



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MICROBIANA**

**LEONARDO LOPES DA LUZ**

**EXPRESSÃO DE ANTÍGENOS DE MULTIEPÍTOPO DE DENGUE E ZIKA VÍRUS**  
**EM PLANTA E BACULOVÍRUS**

**BRASÍLIA - DF**

**2019**

**LEONARDO LOPES DA LUZ**

EXPRESSÃO DE ANTÍGENOS DE MULTIEPÍTOPO DE DENGUE E ZIKA VÍRUS EM  
PLANTA E BACULOVÍRUS

Dissertação apresentada ao  
Departamento de Biologia Celular, do  
Instituto de Ciências Biológicas da  
Universidade de Brasília como requisito  
parcial para obtenção do Título de  
Mestre em Biologia Microbiana.

Orientador:

**Prof. Dr. Tatsuya Nagata**

Co-orientador:

**Prof. Dr. Bergmann Ribeiro**

BRASÍLIA - DF

2019

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Le           Lopes da Luz, Leonardo  
              Expressão de antígenos de multiepitopo de Dengue e Zika  
              vírus em planta e baculovírus / Leonardo Lopes da Luz;  
              orientador Tatsuya Nagata; co-orientador Ribeiro Bergmann.  
              - Brasília, 2019.  
              75 p.

              Dissertação (Mestrado - Mestrado em Biologia Microbiana)  
              - Universidade de Brasília, 2019.

              1. Dengue. 2. Zika. 3. Diagnóstico. 4. Planta . 5.  
              Baculovírus. I. Nagata, Tatsuya, orient. II. Bergmann,  
              Ribeiro, co-orient. III. Título.

# LEONARDO LOPES DA LUZ

## EXPRESSÃO DE ANTÍGENOS DE MULTIEPÍTOPO DE DENGUE E ZIKA VÍRUS EM PLANTA E BACULOVÍRUS

Dissertação de Mestrado apresentada à banca examinadora como requisito parcial à  
obtenção do Título de Mestre em Biologia Microbiana, da Universidade de Brasília,  
defendida e

aprovada em \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ pela banca examinadora constituída  
por:

---

Prof. Dr. Tatsuya Nagata - Universidade de Brasília  
Presidente da Banca

---

Prof<sup>a</sup> Dra. Rita de Cássia Pereira Carvalho - Universidade de Brasília

---

Prof<sup>a</sup> Dra. Kelly Grace Magalhães - Universidade de Brasília

“Decido este trabalho a todo sucesso profissional  
que venha surgir daqui em diante!”

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar forças e proteção durante esta etapa de minha vida.

Aos meus pais, Fábio Lopes e Núbia Mendes, que sempre acreditaram no meu potencial, incentivando-me e dando-me apoio com muito amor e carinho.

À minha irmã, Beatriz Lopes, que me alegrou com suas “artes” nos momentos ruins.

A um novo Leonardo que acabei descobrindo nesses dois anos morando “sozinho” e longe de casa e que me fortaleceu frente aos novos desafios da vida e, principalmente, nas relações humanas.

Às minhas três grandes amigas, Ana Clara, Lara Gonçalves e Lorrany Cardoso, consideradas meus portos seguros, por me apoiarem em momentos de dificuldades. Sempre me alegraram, ouviram-me e aconselharam-me quando mais precisei.

À minha avó, Erendy Camargo, e aos meus tios, Nébica Mendes e Neivaldo Mendes, que formaram um pilar de aconchego, paz e tranquilidade para que eu pudesse elevar meu ânimo nessa jornada.

Aos meus primos amados e amigos conterrâneos que serviram como escape nos momentos de descontração e alegria.

À minha Cidade de Goiás que sempre me inspirou e me fez feliz.

Ao meu orientador, Tatsuya Nagata, que gentilmente me guiou no decorrer dos trabalhos, dando-me todos os suportes necessários.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Virologia que me apoiaram, ensinaram-me, guiaram-me e alegraram os meus dias. Em especial à Raquel Sampaio, à Moana Tavares e à Dione Mendes por puxarem minha orelha e aguentarem minhas saudáveis brincadeiras.

À Universidade de Brasília, à Coordenação de Pessoal de Nível Superior e aos colaboradores da Universidade Federal de Goiás por permitirem a realização dos meus estudos e trabalhos, ofertando-me bolsas e financiamentos.

“Mais tequila. Mais amor.  
Mais qualquer coisa.  
Mais é melhor”  
**Meredith Grey**

## LISTA DE SIGLAS

AA	Aminoácidos
ADE	<i>Antibody dependet enhancement</i>
CDC	<i>Centers of Disease Control and Prevention</i>
cDNA	<i>complementar DNA</i>
CHIKV	<i>Chikungunya virus</i>
CMV	<i>Cauliflower mosaic virus</i>
CP	<i>Coat protein</i>
DENV	<i>Dengue virus</i>
DHF	<i>Dengue haemorrhagic fever</i>
DI	<i>Domain I</i>
DII	<i>Domain II</i>
DIII	<i>Domain III</i>
DNA	<i>Desoxirribonucleic acid</i>
DSS	<i>Dengue shock syndrome</i>
FD	<i>Dengue fever</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FOR	<i>Foward</i>
GA	<i>Gibsson Assembly</i>
GarMbFV	<i>Garlic mite-borne filamentous virus</i>
GFP	<i>Gree Fluorescent Protein</i>
IgA	<i>Immunoglobulin A</i>
IgG	<i>Immunoglobulin G</i>
IgM	<i>Immunoglobulin M</i>
kb	kilo bases
LB	<i>Left Border</i>
LPS	Lipolissacarídeos



