadeia o rearranjo conformacional de prM e E, o que torna a prM acessível à clivagem pela protease celular furina, produzindo a proteína M e o peptídeo pr, que permanece ligado ao envelope viral em pH ácido e continua a impedir a fusão viral prematura. Uma mudança de pH de ácido para neutro, na saída do vírus para o espaço extracelular, provoca a liberação do peptídeo pr da superfície viral, resultando em vírus maduro infeccioso (Oliveira, de Alencastro, & Horta, 2017).

### 1.3. A proteína NS5 de Zika

A proteína não estrutural 5 (NS5) é a maior (aproximadamente 100 KDa) e a mais conservada dentre as proteínas de ZIKV, com 94% de identidade sequencial entre as duas maiores linhagens: Asiática e Africana (A. Wang, Thurmond, Islas, Hui, & Hai, 2017). A NS5 é essencial para a replicação do genoma do ARN flaviviral. A porção N-terminal de NS5 contém uma metiltransferase (MT), e a porção C-terminal é composta por uma ARN polimerase dependente de ARN (RdRP). A MT adiciona a estrutura de *cap 5* 'ARN para facilitar a tradução da poliproteína e para diminuir a indução da resposta imune inata do hospedeiro. O RdRP inicia a síntese de ARN por um mecanismo síntese *de novo*, em que um único nucleotídeo tri-fosfatado serve como iniciador para a polimerização de nucleotídeos. O mutante nulo de NS5 MTase é letal para o vírus (ZHAO, 2017). Desta forma, a NS5 é a responsável por executar três funções essenciais ao ciclo viral: replicação genômica, capeamento e supressão da atividade do interferon (B. Wang, Thurmond, Hai, & Song, 2018), além de ser capaz de modular o mecanismo de *splicing* celular (De Maio et al., 2016).

O domínio RdRP do ZIKV NS5 (NS5-RdRP), assim como nos outros membros da família Flaviviridae, gera cópias de sentido positivo e negativo do genoma do ARN viral através de um mecanismo de síntese *de novo*, isto é, usa o ARN como molde, mas não requer um *primer* para alongar o ARN nascente (Kao, Singh, & Ecker, 2001). Acredita-se que o processo de replicação mediado por NS5-RdRP envolva três estados conformacionais distintos (Welsch et al., 2009). No primeiro estado, de pré-iniciação, a NS5 está preparada para receber os nucleotídeos iniciais, mas o túnel de saída do ARN está bloqueado. No segundo estado, o da iniciação, a estrutura secundária das regiões não traduzidas 3' e 5' (UTRs) e a ciclização do genoma permitem que a NS5 se ligue à extremidade 3' do molde de ARN viral. Enquanto isso, as moléculas de ATP e GTP entram no local ativo de NS5-RdRP para formar pares de "Watson-Crick" com as bases conservadas C e U na extremidade 3' do ARN do modelo viral. Subsequentemente, uma ligação ribose-fosfato é gerada por ataque nucleofílico pelo grupo álcool ativado da adenina ribose no  $\alpha$ -fosfato de guanina. Esses dois nucleotídeos servem como *primer* dinucleotídeo inicial. No terceiro estado, o do alongamento, o túnel de saída de ARN do NS5 se abre, garantindo o processamento da polimerização do ARN. É provável que fatores virais adicionais também estejam envolvidos na facilitação da replicação do ARN do ZIKV, como

observado em outros flavivírus. Por exemplo, a NS3 codifica um domínio de helicase, que é essencial para desenrolar o ARN intermediário de cadeia dupla (ds), formado durante a síntese do genoma. Além disso, a proteína NS4B foi relatada como uma das envolvidas nas alterações de membrana e na ancoragem do complexo de replicação viral na membrana celular (Ranjith-Kumar, Gutshall, Kim, Sarisky, & Kao, 2002).

A atividade da metiltransferase apresentada pelo domínio da metiltransferase N-terminal (MTase) de NS5 é necessária para as etapas finais na geração do *capping* tipo I 5'. Com base em estudos realizados *in vitro*, observa-se que o domínio MTase é capaz de mediar a metilação do átomo N7 da capa guanina (G0) e do átomo 2'-O da ribose adenina (o primeiro nucleotídeo do genoma viral), por meio de uma reação de duas etapas. Além disso, a porção N-terminal da MTase serve como uma guanililtransferase, que usa o GTP como substrato para formar um intermediário NS5-GMP covalente, seguido pela transferência do GMP de NS5 para o final de um transcrito de ARN aceitador (Issur et al., 2009).

As citocinas interferon do tipo I- $\alpha$  e - $\beta$  (IFN- $\alpha$  e  $\beta$ ) desempenham um papel crítico no controle da infecção viral, e para estabelecer a infecção, os flavivírus desenvolveram vários mecanismos de evasão do sistema imune do hospedeiro para suprimir as respostas antivirais do IFN tipo I (García-Sastre & Biron, 2006). Em particular, as proteínas NS5 de DENV e de ZIKV são capazes de inibir as respostas celulares induzidas pelo INF-I, ligando o transdutor de sinal do hospedeiro e o ativador da transcrição 2 (STAT2) e direcionando-o para a degradação dependente do proteassoma (Ashour, Laurent-Rolle, Shi, & Garcia-Sastre, 2009; Grant, Ponia, Tripathi, Balasubramaniam, Miorin, Sourisseau, Schwarz, Paz Sánchez-Seco, et al., 2016). A proteína NS5 do DENV também interage com o hospedeiro E3 ubiquitina-proteína ligase (UBR4), um componente do proteassoma do hospedeiro que é necessário para a degradação de STAT2 mediada por NS5 do DENV (Grant, Ponia, Tripathi, Balasubramaniam, Miorin, Sourisseau, Schwarz, Sánchez-Seco, et al., 2016). De acordo com os autores, além de recrutar o UBR4, a proteína NS5 do DENV deve ser amadurecida proteoliticamente em sua porção N-terminal para que ocorra a degradação de STAT2. O mapeamento de domínio revelou que os dez primeiros aminoácidos do NS5 do DENV são necessários para a degradação do STAT2, mas não para a ligação do STAT2, consistente com o fato de que esses resíduos são essenciais para a interação do UBR4. Os autores sugerem que o local de ligação de

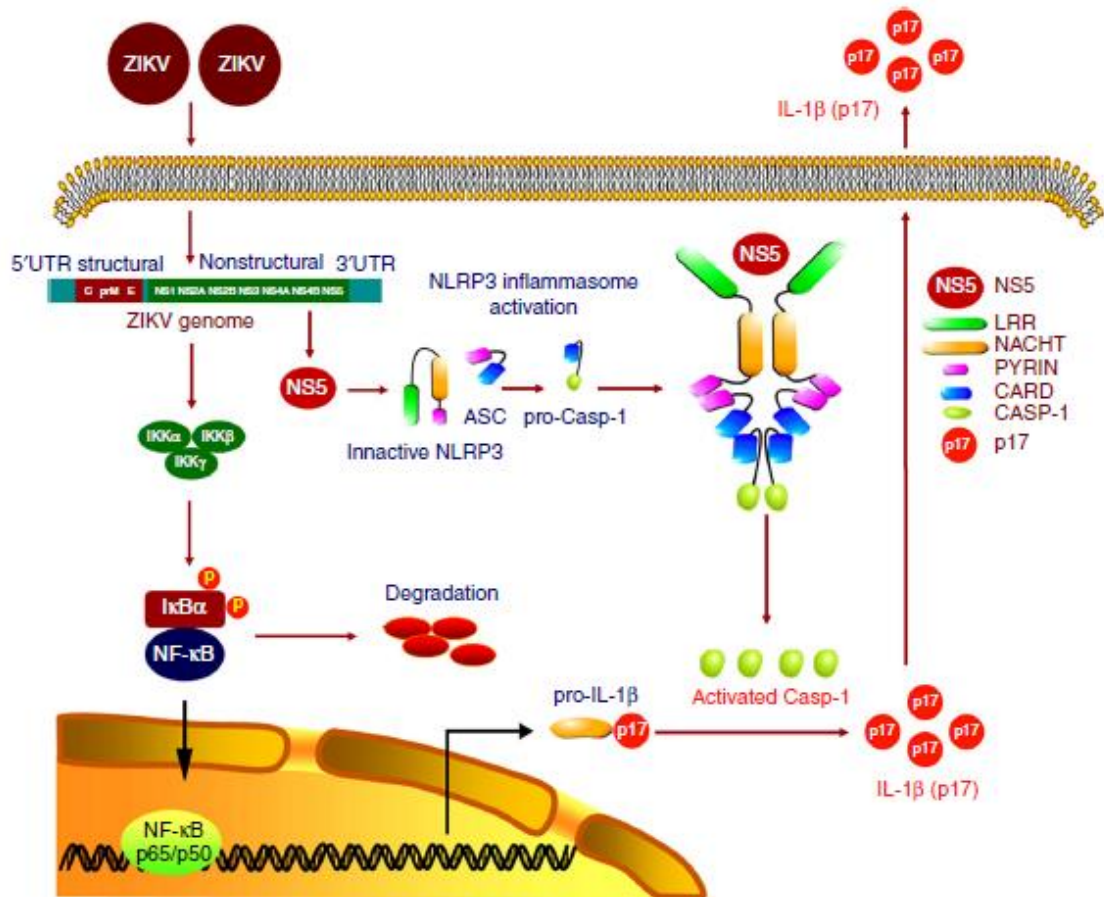
STAT2 de NS5 do DENV esteja localizado na região entre os domínios MTase e RdRP. No entanto, os aminoácidos exatos necessários para a interação STAT2 ainda precisam ser elucidados.

Em contraste com DENV, o processamento proteolítico N-terminal de NS5 de ZIKV não é necessário para a degradação de STAT2. E embora tenha sido demonstrado que a degradação de STAT2 mediada por NS5 de ZIKV seja dependente de proteassoma, o mesmo processo não se mostra dependente de UBR4, e o componente preciso do proteassoma envolvido na degradação de STAT2 mediada por NS5 de ZIKV ainda não foi identificado (Grant, Ponia, Tripathi, Balasubramaniam, Miorin, Sourisseau, Schwarz, Sánchez-Seco, et al., 2016). Estas observações indicam que o NS5 de ZIKV usa um mecanismo distinto daquele do NS5 de DENV para degradar o STAT2. A resolução exata da região aminocítica onde ocorre a interação de NS5 de ZIKV com STAT2, e a identificação do componente do proteassoma do hospedeiro, irão contribuir para a elucidação do mecanismo de degradação empregado pela NS5 de ZIKV. Com base nestas informações, também será possível gerar uma cepa de ZIKV atenuada para uso em uma vacina, através do uso de um vírus incapaz de inibir a resposta antiviral do hospedeiro, podendo assim contribuir para o desenvolvimento de terapêuticas antivirais que visam a proteína NS5 de ZIKV.

Foi descrito recentemente que a NS5 promove o tráfego do fator de *splicing* SC35, rico em serina/arginina, do núcleo para o citoplasma, reduzindo o nível total da proteína SR35, e sugerindo que a NS5 pode desempenhar um papel importante na regulação do processamento gênico nas células hospedeiras (HOU *et al.*, 2017). Também foi descrito que a NS5 tem como alvo o transdutor de sinal humano e ativador do fator de transcrição 2 (STAT2), inibindo assim a sinalização do interferon tipo I (IFN-I). A NS5 participa diretamente da atividade do proteassoma, resultando na degradação do ativador de transcrição regulado pelo INF (STAT2) de humanos (GRANT *et al.*, 2016), fazendo com que a infecção pelo ZIKV evite a sinalização pelo IFN do tipo I, que é importante para a ativação completa da imunidade inata antiviral do hospedeiro.

Uma nova função para NS5 também foi recentemente descrita na regulação do inflamassoma NLRP3. De forma peculiar, a NS5 liga-se ao NLRP3, permitindo a montagem do complexo inflamassoma/NLRP3 e, formando assim, uma estrutura esférica composta por NS5/NLRP3/ASC, na qual a NS5 localiza-se no interior, NLRP3 no meio e ASC distribuídos ao redor (WANG *et al.*, 2018). A NS5 interage diretamente

com NLRP3 no citosol, mas não com ASC ou Casp-1, através dos domínios NACHT e LRR, respectivamente. Essa interação leva à ativação da secreção de interleucina 1- $\beta$  (IL1- $\beta$ ) e, conseqüentemente, à indução de respostas inflamatórias agressivas do hospedeiro, e são os principais fatores determinantes da patogenicidade do ZIKV.



**Figura 1.2.1:** Participação direta da NS5 na formação do complexo inflamassoma/NLRP3 e consequente indução da resposta inflamatória observada após infecção por ZIKV. Esquema retirado de Wang e col., 2018.

Além disso, como a NS5 é um alvo importante para linfócitos T CD4+ e CD8+, o uso da proteína como antígeno tem sido proposto como uma estratégia promissora no desenvolvimento de uma vacina contra a infecção por ZIKV, a fim de induzir uma resposta imune celular significativa em diferentes populações humanas no mundo (Franco e col., 2017).

Portanto, como a proteína NS5 do flavivírus desempenha funções cruciais para a infecção viral, além da imunossupressão nos hospedeiros, esta proteína torna-se um potencial alvo para o tratamento e diagnóstico de infecções causadas por ZIKV (ZHANG *et al.*, 2016).

#### 1.4. Aptâmeros

O termo aptâmero, derivado do latim “aptus” que significa “adaptar-se”, foi primeiramente introduzido por Szostak e Ellington (Ellington & Szostak, 1990) e Tuerk e Gold no mesmo ano (Tuerk & Gold, 1990), quando foi descrito a seleção *in vitro* de moléculas de ARN que se ligavam especificamente à alvos de interesse. Os pesquisadores observaram que aproximadamente uma dentre  $10^{10}$  moléculas de ARN de sequências aleatórias se dobrava de forma específica, criando um sítio de ligação específico para seu alvo.

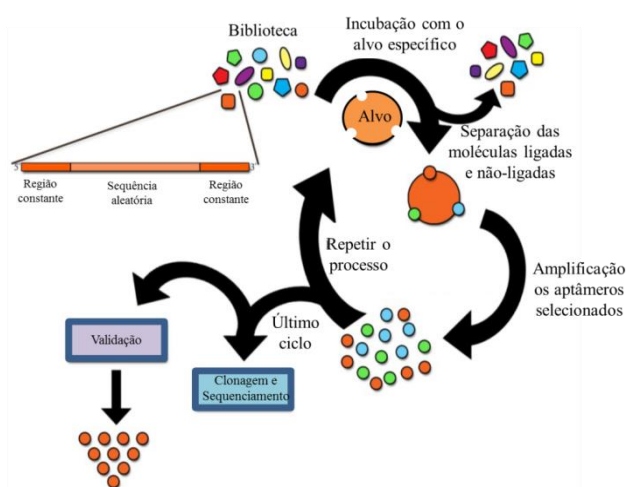
De forma geral, aptâmeros são moléculas de ARN ou ADN de fitas simples, que se ligam a uma vasta gama de ligantes com elevada especificidade e afinidade. Aptâmeros de ADN e de ARN não diferem em termos de especificidade ou afinidade, entretanto, os de ADN possuem maior estabilidade química intrínseca. Por outro lado, os de ARN têm mais flexibilidade e, portanto, produzem uma maior variedade de possíveis configurações estruturais (ROTHERHAM *et al.*, 2012).

Os aptâmeros podem ser gerados através da método de Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial (SELEX), desenvolvido por Tuerk e Gold (Tuerk & Gold, 1990) e suas variações ou por diferentes métodos não SELEX subsequentemente desenvolvidos.

O método SELEX, desenvolvido por Tuerk e Gold em 1990 (Tuerk & Gold, 1990), envolve três etapas principais: i) incubação da biblioteca de oligonucleotídeos aleatórios com o alvo; ii) separação dos oligonucleotídeos ligados dos não-ligados ao antígeno; iii) amplificação dos alvos específicos (GOPINATH, 2011). Essas etapas são geralmente repetidas de 8-15 vezes para se obterem moléculas com alta especificidade e afinidade, que serão clonadas e sequenciadas.

De forma geral, o processo de SELEX começa com a síntese de uma biblioteca de oligonucleotídeos que consiste em uma região central de sequências aleatórias (que pode conter de 20 a 90 nucleotídeos), flanqueadas por extremidades 5' e 3' de oligonucleotídeos iniciadores específicos (senso e anti-senso). Cada membro da biblioteca é constituído por um oligonucleotídeo linear com uma sequência única de nucleotídeo que adquire uma estrutura tridimensional dependendo das condições experimentais, tais como pH, força iônica, temperatura e até mesmo a presença do ligante. Entretanto, em termos práticos, a complexidade de combinações de oligonucleotídeos de uma biblioteca está limitada a  $10^{12}$ - $10^{18}$  sequências únicas (GONZÁLEZ *et al.*, 2016).

O primeiro passo para seleção consiste na incubação da molécula alvo com a biblioteca oligonucleotídica inicial em condições otimizadas de temperatura, pH e concentração de sal para o uso final do aptâmero. Sendo assim, durante cada etapa de seleção, uma subpopulação de sequências individuais interage especificamente com a molécula alvo e essa subpopulação enriquecida é isolada por técnicas físico-químicas (JIJAKLI *et. al.*, 2016). Sequências com maiores especificidades e afinidades se ligam ao alvo, enquanto outras são removidas do conjunto de sequências primárias. As sequências ligadas são posteriormente recuperadas e amplificadas através da reação em cadeia da polimerase (PCR), para um próximo ciclo de seleção, no qual condições mais restritas podem ser adicionadas para identificar as sequências de ligações de maior afinidade. Os ciclos de interações são realizados até que a população de oligonucleotídeos seja enriquecida com sequências que exibam alta afinidade e especificidade para o alvo de interesse. Normalmente, são necessários de 12 a 15 ciclos de seleção/replicação para se obter aptâmeros altamente específicos (FIGURA 1.3.1). As sequências oligonucleotídicas obtidas são então analisadas utilizando programas de bioinformática com base em algumas características que os indicam como potenciais aptâmeros.



**Figura 1.3.1:** Processo SELEX (Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial). Esquema adaptado de Wandtke *e col.*, 2015.

Durante os últimos 25 anos, surgiram vários processos SELEX modificados que permitem adaptar a tecnologia para diferentes alvos, tais como células inteiras, pequenas moléculas, corantes orgânicos e peptídeos ou para diferentes aplicações finais. Como meta final, os aptâmeros selecionados são produzidos por síntese química e purificado em alto grau, eliminando assim a variação de lote para lote encontrada quando se usa anticorpos, por exemplo.



Os aptâmeros de ADN e ARN possuem características específicas que lhes dariam vantagens para diferentes aplicações. Por exemplo, o processo de seleção de aptâmeros de ADN é mais curto e a síntese química de oligômeros de ADN é mais barata e mais fácil do que os oligômeros de ARN. Além disso, os aptâmeros de ADN geralmente têm maior estabilidade química e vida útil mais longa do que os oligômeros de ARN, e são mais resistentes à atividade das nucleases dentro dos organismos vivos. Essas características parecem conferir aos aptâmeros de ADN importantes vantagens a serem utilizadas. No entanto, os aptâmeros de ARN parecem ter maior flexibilidade quando se trata de dobrar e adquirir estruturas terciárias, e podem ser geneticamente codificados, e assim podem ser expressos diretamente pelas células ou organismos alvo. Embora seja comumente aceito que os aptâmeros de ARN sejam preferencialmente usados para terapia, enquanto os aptâmeros de ADN são preferencialmente utilizados como ferramentas de diagnóstico, existem algumas exceções a essa regra não escrita (BATES *et. al.*, 2009).

Os aptâmeros podem ser modificados individualmente para melhorar sua acessibilidade. Por exemplo, algumas modificações químicas podem ser introduzidas para elevar a estabilidade do aptâmero *in vivo*. Além disso, rotulagem de biotina e/ou digoxigenina, moléculas repórteres fluorescentes ou qualquer outro grupo químico (tióis, aminas, etc.) podem ser adicionados para fins de aplicação como biossensores, diagnóstico ou terapia. Além disso, os aptâmeros podem ser adicionalmente truncados para eliminar as sequências oligonucleotídicas que não são importantes para a interação com o alvo ou para a estrutura correta do aptâmero tridimensional (ULRICH *et. al.*, 2006). A identificação de aptâmeros truncados limitados ao domínio mínimo de interação requer esforços consideráveis, apesar de já terem sido relatados aptâmeros com menos de 40 nucleotídeos de comprimento (JENISON *et. al.*, 1998).

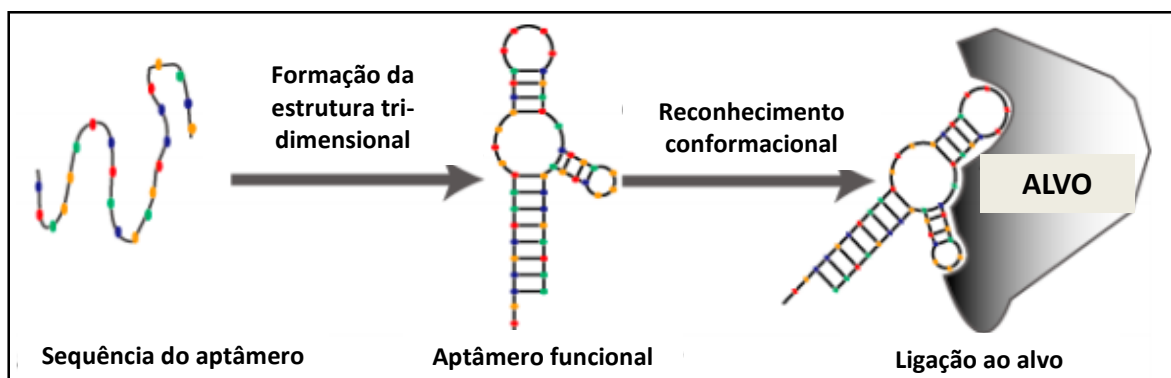
O método principal não-SELEX consiste em dois passos principais: incubação da biblioteca oligonucleotídica aleatória com o alvo e a separação de ligados dos não-ligados ao ácido nucleico, sem a necessidade de amplificação. Esses passos são geralmente repetidos três vezes, até que um conjunto de ácidos nucleicos contendo aglutinantes de alta afinidade seja obtido (BEREZOVSKI *et. al.*, 2006).

Apesar de terem funções semelhantes aos anticorpos, os aptâmeros apresentam vantagens, tais como: a) podem ser facilmente produzidos através de síntese química, o que elimina variações de lote, além de reduzir o custo e o tempo necessários para a produção; b) ao contrário dos anticorpos, que sofrem desnaturação irreversível à

temperatura ambiente ou superior, os aptâmeros mantêm suas conformações originais quando a temperatura ótima é restaurada (JAYASENA, 1999); c) apresentam baixas taxas de dissociação constante que giram em torno de pico a fentomolar (GOPINATH E KUMAR, 2013); d) possuem menor tamanho quando comparados aos anticorpos, podendo atingir alvos previamente bloqueados ou até mesmo intracelulares, além de serem menos imunogênicos do que os anticorpos (Jayasena, 1999); e) por serem ácidos nucleicos, são fáceis de serem rotulados e modificados, com uma variedade de moléculas repórter, ligantes e de outros grupos funcionais (LUZI, 2003), proporcionando, portanto, um meio simples de detecção (JAYASENA, 1999).

Os aptâmeros podem ser usados para detectar uma grande variedade de alvos, que podem variar desde pequenas moléculas até complexos supramoleculares (SHAMAH, 2008). Além disso, os aptâmeros podem discriminar entre moléculas com bastante semelhança, tais como teofilina e cafeína, que diferem por apenas um grupo metil (WANG, 2011). Devido a esta característica, os aptâmeros têm um enorme potencial para uso em tecnologias de terapêutica e de diagnóstico.

Semelhante ao reconhecimento conformacional que medeia o reconhecimento anticorpo-antígeno e a formação de complexos, os aptâmeros se ligam aos seus alvos usando alta especificidade e afinidade por meio de forças de Van der Waals, pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas e ligações entre as bases complementares (Figura 1.3.2), com constantes de dissociação de equilíbrio ( $K_d$ ) geralmente variando de pico a nanomolar. Assim, os aptâmeros são também referidos como "anticorpos químicos" e são funcionalmente utilizados como antagonistas, agonistas ou ligantes de alvos, sendo aplicados em uma variedade de ensaios bioanalíticos e biomédicos (GOPINATH, 2007; SUN E ZU, 2015).



**Figura 1.3.2:** Diagrama esquemático da conformação de um aptâmero e a ligação deste a um alvo para formar o complexo alvo-aptâmero. Fonte: (adaptado de Sun e Zu, 2015)

Do ponto de vista terapêutico, os aptâmeros oferecem uma solução esperançosa para o tratamento de doenças virais, porque podem ter como alvo elementos do vírus ou da célula hospedeira infectada mais facilmente que os anticorpos, principalmente em função de seu pequeno tamanho. O projeto potencial do uso de aptâmeros trabalhando contra diferentes alvos que possam bloquear a penetração do virion nas células ou inibir as enzimas responsáveis pela replicação viral ou outros processos críticos parece promissor (González, Elena Martín, Fernández, & García-Sacristán, 2016).

O uso mais provável de aptâmeros em diagnósticos de vírus envolve o desenvolvimento de dispositivos de diagnóstico mais simples, rápidos e baratos. Um desses sistemas de detecção simples pode ser o “Imunoensaio de Fluxo Lateral” (LFIA) que são atualmente usados para monitoramento qualitativo em ambientes de recursos limitados ou que não comportem uma estrutura laboratorial. A plataforma de LFIA compreende principalmente uma almofada para a amostra e outra para teste, que geralmente são compostas por uma membrana de nitrocelulose, fornecendo uma plataforma tanto para a reação quanto para a detecção (CHEN *et. al.*, 2015). O LFIA baseado em aptâmeros pode ser uma proposta interessante de plataformas de diagnóstico para uso comercial, destacando as vantagens do uso de aptâmeros sobre o uso de anticorpos como moléculas de captura do teste. Este método permite a detecção de vírus em áreas humanas endêmicas e/ou de difícil acesso, ou com infraestrutura precária.

Desta forma, os aptâmeros se apresentam como excelentes alternativas aos anticorpos monoclonais, os quais apresentam altos custos de produção e algumas limitações, dependendo do anticorpo, para serem obtidos em escala de produção, como a instabilidade ou a baixa secreção por parte do clone obtido. A especificidade de ligação dos aptâmeros têm demonstrado que eles são capazes de discriminar em até 12.000 vezes mais entre duas moléculas muito similares. Deste modo tornar-se claro que a afinidade e especificidade destas moléculas as colocam como importante tecnologia para aplicações não apenas diagnósticas e terapêuticas, como também nas aplicações bioanalíticas (SUN E ZU., 2015).

Ressalta-se que esta dissertação se propõe a fornecer dados concretos para introduzir o Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Bio-Manguinhos nesse promissor mercado de uso da tecnologia de aptâmeros, e providenciar dados sobre o possível uso da proteína NS5 do vírus Zika, e sua captura por aptâmeros, em ensaios

de Imunocromatografia de fluxo lateral, para desenvolvimento de diagnósticos na fase aguda da infecção por vírus Zika (detecção de antígeno).

### **1.5 Espectroscopia de fluorescência**

A fluorescência é uma das técnicas empregadas no estudo da interação, estrutura e função de moléculas biológicas, e é tida como um método seletivo, já que nem todas as substâncias que absorvem radiação eletromagnética são capazes de emitir fluorescência sensível, reprodutível, repetível e replicável. É de grande aplicabilidade na pesquisa de mudanças conformacionais, interações intermoleculares e localização de sítios de ligação de moléculas de interesse biológico e biomembranas. Estes conceitos, dada a sua ação, têm sido aplicados na farmacologia e toxicologia, na determinação da presença e agentes de interesse terapêutico (CORTEZ *et al.*, 2012).

A energia aplicada na manutenção e formação das moléculas, se encontra distribuída na sua constituição em níveis eletrônicos de energia, que desdobram em níveis vibracionais e rotacionais. A energia é advinda dos elétrons distribuídos nos orbitais que podem estar ocupados ou não. No estado fundamental os elétrons se distribuem de forma a minimizar a energia eletrônica e dos movimentos internos. Existe, porém, a possibilidade de ocupação de orbitais mais energéticos, se for proporcionada certa quantidade de energia. A ocupação dos níveis de maior energia é o resultado do salto de elétrons provenientes de níveis energéticos mais baixos, tal estado é denominado de excitado. O elétron excitado tende a voltar para o estado fundamental, o que geralmente ocorre por um caminho tortuoso, na qual o elétron passa para um estado metaestável, emitindo com isso energia, e deste estado volta ao estado fundamental, emitindo luz. Ao retornar ao estado não excitado, há emissão de luz correspondente à diferença de energia entre os dois. A emissão de energia é classificada como fluorescência quando o intervalo de tempo entre a captação do fóton e a emissão da energia captada é extremamente curto ( $<10^{-5}$ s, podendo ser de até  $10^{-12}$ s), e fosforescência, quando a emissão espontânea continua por períodos de tempo mais elevados - até mesmo horas, mas caracteristicamente segundos ou frações de segundos níveis.