MAC-ELISA	<i>M antibody capture - Enzyme linked immunossorbent assay</i>
MAYV	<i>Mayarau virus</i>
MP	<i>Moviment protein</i>
NOS	<i>Nopaline synthase</i>
ORSV	<i>Odontoglossum ringspot virus</i>
PAHO	<i>Pan American Health Organization</i>
pFB-A	pFastBac-Amino
pH	Potencial hidrogeônico
PMMoV	<i>Pepper mild mottle virus</i>
Polh	Poliedrina
PRNT	<i>Plaque reduction neutralization test</i>
RB	<i>Right border</i>
REV	<i>Reverse</i>
RT	<i>Reverse transcription</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcription - polimerase chain reaction</i>
RZ	<i>Ribozime</i>
sfRNA	<i>subgenomic RNA</i>
ssRNA	<i>single strand RNA</i>
Ti	<i>Tumor inducing</i>
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>
TORCHZ	Toxoplasmose, Rubérola, Citomegaloirose, Herpesvirose, Zika
UTR	<i>Untranslated region</i>
VLP	<i>Virus like particle</i>
WB	<i>Western blotting</i>
WNV	<i>West nile virus</i>
YFV	<i>Yellor fever virus</i>
ZIKV	<i>Zika virus</i>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Genoma de <i>Flavivirus</i> .....	<b>9</b>
<b>Figura 2.</b> Domínios da proteína E.....	<b>9</b>
<b>Figura 3.</b> Mapeamento de epítomos.....	<b>17</b>
<b>Figura 4.</b> Clonagem dos genes de multiepítopo Multi-DENV, Multi-ZIV no vetor viral pJL_PMMoV.....	<b>24</b>
<b>Figura 5.</b> Região de clonagem do pFB-A.....	<b>28</b>
<b>Figura 6.</b> Gradiente de Sacarose.....	<b>29</b>
<b>Figura 7.</b> Eletroforese em gel de agarose 1%.....	<b>33</b>
<b>Figura 8.</b> Análise da expressão de GFP sob luz ultravioleta.....	<b>34</b>
<b>Figura 9.</b> Expressão da GFP em <i>N. bethamiana</i> .....	<b>34</b>
<b>Figura 10.</b> Expressão dos antígenos de multiepítopo em <i>N. bethamiana</i> .....	<b>36</b>
<b>Figura 11.</b> Eletroforese em gel de agarose 2%.....	<b>37</b>
<b>Figura 12.</b> Eletroforese em gel de agarose 1,5%.....	<b>38</b>
<b>Figura 13.</b> Expressão de antígenos de Multi-DENV em <i>T. nii</i> .....	<b>39</b>
<b>Figura 14.</b> Expressão de antígenos de Muti-ZIKV em <i>T. nii</i> .....	<b>40</b>
<b>Figura 15.</b> Expressão de antígenos do ZIKV e YFV em <i>T. nii</i> .....	<b>40</b>
<b>Figura 16.</b> ELISA de detecção de IgG anti-DENV.....	<b>42</b>
<b>Figura 17.</b> ELISA de detecção de IgG anti-ZIKV.....	<b>43</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Isolados de <i>flavivirus</i> , identificação e N° de acesso.....	<b>21</b>
<b>Tabela 2.</b> Sequências do <i>primers</i> utilizados na amplificação dos insertos Muilto-DENV e Multi-ZIKV.....	<b>23</b>
<b>Tabela 3.</b> Sequências do <i>primers</i> utilizados na amplificação do vetor viral pJL_PMMo....	<b>23</b>
<b>Tabela 4.</b> <i>Primers</i> utilizados no sequenciamento para confirmação das construções PMMoV_( $\Delta$ CP)DENV e PMMoV_( $\Delta$ CP)ZIKV.....	<b>24</b>
<b>Tabela 5.</b> Sequências dos <i>primers</i> utilizados na PCR para inserção do sítio de restrição para NcoI.....	<b>27</b>

## RESUMO

*Dengue virus* (DENV) e *Zika virus* (ZIKV) são arbovírus pertencentes à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, que provocam milhões de infecções em todo o mundo. Devido à emergência do ZIKV em áreas endêmicas para o DENV, o diagnóstico clínico não consegue distinguir as viroses devido à similaridade dos sintomas. Além disso, os métodos sorológicos disponíveis no mercado têm baixa especificidade devido à alta similaridade entre as proteínas do DENV e do ZIKV que provocam reatividade cruzada entre os anticorpos anti-flavivírus. Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi expressar antígenos de multiepítopo de DENV e ZIKV utilizando sistemas de planta e baculovírus recombinante para desenvolver kit diagnóstico sorológico específico para cada vírus. Os genes de multiepítopos foram desenhados através de alinhamento múltiplo e mapeamento de epítopos. Então, os genes foram clonados em um vetor viral vegetal, o *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) e no vetor baseado em baculovírus para infecção em folhas de *Nicotiana benthamiana* e células TN5-B de *Trichoplusia ni*, respectivamente. Após as inoculações, plantas de *N. benthamiana* foram mantidas por 10 dias em condições favoráveis de crescimento, e as células TN5-B foram cultivadas por 72 horas a 28°C. Em seguida, os extratos de folha e de células TN5-B foram submetidos à análise eletroforética de proteínas e *Western blotting*. Os antígenos foram confirmados utilizando anticorpos anti-his e, então, foram purificados em gradiente de sacarose por ultracentrifugação para utilização nos ensaios de ELISA. Amostras de soro IgG positivas para DENV e ZIKV foram utilizadas em ELISA indireto. Os resultados mostram que os antígenos produzidos não apresentaram reatividade cruzada entre os soros dos pacientes e, portanto, são ótimos candidatos para o desenvolvimento de testes sorológicos mais específicos.

**Palavras-chave:** DENGUE. ZIKA. DIAGNÓSTICO. ESPECIFICIDADE. PLANTA. BACULOVÍRUS

## ABSTRACT

Dengue (DENV) and Zika (ZIKV) viruses are arthropod-borne virus that belongs to the family *Flaviviridae*, *Flavivirus* genus, that causes millions of infections worldwide. Due to the emergence of ZIKV in endemic areas for DENV, clinical diagnostic cannot distinguish both viruses due to similar symptoms. Furthermore, available serological methods have low specificity due to the high similarity between DENV and ZIKV proteins. In addition, anti-flavivirus antibodies may cross-react with proteins of such viruses. Therefore, the purpose of this work is to express DENV and ZIKV multi-epitope antigens using plant system via *Agrobacterium tumefaciens* and recombinant baculovirus. Multi-epitope antigens genes were designed using multiple alignment and epitope mapping. Then, genes were cloned in vegetable viral vector *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) and in pFastBac-Amino vector (pFB-A) to further infection in *Nicotiana benthamiana* leaves and *Trichoplusia ni* TN5B cells, respectively. After infection, *N. benthamiana* plants were maintained for 10 days in favorable conditions to their growth while TN5B cells were cultivated at 28°C for 3 days. Next, *western blotting* was performed using leaf and TN5B cells extracts to detect antigens with anti-histidine monoclonal antibody. Antigens were purified using sucrose gradient by ultracentrifugation for use in ELISA. Results shows the antigens produced did not present cross-reactivity between patients' sera and, therefore, are good candidates for specific serological test development.