Os compostos químicos distribuídos pelos organismos resultam especialmente do equilíbrio cinético da ligação destes às proteínas presentes no meio sanguíneo. A

albumina, principal proteína envolvida neste processo, possui na sua constituição o triptofano, um conhecido amino ácido fluorescente que permite aplicar o fenômeno da supressão na monitorização das interações com diversos ligantes e com isto inferirmos sobre o metabolismo e a eficiência de fármacos no organismo (FRAGOSO *et.al.*, 2012; CORTEZ *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2004a; 2004b).

A luz emitida ou absorvida pode ser registrada como espectros, através da captação da intensidade de luz emitida ou absorvida em função do comprimento de onda. A energia absorvida pelo elétron é decorrente da sua excitação em comprimento de onda fixo e determinado. O espectro de emissão é obtido quando a amostra, uma vez excitada, é analisada quanto à emissão em intervalo de comprimento de onda específico para a molécula em questão. Técnicas modificadas permitem o registro sincronizado da excitação e emissão denominada de bidimensional e fornecem os dados de comprimento de onda de emissão ( $\lambda_{em}$ ) e excitação ( $\lambda_{ex}$ ) paralelamente durante as análises, onde os monocromadores de excitação e emissão são escaneados sincronizadamente a um intervalo de comprimentos de onda constante, ( $\delta = \lambda_{em} - \lambda_{ex}$ ).

Compondo as proteínas existem três aminoácidos caracterizados como fluoróforos naturais, ou seja, grupamentos de uma molécula que lhes conferem a propriedade da fluorescência: o triptofano, a tirosina e a fenilalanina. Tais grupos se encontram presentes na albumina humana, conferindo a esta a propriedade de ser monitorada pelo método fluorimétrico.

Existem vários ligantes, substâncias que suprimem a emissão de fluorescência, denominadas *quenchers*, em função do grupo fluorescente estar em contato com o meio que o circunda, ou mesmo estar protegido por outras estruturas. Sendo assim, é possível afirmar que a supressão da fluorescência é resultante de qualquer processo de interação molecular por uma determinada substância que diminua a intensidade da fluorescência emitida. A supressão pode ser induzida por diferentes processos, tais como reações no estado excitado, rearranjos moleculares, transferência de energia, formação de complexo no estado fundamental e colisões moleculares (LAKOWICZ, 2006).

Os principais mecanismos da supressão da fluorescência podem ser descritos como colisional (ou dinâmica) e estática (formação de complexo). A supressão

colisional ocorre quando os fluoróforos do estado excitado são desativados após contato com alguma outra molécula denominada *quencher* ou supressor. Nesse caso, o fluoróforo retorna ao estado fundamental durante um eventual encontro com o supressor. As moléculas não são quimicamente alteradas nesse processo. Na supressão estática é formado um complexo entre o fluoróforo e o supressor, complexo este que reduz a emissão de fluorescência (LAKOWICZ, 2006).

A teoria da supressão de fluorescência por colisão descrita pela equação de Stern-Volmer, estabelece a razão entre a intensidade da fluorescência na ausência e na presença do supressor em função da concentração deste último, considerando o tempo de vida do fluoróforo na ausência do supressor, sendo representada pela seguinte equação:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K(Q)$$

Na equação,  $F_0$  e  $F$  representam as intensidades da fluorescência da proteína, respectivamente, na ausência e na presença da substância supressora;  $K$  é a constante de supressão de Stern-Volmer, que corresponde ao coeficiente angular do gráfico, e  $(Q)$  é a concentração molar do supressor.

A medida dos tempos de vida de fluorescência é o método mais adequado para a definição do tipo de supressão. A supressão estática remove uma fração da fluorescência devido ao envolvimento de parte dos fluoróforos na formação de complexo não fluorescente. A fração que não foi complexada não sofre perturbações (Chowdhry *et al.*, 2002).

A distinção entre a supressão dinâmica e a estática também pode ser feita pela análise da variação da constante de supressão com o aumento da temperatura. Como a supressão dinâmica depende da difusão do supressor através da estrutura da molécula que contém o grupamento fluorescente, o aumento da temperatura resulta no aumento dos coeficientes de difusão, devendo acarretar um maior valor da constante de supressão bimolecular, indicando a ocorrência da supressão dinâmica. Da mesma forma, o aumento da temperatura tende a diminuir a estabilidade dos complexos, diminuindo os valores das constantes de supressão estática (Chowdhry *et al.*, 2002).

Outro método para se distinguir a supressão estática da dinâmica é pelo exame acurado do espectro de absorção do fluoróforo. A supressão por colisão só afeta os estados excitados dos fluoróforos, conseqüentemente nenhuma mudança no espectro de absorção é esperada. Já a formação de complexo resulta frequentemente em perturbação do espectro de absorção do fluoróforo (LAKOWICZ, 2006).

Devemos considerar também o efeito filtro interno (EFI), que está relacionado ao conjunto de fatores presentes nas soluções que podem alterar a intensidade final da emissão de fluorescência. A necessidade de se corrigir esse efeito pode ser verificada através da medição do valor da densidade ótica (DO) da solução. A maioria dos autores concorda que o valor de densidade ótica aceitável seja menor ou igual a 0,05 de unidade de absorbância, devendo os valores de intensidade de emissão de fluorescência serem corrigidos quando a DO ultrapassar a esse limite.

Considerando que as soluções podem absorver luz tanto no comprimento de onda de excitação, quanto no de emissão, a densidade ótica deve ser medidas comprimentos de onda de excitação e emissão, a cada variação de concentração do supressor. Quando a solução absorve luz no comprimento de onda correspondente à excitação, dizemos que ela poderá sofrer um efeito filtro primário, enquanto a absorção de luz no comprimento de emissão conduz à ocorrência do efeito filtro secundário. É importante considerar, portanto, que a intensidade da fluorescência é proporcional à concentração da solução em apenas uma estreita faixa de densidade ótica (Chowdhry *et al.*, 2002).

## **2. OBJETIVO**

### **2.1- Geral**

Selecionar e caracterizar aptâmeros capazes de se ligarem a porção N-terminal (481-718 aa) da proteína recombinante NS5 do vírus Zika (rNS5z), com a finalidade de realizar estudos de detecção deste antígeno.

### **2.2- Específicos**

- Selecionar, por meio da técnica de SELEX, aptâmeros específicos para a proteína rNS5z (481-718 aa) a partir de uma biblioteca de ssADN;
- Caracterizar a ligação dos aptâmeros a proteína rNS5z (481-718 aa) por meio da determinação da constante de Stern-Volmer empregando espectroscopia de fluorescência;
- Caracterizar a ligação dos aptâmeros a proteína rNS5z (483-718 aa) por meio da sua interação em imunoenaios de ELISA, na presença ou ausência de proteínas séricas e/ou soro humano.



### 3. Material e Métodos

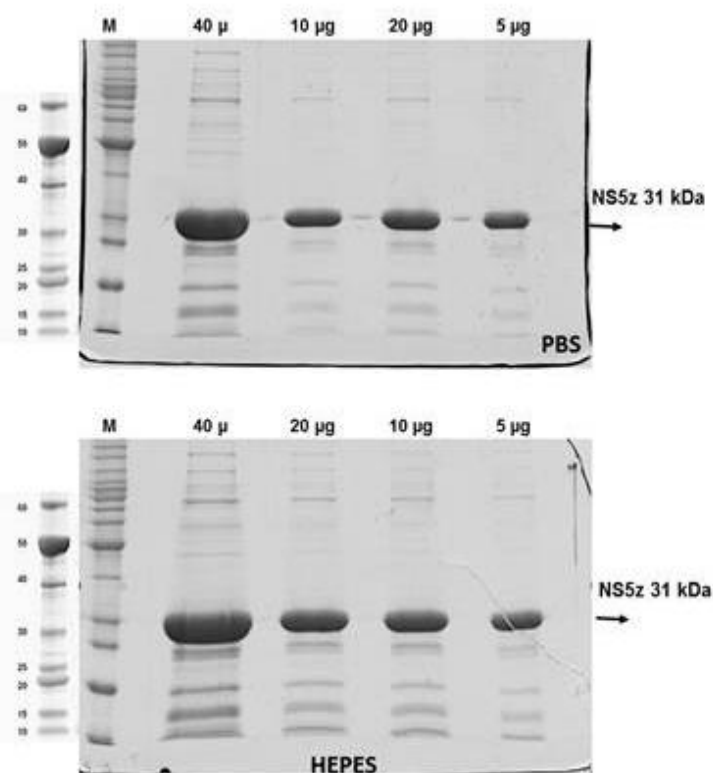
#### 3.1. Obtenção da proteína recombinante NS5 de ZIKV (rNS5z 483-718 aa )

A sequência nucleotídica do gene que codifica para a proteína NS5 do vírus Zika e para a proteína NS5 dos quatro sorotipos do vírus dengue foram analisadas pelo grupo de pesquisa do Dr. José Mauro Peralta (UFRJ). O grupo identificou uma região de 714 nucleotídeos (correspondendo a 238 aa) responsável pela expressão de parte da região C-terminal da proteína NS5 (aminoácidos 481 a 718 de um total de 903 aa da NS5 completa, NC\_012532.1, YP\_009227205) (dados não publicados). Esta região apresentou diferenças nucleotídicas capazes de distinguir NS5 de Zika da NS5 dos quatro sorotipos de dengue. Desta forma, esta região gênica otimizada para a expressão em *Escherichia coli* (*E. coli*) foi sintetizada e a construção pQE30/NS5z foi gentilmente cedida para o nosso grupo. A região nucleotídica de interesse presente no vetor pQE30 foi então sub-clonada no vetor pET28a nos sítios de restrição *Bam*HI/*Hind*III. Os plasmídeos recombinantes foram inseridos em *E. coli* BL21 Star (DE3) e a proteína recombinante, expressa a partir da indução com isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG). A fim de se obter a proteína de forma solúvel, foram testadas diferentes temperaturas de indução (15°C, 20°C, 25°C e 37°C) e diferentes tampões contendo sais, detergentes e agentes caotrópicos, no processo de lise celular. A proteína foi purificada por cromatografia de afinidade ao metal imobilizado níquel (IMAC) utilizando coluna HiTrap HP (GE HealthCare) e sistema de cromatografia líquida (FPLC – Akta Pure). A proteína obtida foi dialisada em tampões específicos para permitir o enovelamento. A parte de sub-clonagem de parte da NS5z no vetor pET28a, assim como os testes de expressão, solubilização e purificação da proteína recombinante foram realizados pela Dra. Ana Paula Corrêa Argondizzo no Laboratório de Tecnologia Recombinante no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (LATER/Bio-Manguinhos).

A bactéria *E. coli* BL21 Star (DE3) pET28a/NS5z (481-718 aa) foi cultivada em meio Terrific Broth (TB) suplementado com 1% glicose, 0,4% glicerol e ampicilina (100  $\mu$ g/mL) a 37°C, 200 rpm por cerca de 2 h até o crescimento atingir a fase logarítmica de crescimento ( $Abs_{600} \sim 0,6-0,8$ ). Nesse momento a expressão da proteína recombinante foi induzida pela adição de 1 mM de IPTG (isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo) e o cultivo mantido por mais 4 h a 37°C, 200 rpm. Ao final do processo as bactérias foram sedimentadas e lisadas, por sonicação, em tampão

HEPES 25 mM / NaCl 200 mM / glicerol 10% / MgCl<sub>2</sub> 10 mM / triton x-100 0,1% / n-lauril-sarcosil 3% pH7,0. O lisado foi centrifugado e o sobrenadante, contendo a proteína recombinante solúvel, aplicado em coluna HisTrap HP carregada com o íon níquel (GE HealthCare). A proteína de interesse foi eluída com 0,5 M de imidazol em tampão HEPES 25 mM / NaCl 200 mM / n-lauril-sarcosil 1% pH7,0. Após a proteína foi dialisada em dois diferentes tampões: PBS / 5% glicerol pH7,4 e HEPES 25 mM / NaCl 200 mM / 5% glicerol pH7,0. A homogeneidade da proteína recombinante obtida foi avaliada por eletroforese em gel de SDS-Page 12% seguida por análise de densitometria, utilizando-se concentrações totais de 40, 20,10 e 5 µg de proteína purificada e avaliação do percentual de proteína correspondente a proteína de interesse.

Para a proteína dialisada em tampão HEPES 25 mM / NaCl 200 mM / glicerol 5% pH 7,0, a homogeneidade calculada foi de cerca de 92%. Já para a proteína dialisada em tampão PBS / glicerol 5% pH 7,4, a homogeneidade observada foi de cerca de 97% (Figura 3.1).



**Figura 3.1:** Gel de SDS-Page 12% com diferentes concentrações de (rNS5z 481-718 aa). Foto gentilmente cedida pela Dra. Ana Paula Corrêa Argondizzo (dados não publicados).

### 3.2. Seleção de aptâmeros capazes de se ligar a proteína rNS5z (483-718 aa)

Para a imobilização da proteína foram utilizadas placas de microtitulação e colunas de cromatografia HiTrap NHS, de acordo com o protocolo descrito por Ferreira e colaboradores em 2006 (Ferreira *et. al.*, 2006). Em ambos os casos, o processo utilizou uma biblioteca de ADN fita simples (ssADN) para a metodologia de SELEX.

Na seleção em placa, a proteína rNS5z (481 a 718 aa) foi imobilizada em uma microplaca de 96 poços com a concentração de 300 ng/poço em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6 e incubada por 16-18 h. Uma biblioteca de ssADN foi adicionada aos poços e deixada para reagir durante 1 h (4-8°C). Após três lavagens com PBS pH 7,4 as sequências de ssADN foram eluídas utilizando concentrações crescentes de sal, a primeira composta por cloreto de sódio (NaCl) a 0,5 M (para o rompimento das ligações fracas), seguida de NaCl 1,5 M (para o rompimento das ligações iônicas intermediárias à fortes), e finalmente tiocianato de sódio (NaSCN) a 3M (agente caotrópico que dissocia as demais ligações). As amostras foram então dessalinizadas com coluna de 5 kDa vivaspín (GE HealthCare) e amplificadas através do método de reação em cadeia da polimerase (PCR) assimétrica (para amplificação de ssADN) utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos (senso 5'GGGAGACAAGAATAACGCTAAA3' e anti-senso 5'TTCGACAGGAGGCTCACAACAGGC3'). Ressaltando que, nesta etapa, as amostras de 1,5 M NaCl e 3 M tiocianato de sódio são misturadas e dessalinizadas para posterior amplificação. Apenas no último ciclo é que as dessalinizações são feitas de modo individual e amplificadas de modo individual, igualmente.

Este ciclo de seleção foi repetido sete vezes, sendo que a cada ciclo, a proteína recombinante foi incubada com a sub-biblioteca de aptâmeros gerada a cada ciclo. No sétimo dia de SELEX (sétimo ciclo), os aptâmeros foram eluídos com uma concentração crescente de NaCl (1,25M; 1,375M e 1,5 M) e NaSCN (3 M). Os produtos foram dessalinizados e com estes foram realizadas reações de PCR simétrica (para gerar o dsADN). Os produtos gerados foram clonados, individualmente, no vetor pCR2.1 TOPO (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante.

Aptâmeros também foram selecionados utilizando coluna de afinidade HiTrap<sup>TM</sup> NHS-Sepharose (1mL) (GE Healthcare), a qual é composta por uma matriz base de sepharose ativada pelo NHS (N-hidroxissuccinimida éster). Esta esterificação leva à formação de ésteres ativados, que reagem de forma rápida e eficiente com ligantes que contenham grupos amino, resultando em uma ligação amida muito estável. A

natureza dos carboidratos da agarose fornece ainda um efeito hidrofílico, além de um ambiente quimicamente favorável ao acoplamento, enquanto a interligação da estrutura da matriz esférica de 34 µm garante uma excelente propriedade cromatográfica considerada de alta performance. Desta forma, ligantes contendo grupos amino primários são fáceis de imobilizar nesta coluna, com alto desempenho.

Sendo assim, para o SELEX de aptâmeros realizado em coluna, 1 mg de rNS5z (481 a 718 aa) foi acoplada à uma coluna HiTrap™ por meio do domínio NH<sub>2</sub> presente na proteína. A biblioteca de ssADN foi diluída em tampão fosfato de sódio 10 mM pH 6,0 e aplicada à esta coluna. O material ligado à matriz foi eluído com um gradiente crescente de cloreto de sódio (1,2 e 1,5 mM), seguido da adição de sal tiocianato de sódio, sendo posteriormente dessalinizado empregando colunas Amicon Ultra-4 3 kDa (Merck) e amplificado através do método de PCR assimétrico gerando a sub-biblioteca de ssADN. Este ciclo foi repetido dez vezes. No décimo dia de SELEX (décimo dia de ciclo) foram realizadas eluições com gradiente crescente de NaCl (1M; 1,1M; 1,2M; 1,3M; 1,4M e 1,5 M) e NaSCn (3 M). Os eluídos foram dessalinizados individualmente, e aqueles das eluições de 1,5 M NaCl e 3 M tiocianato de sódio foram amplificados por PCR e clonados conforme descrito anteriormente.

### **3.3. Clonagem das sequências de ADN (aptâmeros)**

Os produtos de PCR dsDNA (aptâmeros) amplificados foram clonados no vetor pCR2.1 TOPO (Invitrogen). O vetor se baseia no emprego da enzima topoisomerase para realizar a ligação com o produto de PCR em uma única etapa. A reação de ligação foi realizada de acordo com as normas do fabricante. A seguir, um volume de 100 µL de *E. coli* TOP10 eletrocompetente foi transformada por eletroporação (DOWNER *et al.*, 1988) com 3 µL da reação de ligação, utilizando cubetas de eletroporação de 0,2 cm (Bio-Rad), transmitindo-se o pulso elétrico através do aparelho “MicroPulser” (Bio-Rad). Após o pulso, foram adicionados imediatamente 900 µL de caldo LB às células e estas foram crescidas sob agitação de 200 rpm a 37°C por 1 h. A seguir foram semeados 100 µL destas células transformadas em meio LB ágar suplementado com ampicilina na concentração de 100 µg/mL e os clones transformantes foram selecionados após 16-18 h de incubação das placas a 37°C.

### **3.4. Seleção dos clones recombinantes em *Escherichia coli* TOP10**

Prováveis clones recombinantes foram selecionados a partir das placas LB ágar/ampicilina e inoculadas, individualmente, em 4 mL de meio LB caldo, acrescido do antibiótico ampicilina, em tubos de fundo cônico de 15 mL. A incubação foi realizada a 37°C a 200 rpm por um período de 16-18 h. A seguir, foi realizada a extração do ADN plasmidial utilizando o “High Pure Plasmid Isolation Kit” (Roche) de acordo com as recomendações do fabricante.

### **3.5. Sequenciamento nucleotídico e análise preditiva de estrutura secundária**

Os plasmídeos recombinantes purificados foram quantificados pela metodologia de “Qubit dsADN HS Assay kit” (Life Technologies) e sequenciados a fim de verificarmos a integridade e sequência dos aptâmeros clonados. Para as reações de sequenciamento foi utilizada a metodologia “BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit” (Life Technologies), de acordo com as recomendações do fabricante. Ambas as fitas foram sequenciadas para resolver compressões e ambiguidades. Os genes foram sequenciados com os oligonucleotídeos iniciadores que fazem parte da própria sequência dos aptâmeros.

O sequenciamento e a leitura automática das sequências foram realizados utilizando o sequenciador “ABI PRISM® XL3500 Genetic Analyser” (Applied Biosystems, Life Technologies). Para a análise das sequências obtidas, foi utilizado o programa “SeqManII versão 5.05” (ADNStar, Inc.).

Após o sequenciamento as sequências obtidas foram analisadas utilizando-se o programa mfold para a predição da estrutura secundária de ADN (ZUKER, 2003) e alinhadas utilizando o programa ClustalW (<http://www.clustal.org>).

### **3.6. Espectroscopia de fluorescência**

Os aptâmeros foram submetidos a titulações utilizando a técnica de *quenching* de fluorescência, com o intuito de definir as constantes de afinidade destes com a proteína alvo rNS5z (481 a 718 aa), utilizando as alterações na intensidade de fluorescência após ligação.

As titulações da fluorescência foram realizadas através de adição incremental de cada aptâmero, e medindo o decaimento da intensidade de fluorescência dos resíduos de triptofano presentes na proteína rNS5z (481 a 718 aa). Os ensaios foram

realizados utilizando-se os fluorímetros modelo FP-6500 (Jasco) do Laboratório de Macromoléculas (LAMAM) de Bio-Manguinhos e o Cary Eclipse da marca Agilent da Central Analítica Professora Fernanda Coutinho do Instituto de Química da UERJ. Em ambos com a amostra presente numa cubeta de fluorescência de 1 mL. Os espectros de emissão foram adquiridos entre 300 e 400 nm, com um comprimento de onda de excitação de 290 nm, predominantemente do triptofano, e tempo de integração de 1 minuto, a incrementos de 3  $\mu\text{M}$  a 25°C e 37°C de temperatura. As fendas foram utilizadas em 5 nm. Os resultados foram analisados utilizando-se o programa Microcal Origin 6<sup>TM</sup> e a constante de associação de equilíbrio ( $K_a$ ) determinada pela equação de Stern-Volmer (LAKOWICZ, 2006).

A albumina é a principal proteína envolvida na distribuição das substâncias químicas pelos organismos, resultando no equilíbrio cinético da ligação destes compostos com as demais proteínas presentes no meio sanguíneo. E como a albumina humana (HSA) possui na sua constituição o triptofano (FRAGOSO et al., 2015; CORTEZ et al., 2012; SILVA et al., 2010a; 2010b; SILVA et al., 2004a; 2004b), ensaios de fluorimetria utilizando as alterações na intensidade de fluorescência após a adição de cada aptâmero à uma solução de HSA (6  $\mu\text{M}$ ) também foram realizados.

### **3.8. Obtenção dos anticorpos policlonais anti-rNS5z (483-718aa)**

Os camundongos foram ativamente sensibilizados através de uma injeção subcutânea (0,1mL) de uma mistura contendo 1mg de rNS5z (483-718aa) homogeneizada em hidróxido de alumínio (20%) usado como adjuvante. Após 14 dias, os animais receberam um reforço da imunização com a mesma dose da sensibilização. Durante o período das imunizações não foram observados sinais clínicos ou reações adversas nos animais. Sete dias após a última dose injetada, foi realizada a coleta do sangue dos camundongos, sendo o soro (+) obtido, aliquotado e armazenado a -20°C até o momento da utilização nos ensaios de ELISA. Os anticorpos produzidos desse modo constituem uma mistura heterogênea de imunoglobulinas específicas para diferentes epítopos de um mesmo antígeno, sendo denominado soro policlonal (Silverton e *col.*, 1977).

A determinação da diluição de trabalho foi realizada por experimentos de titulação, sendo considerada como ideal a de 1:1.600, por ser a maior diluição encontrada capaz de reagir de forma específica e adequada para a detecção primária do antígeno na placa. O soro pré-imune (-) obtido do sangue coletado dos

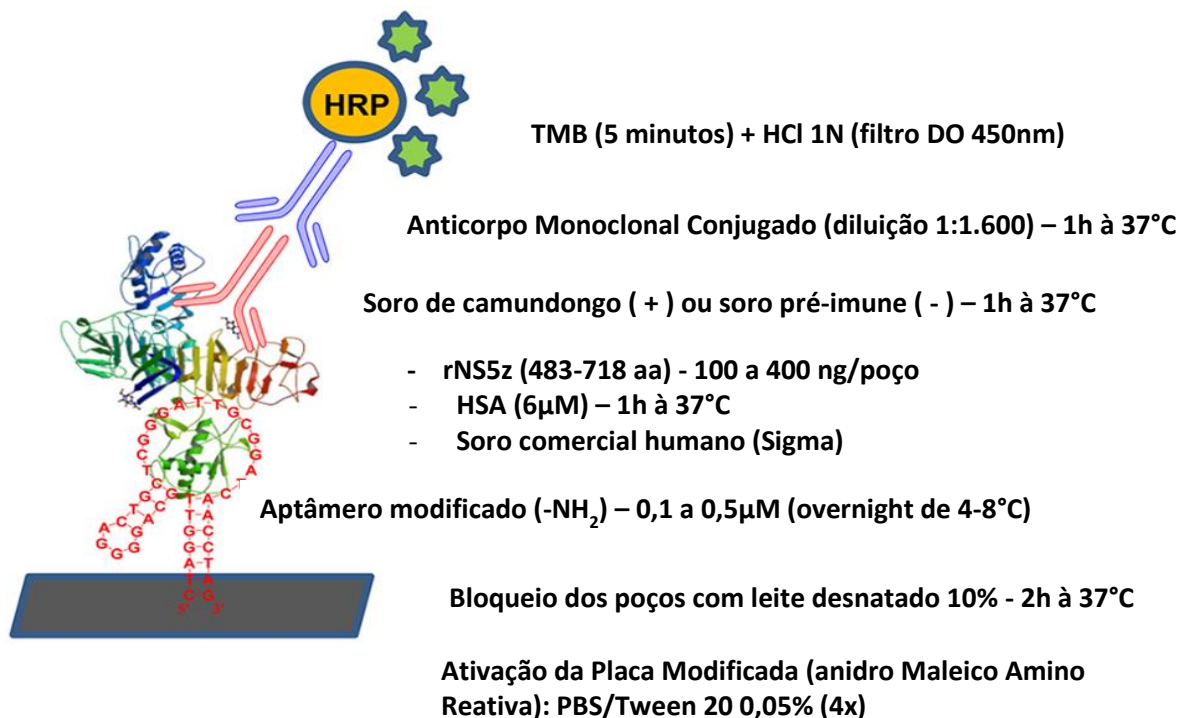
camundongos antes do início do protocolo de imunização foi utilizado como controle negativo dos experimentos. Toda a parte de experimentação animal foi realizada pela equipe técnica do LAEAN (Laboratório de Experimentação Animal de BioManguinhos/FIOCRUZ).

### 3.7. Ensaio Imunoadsorção enzimática - ELISA

Neste estudo foi utilizado um modelo semelhante ao teste de ELISA sanduíche (do inglês *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), no qual a principal modificação foi a utilização de aptâmeros (no lugar de anticorpos) para sensibilizar a placa de 96 poços de fundo chato anidrido maleico amino-reativa (Pierce, Thermo Scientific). Após ativação dos poços através de quatro lavagem com tampão PBS/Tween 20 0,05% (de acordo com as instruções do fabricante), cada aptâmero modificado (5'-amino C<sub>6</sub>-modificado) diluído em tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M (pH9,6) a uma concentração final de 0,1 $\mu$ M e 0,5 $\mu$ M (100  $\mu$ L/poço) foi utilizado para imobilização, sendo a placa deixada por 16-18h (*overnight*) a uma temperatura de 4-8°C. A seguir, a placa foi lavada por quatro vezes com tampão de lavagem PBS/tween 20 0,05% e bloqueada com 300  $\mu$ L/poço de leite em pó desnatado (10%) diluído em tampão PBS por 2 h à 37°C. A placa foi lavada novamente por quatro vezes com tampão PBS/tween 20 0,05%, e a proteína rNS5z (200 a 400 ng/poço) foi adicionada em seguida (100  $\mu$ L/poço), diluída em tampão fosfato (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 10 mM e pH7,4, sendo a placa incubada por 1 h à 37°C. Em alguns ensaios a proteína rNS5z (200 a 400 ng/poço) foi diluída em solução contendo 6  $\mu$ M de albumina humana (HSA), também diluída em tampão fosfato (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 10 mM (pH7,4). A placa foi novamente lavada por quatro vezes com tampão PBS/tween 20 0,05%, e 100  $\mu$ L de soro policlonal (+) anti-rNS5z produzido em camundongo com diluição de 1:1.600 (correspondente à diluição considerada ótima em titulações anteriores) foi adicionado a cada poço, e a placa incubada por 1 h à 37°C. Para controle negativo foi utilizado o soro pré-imune (-) na mesma diluição. Após mais quatro lavagens com tampão PBS/tween 20 0,05%, foi realizada a adição de um anticorpo monoclonal comercial (Sigma) dirigido contra imunoglobulinas (anti-IgG) de camundongo conjugado à enzima peroxidase (diluição de 1:30.000) e a placa incubada por mais 1 h à 37°C. Após realização das quatro últimas lavagens com tampão PBS/tween 20 0,05%, 100  $\mu$ L do substrato cromogênico estável comercial TMB (3,3',5,5' tetrametilbencidina contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> da BioRad), que desenvolve coloração azul na presença de conjugado

marcado com peroxidase, foi adicionado aos poços e a placa deixada por 5 minutos no escuro à temperatura ambiente. A reação foi interrompida com a adição de 50 µL de ácido clorídrico (HCl) 1 M, tornando a coloração amarelada. Os resultados foram expressos com base na leitura da densidade ótica (D.O.) em espectrofotômetro com filtro de 450 nm (Figura 3.2).