**Keywords:** DENGUE. ZIKA. DIAGNOSIS. SPECIFICITY. PLANT. BACULOVIRUS

## Sumário

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 ORIGEM, EPIDEMIOLOGIA E SAÚDE PÚBLICA	1
1.2 ASPECTOS CLÍNICOS, TRATAMENTO E PREVENÇÃO	3
1.3 DIAGNÓSTICOS	4
1.3.1 Diagnósticos sorológicos	5
1.5 GENÉTICA, ESTRUTURA PROTEICA E IMUNIDADE HUMORAL	7
1.6 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS	10
1.6.1 Expressão em planta	11
1.6.2. Clones infecciosos como vetores de expressão	13
1.6.2 Expressão em células de inseto	15
1.7 ANTÍGENOS RECOMBINANTES E NOVOS DIAGNÓSTICOS	16
2 JUSTIFICATIVA	19
3. OBJETIVOS	20
3.1. OBJETIVO GERAL	20
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1 EXPRESSÃO EM PLANTAS	21
4.1.1. Desenho das sequências de aminoácidos dos antígenos de multiepítomos	21
4.1.2 Clonagem dos insertos no vetor pJL_PMMoV por <i>Gibson Assembly</i>	22
4.1.3 Transformação de <i>Escherichia coli</i> DH10B com os vetores PMMoV( $\Delta$ CP)DENV e PMMoV( $\Delta$ CP)ZIKV e sequenciamento	24
4.1.4 Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> com as construções PMMoV_ $\Delta$ (CP)DENV e PMMoV_ $\Delta$ (CP)ZIKV	25
4.1.4. Agroinfiltração	25
4.1.5 Detecção de proteínas recombinantes por <i>Western Blotting</i>	26
4.2 EXPRESSÃO EM CÉLULAS DE INSETO	26

4.2.1 Amplificação dos genes Multi-DENV e Multi-ZIKV com sítio de restrição para enzima NcoI e digestão	26
4.2.2 Obtenção do vetor pFastBac-AMINO para clonagem e transformação	27
4.2.3 Transformação de <i>E. coli</i> DH10Bac e transfecção das células de inseto	28
4.2.4 Purificação dos antígenos de multiepítipo por gradiente de sacarose	29
4.3 ENSAIOS IMUNOENZIMÁTICOS	30
4.3.1 ELISA indireto para detecção de IgG	30
4.3.2 MAC-ELISA	31
4.3.3 Análise das absorvâncias	31
5 RESULTADOS	33
5.1 CONSTRUÇÃO PMMoV_( $\Delta$ CP)DENV e PMMoV_( $\Delta$ CP)ZIKV	33
5.2 EXPRESSÃO EM <i>N. benthamiana</i>	33
5.2.1 Expressão da GFP e ação do supressor HC-Pro	33
5.2.1 Expressão dos antígenos de multiepítipo de DENV e ZIKV	35
5.3 BACMÍDEOS RECOMBINANTES	36
5.3.1 Construção dos bacmídeos com antígenos de multiepítipo DENV e ZIKV	36
5.3.2 Transfecção das células de inseto, expressão e purificação dos antígenos	39
5.4 ENSAIOS IMUNOENZIMÁTICOS	40
5.4.1 ELISA indireto	41
6 DISCUSSÃO	44
7. CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	52
ANEXOS	60

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ORIGEM, EPIDEMIOLOGIA E SAÚDE PÚBLICA

Desde sua descoberta em 1943, as notificações de infecção causada pelo *Dengue virus* (DENV) têm aumentado nas regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo (Messina *et al.*, 2014). O DENV é a maior causa de doença viral transmitida por um artrópode no mundo, classificando-o como um Arbovírus – *arthropod borne virus*. Pertencente ao gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae* e transmitido pelos mosquitos do gênero *Aedes*, o DENV possui quatro sorotipos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (Gibbons & Vaughn, 2002).

As infecções causadas pelo DENV são consideradas um problema grave de saúde pública em diversos países, pois provocam aproximadamente 400 milhões de infecções anualmente, sendo 2 milhões de casos graves e 20 mil óbitos em todo o mundo (Ramos-Castãnedo *et al.*, 2017). O impacto econômico, incluindo gastos com cuidados médicos, vigilância, controle do vetor de transmissão e perda de produtividade é alto com estimativa de aproximadamente 39 bilhões de dólares por ano no mundo. Nas Américas, os custos econômicos e sociais relacionados à doença Dengue estão estimados entre 1 bilhão e 4 bilhões de dólares anualmente. Estudos epidemiológicos recentes indicam que a incidência de Dengue na América Latina e regiões caribenhas aumentou no período de 1995 a 2010 (71,1/100.000 pessoas por ano) (Cafferata *et al.*, 2013).

Entre 1947 e 1970, a dengue foi erradicada nas Américas devido ao programa de erradicação do *Ae. aegypti* introduzido pela Organização de Saúde Pan-americana (PAHO). Este programa, por sua vez, objetivava eliminar os casos de febre amarela causada por outro flavivírus: *Yellow fever virus* (YFV). No entanto, entre 1971 e 1999 e com o cancelamento do programa da PAHO, a re-infestação do mosquito espalhou o DENV para as Américas do Sul, inclusive para o Brasil. Com o aumento da população, os quatro sorotipos atualmente circulam no país com padrões de surtos endêmicos e epidêmicos a cada três a cinco anos (Teixeira *et al.*, 2013).

No Brasil, foram registrados 1.483.623 casos prováveis de Dengue no ano de 2016, último ano com surto epidêmico. Já no ano de 2017, foram notificados 232.372 casos prováveis (111,5 casos/100 mil habitantes) e no ano de 2018, 247.393 casos foram notificados (118,7 casos/100 mil habitantes). Em relação a óbitos, em 2017 registraram-se 176 e em 2018 foram



141. Já no ano epidêmico de 2016, foram registrados 675 óbitos por infecção pelo DENV (Ministério da Saúde, 2018).

Outro flavivírus transmitido pelo mosquito *Aedes* spp. é o *Zika virus* (ZIKV). O ZIKV foi isolado pela primeira vez na floresta de Zika, em Uganda, a partir de macacos *rhesus*, em 1947. No entanto, este vírus não causou notável preocupação em saúde pública até sua chegada ao continente americano em meados de 2014 e 2015. No início de abril de 2015, ocorreu o primeiro surto da doença provocada por ZIKV no Brasil com aproximadamente 500 casos notificados (Weaver *et al.*, 2016). Em janeiro do ano seguinte, o vírus chegou a países da América Central e aos Estados Unidos. Assim, o *Centers for Disease Control e Prevention* (CDC) emitiu uma alerta de nível 2 para viagens às áreas com epidemia da doença (Schmidt, 2016). A seguir, estudos de Araújo *et al.* (2016) associaram a infecção pelo ZIKV com casos de microcefalia em recém-nascidos no nordeste brasileiro. Outros estudos associaram a infecção com a Síndrome de *Guillain-Barré* em adultos (Cao-Lormeau *et al.*, 2016; Mysorekar & Diamond, 2016), uma neuropatia que provoca fraqueza progressiva com reflexos miotáticos diminuídos ou ausentes que podem levar o paciente à morte (Walling & Dickson, 2013).

Esta atração do ZIKV pelo sistema nervoso central foi o principal motivo que o tornou um grave problema de saúde pública e impulsionou grandes investimentos no seu estudo. Adicionalmente, a presença do vírus em sêmem humano indica transmissão via relação sexual. Estudos de Hamer *et al.* (2017) revelaram transmissão de homem para mulher, mulher para homem e homem para homem. Transfusões sanguíneas são apontadas como a principal razão da transmissão viral dos casos confirmados no Brasil (Paz-Bailey *et al.*, 2017). Proteínas e o material genético do ZIKV tem sido detectado, ainda, em fluidos amnióticos e tecidos placentários (Oliveira *et al.*, 2016).

Em 2016, 216.207 casos prováveis foram notificados no Brasil com 8 óbitos. Já em 2017, foram registrados 17.025 casos sem óbito até a segunda quinzena de setembro. Ainda, foram confirmados 708 casos de Zika em gestantes. No ano de 2018, foram registrados 8.024 casos prováveis de infecção por ZIKV (3,8/100 mil habitantes) (Ministério da Saúde, 2018). Nas Américas, 559.721 casos de ZIKV com 209.628 casos laboratorialmente confirmados foram reportados até abril de 2017 (Lim *et al.*, 2017).

O DENV e o ZIKV, como mencionado, são classificados como arbovírus, e este grupo é composto por outros vírus importantes em saúde pública, uma vez que co-circulam em distintos continentes, dificultando não só o diagnóstico clínico, mas também os exames laboratoriais. Esses vírus apresentam um material genético que sofrem mutações frequentes, as

quais permitem adaptações da infecção para hospedeiros vertebrados e invertebrados. Os arbovírus, em geral, circulam entre uma gama de animais, sendo alguns com hospedeiros específicos, mantendo um ciclo enzoótico. Isso ocorre, por exemplo, com a infecção pelo YFV, o qual é encontrado em surtos pelo Brasil, mas para o qual existe uma vacina de vírus atenuado gratuita. As campanhas de vacinação contra febre amarela no Brasil ocorrem sempre que novos casos surgem em regiões de risco onde a imunização se faz necessária.

Outros arbovírus que preocupam as autoridades brasileiras são o *Chikungunya virus* (CHIKV) e, mais recente, o *Mayaro virus* (MAYV). Os sintomas das infecções por esses dois vírus são muito semelhantes às infecções por DENV e ZIKV. Apesar da co-circulação dos quatro vírus e do YFV, no entanto, o CHIKV e o MAYV não representam obstáculo no que tange ao diagnóstico sorológico, pois pertencem à família dos *Togaviridae* (gênero *Alphavirus*) e seus antígenos apresentam baixa identidade com os *Flavivirus* (Donalisio *et al.*, 2017).

Na América do Norte e Europa, o YFV não apresenta consideráveis índices de infecção. Todavia, o *West nile virus* (WNV), outro flavivírus, provoca epidemias em áreas urbanas em ambos os continentes. Transmitido pelo mosquito do gênero *Culex* e tendo os passáros como reservatórios principais, o WNV co-circula com DENV e ZIKV nessas regiões. Assim sendo, os sintomas são semelhantes, o diagnóstico clínico é ineficiente e novos métodos sorológicos precisam ser desenvolvidos para melhor diagnose dessas viroses (Weaver & Reisen, 2010).

## 1.2 ASPECTOS CLÍNICOS, TRATAMENTO E PREVENÇÃO

Inicialmente, a infecção pelo DENV provoca uma súbita febre (~ 40°C), a qual caracteriza a Febre do Dengue (FD), seguida de dor muscular, dor nos olhos, cefaleias e exantema moderada. Entretanto, o paciente poderá progredir para formas clínicas mais graves como a Febre Hemorrágica do Dengue (DHF) e a Síndrome do Choque do Dengue (DSS). Nestas situações, devido ao extravasamento de plasma, poderá ocorrer choque hipovolêmico e falência múltipla de órgãos (Andrade *et al.*, 2017). Já o ZIKV provoca uma febre moderada (~ 38,5°C) e os exantemas estão presentes com coceiras, além de conjuntivites, dores nos músculos e artralgia. Conjuntivites e edemas periféricos são mais comuns nas infecções pelo ZIKV (Paixao *et al.*, 2016; Savidis *et al.*, 2016).

Em relação a óbitos, as infecções por DENV são mais preocupantes, pois os casos com complicações e os casos graves, DHF e DSS, levam à trombocitopenia (plaquetas < 100.000/mm<sup>3</sup>) mais severa e riscos elevados de hemorragias. Estas, por sua vez, levam a diminuição da difusão sanguínea e consequente falência múltipla de órgãos. Já as infecções por

ZIKV, por serem mais brandas, exibem baixos índices de mortalidade. No entanto, o ZIKV pode provocar outras patologias severas que não são provocadas pelo DENV. As síndromes congênitas, como microcefalia, enquadraram o ZIKV entre os patógenos mais perigosos para o desenvolvimento embrionário (TORCHZ: Toxoplasmose, Rubéola, Citomegalovirose, Herpevirose e Zika) (Regadas *et al.*, 2018).

Não existem medicamentos antivirais específicos contra DENV e ZIKV. O uso cauteloso de analgésicos e antitérmicos é indicado para amenizar os sintomas enquanto a doença regride, evitando o uso de salicilatos e anti-inflamatórios não esteroidais que aumentam as chances de hemorragia por inibição de fatores da cascata de coagulação. O paciente pode necessitar de soro fisiológico via venoso ou em casos graves de trombocitopenia, deve-se realizar a transfusão de plaquetas (Premaratna *et al.*, 2011).

Em relação à prevenção destas arboviroses, não existe uma vacina disponível contra o ZIKV. Entretanto, em 2015 foi licenciada uma vacina contra o DENV, DENVVAXIA<sup>®</sup>, a qual recebeu diversas críticas e gerou diferentes estudos para analisar a sua eficácia e sua segurança, uma vez que essa vacina poderia provocar casos graves de Dengue ou Zika, principalmente a partir do Fenômeno ADE (*antibody dependent enhancement*) (Aguiar *et al.*, 2016; Martínez-Vega *et al.*, 2017). Assim, a profilaxia dessas arboviroses, bem como de YFV, CHIKV e MAYV, está no combate ao vetor. A destruição de seus criadouros (água parada), políticas públicas para descarte adequado de lixo, bem como técnicas biotecnológicas, como utilização de mosquitos transgênicos (Carvalho & Moreira, 2017) e bactérias entomopatogênicas (King *et al.*, 2018) são práticas e métodos úteis no combate aos mosquitos.