Em alguns ensaios também foram testadas amostras de soro humano comercial (Sigma) às quais foram adicionadas (*spike*) 400 ng de proteína rNS5z (481 a 718 aa), buscando desta forma mimetizar as condições reais de um teste no estado agudo da doença, e investigar a potencial interferência de elementos do soro, tais como proteínas séricas (albumina) e imunoglobulinas na sensibilidade do ensaio.



**Figura 3.2:** Esquema do Ensaio de Imunoadsorção enzimática (ELISA) utilizando aptâmeros (Adaptado de Lee & Zeng, 2017).



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Seleção de aptâmeros capazes de se ligar a proteína rNS5z (481-718 aa)

Para selecionar aptâmeros contra a proteína rNS5z, duas metodologias distintas foram utilizadas, uma com a proteína imobilizada em microplaca de ELISA e uma com a proteína imobilizada em coluna de cromatografia. Em ambas metodologias, a biblioteca de aptâmeros foi incubada com a proteína por 1 hora a temperatura ambiente, para permitir a interação entre os aptâmeros e sua proteína alvo, conforme descrito anteriormente. Os aptâmeros que são ligados por interações fracas são removidos por lavagem com tampão de interação e subsequentemente com tampão com baixa concentração de NaCl. Aptâmeros ligados com maior afinidade permanecem ligados na proteína alvo, e são eluídos com maiores concentrações de NaCl, ou NaSCN.

Na seleção em microplacas, as eluições de 1.5M NaCl e 3M NaSCN não tiveram aptâmeros identificados no gel de agarose após amplificação por PCR, e sendo assim, foram descartadas. A partir do dsADN, amplificado das eluições com 1,25 e 1,375 M de NaCl, após a técnica de SELEX em microplaca, e clonagem, um total de 80 clones bacterianos foram avaliados (extração de ADN plasmidial e sequenciamento). Após a análise de sequenciamento destes clones, 11 sequências de aptâmeros foram obtidas e sintetizadas para subsequente análise.

Para a seleção realizada em coluna, foram obtidos 21 clones para o dsADN amplificado a partir da eluição com 1,2 M de NaCl, para as eluições com 1,5 M de NaCl e 3 M de NaSCN foram avaliados 25 clones de cada. Cada sequência selecionada foi clonada no vetor pCR.1 TOPO e transformado em *Escherichia coli* TOP10. Clones foram selecionados e os plasmídeos recombinantes extraídos, quantificados e sequenciados.

Um total de 24 sequências de aptâmeros foram obtidas, sendo 6 sintetizadas após avaliações cujos critérios de escolha incluíram repetitividade e estrutura secundária do aptâmero. A seguir estão todos os alinhamentos realizados usando o programa CLUSTAL para os aptâmeros obtidos em placa (P) ou em coluna (C), sendo destacados em cinza os que foram selecionados para a síntese.

**Tabela 4.1.** Clustal analise dos aptâmeros selecionados após as duas metodologias de SELEX utilizadas para identificar homologias. Clones identificados por seleção em coluna são denominados com C, e clones identificados em placa com P.

CLUSTAL O(1.2.4) muLtipLe sequenCe Alignment

```

NS5_Zika_Clone_D04_P      -----GTTGTAGAGTCTCATTCCG---TGGTAA-----
NS5_Zika_Clone_15_C12    -----CCGTTTCAGATTTCAC---GGAATACCTA---
NS5_Zika_Clone_16_C12    -----CCGTTTCAGATTTCAC---GGAATACCTA---
NS5_Zika_Clone_7_C15     -----CGAGTAAGATAATCC---GTAAACGGTAG---
NS5_Zika_Clone_H08_P     -----GCCTCATACACACCATCTCCGCGAA-----
NS5_Zika_Clone_A03_P     -----AATCACACACTTTTTTTCCTTAATAC-----
NS5_Zika_Clone_C09_P     -----GAA-TCTTCCIGTTCACCGCAACTCG---
NS5_Zika_Clone_D09_P     -----GAA-TCTTCCIGTTCACCGCAACTCG---
NS5_Zika_Clone_4_C15     -----GTTGAGC-ACCTGTTCCCTCACGGCAC-----
NS5_Zika_Clone_25_A_C3   --CTTTCAGGGCTGTATCCTGGTA-----AGG---
NS5_Zika_Clone_18_A_C15 --ATAGTCAA-----CGTGTCCCT-----TATGCCG---
NS5_Zika_Clone_5_B_C3   ---CTGACTCCTAGGATGCTC---AAGCATG---
NS5_Zika_Clone_5_A_C3   ---ATGATCCGTCCAGTCAGGG---ACATTT---
NS5_Zika_Clone_22_C3    -----GTATTTCGTACAACCTCGGC-----ATATGGC---
NS5_Zika_Clone_B08_P    -----CCGATTGATCAGGTAC-----TAGCTGCTA---
NS5_Zika_Clone_H06_P    -ACAACGCCGG---GCGCTTGGT-----GCTGCT---
NS5_Zika_Clone_16_C3    -ATGGCGACGA---CGTTCTGGT-----GATGG---
NS5_Zika_Clone_13_C3    ---TTCGGCCGGTGTACACCCGCTGC---CC---
NS5_Zika_Clone_25_B_C3  ---GGTGTGTACCTCGGAGC---GCGAAGGG---
NS5_Zika_Clone_17_C12  --GCGTGGGTAGTGGGGCATTAGT---CAG---
NS5_Zika_Clone_23_C3   -CGTGTGTGCTAGGGGTCATGGGG---CA---
NS5_Zika_Clone_20_A_C3 -CGCGTCCCAGCTGGACCGGGCG---GA---
NS5_Zika_Clone_11_A_C15 -----GGATAAGGAACGGCTTAACGGACAC-----
NS5_Zika_Clone_13_C12  --GTGTCAGGGCGTTCTGCCCCCGC---G---
NS5_Zika_Clone_19_C12  --GTGTCAGGGCGTTCTGCCCCCGC---G---
NS5_Zika_Clone_20_C12  --GTGTCAGGGCGTTCTGCCCCCGC---G---
NS5_Zika_Clone_19_C3   ---GGGTTGAGTAGCGAGTGGTGGGGT-----
NS5_Zika_Clone_18_C_C15 ---TGATATGCGAGTCACAGGGCTCAGG-----
NS5_Zika_Clone_11_B_C15 -----CATATCAGCGGTGGAACATTCTAA-----
NS5_Zika_Clone_A04_P    ---GGCAGGTGCTGGGGAGGGT---GGAAG---
NS5_Zika_Clone_B03_P    ---TGGGCCGGGCCATCGGGGGAGCAGG-----
NS5_Zika_Clone_10_C12  ACGTGGGATGGAAGGAGGACGGCGG-----
NS5_Zika_Clone_A07_P    ACTCGGGGGCGGAGGGGGCGGCTA-----
NS5_Zika_Clone_C03_P    -----GCGTTCATGGCTGCTCGGGCGACAT-----
NS5_Zika_Clone_18_B_C15 ---GGGAGGCACGGCAGGCTAGTCGGGC-----
NS5_Zika_Clone_20_B_C3  -----GATGGACTCGGGAGAGGGGGGACA-----

```

CLUSTAL O(1.2.4) muLtipLe sequenCe Alignment

```

NS5_Zika_Clone_17_C12    GCGTG--GGTAGTGGGGCATTAGTCAG-----
NS5_Zika_Clone_15_C12    CCGTTTCAGATTTCACGGAATAC---CTA---
NS5_Zika_Clone_16_C12    CCGTTTCAGATTTCACGGAATAC---CTA---
NS5_Zika_Clone_13_C12    --GTG--T---CAGGGCGTTCTGCCCCCGC
NS5_Zika_Clone_19_C12    --GTG--T---CAGGGCGTTCTGCCCCCGC
NS5_Zika_Clone_20_C12    --GTG--T---CAGGGCGTTCTGCCCCCGC
NS5_Zika_Clone_10_C12    ACGTG--GGATGGAAGGAGGACGGCGG-----

```

CLUSTAL O(1.2.4) muLtipLe sequenCe Alignment

```

NS5_Zika_Clone_11_B_C15  -CATATCAGCGGTGGAACAT-----TCTAA-----
NS5_Zika_Clone_18_C_C15  -TGATATGCGAG-----TCACAGGGCTCAGG---
NS5_Zika_Clone_4_C15     GTTGAGC-ACCTGTTCT-CT-CAC-GGCAC-----
NS5_Zika_Clone_18_B_C15  ---GGGAGGCACGGCAGGCTAGTCGGGC-----
NS5_Zika_Clone_18_A_C15  -ATAGTCAACG-TGTCCCTT-----ATGCCG---
NS5_Zika_Clone_7_C15     -----CG-AGTAAGATAATCCGTAAACGGTAG---
NS5_Zika_Clone_11_A_C15  -----GGATAAG-GAACGGCTTAACGGACAC-----

```

CLUSTAL O(1.2.4) muLtipLe sequenCe Alignment

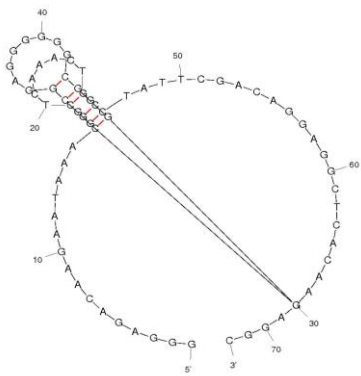
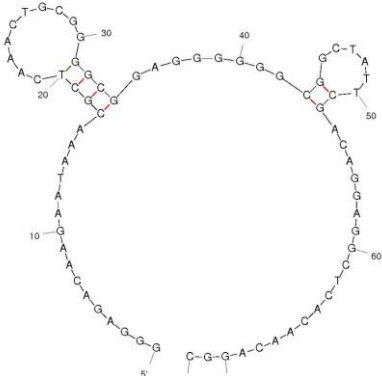
```

NS5_Zika_Clone_5_A_C3      --ATGATCCGTC--CAG--T--CAGGGACATTT--
NS5_Zika_Clone_22_C3     --GTATTCGTA--CAACTCGG--C--ATATGGC--
NS5_Zika_Clone_19_C3     ---GGG--TTGAGTAG--CGAGTGGTCCGGT--
NS5_Zika_Clone_25_B_C3   GGTGTGTA--CCTCGGAG--CGCAAGGG--
NS5_Zika_Clone_23_C3     CGTGTGIG--CTAGGGGT--CA--TGGGGCA--
NS5_Zika_Clone_20_B_C3   ---GATGGACTGCGGG---AGAGGGGGGACA--
NS5_Zika_Clone_5_B_C3   ---CTGACTCCTAGGATGCTCA--AGCATG--
NS5_Zika_Clone_13_C3    TTCGGCGGTGTACACCGCGCTGCC--
NS5_Zika_Clone_16_C3    -ATGGC--GACGACGTTT--TGGTGATGG--
NS5_Zika_Clone_25_A_C3   -C--TTT--CCAGGCTGTATCC--TGGTAAGG--
NS5_Zika_Clone_20_A_C3   -CGC--GTC--CCGAGCTGGACCG--GGCAGA--

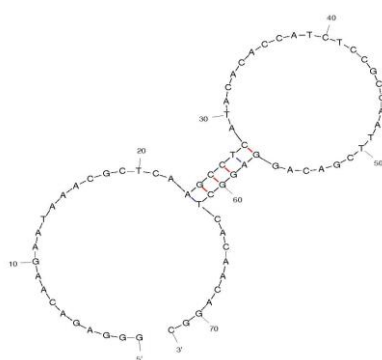
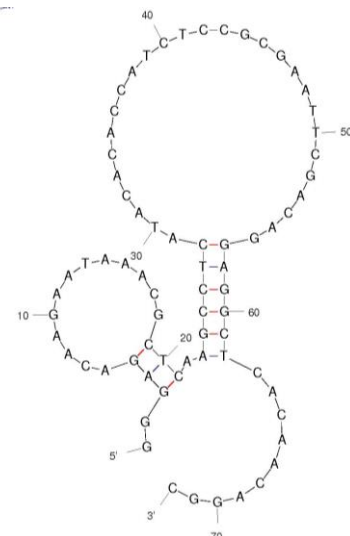
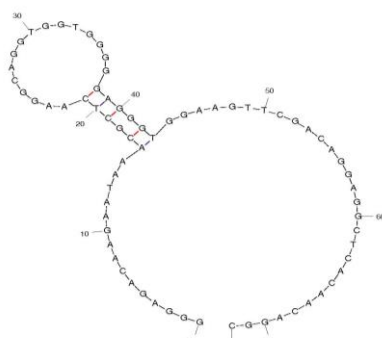
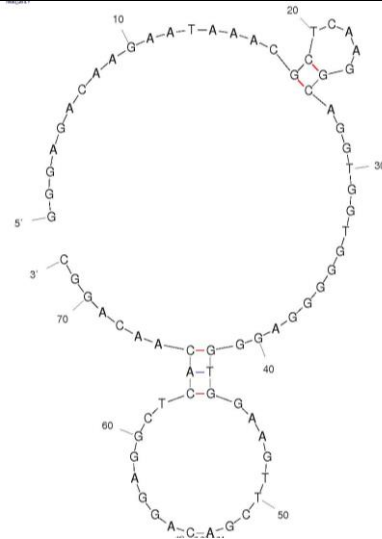
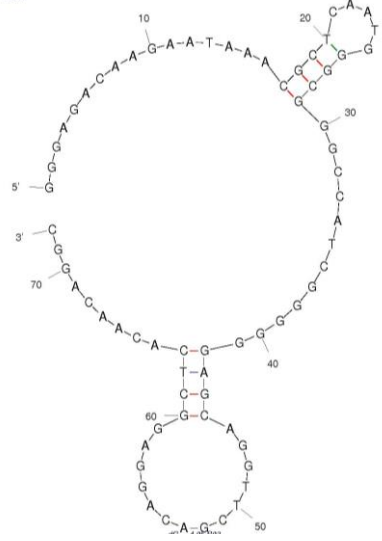
```

Em seguida, as sequências dos aptâmeros obtidos tiveram suas estruturas secundárias sugeridas através da utilização do programa mfold (<http://unafold.ARN.albany.edu>), que também forneceu os valores de  $dG$  para cada uma delas, que estão expostas a seguir, na Tabela 4.2.

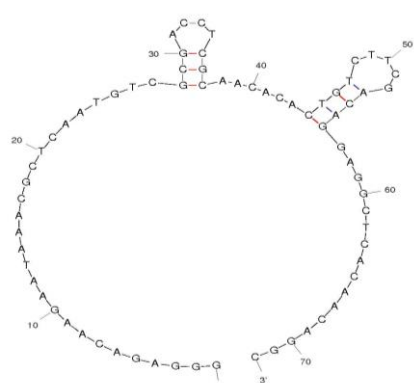
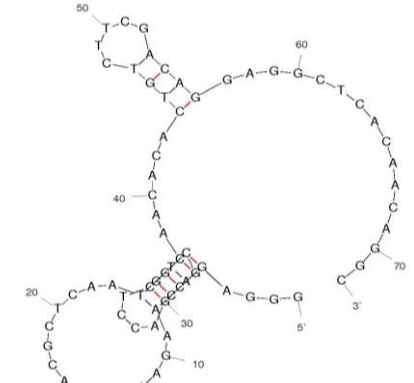
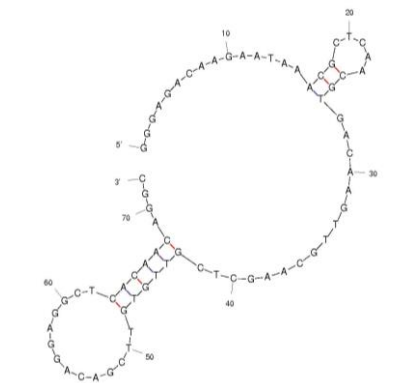
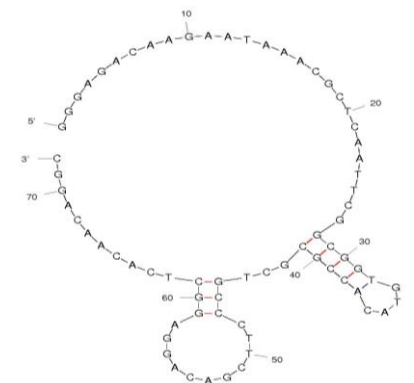
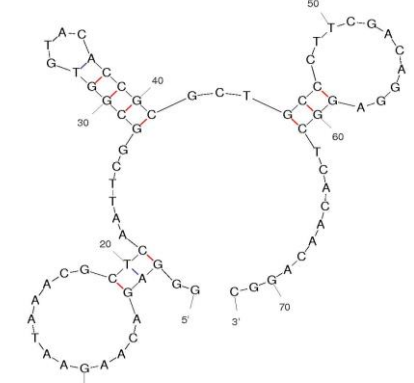
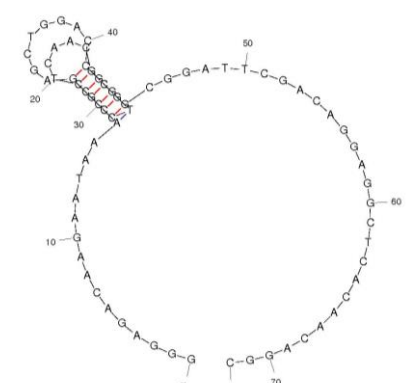
**Tabela 4.2- Estruturas dos aptâmeros e respectivos valores de  $dG$  obtidos após análise computacional mfold para ssDNA, considerando temperatura de 37°C e 100mM de sal presente.**

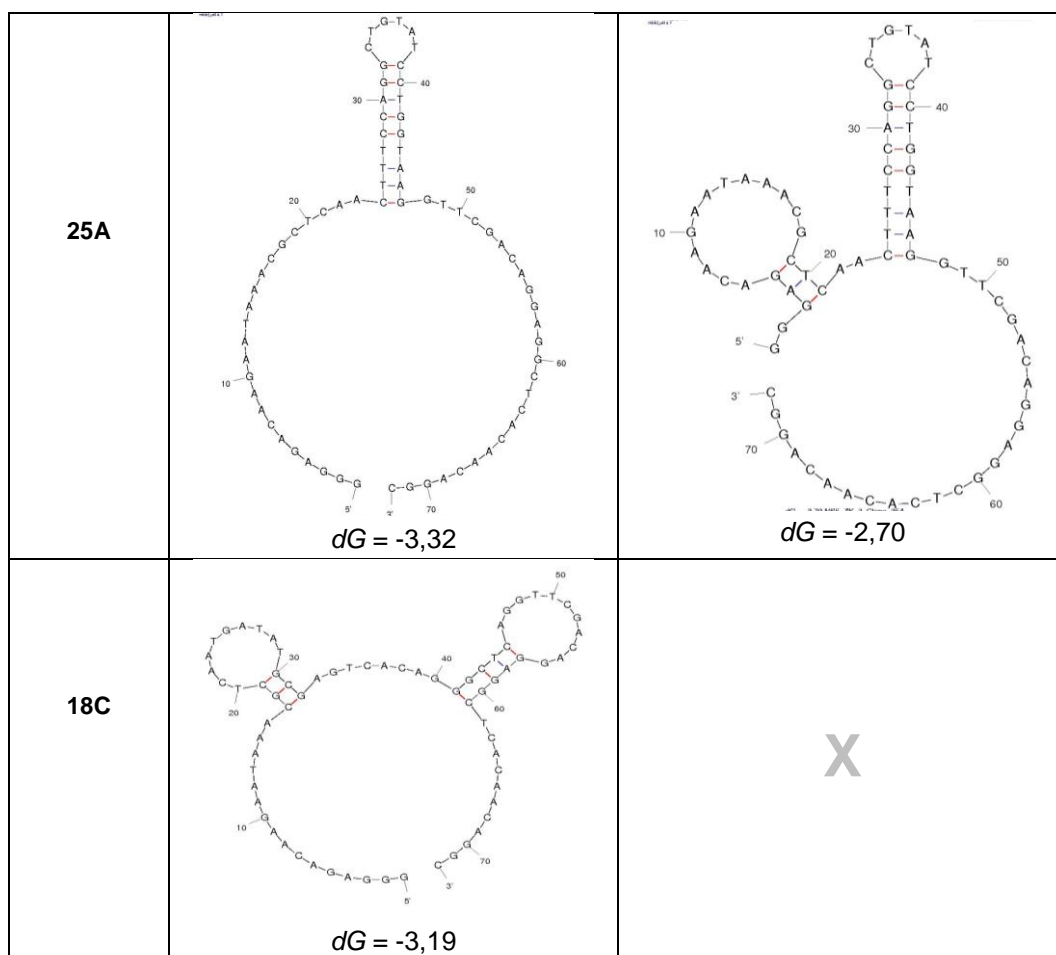
Aptâmero	Estrutura 1 (mfold)	Estrutura 2 (mfold)
A07	 <p style="text-align: center;"><math>dG = -2,45</math></p>	 <p style="text-align: center;"><math>dG = -1,66</math></p>



<p><b>H08</b></p>	 <p><math>dG = -1,93</math></p>	 <p><math>dG = -0,93</math></p>
<p><b>A04</b></p>	 <p><math>dG = -0,74</math></p>	 <p><math>dG = -0,23</math></p>
<p><b>B03</b></p>	 <p><math>dG = -4,05</math></p>	<p>X</p>



<p><b>15_16</b></p>	 <p><math>dG = -4,52</math></p>	 <p><math>dG = -4,17</math></p>
<p><b>13_19_20</b></p>	 <p><math>dG = -4,17</math></p>	<p>X</p>
<p><b>13</b></p>	 <p><math>dG = -5,41</math></p>	 <p><math>dG = -4,79</math></p>
<p><b>20A</b></p>	 <p><math>dG = -4,27</math></p>	<p>X</p>



### 4.3. Espectroscopia de fluorescência

A aquisição inicial dos dados foi realizada com a proteína rNS5z (481-718 aa) (2  $\mu\text{M}$ ) diluída em 1 mL de tampão fosfato de potássio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 10 mM (pH7,4). Após 3 min de repouso, foram sendo adicionados 3  $\mu\text{L}$  de uma solução de 100  $\mu\text{M}$  de cada aptâmero; dessa forma, os aptâmeros foram sendo titulados utilizando-se as concentrações finais de 0,3  $\mu\text{M}$ ; 0,6  $\mu\text{M}$ ; 0,9  $\mu\text{M}$ ; 1,2  $\mu\text{M}$ ; 1,5  $\mu\text{M}$ ; 1,8  $\mu\text{M}$ ; 2,1  $\mu\text{M}$ ; 2,7  $\mu\text{M}$ ; 3,3  $\mu\text{M}$ . Como a concentração da proteína era fixa a 2  $\mu\text{M}$ , a concentração de saturação das moléculas da proteína com aptâmeros (proteína:aptâmero 1:1) foi alcançada a partir do sétimo ponto da titulação. As fendas de excitação e emissão foram da ordem de 5 nm. Os espectros de emissão foram adquiridos entre 300 e 400 nm, região típica da emissão de fluorescência dos amino ácidos aromáticos, e principalmente do triptofano, sendo o comprimento de onda de excitação de 290 nm ( $\lambda_{\text{ex}}=290$  nm), nas temperaturas de 25°C e 37°C.

Utilizando a técnica de *quenching*, os dados da fluorescência foram analisados utilizando o modelo de Stern-Volmer através do programa de software Origin<sup>TM</sup>

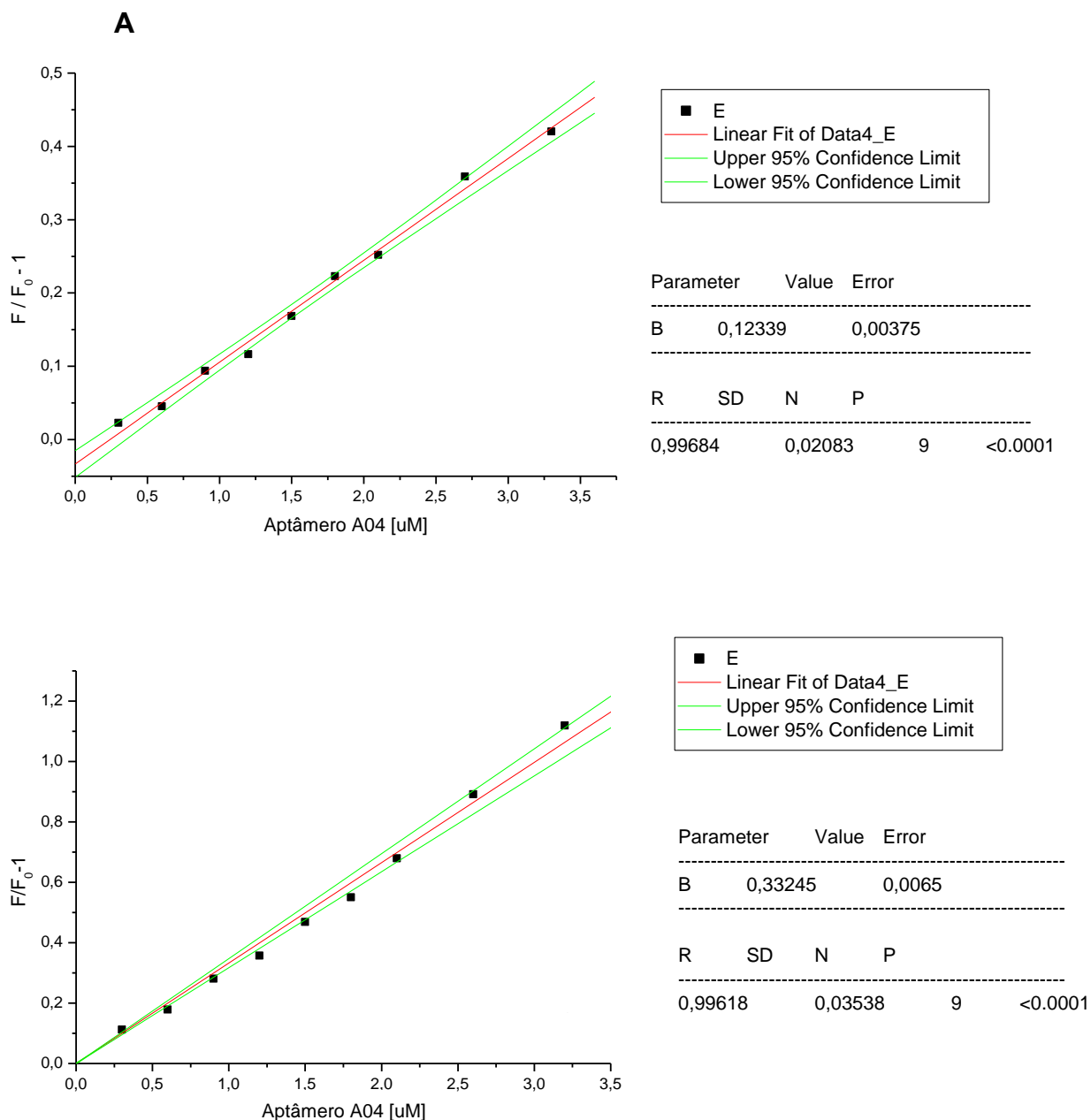


versão 6.0 da Microcal. Os gráficos foram elaborados com base no resultado da média aritmética de três replicatas realizadas para a titulação com cada aptâmero testado. Na análise dos gráficos de Stern-Volmer, os resultados foram considerados segundo a correlação linear adequada, ou seja, aqueles que apresentaram coeficientes de regressão ( $r$ ) maiores que 0,9900 e  $P < 0,0001$  (SILVA *et al.* 2003).