### 1.3 DIAGNÓSTICOS

O quadro clínico das infecções por DENV e ZIKV é bastante similar, tornando-se difícil o diagnóstico correto das doenças. Além disso, devido à co-circulação de outros vírus da mesma família (*Flaviviridae*) como o YFV e o alfavírus CHIKV, o estudo da imunopatogênese dessas infecções é essencial para diagnosticar corretamente os pacientes (Patterson *et al.*, 2016). O desenvolvimento, portanto, de testes de diagnósticos que possam distinguir com precisão as infecções co-circulantes é o ponto mais importante para o tratamento mais adequado, prevenção de casos graves da doença, vigilância epidemiológica, investigação de surtos, gestão e redução de riscos, além de tratar adequadamente as mulheres grávidas infectadas por ZIKV (Premkumar *et al.*, 2017).

Comprovar, laboratorialmente, a presença do vírus no paciente é fundamental para demonstrar uma dada infecção de etiologia viral. O isolamento viral foi um dos primeiros métodos utilizados para detectar o DENV em pacientes infectados. No isolamento, é possível amplificar a quantidade de vírus para estudos posteriores, além de identificar vírus desconhecidos. Entretanto, o tempo certo para coleta do material e a indisponibilidade de certos sistemas celulares prejudicam a aplicação dessa metodologia (Shrivastava et al., 2018).

Em relação aos testes moleculares, a RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) é o teste padrão-ouro no diagnóstico. O FDA (*Food And Drug Administration*) aprovou este método para diagnóstico de DENV. No entanto, é uma metodologia bastante dispendiosa para que possa ser aplicada rotineiramente em unidades de saúde. Para o ZIKV, o teste é realizado em poucos laboratórios e demonstra bastante especificidade e sensibilidade, o que permite diferenciar ambas as doenças. Todavia, para a realização da RT-PCR, o tempo de coleta do material é um fator limitante. Nas infecções por DENV ou ZIKV, só é possível detectar o material genético do vírus até o 5º dia da doença (Nunes et al., 2018).

### **1.3.1 Diagnósticos sorológicos**

Os testes sorológicos são os mais aplicáveis e utilizados atualmente. O objetivo é detectar anticorpos utilizando antígenos específicos ou detectar antígenos através de anticorpos. O ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) é uma metodologia bastante utilizada para ensaios mais rápidos, simples e menos dispendiosos quando comparado aos métodos moleculares. A técnica baseia-se na utilização de placas de poliestireno, nas quais são adsorvidas proteínas (anticorpos ou antígenos) para formação de um complexo antígeno-anticorpo referente à patologia que se deseja diagnosticar. Este complexo é observado através de anticorpos conjugados à enzimas que reagem com seus respectivos substratos que vão liberar íons que reagirão com cromógenos específicos. Estes, então, emitem uma coloração que é mensurada por absorvância (densidade óptica). A relação da intensidade da coloração (formação do complexo antígeno-anticorpo) com os valores obtidos podem ser utilizados para indicar a presença atual (ou passada, se alvo for anticorpo) de um patógeno (Shah & Maghsoudlou, 2016).

Os ensaios de ELISA variam em relação a sua indicação e desenvolvimento. O método indireto consiste na adsorção de antígenos na placa com posterior adição do anticorpo primário, o qual poderá ser o soro, contendo anticorpos-alvo, de um paciente suspeito. Em seguida, adiciona-se o anticorpo secundário conjugado à enzima ou outro tipo de indicador e analisa-se

o resultado. O ELISA direto, utilizado para detectar antígenos, não utiliza o anticorpo secundário. A enzima está conjugada, então, ao primeiro anticorpo adicionado à reação. O ELISA do tipo “sanduíche” é uma das mais robustas e sensíveis variações da técnica. Devido a posição do antígeno entre dois anticorpos, o de captura e o de detecção conjugado à enzima, essa variação impede a ligação do anticorpo de detecção a outro tipo de antígeno, pois este é previamente selecionado pelo anticorpo de captura, melhorando a especificidade (Lin, 2015)

O ELISA denominado MAC-ELISA (*IgM antibody capture enzyme linked immunosorbent assay*) é uma variação bastante útil na detecção de anticorpos IgM durante a fase aguda de infecções, em especial, por DENV e ZIKV. A técnica consiste na adição de anticorpos anti-IgM humanos nas placas com posterior adição dos soros suspeitos. A presença do anti-IgM garante a ligação de IgM produzidos pelo paciente. Na terceira etapa, todavia, adiciona-se o antígeno específico e desejado para diagnosticar a doença, selecionando apenas os complexos contendo IgM específico ao patógeno. Por fim, um anticorpo conjugado à enzima e específico a esse antígeno adicionado é utilizado para detectar e realizar a leitura do teste (Huillier *et al.*, 2017). Os anticorpos da classe IgM têm demonstrado maior especificidade nos ensaios sorológicos que anticorpos IgG, especialmente frente aos de memória (Braveny *et al.*, 1976; Huillier *et al.*, 2017). Os ensaios sorológicos baseados no MAC-ELISA são considerados, pelo CDC, o padrão-ouro no diagnóstico da Dengue na fase aguda (entre 4 e 7 dias após o aparecimento dos sintomas). Para o ZIKV, ainda não há um ensaio imunológico disponível, sendo os testes realizados apenas em laboratórios de pesquisa (Johnson *et al.*, 2016). As metodologias de diagnósticos aprovadas pela Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) para diagnose da ZIKV são baseadas em imunofluorescência e PCR (Anvisa, 2016).

No Brasil, vários kits de diagnóstico da Dengue baseados em ELISA são aprovados e registrados pela ANVISA. O *Dengue Virus IgM Capture Dx>Select™* (Diasorin Molecular, CA, EUA) é um teste qualitativo para detecção de anticorpos IgM anti-DENV no soro humano e pode ser utilizado no apoio ao diagnóstico da infecção aguda pelo dengue, sendo a metodologia baseada no MAC-ELISA. Sua especificidade é de 100% segundo fabricante (Focus Diagnostics, 2019). O Kit *PanBio Dengue IgG Indirect ELISA* (Panbio, CA, EUA) é utilizado para detecção de IgG para todos os sorotipos do DENV em pacientes com sintomas clínicos e para exposição passada. Um *cut-off* é utilizado para diferenciar infecções antigas de recentes, sendo a metodologia baseada no ELISA indireto. Segundo o fabricante, o teste possui 100% de especificidade (Panbio, 2019). Tem-se, ainda, o *Platelia™ Dengue NS1 AG* que é utilizado para detecção qualitativa ou semi-quantitativa do antígeno NS1 do DENV. A metodologia deste

ensaio é baseado no ELISA “sanduíche” e sua especificidade é de 100%, segundo o fabricante (Lindegren *et al.*, 2005).

Para o desenvolvimento de kits diagnósticos sorológicos específicos para DENV e ZIKV, é importante o estudo da resposta imune humoral contra o vírus bem como compreender as suas respectivas proteicas virais (Balmaseda *et al.*, 2018), uma vez que um dos maiores problemas dos diagnósticos baseados em anticorpos é a similaridade em sequência de aminoácidos e estruturas das proteínas dos diferentes flavivírus que permite a reação cruzada, a qual gera resultados falso-positivos (Hunsperger *et al.*, 2014).

No campo do diagnóstico sorológico dessas arbovírus, deve-se considerar três aspectos antes de realizar o teste: se o paciente está em uma infecção primária ou secundária por flavivírus, o período que surgiram os sintomas e, conseqüentemente, a resposta imune humoral. O teste de Neutralização por Redução de Placa (PRNT) não pode, por exemplo, ser utilizado para confirmar a infecção por ZIKV caso o paciente já tenha se infectado anteriormente com outro flavivírus devido à alta reatividade cruzada dos anticorpos (Rabe *et al.*, 2016). Em relação ao ELISA, a utilização do antígeno (proteína estrutural ou não estrutural) e a amostra do paciente (fase aguda, convalescença ou pós-convalescença) interferem diretamente no diagnóstico. Os anticorpos IgG têm demonstrado reatividade cruzada maior entre DENV e ZIKV que anticorpos IgM nas reações de ELISA. Conforme Tsai *et al.* (2017), IgG apresenta uma baixa especificidade no diagnóstico de pacientes com ZIKV aguda e que já tiveram uma infecção anterior por DENV. Como DENV e o ZIKV compartilham de 55-58% de suas sequências de aminoácidos de proteínas estruturais, anticorpos produzidos contra o DENV podem reagir cruzadamente contra o ZIKV ou vice e versa.

É importante, portanto, a produção de kit diagnóstico sorológico que possibilitariam a diminuição da resposta cruzada para ambos os vírus. Mesmo compartilhando essas sequências de aminoácidos, existem epítomos que são específicos para cada vírus. Diferentes estudos apostam na análise da superfície proteica com o objetivo de explorar epítomos conservados e variáveis entre os flavivírus. E esta análise de comparação aliada à conformação dos epítomos podem guiar para a predição de regiões antigênicas DENV ou ZIKV específicas (Premkumar *et al.*, 2017).

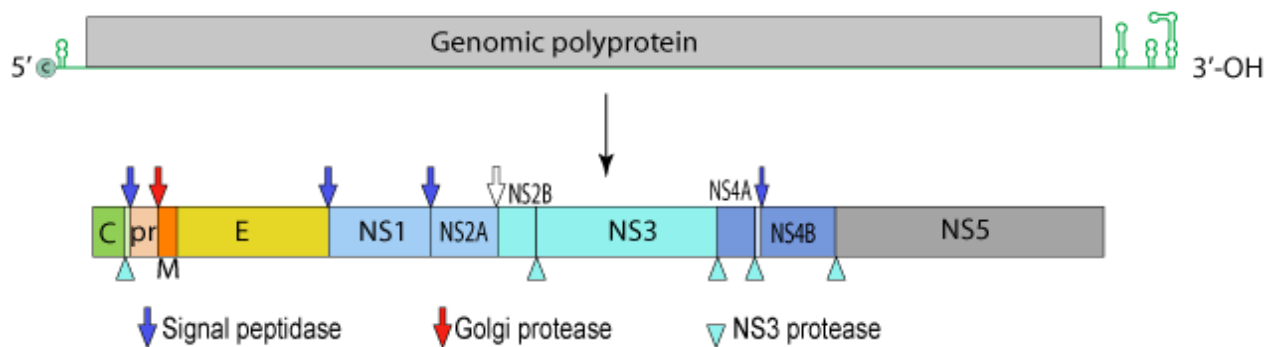
## **1.5 GENÉTICA, ESTRUTURA PROTEICA E IMUNIDADE HUMORAL**

Os vírus da família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, como o DENV e ZIKV são vírus de genoma de RNA fita simples de polaridade positiva (ssRNA +) de tamanho entre 10-11 kb.

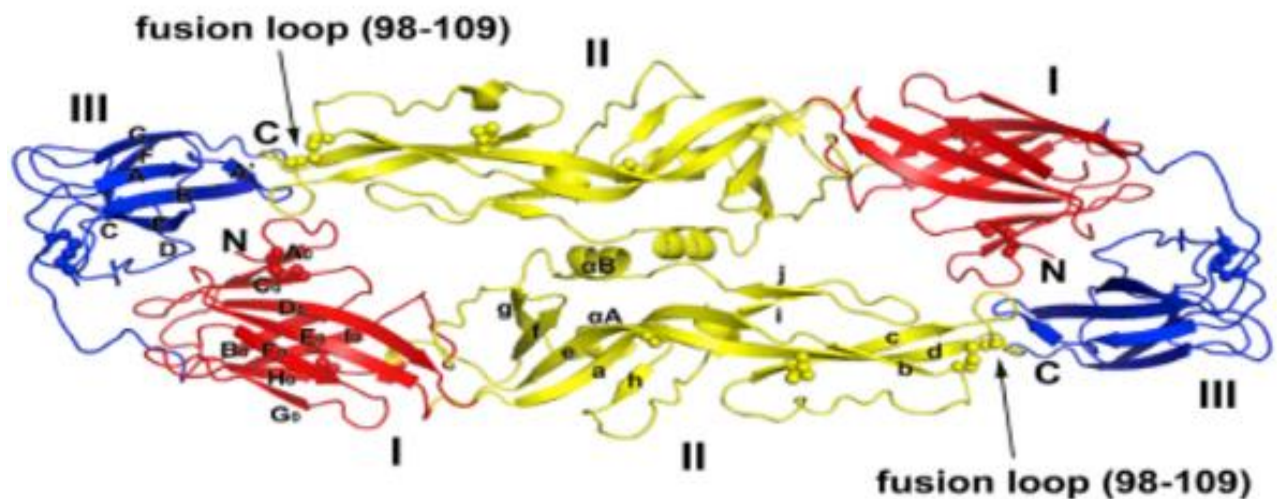
A extremidade 5' possui *cap* para tradução celular canônica, enquanto a extremidade 3' não apresenta poliadenilação, mas forma estruturas tipo *loop*. (Figura 1) Essas estruturas secundárias permitem a formação do RNA subgenômico (sfRNA) que é essencial para patogenicidade e atua na inibição do complexo antiviral (RIG-I) do hospedeiro impedindo a produção de interferons e outras citocinas antivirais. São vírus envelopados e esféricos com aproximadamente 50 nm de diâmetro. As proteínas da superfície arranjam-se em formato pseudo-icosaédrico (Zhang *et al.*, 2003; Yoneyama *et al.*, 2004).