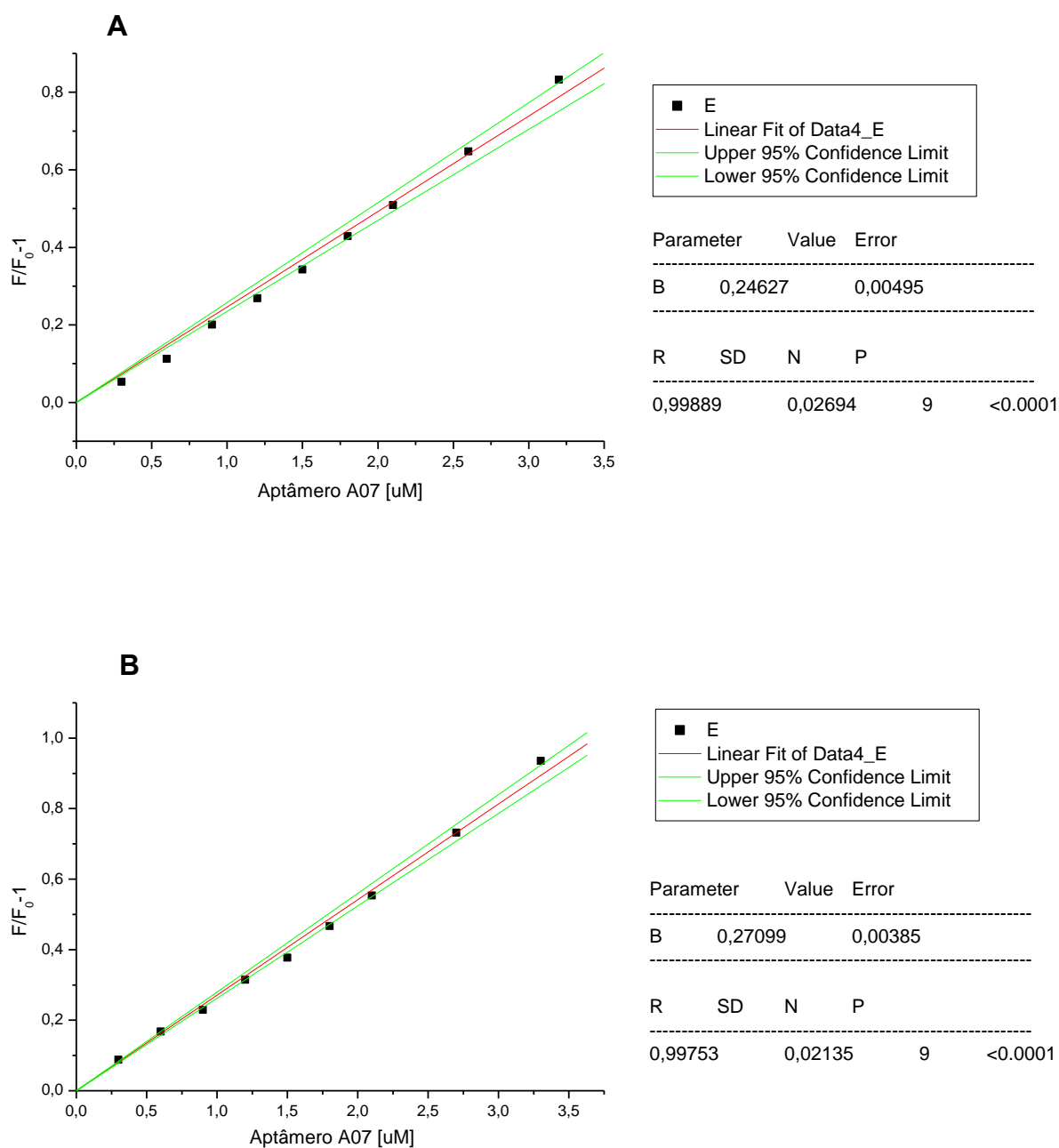
A interação de aptâmeros com a HSA, num volume de 1 ml de solução 6  $\mu\text{M}$  desta proteína, também foi estudado através da titulação nas mesmas temperaturas (25 e 37°C), seguindo o mesmo protocolo de adição de cada aptâmero na solução da proteína. A determinação do tipo de supressão da interação aptâmero-proteína (rNS5z e HSA) foram feitas por comparação dos experimentos realizados nas temperaturas de 25°C e 37°C.

Os valores obtidos para cada constante de Stern-Volmer foram calculados para os aptâmeros selecionados usando como base o resultado da média aritmética dos dados normalizados de um (temperatura à 37°C) a três experimentos (temperatura à 25°C) independentes, sendo cada um realizado com leituras feitas em duplicata. Utilizando a equação  $\frac{F_0}{F} = 1 + K[Q]$ , foi verificado que todos os aptâmeros demonstraram afinidade pelo alvo com magnitude em torno de  $10^6 \text{ M}^{-1}$ . Na análise, foram considerados com a correlação linear adequada aqueles dados que apresentaram coeficientes de regressão ( $r$ ) maiores que 0,99 ( $p < 0,0001$ ).

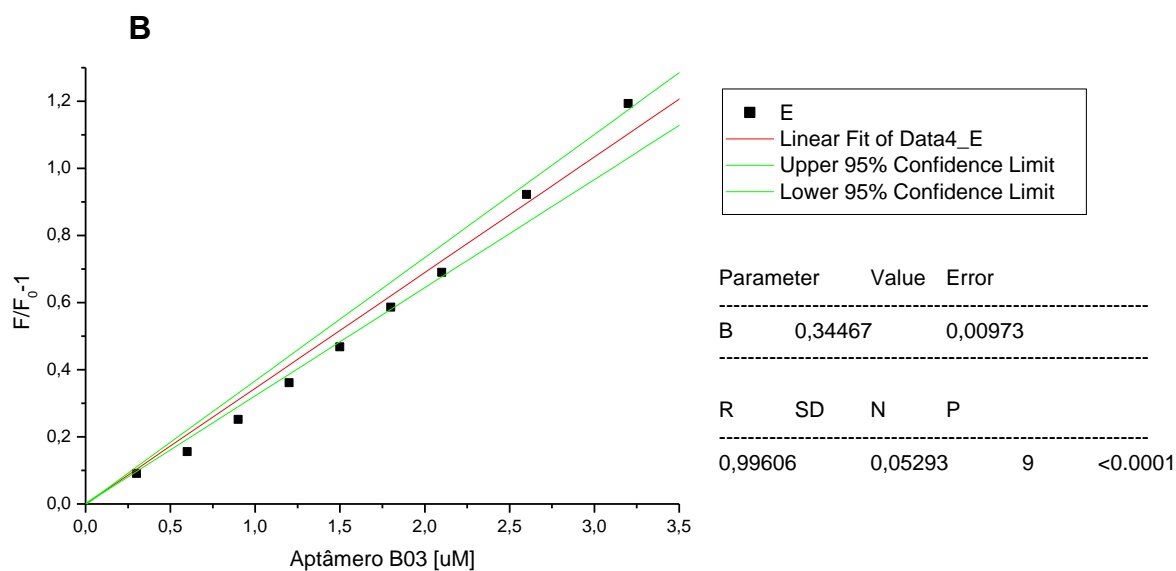
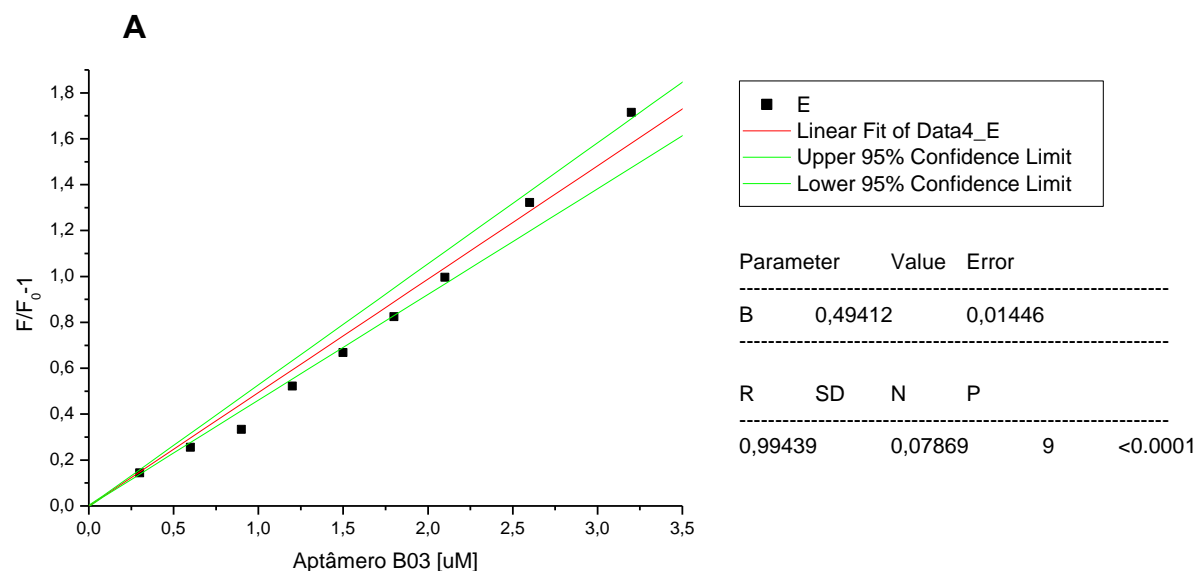
Os gráficos a seguir demonstram as análises de cada aptâmero testado com seus respectivos valores da constante de Stern-Volmer obtidas nos ensaios de fluorimetria utilizando a proteína rNS5z (481-718 aa) ou HSA. As temperaturas utilizadas durante cada experimento (25°C e 37°C) estão indicadas em cada figura.



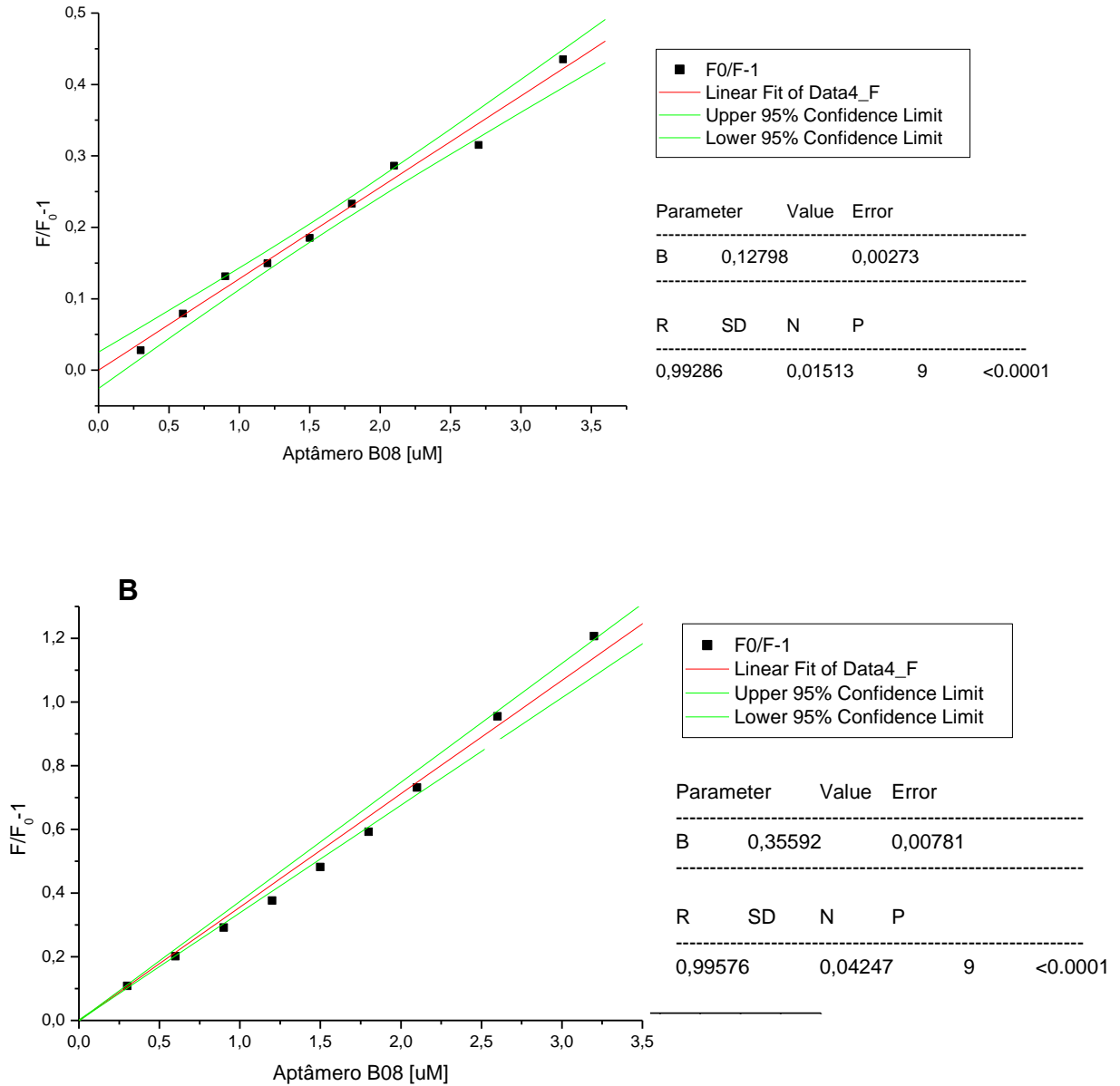
**Figura 4.3.1: Gráfico de Stern Volmer ( $K_{sv}$ ) do aptâmero A04 calculado para rNS5z (481-718 aa) 2  $\mu\text{M}$  (A) e para HSA 6  $\mu\text{M}$  (B) à temperatura de 25°C. Dentre os parâmetros demonstrados na tabela ao lado de cada gráfico, B indica o valor calculado da constante de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ )  $\times 10^6 \text{ M}^{-1}$ . A linha vermelha representa o coeficiente de angulação; em verde estão as linhas de intervalo de confiança; e os quadrados em preto indicam as concentrações crescentes de titulação do aptâmero. A correlação linear é considerada adequada quando os dados apresentaram coeficientes de regressão (R) maiores que 0,99 e  $p < 0,0001$ .**



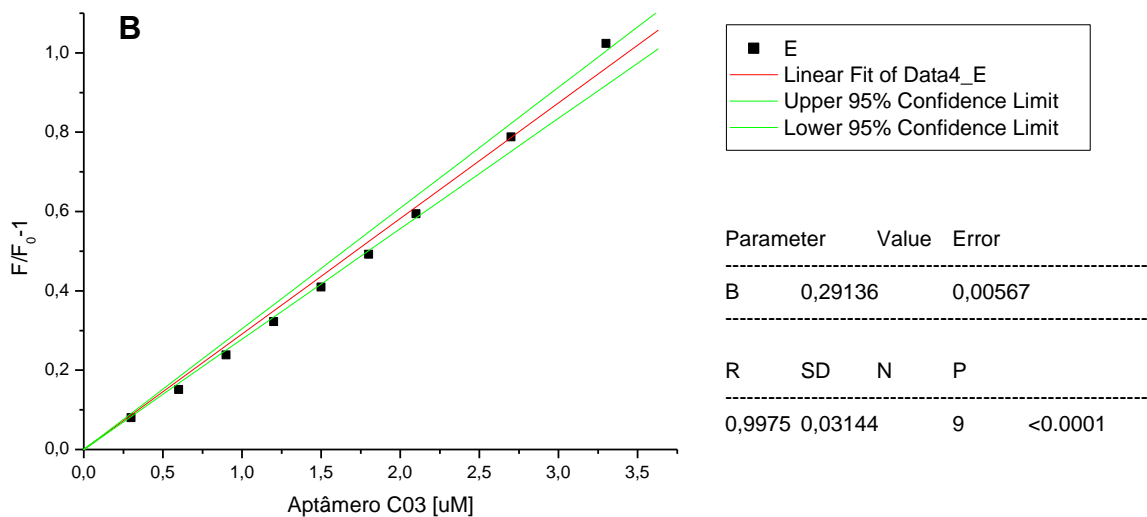
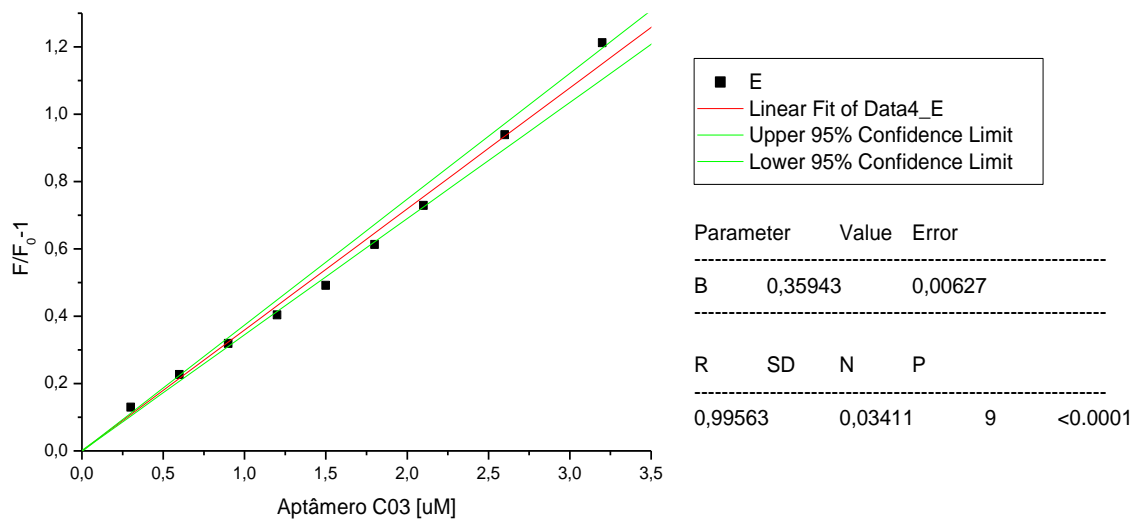
**Figura 4.3.2: Gráfico de Stern Volmer ( $K_{sv}$ ) do aptâmero A07 calculado para rNS5z (483-718 aa) 2 $\mu$ M (A) e para HSA 6  $\mu$ M (B) à temperatura de 25°C. Dentre os parâmetros demonstrados na tabela ao lado de cada gráfico, B indica o valor calculado da constante de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) x 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>. A linha vermelha representa o coeficiente de angulação; em verde estão as linhas de intervalo de confiança; e os quadrados em preto indicam as concentrações crescentes de titulação do aptâmero. A correlação linear é considerada adequada quando os dados apresentaram coeficientes de regressão (R) maiores que 0,99 e  $p < 0,0001$ .**



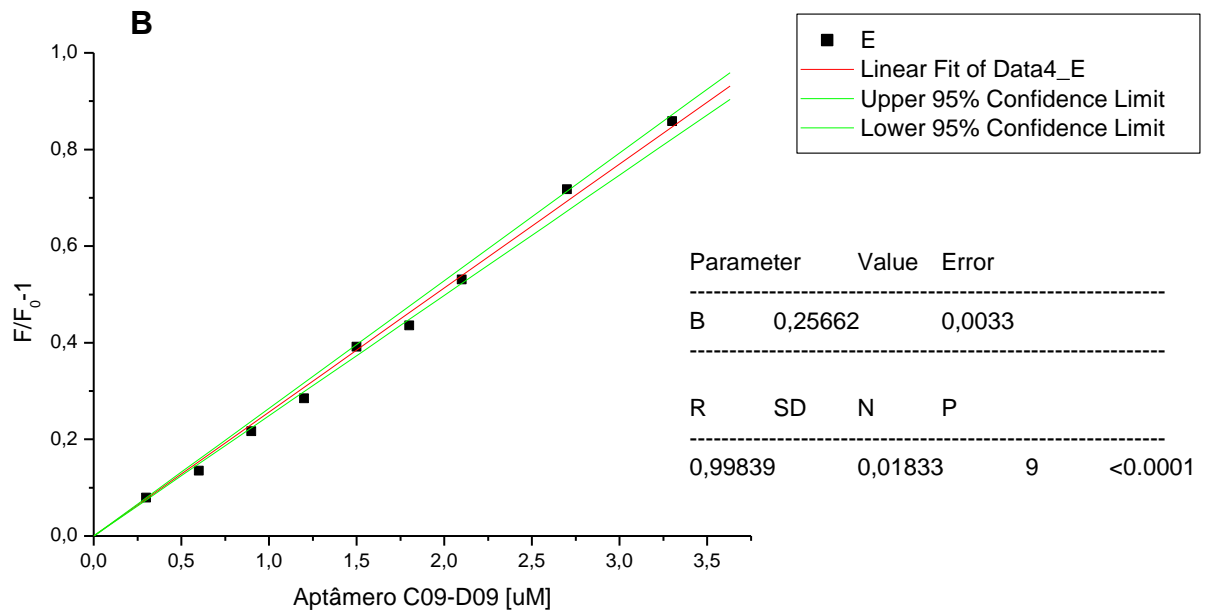
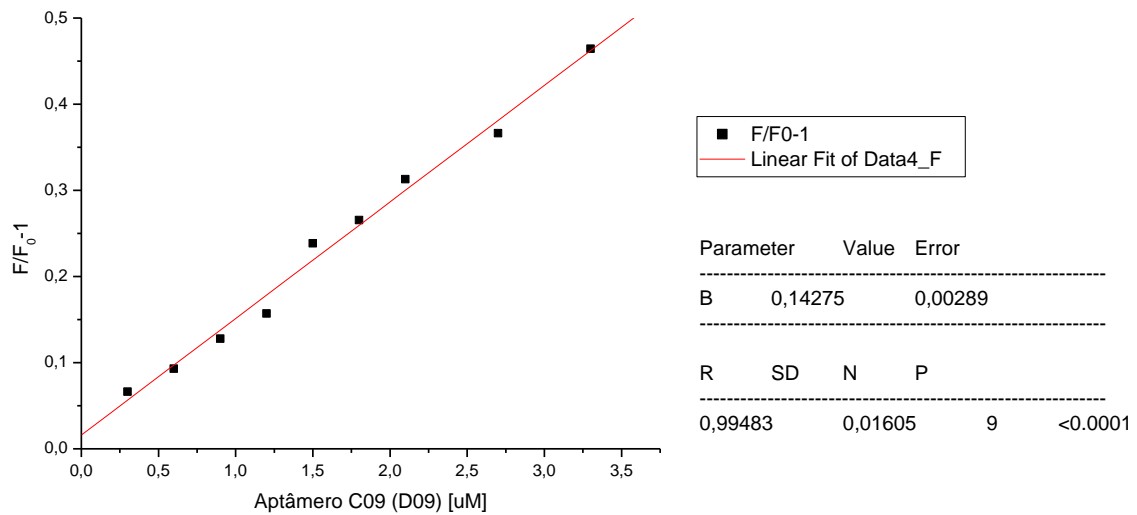
**Figura 4.3.3: Gráfico de Stern Volmer ( $K_{sv}$ ) do aptâmero B03 calculado para rNS5z (483-718 aa)  $2\mu\text{M}$  (A) e para HSA  $6\mu\text{M}$  (B) à temperatura de  $25^\circ\text{C}$ . Dentre os parâmetros demonstrados na tabela ao lado de cada gráfico, B indica o valor calculado da constante de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ )  $\times 10^6\text{ M}^{-1}$ . A linha vermelha representa o coeficiente de angulação; em verde estão as linhas de intervalo de confiança; e os quadrados em preto indicam as concentrações crescentes de titulação do aptâmero. A correlação linear é considerada adequada quando os dados apresentaram coeficientes de regressão (R) maiores que 0,99 e  $p < 0,0001$ .**



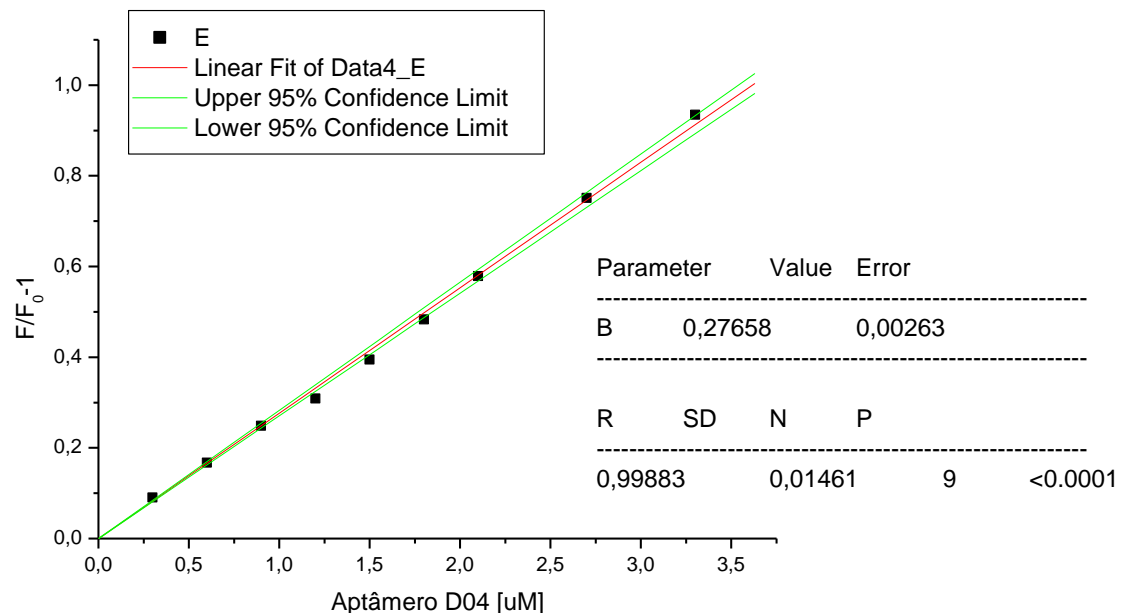
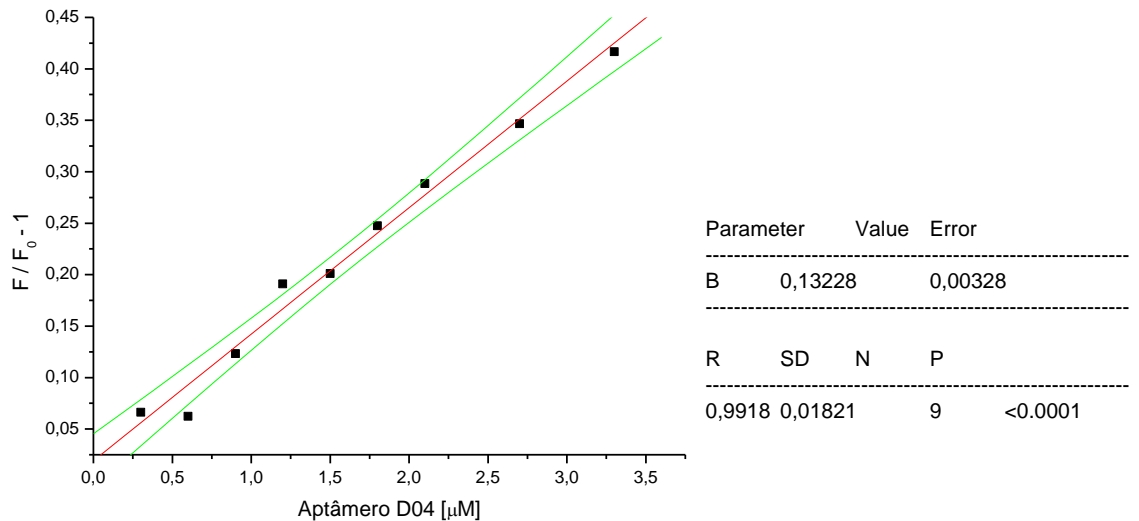
**Figura 4.3.4: Gráfico de Stern Volmer (Ksv) do aptâmero B08 calculado para para rNS5z (483-718 aa) 2 $\mu$ M (A) e para HSA 6  $\mu$ M (B) à temperatura de 25°C. Dentre os parâmetros demonstrados na tabela ao lado de cada gráfico, B indica o valor calculado da constante de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ )  $\times 10^6 M^{-1}$ . A linha vermelha representa o coeficiente de angulação; em verde estão as linhas de intervalo de confiança; e os quadrados em preto indicam as concentrações crescentes de titulação do aptâmero. A correlação linear é considerada adequada quando os dados apresentaram coeficientes de regressão (R) maiores que 0,99 e  $p < 0,0001$**



**Figura 4.3.5: Gráfico de Stern Volmer ( $K_{sv}$ ) do aptâmero C03 calculado para rNS5z (483-718 aa) 2 $\mu$ M (A) e para HSA 6  $\mu$ M (B) à temperatura de 25°C. Dentre os parâmetros demonstrados na tabela ao lado de cada gráfico, B indica o valor calculado da constante de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) x 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>. A linha vermelha representa o coeficiente de angulação; em verde estão as linhas de intervalo de confiança; e os quadrados em preto indicam as concentrações crescentes de titulação do aptâmero. A correlação linear é considerada adequada quando os dados apresentaram coeficientes de regressão (R) maiores que 0,99 e  $p < 0,0001$ .**