O genoma dos flavivírus contém um único *open reading frame* (ORF) que codifica uma única poliproteína. Esta é inicialmente ancorada ao retículo endoplasmático via helices transmembranas e, subsequentemente, é clivada por proteases celulares e virais e glicosilada por glicosiltransferases do hospedeiro. As proteínas do capsídeo (~ 100 aminoácidos (aa)) estão envolvidas no empacotamento do genoma viral e na formação do nucleocapsídeo. As glicoproteínas prM (~165 aa) e E (~495 aa) possuem duas helices transmembrana cada. A prM atua como uma chaperona promovendo a montagem da proteína E e sofre uma clivagem para produzir o peptídeo pr e a proteína M (~75 aa). A proteína E, enfim, possui um ou mais sítios de ligação a receptores e um peptídeo de fusão que atua na fusão do vírus com a célula hospedeira (Zhang *et al.*, 2003).

O precursor da poliproteína também possui sete proteínas não estruturais (Figura 1): NS1 (importante na replicação e montagem da partícula), NS2A (replicação e evasão viral), NS2B (cofator da NS3), NS3 (protease), NS4A (cofator da NS3), NS4B (evasão viral e replicação do RNA) e NS5 (síntese e modificação do RNA). Estudos (Barba-Spaeth *et al.*, 2016; Dejirattisai *et al.*, 2016) demonstram que os flavivírus promovem diversas alterações conformacionais em suas estruturas desde a maturação, reconhecimento da célula hospedeira e fusão, e estas alterações são moduladas por temperatura e pH. Essas mudanças são essenciais para estudos do ciclo de vida, drogas antivirais e, ainda, no estudo da resposta humoral, pois essas alterações promovem a produção de anticorpos neutralizantes (Hasan *et al.*, 2018).



**FIGURA 1. GENOMA DOS FLAVIVIRUS.** A poliproteína é clivada por proteases virais e celulares (setas) formando as proteínas do capsídeo (C), membrana (prM) e envelope (E) e as sete proteínas não estruturais (NS).  
Fonte: ViralZone (2019).



**FIGURA 2. DOMÍNIOS DA PROTEÍNA E.** O loop de fusão (setas) está envolvido na ligação do vírus à membrana celular para liberação do genoma viral no citoplasma. É uma região antigênica entre os flavivírus. No entanto, os anticorpos produzidos contra essa região apresentam alta reatividade cruzada.

Os flavivírus entram nas células por endocitose mediada por receptor e a alteração do pH promove a trimerização da proteína E, resultando em fusão viral e liberação do RNA genômico no citoplasma. Assim, inicia-se a replicação do RNA e a montagem de novas partículas. A proteína E forma um dímero na partícula madura e cada monômero possui três domínios: domínio amino-terminal (DI) que é centralmente localizado na proteína; o domínio de dimerização (DII) que possui o peptídeo de fusão; e o domínio carboxi-terminal semelhante à imunoglobulina (DIII). (Barba-Spaeth *et al.*, 2016) (Figura 2).

Anticorpos neutralizantes possuem papel importante na proteção contra infecção por muitos flavivírus e são considerados correlatos de proteção para vacinas contra YFV, por exemplo. A proteína E é um alvo antigênico primário de anticorpos neutralizantes que se ligam



a epítomos em todos os três domínios estruturais, sendo que os anticorpos mais protetores e específicos reconhecem os epítomos do DIII. Os anticorpos anti-flavivírus potencialmente neutralizantes também reconhecem epítomos quaternários complexos compostos por mais de um domínio da proteína E. No entanto, os anticorpos que reconhecem o *loop* de fusão do DII são mais reativos entre o gênero e neutralizam os flavivírus de forma menos eficiente, embora apresentem ainda atividade protetora *in vivo* (Zhao *et al.*, 2016).

Os anticorpos produzidos em uma infecção por flavivírus possuem diferentes mecanismos de neutralização do patógeno. Em uma infecção pelo DENV ou ZIKV, os anticorpos podem realizar um bloqueio estérico ao receptor dos vírus encontrados na célula hospedeira (Kaufmann *et al.*, 2006). Outros anticorpos podem impedir a fusão das membranas viral e celular ao modificar a estrutura proteica dos vírus. Estudos com anticorpos monoclonais anti-DENV de camundongos, mostrou que os anticorpos poderiam se ligar a epítomos transitórios do vírus, promovendo uma cascata de reordenamento das proteínas estruturais, especialmente na proteína E (Lok *et al.*, 2008).

Diversos estudos têm surgido para elucidar o porquê de alguns pacientes desenvolverem formas mais graves das doenças. A predisposição genética (polimorfismo) do indivíduo, a carga viral recebida na infecção e o estado imunológico são fatores importantes no estabelecimento da infecção (Alwis *et al.*, 2011). Entretanto, diversos autores (Boonnak *et al.*, 2010; Alwis *et al.*, 2012; Ubol & Halstead, 2017) reportaram que a progressão para formas mais graves, no caso da Dengue, deve-se à presença de anticorpos não neutralizantes produzidos por uma infecção primária. Este fenômeno é conhecido como Aumento da Infecção Mediado por Anticorpo ou Fenômeno ADE (*Antibody-dependent Enhancement*). Na infecção secundária por DENV, se os anticorpos anti-DENV produzidos na primeira infecção declinarem abaixo do limiar de neutralização de anticorpos para um sorotipo heterólogo, esses anticorpos podem promover a entrada do DENV nas células contendo os receptores Fcγ, aumentando a replicação viral.

## **1.6 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS**

Existem várias técnicas de expressão de proteínas recombinantes com diferentes finalidades farmacêuticas e biotecnológicas. Cada sistema de expressão possui suas vantagens e desvantagens (Lindbo, 2007). A bactéria *Escherichia coli* é o procarionto mais utilizado para expressar proteínas de interesse devido ao amplo conhecimento da fisiologia e genética desta bactéria. Possuem algumas vantagens como o baixo custo e a fácil manipulação (Chen, 2010).