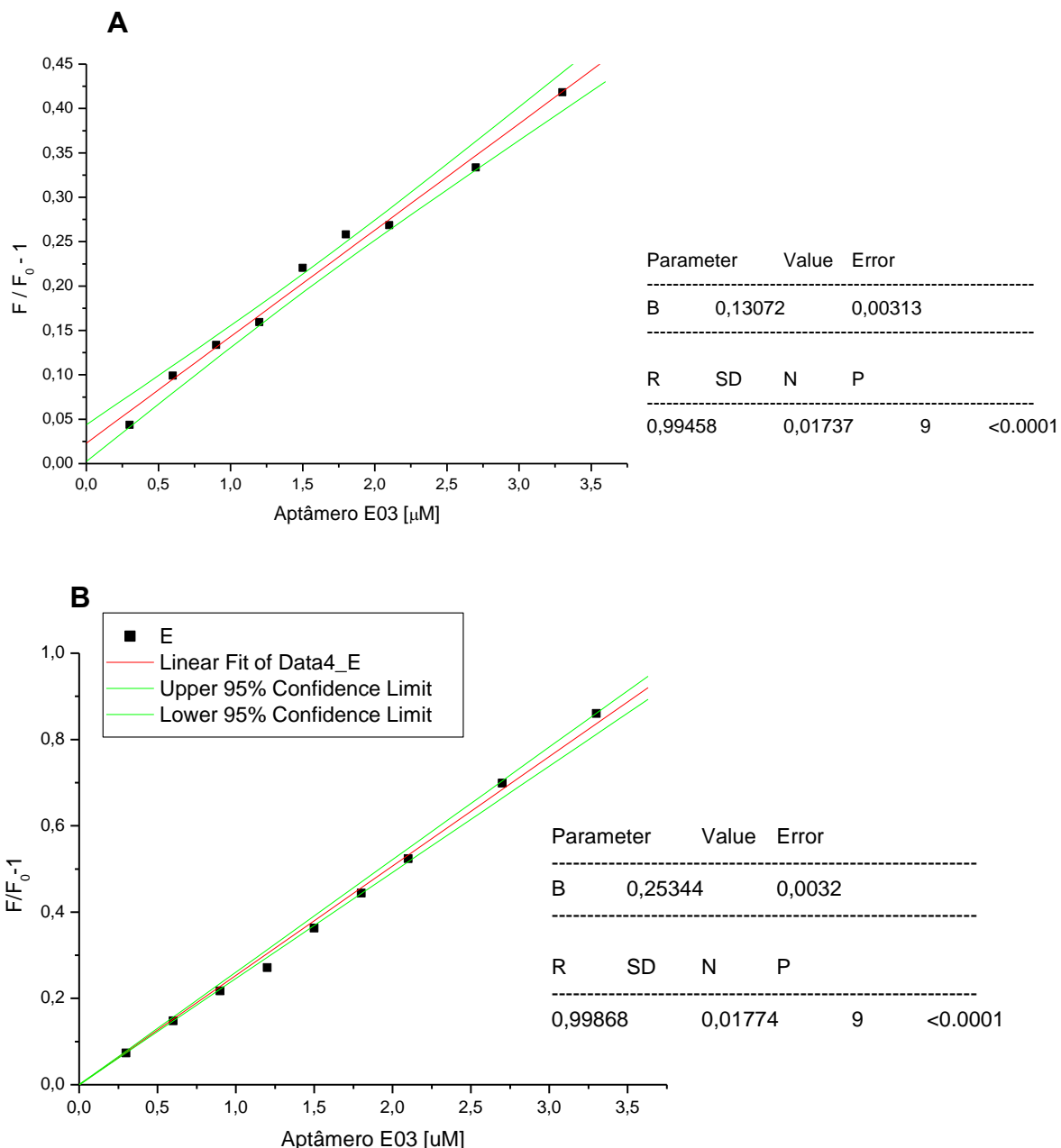


**Figura 4.3.6: Gráfico de Stern Volmer ( $K_{sv}$ ) do aptâmero C09 (D09) calculado para rNS5z (483-718 aa) 2 $\mu$ M (A) e para HSA 6  $\mu$ M (B) à temperatura de 25°C. Dentre os parâmetros demonstrados na tabela ao lado de cada gráfico, B indica o valor calculado da constante de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) x 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>. A linha vermelha representa o coeficiente de angulação; em verde estão as linhas de intervalo de confiança; e os quadrados em preto indicam as concentrações crescentes de titulação do aptâmero. A correlação linear é considerada adequada quando os dados apresentaram coeficientes de regressão (R) maiores que 0,99 e  $p < 0,0001$ .**

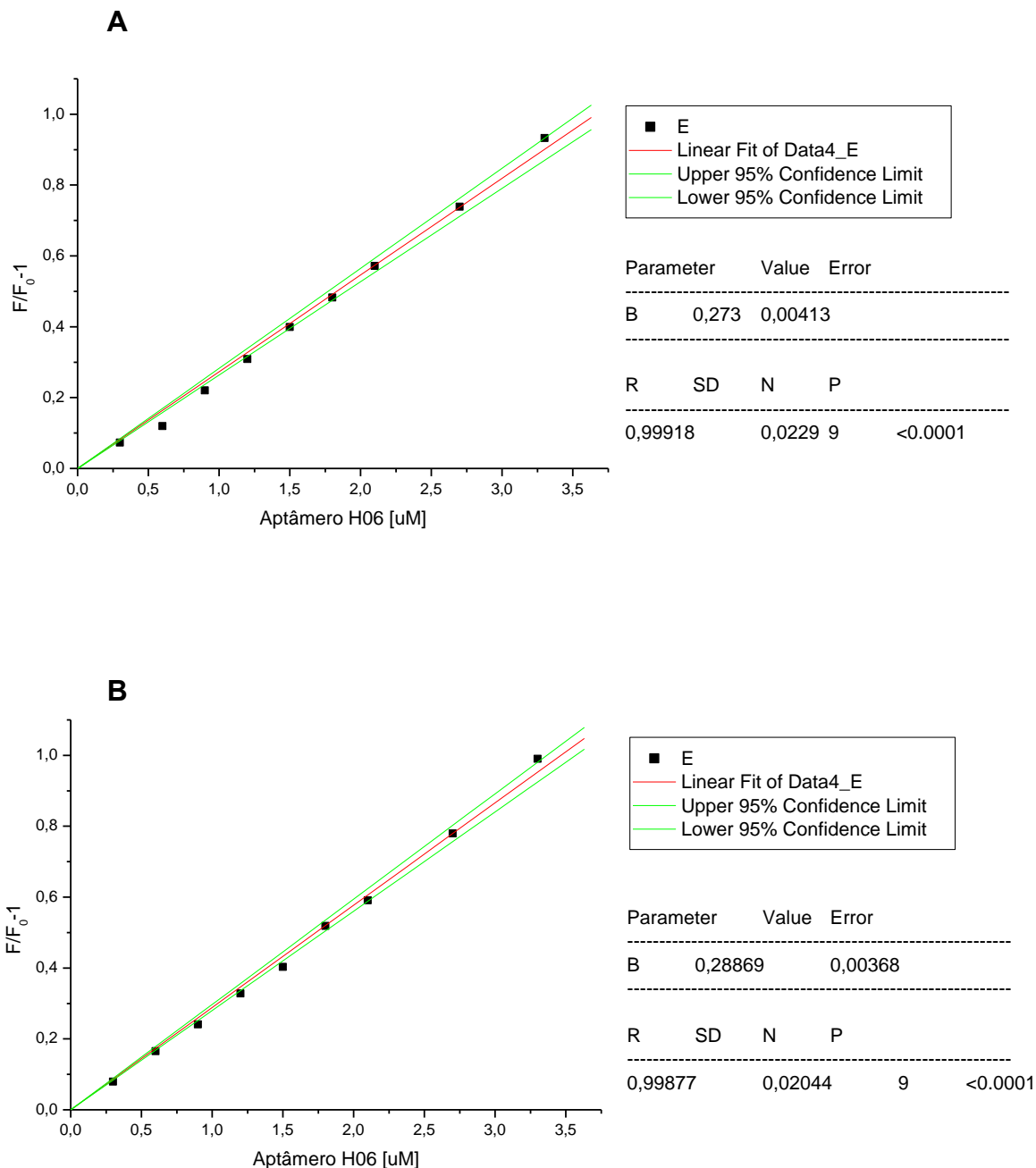


**Figura 4.3.7: Gráfico de Stern Volmer ( $K_{sv}$ ) do aptâmero D04 calculado para rNS5z (483-718 aa)  $2\mu\text{M}$  (A) e para HSA  $6\mu\text{M}$  (B) à temperatura de  $25^\circ\text{C}$ . Dentre os parâmetros demonstrados na tabela ao lado de cada gráfico, B indica o valor calculado da constante de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ )  $\times 10^6\text{ M}^{-1}$ . A linha vermelha representa o coeficiente de angulação; em verde estão as linhas de intervalo de confiança; e os quadrados em preto indicam as concentrações crescentes de titulação do aptâmero. A correlação linear é considerada adequada quando os dados apresentaram coeficientes de regressão (R) maiores que 0,99 e  $p < 0,0001$ .**

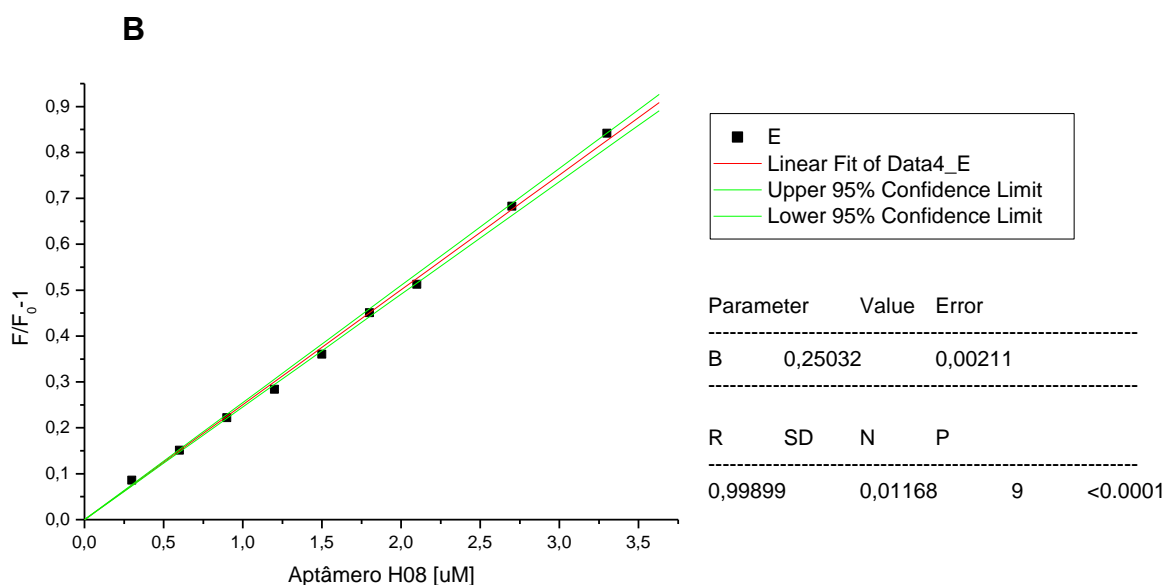
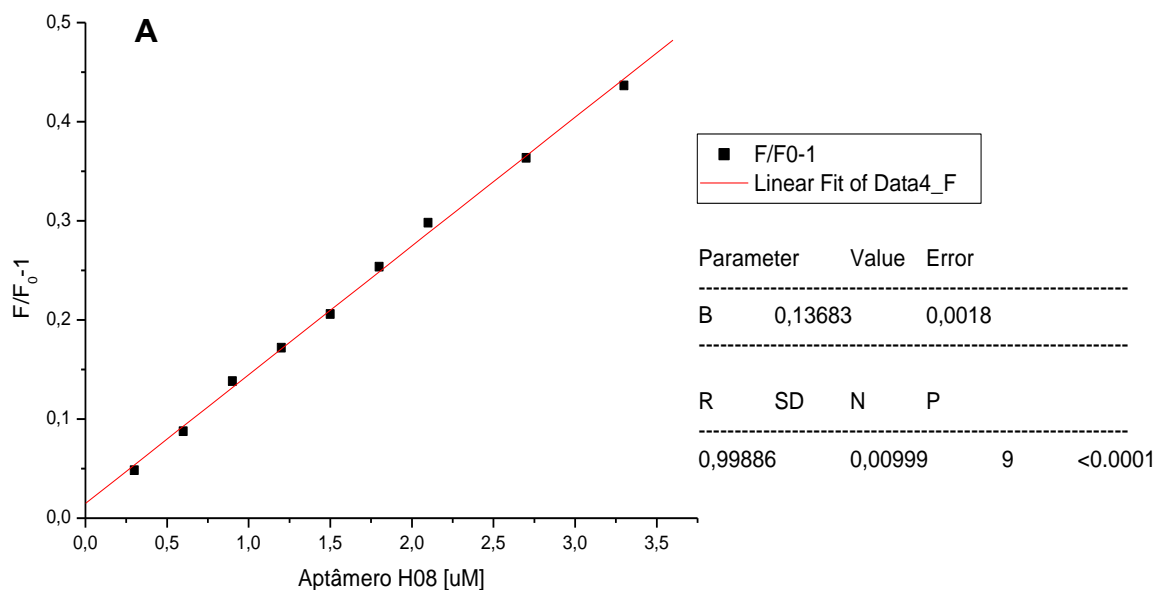




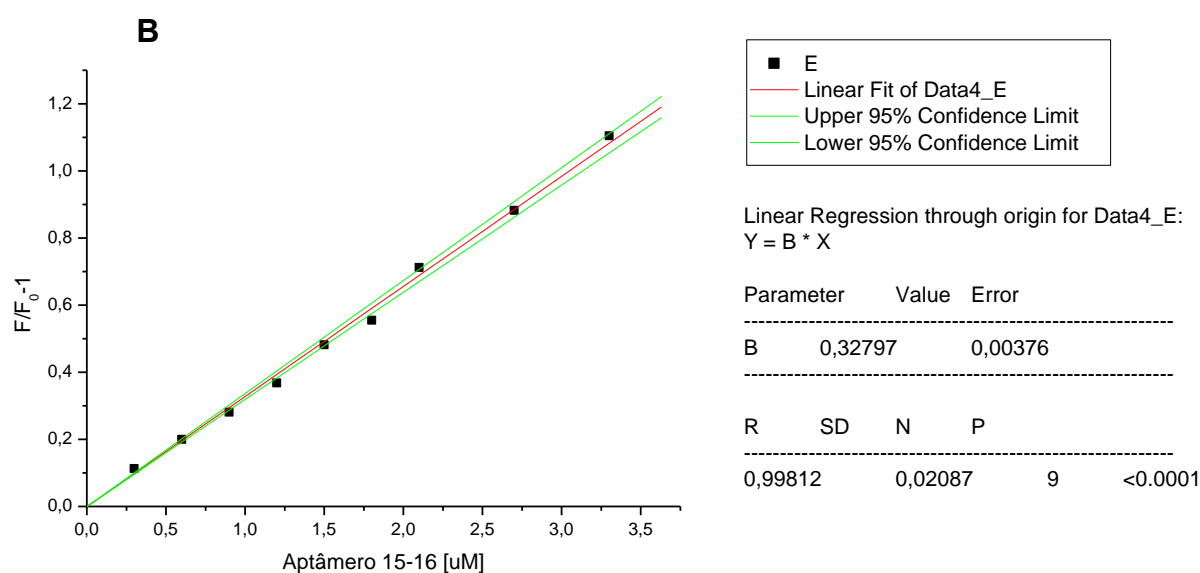
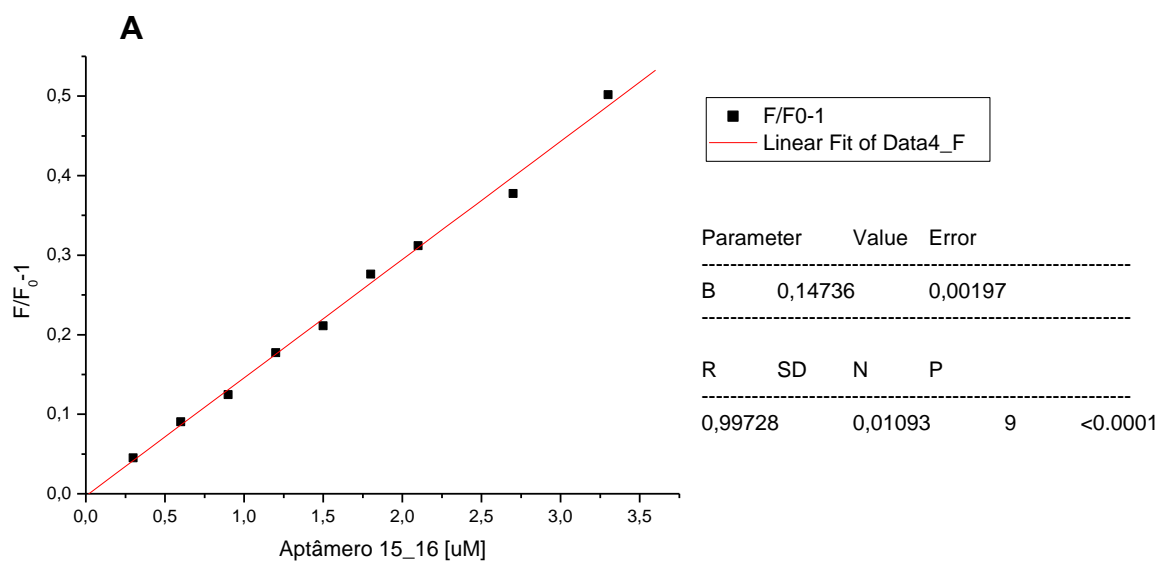
**Figura 4.3.8: Gráfico de Stern Volmer ( $K_{sv}$ ) do aptâmero E03 calculado para rNS5z (483-718 aa)  $2\mu\text{M}$  (A) e para HSA  $6\mu\text{M}$  (B) à temperatura de  $25^\circ\text{C}$ . Dentre os parâmetros demonstrados na tabela ao lado de cada gráfico, B indica o valor calculado da constante de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ )  $\times 10^6\text{ M}^{-1}$ . A linha vermelha representa o coeficiente de angulação; em verde estão as linhas de intervalo de confiança; e os quadrados em preto indicam as concentrações crescentes de titulação do aptâmero. A correlação linear é considerada adequada quando os dados apresentaram coeficientes de regressão (R) maiores que 0,99 e  $p < 0,0001$ .**



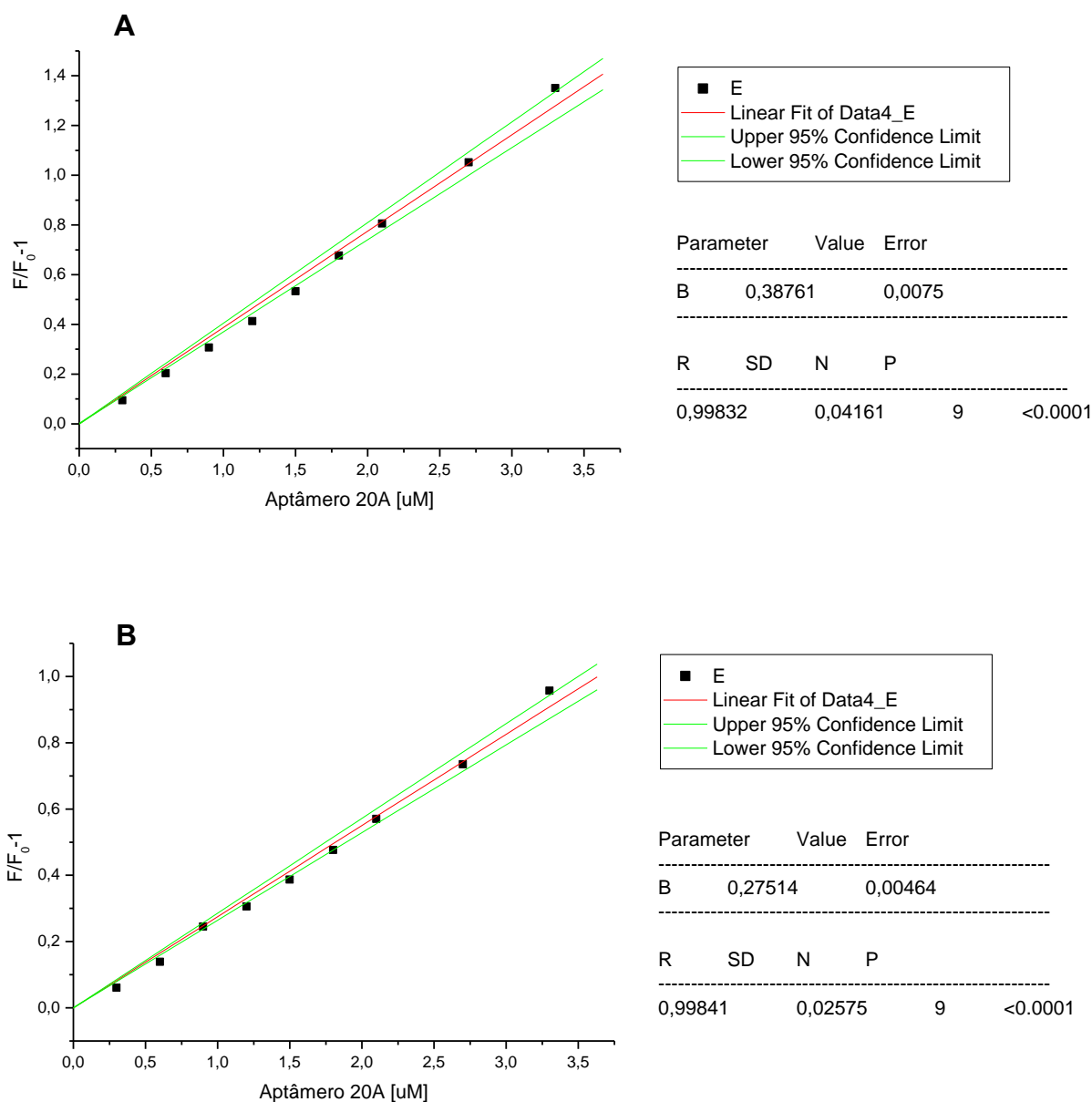
**Figura 4.3.9: Gráfico de Stern Volmer ( $K_{sv}$ ) do aptâmero H06 calculado para rNS5z (483-718 aa) 2 $\mu$ M (A) e para HSA 6  $\mu$ M (B) à temperatura de 25°C. Dentre os parâmetros demonstrados na tabela ao lado de cada gráfico, B indica o valor calculado da constante de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) x 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>. A linha vermelha representa o coeficiente de angulação; em verde estão as linhas de intervalo de confiança; e os quadrados em preto indicam as concentrações crescentes de titulação do aptâmero. A correlação linear é considerada adequada quando os dados apresentaram coeficientes de regressão (R) maiores que 0,99 e  $p < 0,0001$ .**



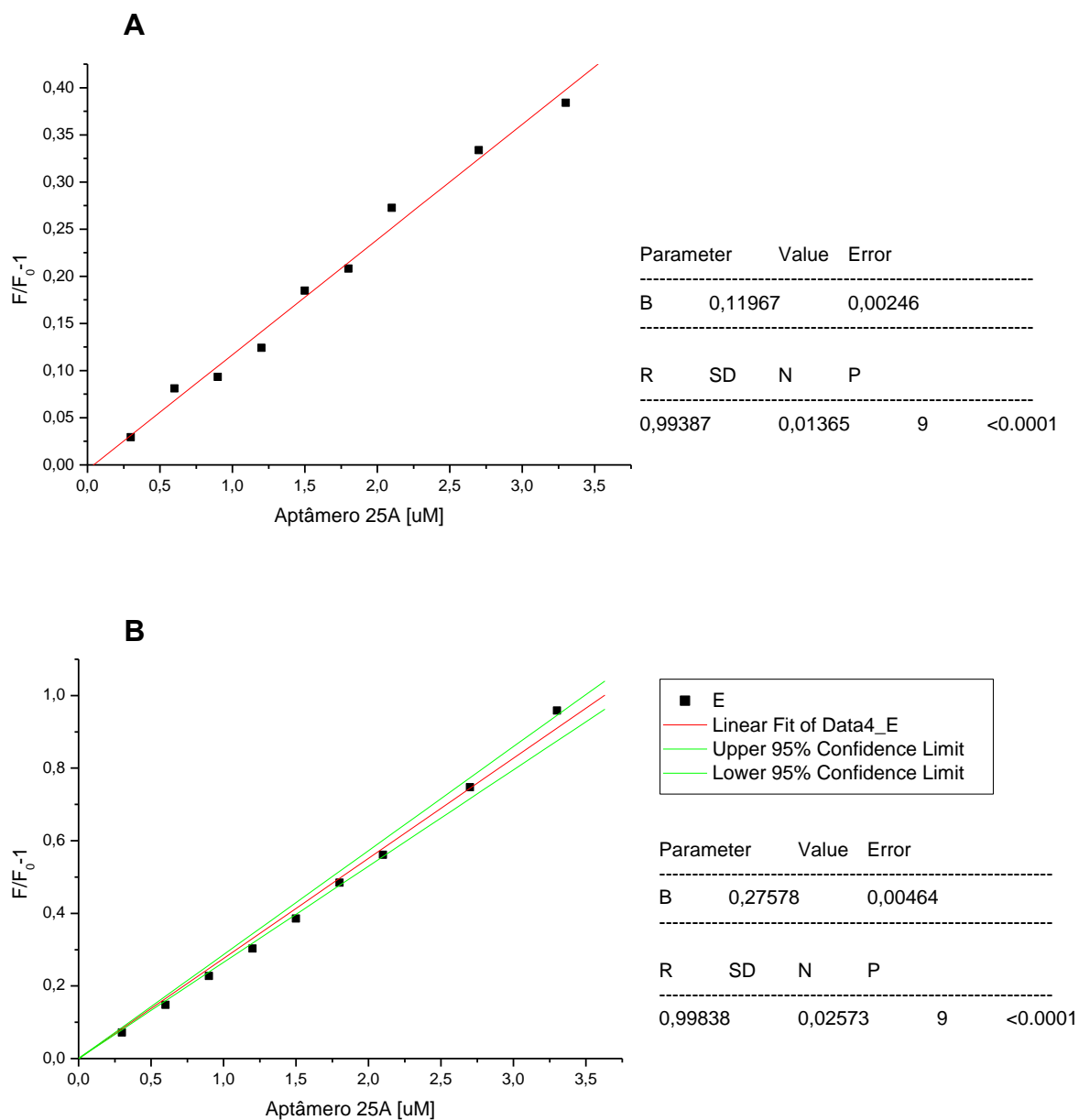
**Figura 4.3.10: Gráfico de Stern Volmer ( $K_{sv}$ ) do aptâmero H08 calculado para rNS5z (483-718 aa) 2 $\mu$ M (A) e para HSA 6  $\mu$ M (B) à temperatura de 25°C. Dentre os parâmetros demonstrados na tabela ao lado de cada gráfico, B indica o valor calculado da constante de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) x 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>. A linha vermelha representa o coeficiente de angulação; em verde estão as linhas de intervalo de confiança; e os quadrados em preto indicam as concentrações crescentes de titulação do aptâmero. A correlação linear é considerada adequada quando os dados apresentaram coeficientes de regressão (R) maiores que 0,99 e  $p < 0,0001$ .**



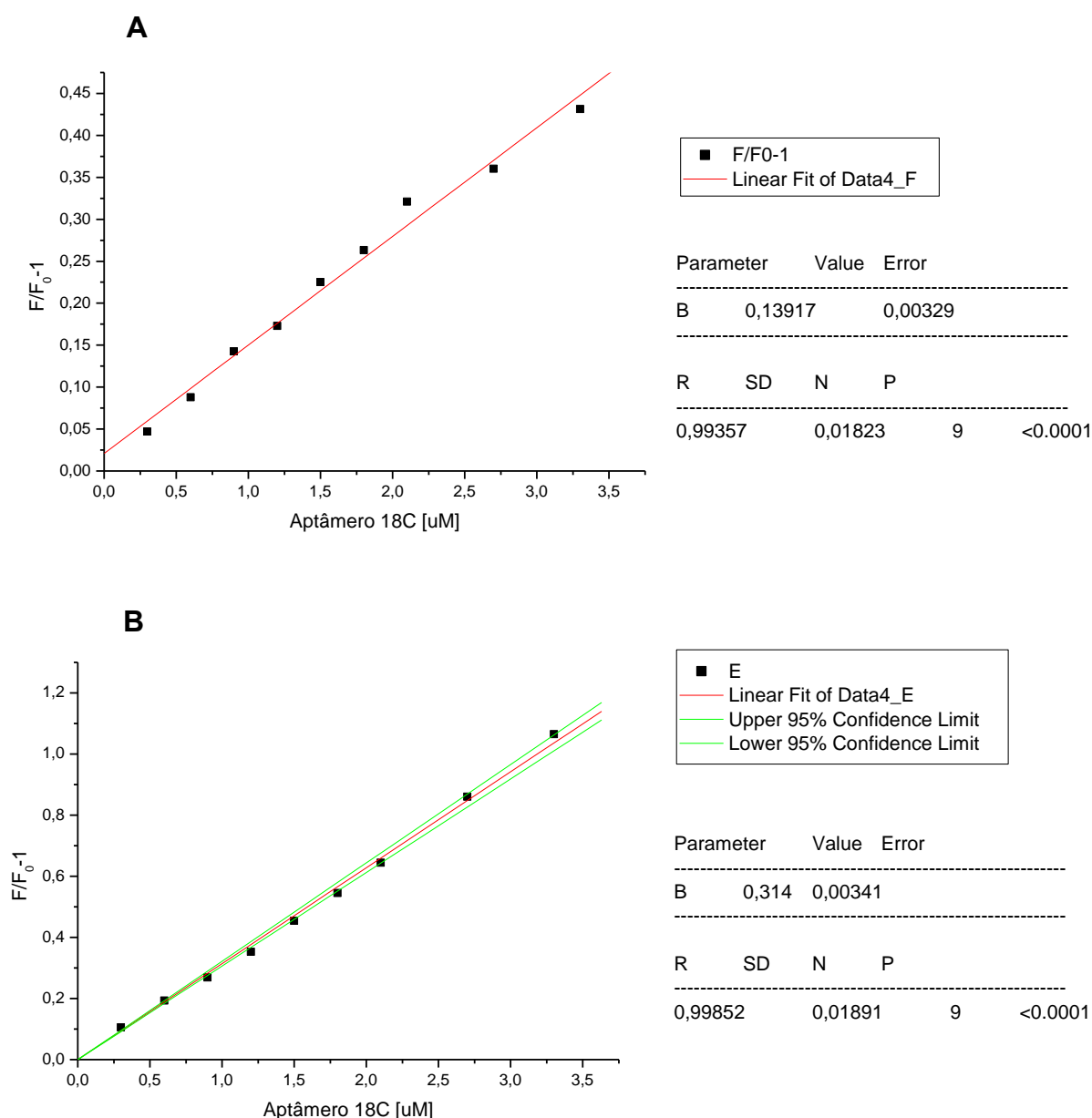
**Figura 4.3.11: Gráfico de Stern Volmer ( $K_{sv}$ ) do aptâmero 15-16 calculado para rNS5z (483-718 aa) 2 $\mu$ M (A) e para HSA 6  $\mu$ M (B) à temperatura de 25°C. Dentre os parâmetros demonstrados na tabela ao lado de cada gráfico, B indica o valor calculado da constante de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) x 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>. A linha vermelha representa o coeficiente de angulação; em verde estão as linhas de intervalo de confiança; e os quadrados em preto indicam as concentrações crescentes de titulação do aptâmero. A correlação linear é considerada adequada quando os dados apresentaram coeficientes de regressão (R) maiores que 0,99 e  $p < 0,0001$ .**



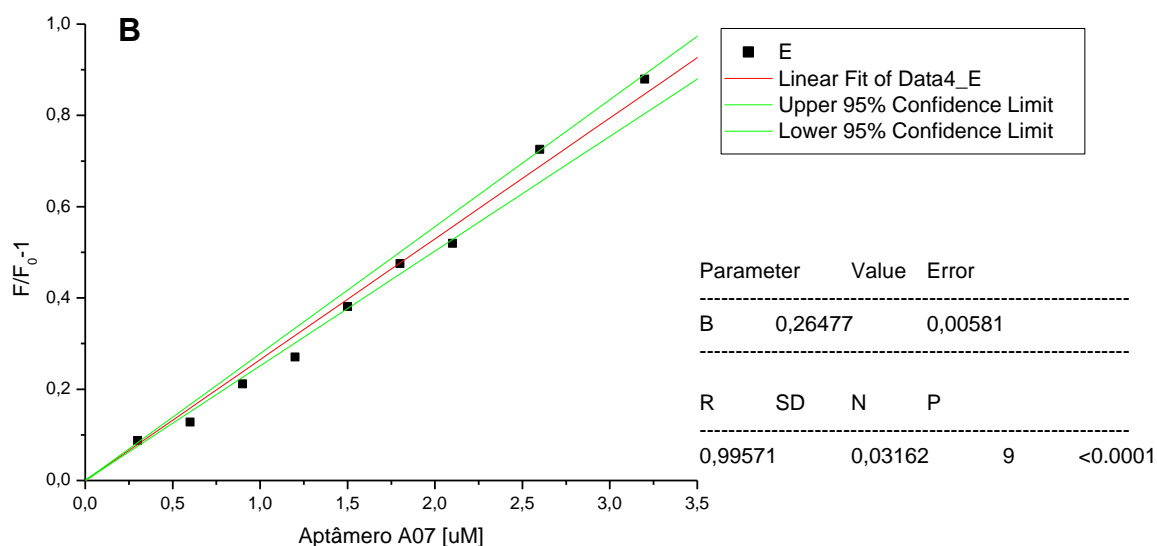
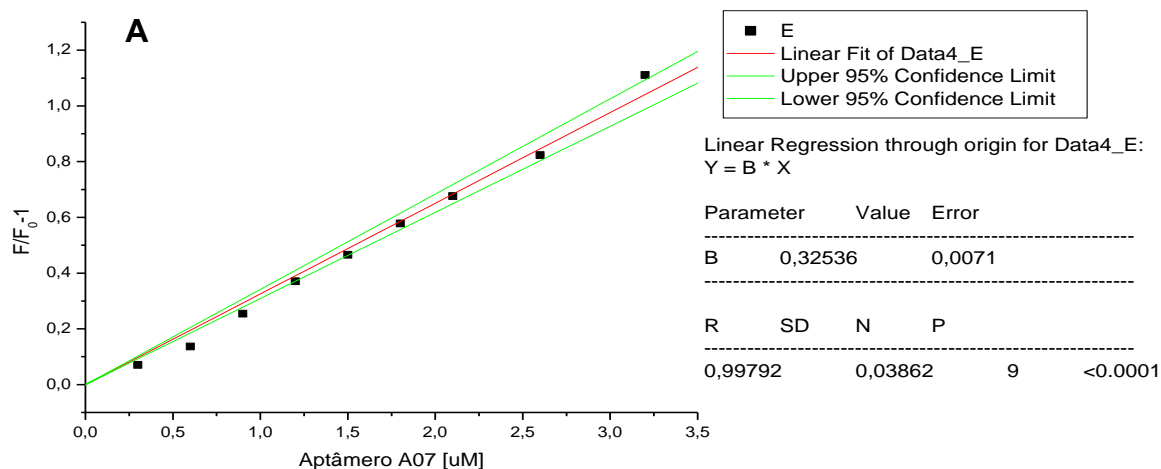
**Figura 4.3.12: Gráfico de Stern Volmer ( $K_{sv}$ ) do aptâmero 20A calculado para rNS5z (483-718 aa) 2 $\mu$ M (A) e para HSA 6  $\mu$ M (B) à temperatura de 25°C. Dentre os parâmetros demonstrados na tabela ao lado de cada gráfico, B indica o valor calculado da constante de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) x 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>. A linha vermelha representa o coeficiente de angulação; em verde estão as linhas de intervalo de confiança; e os quadrados em preto indicam as concentrações crescentes de titulação do aptâmero. A correlação linear é considerada adequada quando os dados apresentaram coeficientes de regressão (R) maiores que 0,99 e  $p < 0,0001$ .**



**Figura 4.3.13: Gráfico de Stern Volmer ( $K_{sv}$ ) do aptâmero 25A calculado para rNS5z (483-718 aa) 2 $\mu$ M (A) e para HSA 6  $\mu$ M (B) à temperatura de 25°C. Dentre os parâmetros demonstrados na tabela ao lado de cada gráfico, B indica o valor calculado da constante de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) x 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>. A linha vermelha representa o coeficiente de angulação; em verde estão as linhas de intervalo de confiança; e os quadrados em preto indicam as concentrações crescentes de titulação do aptâmero. A correlação linear é considerada adequada quando os dados apresentaram coeficientes de regressão (R) maiores que 0,99 e  $p < 0,0001$ .**

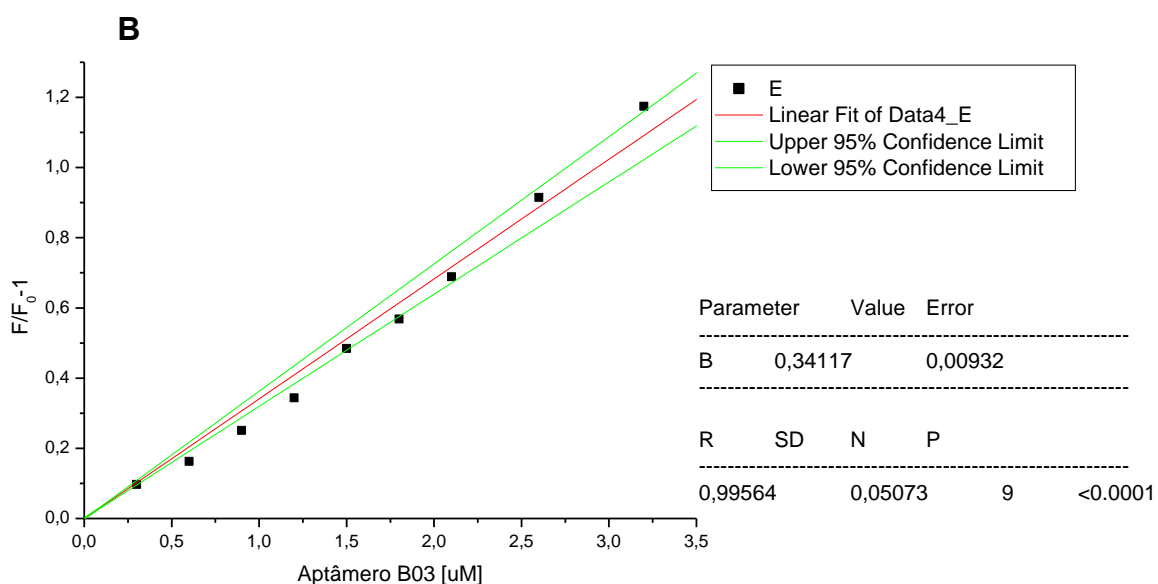
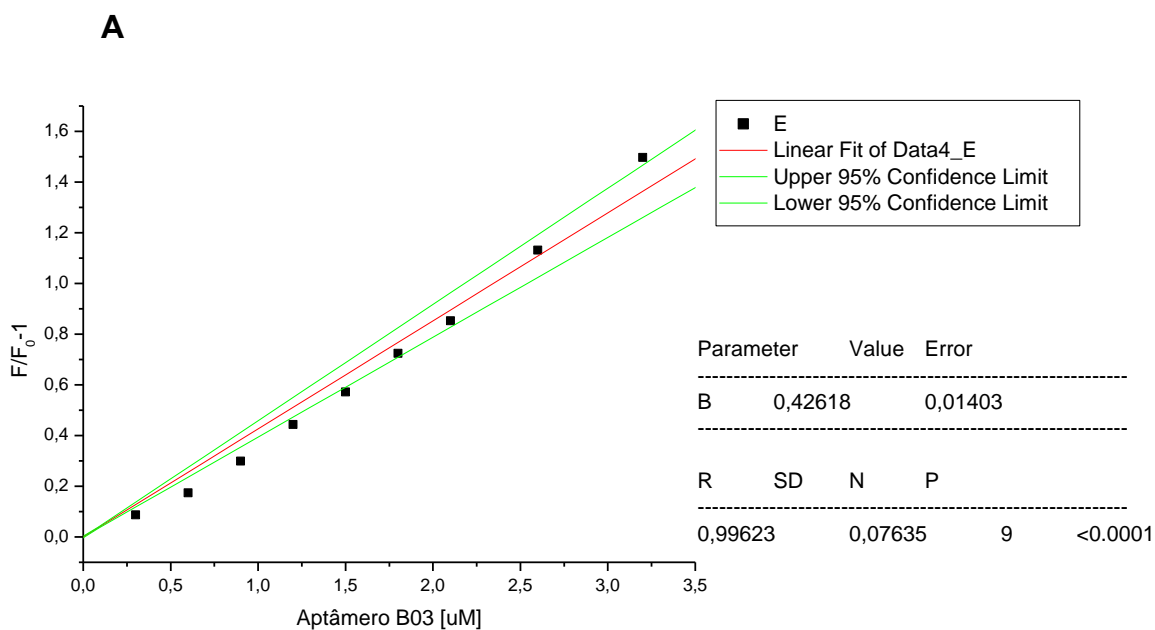


**Figura 4.3.14: Gráfico de Stern Volmer ( $K_{sv}$ ) do aptâmero 18C calculado para rNS5z (483-718 aa) 2 $\mu$ M (A) e para HSA 6  $\mu$ M (B) à temperatura de 25°C. Dentre os parâmetros demonstrados na tabela ao lado de cada gráfico, B indica o valor calculado da constante de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) x 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>. A linha vermelha representa o coeficiente de angulação; em verde estão as linhas de intervalo de confiança; e os quadrados em preto indicam as concentrações crescentes de titulação do aptâmero. A correlação linear é considerada adequada quando os dados apresentaram coeficientes de regressão (R) maiores que 0,99 e  $p < 0,0001$ .**

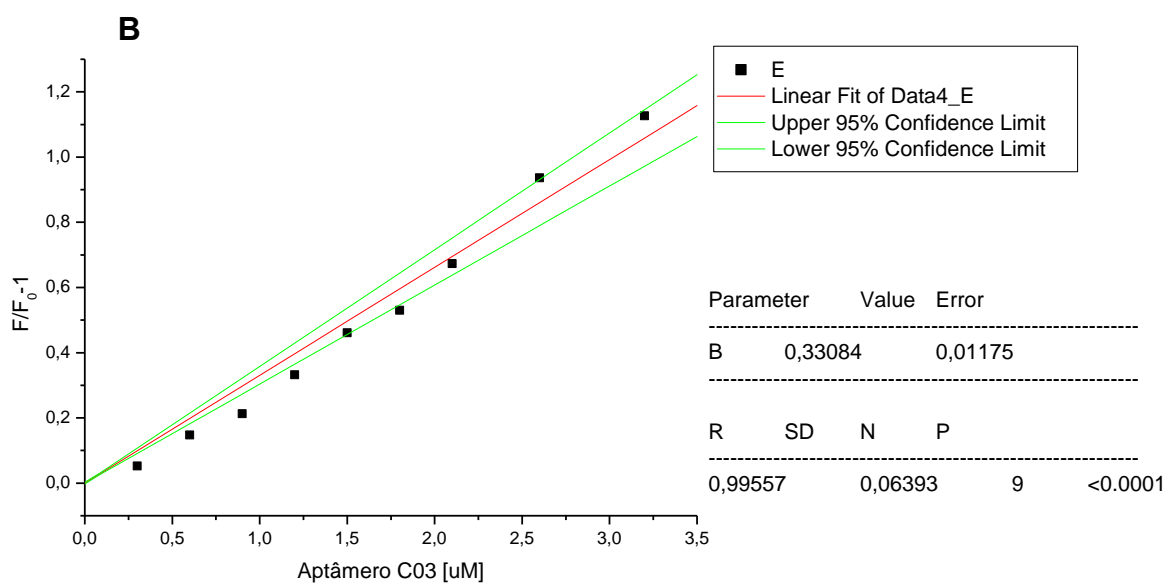
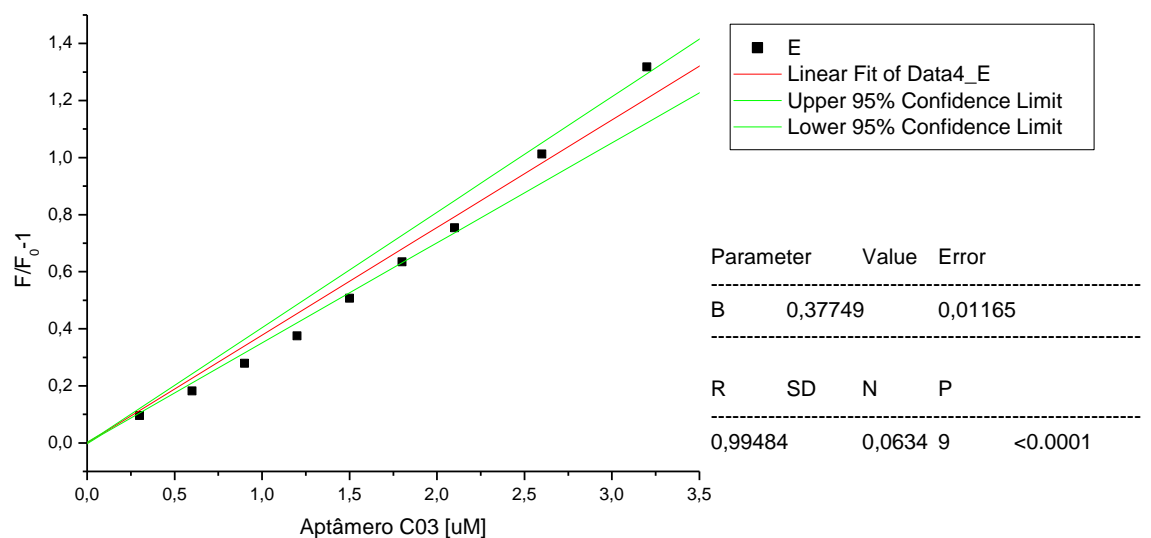


**Figura 4.3.15: Gráfico de Stern Volmer ( $K_{sv}$ ) do aptâmero A07 calculado para rNS5z (483-718 aa) 2 $\mu$ M (A) e para HSA 6  $\mu$ M (B) à temperatura de 37°C. Dentre os parâmetros demonstrados na tabela ao lado de cada gráfico, B indica o valor calculado da constante de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) x 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>. A linha vermelha representa o coeficiente de angulação; em verde estão as linhas de intervalo de confiança; e os quadrados em preto indicam as concentrações crescentes de titulação do aptâmero. A correlação linear é considerada adequada quando os dados apresentaram coeficientes de regressão (R) maiores que 0,99 e  $p < 0,0001$ .**

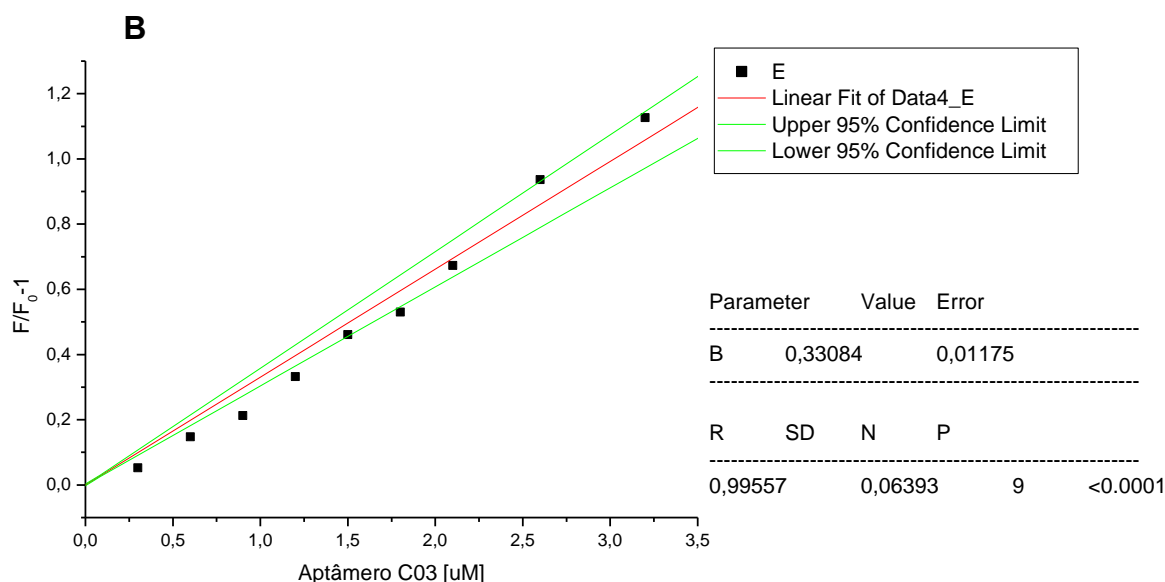
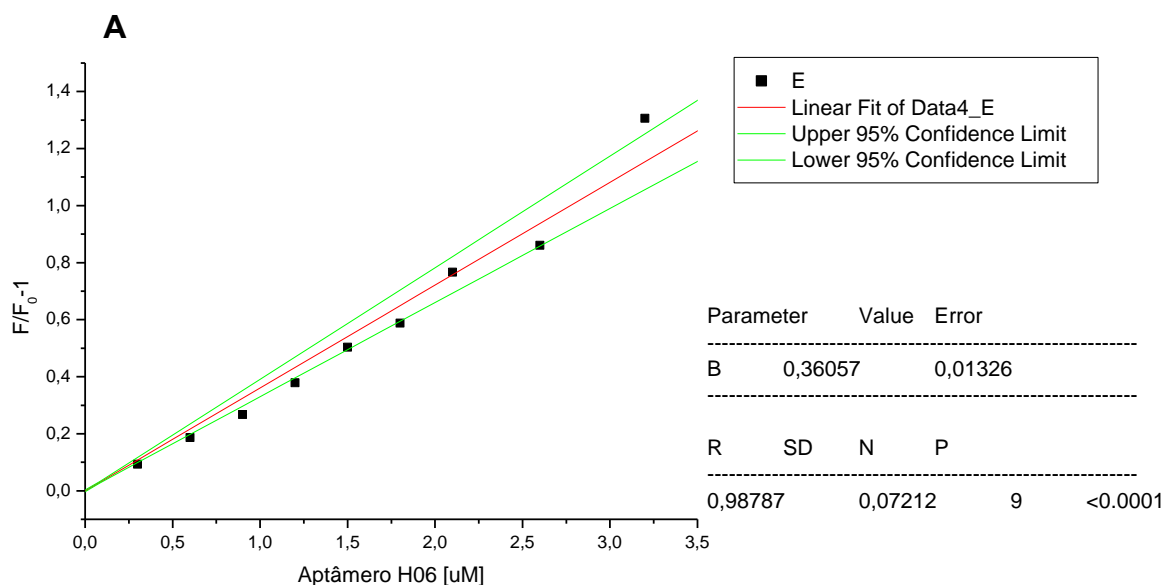




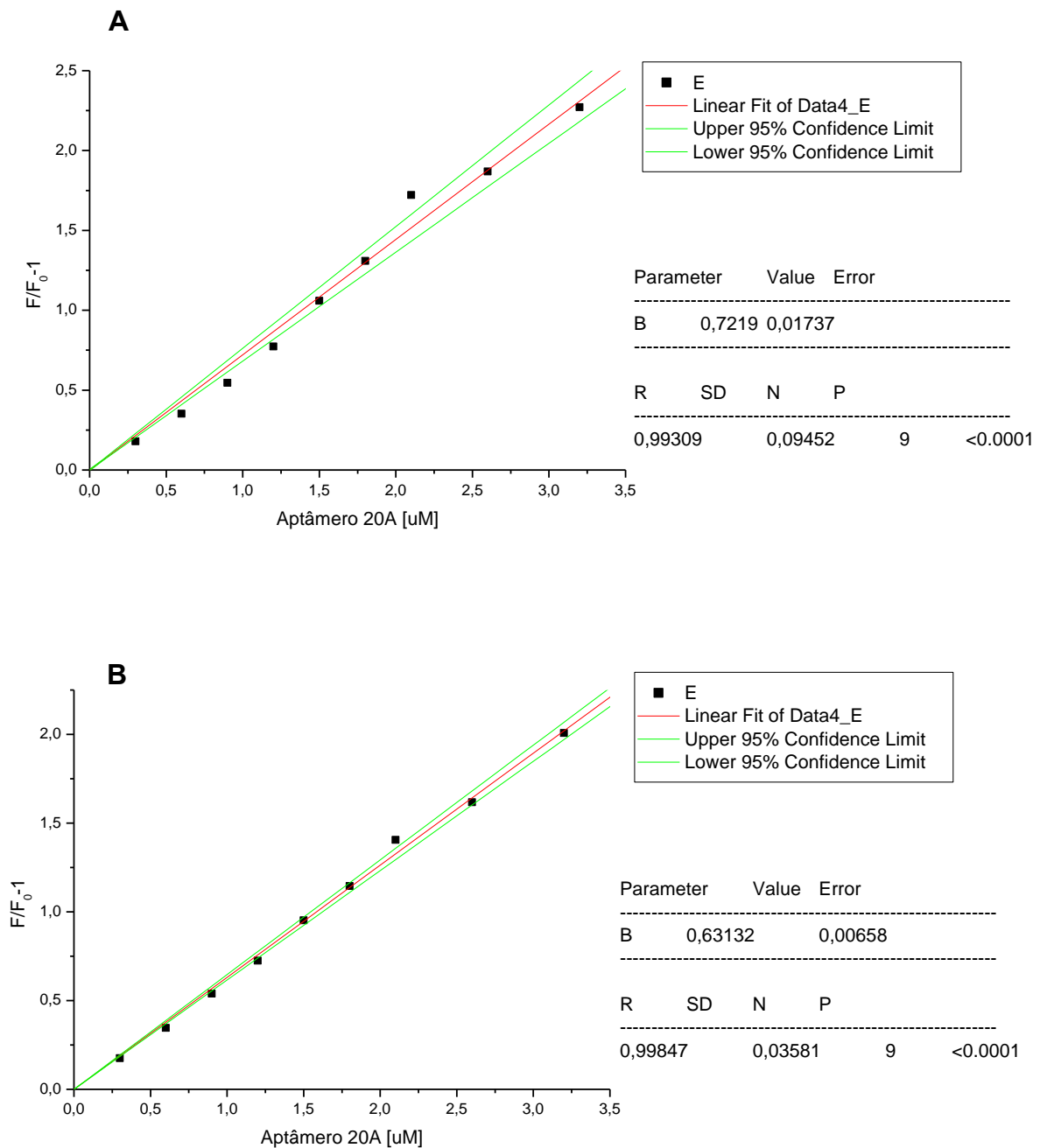
**Figura 4.3.16: Gráfico de Stern Volmer ( $K_{sv}$ ) do aptâmero B03 calculado para rNS5z (483-718 aa) 2 $\mu$ M (A) e para HSA 6  $\mu$ M (B) à temperatura de 37°C. Dentre os parâmetros demonstrados na tabela ao lado de cada gráfico, B indica o valor calculado da constante de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) x 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>. A linha vermelha representa o coeficiente de angulação; em verde estão as linhas de intervalo de confiança; e os quadrados em preto indicam as concentrações crescentes de titulação do aptâmero. A correlação linear é considerada adequada quando os dados apresentaram coeficientes de regressão (R) maiores que 0,99 e  $p < 0,0001$ .**



**Figura 4.3.17: Gráfico de Stern Volmer ( $K_{sv}$ ) do aptâmero C03 calculado para rNS5z (483-718 aa) 2 $\mu$ M (A) e para HSA 6  $\mu$ M (B) à temperatura de 37°C. Dentre os parâmetros demonstrados na tabela ao lado de cada gráfico, B indica o valor calculado da constante de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ )  $\times 10^6$  M $^{-1}$ . A linha vermelha representa o coeficiente de angulação; em verde estão as linhas de intervalo de confiança; e os quadrados em preto indicam as concentrações crescentes de titulação do aptâmero. A correlação linear é considerada adequada quando os dados apresentaram coeficientes de regressão (R) maiores que 0,99 e  $p < 0,0001$ .**



**Figura 4.3.18: Gráfico de Stern Volmer ( $K_{sv}$ ) do aptâmero H06 calculado para rNS5z (483-718 aa) 2 $\mu$ M (A) e para HSA 6  $\mu$ M (B) à temperatura de 37°C. Dentre os parâmetros demonstrados na tabela ao lado de cada gráfico, B indica o valor calculado da constante de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) x 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>. A linha vermelha representa o coeficiente de angulação; em verde estão as linhas de intervalo de confiança; e os quadrados em preto indicam as concentrações crescentes de titulação do aptâmero. A correlação linear é considerada adequada quando os dados apresentaram coeficientes de regressão (R) maiores que 0,99 e  $p < 0,0001$ .**



**Figura 4.3.19: Gráfico de Stern Volmer ( $K_{sv}$ ) do aptâmero 20A calculado para rNS5z (483-718 aa) 2 $\mu$ M (A) e para HSA 6  $\mu$ M (B) à temperatura de 37°C. Dentre os parâmetros demonstrados na tabela ao lado de cada gráfico, B indica o valor calculado da constante de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) x 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>. A linha vermelha representa o coeficiente de angulação; em verde estão as linhas de intervalo de confiança; e os quadrados em preto indicam as concentrações crescentes de titulação do aptâmero. A correlação linear é considerada adequada quando os dados apresentaram coeficientes de regressão (R) maiores que 0,99 e  $p < 0,0001$ .**

**TABELA 4.3: Valores de Constante de Stern Volmer (K<sub>sv</sub>) obtidos de aptâmeros com afinidade para rNS5z e HSA em diferentes temperaturas.**

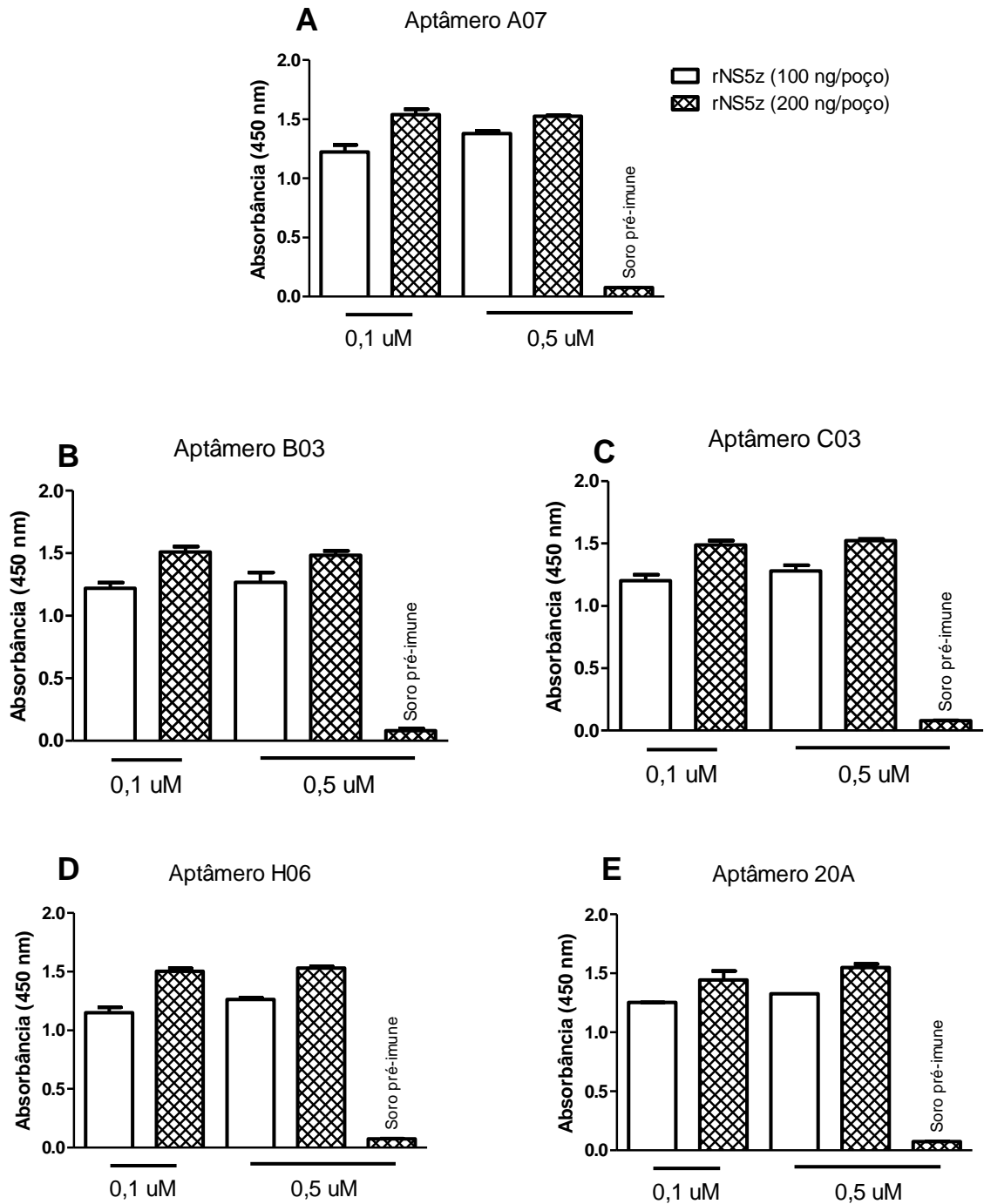
Temperatura	K <sub>sv</sub> (x 10 <sup>5</sup> M <sup>-1</sup> )			
	25°C		37°C	
Aptâmeros	rNS5z (2µM)	HSA (6µM)	rNS5z (2µM)	HSA (6µM)
<b>A04</b>	1,5416E+05	3,3245E+05	-	-
<b>A07</b>	2,4627E+05	2,7099E+05	3,2536E+05	2,6477E+05
<b>B03</b>	4,9412E+05	3,4467E+05	4,2618E+05	3,4117E+05
<b>B08</b>	1,3352E+05	3,5592E+05	-	-
<b>C03</b>	3,5943E+05	2,9136E+05	3,7749E+05	3,3084E+05
<b>C09 (D09)</b>	1,5263E+05	2,5662E+05	-	-
<b>D04</b>	1,3228E+05	2,7658E+05	-	-
<b>E03</b>	1,3127E+05	2,5344E+05	-	-
<b>H06</b>	2,7300E+05	2,8869E+05	3,5067E+05	3,2816E+05
<b>H08</b>	1,4114E+05	2,5032E+05	-	-
<b>15_16</b>	1,5529E+05	3,2797E+05	-	-
<b>13_19_20</b>	1,3395E+05	3,0952E+05	-	-
<b>13</b>	1,4070E+05	3,1803E+05	-	-
<b>20A</b>	3,8761E+05	2,7514E+05	7,2190E+05	6,3132E+05
<b>25A</b>	1,2991E+05	2,7578E+05	-	-
<b>18C</b>	1,4127E+05	3,1400E+05	-	-

Valores calculados da constante de Stern-Volmer (K<sub>sv</sub>) x 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup> para aptâmeros obtidos contra rNS5z (2µM) e HSA (6µM) à temperatura de 25°C e 37°C

#### 4.4. Ensaio Imunoadsorção Enzimática - ELISA

Os ensaios de ELISA foram realizados em placa modificada, utilizando cinco aptâmeros modificados (-NH<sub>2</sub>) imobilizados (0,1 a 0,5 µM) como agentes de captura (A07, B03, C03, H06 e 20A), e um soro obtido de camundongos (+) contendo anticorpos policlonais contra rNS5z (diluição de 1:1.600) foi utilizado como agente de detecção. O soro pré-imune (-) de camundongos foi utilizado na mesma diluição como controle negativo dos experimentos. Um anticorpo monoclonal anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase revelado com TMB foi utilizado para detecção de sinal. Os resultados, expressos com base na leitura da densidade ótica (D.O.) em espectrofotômetro com filtro de 450 nm, demonstraram que a proteína rNS5z pode ser detectada de forma confiável em uma concentração de 200 ng/mL, conforme apresentado na figura 4.5.1 (A-E). Duas concentrações de aptâmeros foram testadas, 0.1 e 0.5 µM com duas quantidades diferentes de proteína rNS5z (100 e 200 ng/poço). Ambas concentrações de aptâmeros foram capazes de capturar a proteína alvo em ambas as quantidades testadas. O aumento de cinco vezes da concentração do aptâmero não resultou em significativo incremento no sinal do ensaio, que aumentou somente em torno de 10%. Como esperado, o sinal com 200ng/poço foi de maior intensidade, mas não duplicou conforme a quantidade testada, indicando que com a concentração de 100ng/poço já é possível alcançar o platô da curva de interação entre aptâmero e proteína. O excesso de proteína só é capaz de aumentar o sinal por volta de 30%, enquanto o restante da proteína seria descartado na lavagem da placa.

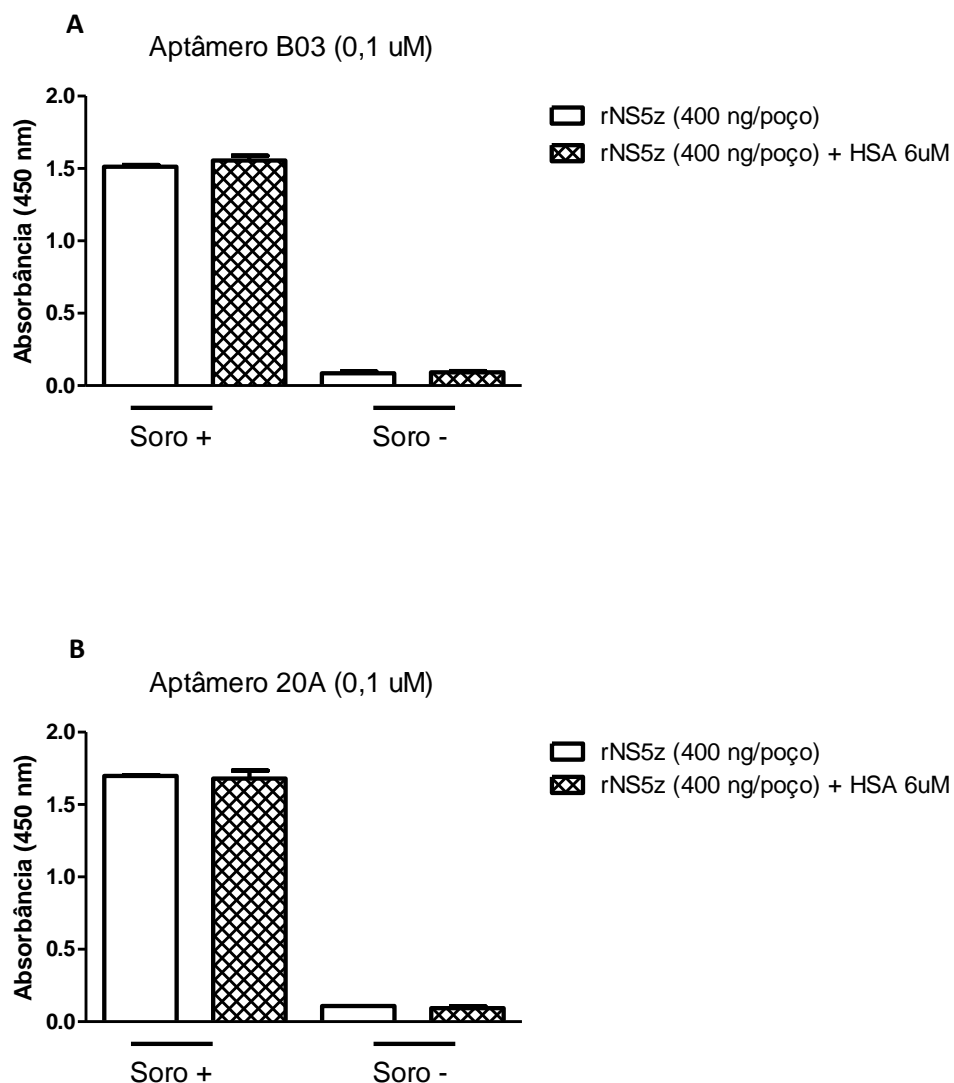
Todos os cinco aptâmeros testados demonstraram similar capacidade de captura da proteína, de forma consistente com os experimentos da fluorescência que demonstram que todos esses aptâmeros tem constantes de interação muito similares. Os resultados de ELISA com os cinco aptâmeros testados estão apresentados na figura 4.4.1.



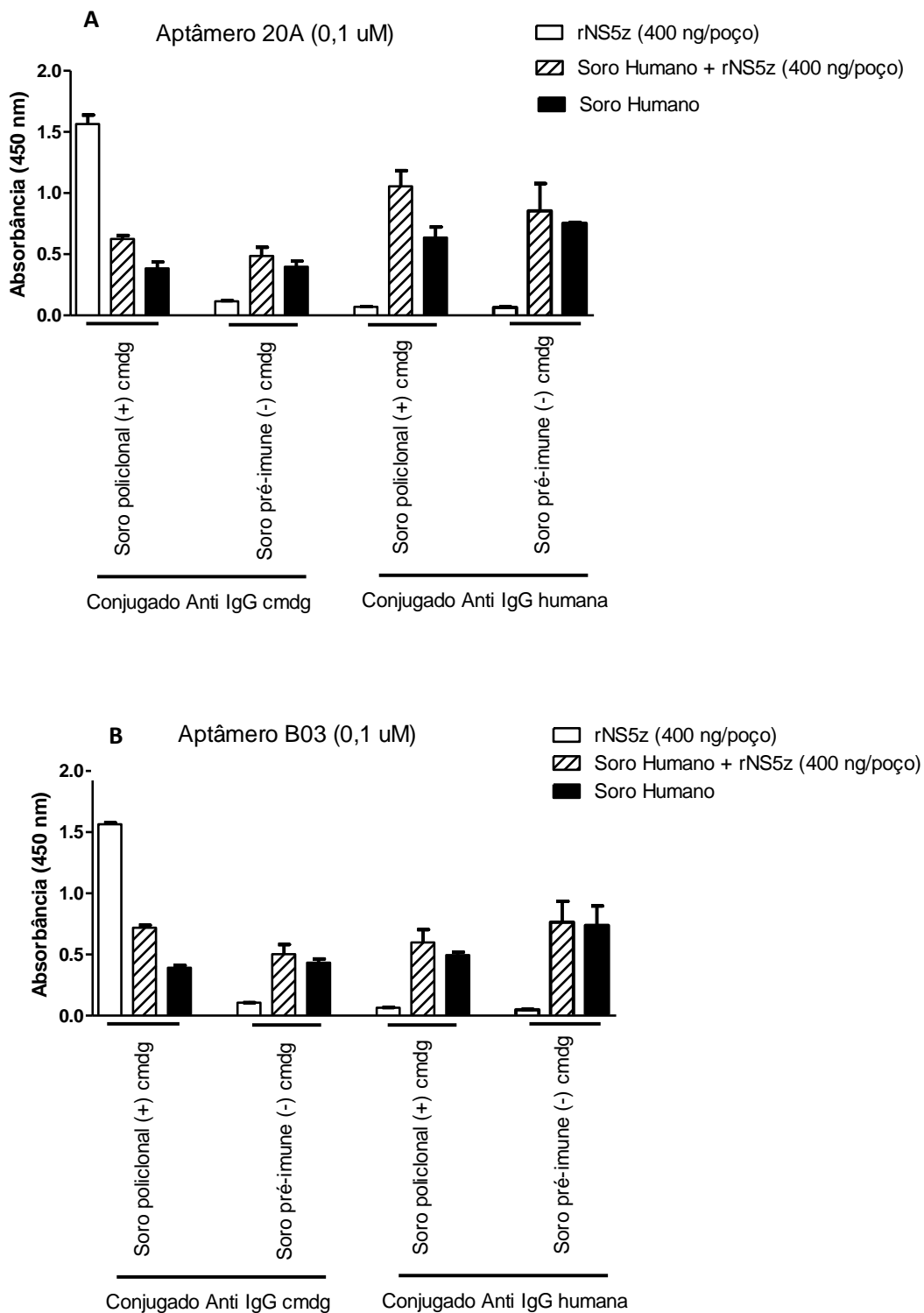
**Figura 4.4.1: Ensaio imunoenzimático (ELISA) realizado em placa de 96 poços modificada (Amine-Binding Maleic Anhydride) sensibilizada com aptâmeros modificados (-NH<sub>2</sub>) A07 (A), B03 (B), C03 (C), H06 (D) e 20A (E).**

Também foram realizados ensaios de ELISA com os aptâmeros imobilizados na placa para efetivar a captura da rNS5z nas mesmas condições descritas acima, mas na presença (ou ausência) de HSA em concentração fisiológica (6  $\mu\text{M}$ ), diluída no tampão de ligação. Isso é extremamente importante para verificar a capacidade dos aptâmeros em ligar à proteína do vírus Zika, que naturalmente seria em concentração muito inferior quando comparada à concentração fisiológica das proteínas séricas, em especial HSA. Esses resultados levantam uma questão, já que os experimentos de fluorescência demonstraram que os aptâmeros também tiveram afinidade para HSA quando testados em solução. Isso poderia ser proibitivo para o desenvolvimento de um teste para NS5z, já que as duas proteínas poderiam competir para o mesmo sítio de ligação do aptâmero. Ou, ainda, se a interação com HSA poderia potencialmente interferir com a interação aptâmero-NS5z. Sendo assim, esse foi um experimento crucial para a viabilidade de um potencial teste de detecção da NS5z em ensaios sorológicos. Entretanto, foi verificado que não houve redução da sensibilidade do ensaio de captura da rNS5z na presença da HSA, mesmo a concentração de HSA 100 vezes maior, e as leituras de densidade óptica na presença de rNS5z não sofreram alterações significativas para os aptâmeros modificados (-NH<sub>2</sub>) testados B03 e 20A (figura 4.4.2 A e B, respectivamente).





**Figura 4.4.2: Ensaio imunoenzimático (ELISA) realizado em placa de 96 poços modificada (Amine-Binding Maleic Anhydride) sensibilizada com os aptâmeros modificados (-NH<sub>2</sub>) 20A (A) e B03 (B) para detecção da proteína rNS5z na presença e ausência de albumina sérica HSA em concentrações fisiológicas.**



**Figura 4.4.3: Ensaio imunoenzimático (ELISA) realizado em placa de 96 poços modificada (Amine-Binding Maleic Anhydride) sensibilizada com os aptâmeros modificados (-NH<sub>2</sub>) 20A (A) e B03 (B) para detecção da proteína rNS5z diluída em soro comercial humano.**

O mesmo ensaio de ELISA para detecção da proteína rNS5z foi realizado em soro comercial humano, para verificar a capacidade dos aptâmeros de detectar essa proteína em um meio mais próximo ao que seria utilizado em um teste sorológico após desenvolvimento e padronização. A proteína rNS5z também foi detectada pelos aptâmeros modificados 20A e B03 quando diluída em 100% de soro comercial humano (figura 4.4.3 A e B, respectivamente).

O valor de densidade ótica obtido para a rNS5z diluída em soro comercial humano foi significativamente reduzido em comparação com o resultado obtido com a mesma concentração de proteína diluída em tampão. Mais do que isso, o sinal gerado para o soro comercial humano (sem a presença da proteína) também foi elevado, ficando bem parecido com os sinais verificados na presença de soro pré-imune (-) e de soro policlonal (+) de camundongos utilizado para detecção (figura 4.4.3). Tendo avaliado a potencial interferência de proteínas séricas (HSA) e verificado que, mesmo na sua concentração fisiológica, ela não tinha interferência na detecção da rNS5z pelos aptâmeros selecionados, foi decidido verificar se a diminuição do sinal poderia ser relacionada à presença da IgG humana no soro comercial, já que a IgG é a principal imunoglobulina do sangue e responde por cerca de 70 a 75% do total de imunoglobulinas. Sendo assim, o mesmo ensaio foi realizado, sendo revelado com soro policlonal de camundongo anti-rNS5z, seguido de anticorpo conjugado anti-IgG camundongo ou utilizando um anticorpo conjugado anti-IgG humano no lugar do soro policlonal murino. Nos resultados foi observado que grande parte da leitura da D.O. adquirida quando soro humano foi utilizado se deve à ligação da IgG humana na placa/aptâmeros, de forma inespecífica. O anticorpo anti-IgG humano parece revelar especificamente o IgG humano retido na placa, mesmo que, independentemente disso, o background sinal da placa quando soro for utilizado permanece alto, mesmo usando soro policlonal e anticorpos anti-IgG murino.

## 5. Discussão e Perspectivas

Os principais testes de diagnóstico laboratorial atualmente em uso podem ser divididos, de uma forma geral, em três grupos: 1 - os convencionais, em geral de menor conteúdo tecnológico, uso mais simples, menor preço e, por conseguinte, usados em maior escala, como a Aglutinação, a Imunofluorescência e o ELISA. Ainda neste grupo enquadram-se os ensaios *Western Blot* e *Dot Blot*, que, no entanto, possuem maior conteúdo tecnológico, custo e complexidade de produção e realização; 2 – os testes rápidos, de tecnologias mais recentes, são de utilização simples, leitura fácil e, dependendo de seu tipo e finalidade, com grandes variações de preços; e 3 – ensaios moleculares, de alto conteúdo tecnológico, geralmente de maior sensibilidade, exigindo equipamentos especiais para sua utilização, preços altos e, por isso, utilizados em pesquisas e para testes especiais ou em testes confirmatórios.

A técnica de ELISA utiliza anticorpos marcados com a enzima peroxidase ou fosfatase alcalina para detectar a reação antígeno-anticorpo. Ao serem adicionados o substrato dessas enzimas e um cromógeno, há a formação de um produto colorido, cuja intensidade pode ser medida espectrofotometricamente. É uma técnica sensível, específica e de fácil interpretação. Os testes podem ser desenvolvidos tanto para a detecção e a quantificação de anticorpos como para a quantificação de antígenos presentes nas amostras de soro ou plasma. Existem vários tipos de ELISA, entre eles o ELISA indireto, o ELISA sanduíche e o ELISA competitivo.

A grande maioria dos ensaios imunoenzimáticos voltados para a detecção de anticorpos são do tipo indireto, mas encontramos também alguns produtos que empregam a metodologia de ELISA competitivo. Os testes de ELISA podem ser utilizados na triagem sorológica em Serviços de Hemoterapia ou ainda como testes preliminares ou iniciais quando existe a finalidade de diagnóstico. A possibilidade de automação, ampliando sua capacidade de testar um grande número de amostras e o baixo custo são, sem dúvida, as principais vantagens desta metodologia.

Pelo outro lado, a tecnologia de cultivo de células vem sendo utilizada há muito tempo, especialmente na produção de vacinas para uso humano e veterinário. Diversos processos utilizando células como hospedeiras são atualmente empregados na indústria biofarmacêutica para produção de proteínas para uso em diagnósticos ou terapêuticos, para produção de vacinas, de fatores de coagulação, de anticorpos monoclonais, dentre outros. Hospedeiros procariotos (células bacterianas) são

utilizados devido à sua simplicidade genética e à existência de vetores de expressão bem definidos e potentes. Contribuem para a utilização de células de origem bacteriana, como a *Escherichia coli*, a facilidade de cultivo e a alta produtividade que apresentam em processos de fermentação, viabilizando a obtenção de proteínas simples e de pequeno tamanho, tal como a proteína estudada rNS5z.

Nesse trabalho abordamos o problema de detecção do vírus Zika, tentando desenvolver um ensaio diagnóstico para infecção do Zika vírus, na fase aguda, utilizando a proteína rNS5z como alvo, já que estudos de grupos colaboradores identificaram essa parte da proteína como um alvo com grande potencial de detecção diferencial entre o vírus Zika e outros flavivirus, como os quatro sorotipos de Dengue e Febre Amarela. Sendo assim, expressamos o fragmento rNS5z da proteína NS5 do vírus Zika em *E.coli*, purificamos e subsequentemente utilizamos como alvo na seleção dos aptâmeros. Utilizamos duas técnicas SELEX para a seleção dos nossos aptâmeros, com variados resultados. Em contraste com trabalhos prévios do grupo, nenhum aptâmero foi identificado nas soluções de 1.5M NaCl e 3M NaSCN na seleção em microplacas, o que indica que talvez essa metodologia não seja capaz de selecionar aptâmeros de alta afinidade, parecida em valores com esse obtidos em estudos anteriores.

Isso foi verificado em subsequentes estudos de espectroscopia de fluorescência, na qual os valores da constante Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ) foram significativamente inferiores em ordem de magnitude com os demais obtidos em outros estudos. Mesmo assim, se fosse possível demonstrar que esses aptâmeros seriam específicos para essa proteína e que não tinham interferência por proteínas séricas, como a albumina sérica humana (HSA), eles poderiam ser utilizados em desenvolvimento de testes diagnósticos, e sua afinidade poderia ser aumentada, se necessário, utilizando modificações pós-SELEX. Ensaios de fluorescência estudando a afinidade dos aptâmeros com rNS5z e HSA demonstraram afinidades similares, mesmo quando avaliados em temperaturas diferentes (25°C e 37°C), o que revelaria diferenças na ligação e na potencial formação de complexo.

Para caracterizar em maior detalhe a interação dos aptâmeros selecionados com a proteína alvo rNS5z, e verificar a potencial interferência da HSA nessa ligação, foram utilizados ensaios de ELISA de captura com os aptâmeros imobilizados na placa de ELISA. Todos os aptâmeros testados demonstraram capacidade para capturar rNS5z em tampão de interação, sem nenhum background no controle negativo (soro

pre-imune). Adicionalmente, essa interação foi avaliada na presença de HSA (na concentração fisiológica), para verificar se a afinidade apresentada na fluorescência, e caracterizada como colisional, poderia interferir na captura/interação da rNS5z pelos aptâmeros imobilizados na microplaca de ELISA. Os resultados demonstram claramente que a presença da HSA, mesmo a condição similar à fisiológica, e em concentração >100x à da rNS5z não exerceu nenhuma interferência no sinal com apenas a rNS5z no ensaio de ELISA.

Sendo assim, foi dada sequência ao desenvolvimento do teste, utilizando então soro comercial humano "spiked" com proteína rNS5z, na mesma concentração previamente testada diluída em tampão. Porém, os resultados não foram tão esclarecedores. O sinal da ELISA encontrado para a detecção da rNS5z em soro comercial humano caiu significativamente, e o background correspondente na revelação com soro pré-imune de camundongo (-) aumentou bastante, chegando próximo aos valores de detecção da proteína. Tentando esclarecer um pouco mais sobre esses resultados, e baseados no fato que a HSA é a proteína mais abundante no soro humano, e que a mesma não interferia com o sinal obtido para rNS5z, a mesma interação foi testada, mas usando um anticorpo anti-IgG humano conjugado, para verificar se a imunoglobulina humana interagiria diretamente com os aptâmeros, ou se poderia interferir de alguma maneira com o resultado.

Os ensaios propostos por Zhao (ZHAO *et al*, 2017) constituem em um dos raros ensaios de ELISA utilizando pares de aptâmero-aptâmero que tenham sido bem-sucedidos no formato sanduíche. Em nossa abordagem de aptâmero para captura e anticorpos para revelação, encontramos ainda alguns problemas técnicos, como ausência de um anticorpo monoclonal, o que nos levou ao uso de soro policlonal de animais imunizados com a proteína alvo.

A IgG é a principal imunoglobulina do sangue, respondendo por cerca de 70 a 75% do total de imunoglobulinas. É monomérica e é a principal classe de anticorpos presente nas respostas imunes secundárias, quando são produzidas em grande quantidade. São encontradas no sangue e líquido extracelular, onde podem neutralizar toxinas, vírus e bactérias, opsonizá-los para fagocitose e também ativar o sistema do complemento. É a única que atravessa a barreira placentária e confere um alto grau de imunidade passiva ao recém-nascido. Dessa forma, a IgG pode em muitas vezes, influenciar no resultado dos testes, aumentando o *background* de leitura de D.O, de forma similar com essa observada nos nossos resultados.

Um outro potencial problema é que os aptâmeros de ácidos nucleicos frequentemente não são estáveis em soro, por conta da presença de nucleases no soro. A susceptibilidade dos aptâmeros na presença dessas nucleases depende muito da sua natureza (ARN ou ADN), da sua estrutura e da presença de modificações. Lee *et al.* (2017) não observaram nenhuma degradação significativa dos aptâmeros testados em seus ensaios de ELISA para detecção de NS1 de Zika após 1 h de incubação com 100% de soro humano. Eles também observaram que o limite de detecção do ensaio poderia ser aumentado em 10 vezes quando o soro é diluído na mesma proporção. E que, sob condições idênticas, o aptâmero por eles testado não detecta nenhuma das proteínas NS1 dos quatro sorotipos de dengue, assim como a NS1 do vírus do Nilo Ocidental, e da NS1 do vírus da febre amarela. Adicionalmente, eles obtiveram a detecção da proteína NS1 de Zika em 100% de soro humano, ou em soro humano diluído a 10% com alta seletividade e sem reatividade cruzada de outras proteínas não relacionadas (IFN- $\gamma$  e BSA).

Uma outra possível explicação é que a afinidade dos aptâmeros pode ser alterada dependendo do seu ambiente, e eles podem funcionar de forma diferente em tampões diferentes, porque isso poderia afetar sua estrutura e subsequentemente sua força de ligação, já que essa é obrigatoriamente de forma conformacional. Sendo assim, eles poderiam não funcionar adequadamente em soro, sendo selecionados em tampão, o que poderia também contribuir na redução do sinal observado no ensaio de ELISA. O fato que o sinal aumenta quando a interação é revelada utilizando anti-IgG humano contribui na hipótese que há interação não específica do IgG humano com a placa e/ou aptâmeros, e isso vai ter que ser investigado em maior detalha e soluções procuradas se o projeto vai avançar no seu desenvolvimento. O background sinal vai ter que ser diminuído e a potencial interação dos aptâmeros com o IgG humano investigada para que possamos propor soluções alternativas.

## 6. CONCLUSÃO

As tendências em novos Reagentes para Diagnóstico Laboratorial estão voltadas, principalmente, para uma melhor orientação da conduta terapêutica com diagnósticos mais precisos, diferenciais e mais precoces das doenças, maior rapidez nos resultados, realização dos testes específicos nos próprios locais de atendimento de pacientes. Associa-se a isto a redução dos custos e o aumento da eficiência, visando maior facilidade para o processamento de grandes quantidades de testes, incluindo testes simultâneos para patologias diversas. Estes alvos estão sendo atendidos pelo desenvolvimento de reagentes baseados em plataformas de ensaios moleculares e testes rápidos, dentre outros. Vale ressaltar que, ao se buscar um novo produto, deve-se utilizar os conhecimentos tecnológicos disponíveis mais avançados, assegurando a possibilidade de aplicação ou uso do produto e considerando, sobretudo, o aspecto custo-benefício. Uma outra tendência que tem sido observada é a de desenvolvimento de Reagentes para Diagnóstico Laboratorial de doenças virais. Com a indústria de diagnósticos *in vitro* alcançando maturidade, as empresas estão agora olhando para o mercado de diagnósticos virais para novos nichos.

Merece realce ainda um novo conceito para o tratamento rápido de doenças infecciosas definido como “Teranóstico”, numa tentativa de aproximar a terapia do diagnóstico. Segundo Picard et al (2002), “a crescente disponibilidade de testes rápidos e sensíveis de ácidos nucleicos para doenças infecciosas vai revolucionar a prática da medicina, reduzindo gradualmente a necessidade de métodos padrão baseados em cultura microbiológica, cujos resultados levam pelo menos dois dias. Teranóstico molecular em doenças infecciosas é um conceito emergente no qual ferramentas de biologia molecular são usadas para propiciar rápido (em menos de uma hora), acurado e mais informativo teste diagnóstico, permitindo, então, uma melhor intervenção terapêutica nos pacientes.” (PICARD *et al.* 2002)

O Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Bio-Manguinhos – é uma Instituição pública nacional, no âmbito da Fundação Oswaldo Cruz, que tem como missão “contribuir para a melhoria dos padrões de saúde pública brasileira, através da pesquisa tecnológica e da produção de imunobiológicos necessários para atender à demanda gerada pelo quadro epidemiológico do país”. Bio-Manguinhos vem investindo intensamente em projetos P&D bem como na aquisição e incorporação de novas tecnologias para a produção, em escala industrial, de produtos capazes de



suprir as demandas dos programas nacionais de saúde pública do Ministério da Saúde. A participação de Bio-Manguinhos na área de reativos para diagnóstico pode ocorrer de forma complementar, atuando em áreas onde empresas privadas não possuem interesse, ou seja, no diagnóstico de doenças órfãs; ou em apoio aos programas prioritários de saúde pública. Nesse caso, o diagnóstico rápido, simples, e de fácil acesso para o vírus Zika torna-se imprescindível para pacientes grávidas ou mulheres que consideram gravidez e seus parceiros. Os testes laboratoriais quantitativos e qualitativos utilizados no monitoramento da infecção também são de suma importância na determinação de um esquema adequado de tratamento o que, por sua vez, poderá resultar num aumento da sobrevivência e da qualidade de vida dos pacientes infectados, ou a prevenção dos efeitos colaterais dessa infecção viral.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, E. G., Castilla, V., & Damonte, E. B. (2008). Functional entry of dengue virus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *Journal of General Virology*, 89(2), 474–484. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83357-0>
- Arzusa-Ortega, L., Polo, A., Pérez-Tatis, G., López-García, H., Parra, E., Pardo-Herrera, L. C., ... Rodríguez-Morales, A. J. (2016). Fatal Zika Virus Infection in Girl with Sickle Cell Disease, Colombia. *Emerging Infectious Disease Journal*, 22(5), 2014–2016. <https://doi.org/10.3201/eid2205.151934>
- Ashour, J., Laurent-Rolle, M., Shi, P.-Y., & Garcia-Sastre, A. (2009). NS5 of Dengue Virus Mediates STAT2 Binding and Degradation. *Journal of Virology*, 83(11), 5408–5418. <https://doi.org/10.1128/JVI.02188-08>
- Barrows, N. J., Campos, R. K., Liao, K., Reddisiva, K., Soto-acosta, R., Yeh, S.-C., ... Garcia-Blanco, M. A. (2018). Biochemistry and Molecular Biology of Flaviviruses. *Chemical Review*, 118(8), 4448–4482. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00719>. Biochemistry
- Bates, P.J.; Laber, D.A.; Miller, D.M.; Thomas, S.D.; Trent, J.O. Discovery and development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer. *Exp. Mol. Pathol.* 2009; 86:151-64. doi: 10.1016/j.yexmp.2009.01.004.
- Berezovski, M.; Musheev, M.; Drabovich, A.; Krylov, S.N. Non-SELEX selection of aptamers. *J Am. Chem. Soc.* 2006; 128: 1410–1411.
- Boyer, S., Calvez, E., Chouin-Carneiro, T., Diallo, D., & Failloux, A. B. (2018). An overview of mosquito vectors of Zika virus. *Microbes and Infection*. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2018.01.006>
- Brasil, P., Moreira, M. E., Nogueira, R. M. R., Damasceno, L., Wakimoto, M., Rabello, R. S., ... Cherry, J. D. (2017). Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *N Engl J Med*, 375(24), 2321–2334. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1602412>. Zika
- Calvet, G., Aguiar, R. S., Melo, A. S. O., Sampaio, S. A., de Filippis, I., Fabri, A., ... de Filippis, A. M. B. (2016). Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(6), 653–660. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00095-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00095-5)

- Chen, A.; Yang, S. Replacing antibodies with aptamers in lateral flow immunoassay. *Biosens Bioelectron.* 2015; 15; 71: 230-242. doi: 10.1016/j.bios.2015.04.041.
- Chowdhry, B.Z.; Mendham, A.P.; Tetteh, J.; Withnall. Kinetic resonance Raman spectroscopy of the Briggs-Rauscher oscillator. *R.Chemphyschem.* 2002; 3: 443-446.
- Cortez, C.M.; Silva, D.; Silva, C.M.; Missailidis, S. Interactions of aptamers with sera albumins. *Spectrochim. Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2012; 5: 270-275. doi: 10.1016/j.saa.2012.04.053.
- Cruz-Oliveira, C., Freire, J. M., Conceição, T. M., Higa, L. M., Castanho, M. A. R. B., & Da Poian, A. T. (2015). Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiology Reviews*, 39(2), 155–170. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuu004>
- de Araújo, T. V. B., Rodrigues, L. C., de Alencar Ximenes, R. A., de Barros Miranda-Filho, D., Montarroyos, U. R., de Melo, A. P. L., ... Martelli, C. M. T. (2016). Association between Zika virus infection and microcephaly in Brazil, January to May, 2016: preliminary report of a case-control study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(12), 1356–1363. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30318-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30318-8)
- De Maio, F. A., Risso, G., Iglesias, N. G., Shah, P., Pozzi, B., Gebhard, L. G., ... Gamarnik, A. V. (2016). The Dengue Virus NS5 Protein Intrudes in the Cellular Spliceosome and Modulates Splicing. *PLoS Pathogens*, 12(8), 1–29. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005841>
- Dejnirattisai, W., Supasa, P., Wongwiwat, W., Rouvinski, A., Barba-Spaeth, G., Duangchinda, T., ... Screaton, G. R. (2016). Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with Zika virus. *Nature Immunology*, 17(9), 1102–1108. <https://doi.org/10.1038/ni.3515>
- Ellington, A. D., & Szostak, J. W. (1990). © 19 90 Nature Publishing Group. *Letters To Nature*, 346, 818–822. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(80\)90501-9](https://doi.org/10.1016/0021-9797(80)90501-9)
- Fragoso, V. M. S.; Silva, D. ; Cruz, F. A. O. ; Cortez, C.M. . Risperidone interacts with serum albumin forming complex. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* 2012; 33: 262-266.
- Fragoso, V.M.; Hoppe, L.Y.; de Araújo-Jorge, T.C.; de Azevedo, M.J.; Campos, J.D.; Cortez, C.M.; de Oliveira, G.M. Use of haloperidol and risperidone in highly aggressive Swiss Webster mice by applying the model of spontaneous aggression (MSA). *Behav Brain Res.* 2016; 301: 110-118. doi:

10.1016/j.bbr.2015.12.010.

- Franco L.S., Vidal P.O., Amorim J.H. In silico design of a Zika virus non-structural protein 5 aiming vaccine protection against Zika and dengue in different human populations. *JouARNI of Biomedical Science* 2017; 24: 88–97.
- Fontes, C. A. P., dos Santos, A. A. S. M. D., & Marchiori, E. (2016). Magnetic resonance imaging findings in Guillain-Barré syndrome caused by Zika virus infection. *Neuroradiology*, 58(8), 837–838. <https://doi.org/10.1007/s00234-016-1687-9>
- Foo, S., Chen, W., Chan, Y., Bowman, J. W., Chang, L., Choi, Y., ... Jung, J. U. (2017). Immunosuppression During Pregnancy. *Nature Microbiology*, 2(November), 1558–1570. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0016-3>
- Forgac, M. (2007). Vacuolar ATPases: Rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(11), 917–929. <https://doi.org/10.1038/nrm2272>
- Foy, B. D., Kobylinski, K. C., Foy, J. L. C., Blitvich, B. J., da Rosa, A. T., Haddow, A. D., ... Tesh, R. B. (2011). Probable Non-Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. *Emerging Infectious Diseases*, 17(5), 880–882. <https://doi.org/10.3201/eid1705.101939>
- García-Sastre, A., & Biron, C. A. (2006). Type 1 interferons and the virus-host relationship: A lesson in détente. *Science*, 312(5775), 879–882. <https://doi.org/10.1126/science.1125676>
- Germi, R., Crance, J. M., Garin, D., Guimet, J., Lortat-Jacob, H., Ruigrok, R. W. H., ... Drouet, E. (2002). Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. *Virology*, 292(1), 162–168. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1232>
- González, V. M., Elena Martín, M., Fernández, G., & García-Sacristán, A. (2016). Use of aptamers as diagnostics tools and antiviral agents for human viruses. *Pharmaceuticals*, 9(4), 1–34. <https://doi.org/10.3390/ph9040078>
- Goo, L., Dowd, K. A., Smith, A. R. Y., Pelc, R. S., Demaso, C. R., & Pierson, T. C. (2016). Zika virus is not uniquely stable at physiological temperatures compared to other flaviviruses. *mBio*, 7(5), 16–19. <https://doi.org/10.1128/mBio.01396-16>
- González, V.M.; Martín, M.E.; Fernández, G.; García-Sacristán, A. Use of Aptamers as Diagnostics Tools and Antiviral Agents for Human Viruses. Gopinath, S.C.; Kumar, P.K. Aptamers that bind to the hemagglutinin of the

- recent pandemic influenza virus H1N1 and efficiently inhibit agglutination. *Acta Biomater.* 2013; 9: 8932–8941.
- Gopinath, S.C.B.. Aptamers. In: Meyers, R.A. (Ed.) *Encyclopedia of Analytical Chemistry* 2011; 1–27.
- Pharmaceuticals* (Basel) 2016; 78: 2-34. doi: 10.3390/ph9040078.
- Grant A., Ponia S.S., Tripathi S., Balasubramaniam V., Miorin L., Sourisseau M., Schwarz M.C., SanchezSeco M.P., Evans M.J., Best S.M., Garcia-Sastre A. Zika virus targets human STAT2 to inhibit type I interferon signaling. *Cell Host Microbe* 2016; 19: 882–890.
- Grant, A., Ponia, S. S., Tripathi, S., Balasubramaniam, V., Miorin, L., Sourisseau, M., ... García-Sastre, A. (2016). Zika virus targets human STAT2 to inhibit type I interferon signaling HHS Public Access. *Cell Host Microbe June, 8(196)*, 882–890. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.05.009>
- Guzman, M. G., Alvarez, M., & Halstead, S. B. (2013). Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: An historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. *Archives of Virology, 158(7)*, 1445–1459. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1645-3>
- Halstead, S. (1977). Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *Journal of Experimental Medicine, 146(1)*, 201–217. <https://doi.org/10.1084/jem.146.1.201>
- Hou W., Cruz-cosme R., Armstrong N., Obwolo L.A., Wen F., Hu M., Tang Q. Molecular cloning and characterization of the genes encoding the proteins of Zika virus. *Gene* 2017; 628: 117-128.
- Issur, M., Geiss, B. J., Bougie, I., Picard-Jean, F., Despins, S., Mayette, J., ... Bisailon, M. (2009). The flavivirus NS5 protein is a true RNA guanylyltransferase that catalyzes a two-step reaction to form the RNA cap structure. *Rna, 15(12)*, 2340–2350. <https://doi.org/10.1261/rna.1609709>
- Jayasena,S.D. Aptamers: an emerging class of molecuLes that rival antibodies in diagnostics. *Clin. Chem.* 1999; 45: 1628–1650.
- Jenison, R.D.; Jennings, S.D.; Walker, D.W.; Bargatze, R.F.; Parma, D. Oligonucleotide inhibitors of P-selectin-dependent neutrophil-platelet adhesion. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 1998; 8: 265-79.

- Jijakli, K.; Khraiweh, B.; Fu, W.; Luo, L.; Alzahmi, A.; Koussa, J.; Chaiboonchoe, A.; Kirmizialtin, S.; Yen, L.; Salehi-Ashtiani, K. The *in vitro* selection world. *Methods* 2016; 106: 3-13. doi: 10.1016/j.ymeth.2016.06.003.
- Junjhon, J., Pennington, J. G., Edwards, T. J., Perera, R., Lanman, J., & Kuhn, R. J. (2014). Ultrastructural Characterization and Three-Dimensional Architecture of Replication Sites in Dengue Virus-Infected Mosquito Cells. *Journal of Virology*, 88(9), 4687–4697. <https://doi.org/10.1128/JVI.00118-14>
- Keefe, A.D.; Pai, S.; Ellington, A. Aptamers as therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2010; 9:537-50. doi: 10.1038/nrd3141.
- Kao, C. C., Singh, P., & Ecker, D. J. (2001). De novo initiation of viral RNA-dependent RNA synthesis. *Virology*, 287(2), 251–260. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1039>
- Kostyuchenko, V. A., Lim, E. X. Y., Zhang, S., Fibriansah, G., Ng, T. S., Ooi, J. S. G., ... Lok, S. M. (2016a). Structure of the thermally stable Zika virus. *Nature*, 533(7603), 425–428. <https://doi.org/10.1038/nature17994>
- Kostyuchenko, V. A., Lim, E. X. Y., Zhang, S., Fibriansah, G., Ng, T. S., Ooi, J. S. G., ... Lok, S. M. (2016b). Structure of the thermally stable Zika virus. *Nature*, 533(7603), 425–428. <https://doi.org/10.1038/nature17994>
- Kuhn, R. J., Zhang, W., Rossmann, M. G., Pletnev, S. V., Corver, J., Lenches, E., ... Strauss, J. H. (2002). Structure of dengue virus: Implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*, 108(5), 717–725. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00660-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00660-8)
- Lakowicz J.R. Plasmonics in Biology and Plasmon-Controlled Fluorescence. *Plasmonics*. 2006; 1: 5–33.
- Laura A. Byk, a Néstor G. Iglesias, a Federico A. De Maio, a Leopoldo G. Gebhard, a Mario Rossi, b A. V. G. F. (2016). Dengue Virus Genome Uncoating Requires Ubiquitination 2 3, 7(3), 1–10. <https://doi.org/10.1128/mBio.00804-16>. Editor
- Leah C. Katzelnick, Lionel Gresh, M. Elizabeth Halloran, J. C. M., & Guillermina Kuan, Aubree Gordon, A. B. and E. H. (2015). Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans, 358(6365), 1–13. <https://doi.org/10.1117/12.2008529>. Image-based
- Lee, H.K., Zeng, H. (2017). Aptamer-based ELISA Assay for Highly Specific and Sensitive Detection of Zika NS1 Protein. *Analytical Chemistry* 89: 12.743-12.748.
- Lodeiro, M. F., Filomatori, C. V., & Gamarnik, A. V. (2009). Structural and Functional

- Studies of the Promoter Element for Dengue Virus RNA Replication. *Journal of Virology*, 83(2), 993–1008. <https://doi.org/10.1128/JVI.01647-08>
- Low, J. G., Wijaya, L., Li, G. K. Y., Lim, E. Y. L., Shum, A. K. L., Cheung, Y. B., & Ooi, E. E. (2015). The role of pre-existing cross-reactive antibodies in determining the efficacy of vaccination in humans: Study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s13063-015-0651-z>
- Ma, L., Jones, C. T., Groesch, T. D., Kuhn, R. J., & Post, C. B. (2004). Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(10), 3414–3419. <https://doi.org/10.1073/pnas.0305892101>
- Mansuy, J. M., Dutertre, M., Mengelle, C., Fourcade, C., Marchou, B., Delobel, P., ... Martin-Blondel, G. (2016). Zika virus: High infectious viral load in semen, a new sexually transmitted pathogen? *The Lancet Infectious Diseases*, 16(4), 405. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00138-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00138-9)
- Michlmayr, D., Andrade, P., Gonzalez, K., & Balmaseda, A. (2018). CD14+ CD16+ monocytes are the main target of Zika virus infection in peripheral blood mononuclear cells in a paediatric study in Nicaragua, 2(11), 1462–1470. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0035-0>.CD14
- Miner, J.J., Diamond, M.S. (2017). Zika virus pathogenesis and tissue tropism. *Cell Host Microbe* 21(2): 134-142. doi:10.1016/j.chom.2017.01.004.
- Mlakar, J., Korva, M., Tul, N., Popović, M., Poljšak-Prijatelj, M., Mraz, J., ... Avšič Županc, T. (2016). Zika Virus Associated with Microcephaly. *New England Journal of Medicine*, 374(10), 951–958. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1600651>
- Musso, D., Roche, C., Robin, E., Nhan, T., Teissier, A., & Cao-Lormeau, V. M. (2015). Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerg Infect Dis*, 21(2), 359–361. <https://doi.org/10.3201/eid2102.141363>
- Ng, K. Y. B., Mingels, R., Morgan, H., Macklon, N., & Cheong, Y. (2018). In vivo oxygen, temperature and pH dynamics in the female reproductive tract and their importance in human conception: A systematic review. *Human Reproduction Update*, 24(1), 15–34. <https://doi.org/10.1093/HUMUPD/DMX028>
- Ns, P., Bujalowski, P. J., Bujalowski, W., & Choi, K. H. (2017). Interactions between the Dengue Virus NS5 and SLA, 91(11), 1–11.
- Organização Mundial da Saúde [homepage da internet]. Acessado em maio de 2017. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/Zika/pt/>.
- Oliveira, E. R. A., de Alencastro, R. B., & Horta, B. A. C. (2017). New insights into

- flavivirus biology: the influence of pH over interactions between prM and E proteins. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 31(11), 1009–1019. <https://doi.org/10.1007/s10822-017-0076-8>
- Pantoja, P., Pérez-Guzmán, E. X., Rodríguez, I. V., White, L. J., González, O., Serrano, C., ... Sariol, C. A. (2017). Zika virus pathogenesis in rhesus macaques is unaffected by pre-existing immunity to dengue virus. *Nature Communications*, 8. <https://doi.org/10.1038/ncomms15674>
- Petersen, L. R., Jamieson, D. J., Powers, A. M., & Honein, M. A. (2016). Zika Virus. *New England Journal of Medicine*, 374(16), 1552–1563. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1602113>.
- Picard, F. (2002). Rapid Molecular Theranostics in Infectious Diseases. *Drug Discovery Today* 7 (21): 1092-1100.
- Ranjith-Kumar, C. T., Gutshall, L., Kim, M.-J., Sarisky, R. T., & Kao, C. C. (2002). Requirements for de novo initiation of RNA synthesis by recombinant flaviviral RNA-dependent RNA polymerases. *Journal of Virology*, 76(24), 12526–12536. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.24.12526>
- Rey, F. A., Heinz, F. X., Mandl, C., Kunz, C., & Harrison, S. C. (1995a). The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/375291a0>
- Rey, F. A., Heinz, F. X., Mandl, C., Kunz, C., & Harrison, S. C. (1995b). The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/375291a0>
- Rice, C. M., Lenches, E. M., Eddy, S. R., Shin, S. J., Sheets, R. L., & Strauss, J. H. (1985). Nucleotide Sequence of. *Science*, 229(19).
- Roby, J. A., Setoh, Y. X., Hall, R. A., & Khromykh, A. A. (2015). Post-translational regulation and modifications of flavivirus structural proteins. *Journal of General Virology*, 96(7), 1551–1569. <https://doi.org/10.1099/vir.0.000097>
- Rotherham, L.S.; MaserumuLe, C.; Dheda, K.; Theron, J.; Khati, M. Selection and application of ssADN aptamers to detect active TB from sputum samples. *PLoS One*. 2012; 7: e46862.
- Salas-benito, J., Valle, J. R., Salas-benito, M., Ceballos-olvera, I., Mosso, C., & Angel, R. M. (2007). Evidence that the 45-kD Glycoprotein , Part of a Putative Dengue Virus Receptor Complex in the Mosquito Cell Line C6 / 36 , Is a Heat-Shock – Related Protein, 77(2), 283–290.
- Sarno, M., Sacramento, G. A., Khouri, R., do Rosário, M. S., Costa, F., Archanjo, G.,



- ... de Almeida, A. R. P. (2016). Zika Virus Infection and Stillbirths: A Case of Hydrops Fetalis, Hydranencephaly and Fetal Demise. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(2), 5–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004517>
- Savidis, G., McDougall, W. M., Meraner, P., Perreira, J. M., Portmann, J. M., Trincucci, G., ... Brass, A. L. (2016). Identification of Zika Virus and Dengue Virus Dependency Factors using Functional Genomics. *Cell Reports*, 16(1), 232–246. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.06.028>
- Silva, D.; Cortez, C.M.; Louro, S.R. Quenching of the intrinsic fluorescence of bovine serum albumin by chlorpromazine and hemin. *Braz J Med Biol Res*. 2004 (a); 37: 963-968.
- Silva, D.; Cortez, C.M.; Cunha-Bastos, J.; Louro, S.R. Methyl parathion interaction with human and bovine serum albumin. *Toxicol Lett*. 2004 (b); 147: 53-61.
- Silva, D.; Cortez, C.M.; Silva, C.M.; Missailidis, S. A fluorescent spectroscopy and modelling analysis of anti-heparanase aptamers-serum protein interactions. *J Photochem Photobiol B*. 2013; 127: 68-77. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2013.06.015.
- Silverton EW, Navia MA, Davies DR. Three-dimensional structure of an intact human immunoglobulin (1977). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 74 (11): 5140-5144.
- Sun, H., Zu, Y. A Highlight of Recent Advances in Aptamer Technology and its application. *Molecules* 2015; 20: 11959-11980.
- Terzian, A. C. B., Schanoski, A. S., De Oliveira Mota, M. T., Da Silva, R. A., Estofolete, C. F., Colombo, T. E., ... Nogueira, M. L. (2017). Viral load and cytokine response profile does not support antibody-dependent enhancement in Dengue-Primed Zika Virus-infected patients. *Clinical Infectious Diseases*, 65(8), 1260–1265. <https://doi.org/10.1093/cid/cix558>
- Tuerk, C., & Gold, L. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: Chemi-SELEX. *Science*, 249(August), 505–510. <https://doi.org/10.1038/346818a0>.
- Ulrich, H.; Trujillo, C.A.; Nery, A.A.; Alves, J.M.; Majumder, P.; Resende, R.R.; Martins, A.H. DNA and RNA aptamers: from tools for basic research towards therapeutic applications. *Comb. Chem. High. Tech.* 2006; 9:619-32.
- Van Der Schaar, H. M., Rust, M. J., Chen, Van Der Ende-Metselaar, H., Wilschut, J., Zhuang, X., & Smit, J. M. (2008). Dissecting the cell entry pathway of dengue

- virus by single-particle tracking in living cells. *PLoS Pathogens*, 4(12).  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000244>
- Wandtke, T., Wozniak, J., Kopinski, P. Aptamers in Diagnostics and Treatment of Viral Infections (2015). *Viruses* 7 (2): 751-780.
- Wang, P.; Hatcher, K.L.; Bartz, J.C.; Chen, S.G.; Skinner, P.; Richt, J.; Liu, H.; Sreevatsan, S. Selection and characterization of ADN aptamers against PrP(Sc). *Exp. Biol. Med.* 2011; 236: 466–476.
- Wang W., Li G., Wu D., Luo Z., Pan P., Tian M., Wang Y., Xiao F., Li A., Wu K., Liu X., Rao L., Liu F., Liu Y., Wu J. Zika virus infection induces host inflammatory responses by facilitating NLRP3 inflammasome assembly and interleukin-1 $\beta$  secretion. *Nature Communications* 2018; 106: 1-16.
- Wang, A., Thurmond, S., Islas, L., Hui, K., & Hai, R. (2017). Zika virus genome biology and molecular pathogenesis. *Emerging Microbes & Infections*, 6(3), e13.  
<https://doi.org/10.1038/emi.2016.141>
- Wang, B., Thurmond, S., Hai, R., & Song, J. (2018). Structure and function of Zika virus NS5 protein: perspectives for drug design. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(10), 1723–1736. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2751-x>
- Wells, M. F., Salick, M. R., Wiskow, O., Ho, D. J., Worringer, K. A., Ihry, R. J., ... Egan, K. (2016). Genetic Ablation of AXL Does Not Protect Human Neural Progenitor Cells and Cerebral Organoids from Zika Virus Infection. *Cell Stem Cell*, 19(6), 703–708. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.11.011>
- Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C. K. E., Walther, P., ... Bartenschlager, R. (2009). Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites. *Cell Host and Microbe*, 5(4), 365–375. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.03.007>
- Xie, X., Yang, Y., Muruato, A. E., Zou, J., Shan, C., Nunes, B. T. D., ... Shi, P. Y. (2017). Understanding zika virus stability and developing a chimeric vaccine through functional analysis. *mBio*, 8(1), 1–14.  
<https://doi.org/10.1128/mBio.02134-16>
- Ye, Q., Liu, Z. Y., Han, J. F., Jiang, T., Li, X. F., & Qin, C. F. (2016). Genomic characterization and phylogenetic analysis of Zika virus circulating in the Americas. *Infection, Genetics and Evolution*, 43, 43–49.  
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.05.004>
- Yuan, L., Huang, X. Y., Liu, Z. Y., Zhang, F., Zhu, X. L., Yu, J. Y., ... Qin, C. F. (2017).

- A single mutation in the prM protein of Zika virus contributes to fetal microcephaly. *Science*, 358(6365), 933–936. <https://doi.org/10.1126/science.aam7120>
- Zhang, C.; Feng, T. Cheng, J.; Li, Y.; Yin, X.; Zeng, W.; Jin, X.; Li, Y.; Guo, F.; Jin, T. Structure of NS5 methyltransferase from Zika virus and implications in inhibitor design. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016; 16: 31963-31970.
- Zhao, B.; Yi, G.; Du, F.; Chuang, Y.Z. ; Vaughan, R.C. ; Sankaran, B.; Kao, C.C.; Li, P. Structure and function of the Zika virus full-length NS5 protein. *Nat Commun*. 2017; 08: 14762-14771.
- Zhang, Y., Corver, J., Chipman, P. R., Zhang, W., Pletnev, S. V, Sedlak, D., ... Rossmann, M. G. (2003). Structures of immature flavivirus particles, 22(11).
- Zhou, Y., Ray, D., Zhao, Y., Dong, H., Ren, S., Li, Z., ... Li, H. (2007). Structure and Function of Flavivirus NS5 Methyltransferase. *Journal of Virology*, 81(8), 3891–3903. <https://doi.org/10.1128/JVI.02704-06>
- Zuker, M. Mfold web Server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*. 2003; 31: 3406-3415.