Entretanto, devido à presença de uma camada de lipopolissacarídeo (LPS), característica de bactérias gram-negativas, a utilização de *E. coli* na expressão heteróloga torna-se um problema. O LPS é altamente imunogênico e provoca graves quadros clínicos de febre e sepse, quando for contaminado em humano. Se a proteína de interesse não for totalmente purificada, seu uso em humano, portanto, torna-se restrito e limitado (Gong *et al.*, 2011).

Como alternativa às células procarióticas, pode-se utilizar leveduras como do gênero *Saccharomyces* ou mais recentemente, *Pichia pastoris*. Esses sistemas eucarióticos são de fácil manuseio e de baixo custo. Todavia, a produtividade não é alta e pode ocorrer toxicidade pelo acúmulo de metanol (Tamas & Shewry, 2006), além da hiperglicosilação das proteínas que pode provocar a perda da função proteica (Twyman *et al.*, 2003). Assim, a utilização de células vegetais para expressão heteróloga torna-se uma alternativa muito interessante.

### **1.6.1 Expressão em planta**

O uso de plantas transgênicas é considerado um sistema de expressão de proteínas barato e seguro. Além disso, permite uma produção em uma escala maior que em células procarióticas. Como as plantas são organismos eucarióticos, suas células conseguem expressar proteínas complexas e o processamento pós-traducional é semelhante ao das células animais, apesar de algumas distinções no que tange à glicosilação das proteínas (Scotti & Cardi., 2012). A transformação genética de uma planta é realizada através da inserção de um gene exógeno de interesse para o interior do genoma nuclear do vegetal, o qual o incorpora e passa a expressá-lo como uma proteína própria (Malabadi *et al.*, 2016).

O uso de planta como biorreator é vantajoso por esta não conter contaminantes ou patógenos animais que poderiam limitar a utilização de proteínas produzidas, especialmente biofármacos que poderiam ser utilizados no diagnóstico, vacinas ou anticorpos para imunoterapia (Scotti & Cardi, 2012).

A biotecnologia de plantas como biorreator é baseada em dois processos de transformação: expressão estável e expressão transiente. Na primeira, existem as plantas transgênicas que são organismos que possuem um ou mais genes de outra espécie inseridos no seu genoma através da transformação genética. Na expressão estável também existe a estratégia de planta transplastômica, a qual se baseia na expressão heteróloga em cloroplastos transformados (Tiwari *et al.*, 2009).

Já na expressão transiente, o DNA exógeno não se integra ao genoma do hospedeiro. São utilizados vetores que carregam o gene de interesse. Uma técnica bastante utilizada é o uso

de *Agrobacterium sp.* (agroinfecção). Esta carrega um plasmídeo denominado plasmídeo Ti (*tumor inducing*) que é transferido para a planta, junto com o gene de interesse, através de seringas ou sob pressão negativa, transformando um grande número de células que irão expressar as proteínas de interesse (Gohlek & Deeken, 2014). Uma vantagem da expressão transiente em relação à estável é o alto nível de expressão do gene de interesse, uma vez que na primeira o gene não é inserido de forma aleatória em regiões do genoma do vegetal que possuem atividades de transcrição incertas (Chen *et al.*, 2013).

O rendimento da expressão de proteínas heterólogas em sistemas vegetais também depende da planta utilizada e de seu manejo. A luz, os nutrientes e a água são os principais fatores que afetam a expressão. Sob luz artificial, a quantidade de proteína por biomassa em *Nicotiana benthamiana* é maior conforme Chen & Lai (2013), sendo 16 horas de luz e 8 horas de escuro à 25°C o ideal. Deve-se evitar o desenvolvimento de flores, pois estas comprometem a acumulação das proteínas recombinantes.

A agroinfiltração pode ser realizada utilizando diversos tipos de vetores, sejam eles virais ou não virais. Os vetores virais podem promover uma maior acumulação de proteínas, pois possuem replicação e/ou transcrição mais eficientes nas células vegetais (Cãizares *et al.*, 2005). Diversos estudos têm utilizado clones infecciosos de vírus vegetal para a expressão transiente (Junqueira, *et al.*, 2014; Bijora, *et al.*, 2017; Vasques *et al.*, 2018). Os tobamovírus, espécie modelo *Tobacco mosaic virus* (TMV), são vírus bastante estudados e utilizados como clones infecciosos na produção heteróloga de proteínas (Lindbo *et al.*, 2007).

Saejung *et al.* (2007) expressaram o DIII da proteína E do DENV-2 (D2EIII) utilizando um vetor baseado em TMV. A proteína foi capaz de induzir a produção de anticorpos neutralizantes anti-D2EIII em camundongos. Gottshamel *et al.* (2016) realizaram um trabalho semelhante utilizando um clone infeccioso de TMV para expressar proteínas do envelope do DENV em cloroplastos de *N. benthamiana*. Esses sistemas não proporcionam a hereditariedade do gene. Frequentemente, a região gênica que expressa a capa proteica viral (CP) é deletada para a inserção do gene de interesse. Como a CP é responsável pela infecção sistêmica, isso não permite que os vetores movam-se célula-a-célula, o que melhora a biossegurança do sistema (Rybicki, 2010).

As plantas tornam-se cada vez mais importantes como ferramentas biotecnológicas para a produção de proteínas de interesse comercial, devido à capacidade de escalabilidade, segurança, velocidade e pela redução de custos. Uma enzima contra a doença de *Gaucher* (Chen & Lai, 2013) foi produzida em plantas e aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA)

nos EUA. Esse marco anuncia uma nova era para produtos farmacêuticos e biotecnológicos fabricados em plantas.

### 1.6.2. Clones infecciosos como vetores de expressão

Com a descoberta da enzima transcriptase reversa (RT), surgiu o conceito de genética reversa permitindo a manipulação de RNA por intermédio de sua fita complementar de DNA (cDNA). Este, portanto, pode ser manipulado e sua transcrição gera sequências de RNA (progênie) (Scholthof *et al.*, 2011). Em 1984, Ahlquist *et al.* estabeleceram o primeiro sistema que manipulou o cDNA do *Brome mosaic virus* (BMV) e em 1986 o mesmo sistema foi aplicado ao TMV (Meshi *et al.*, 1986). Como o uso de de promotores da RNA polimerase de *E. coli* resultava em baixos níveis de expressão, o uso de promotores exógenos começou a ser utilizado, como promotores de bacteriófagos (T3, T7) ou de outros vírus vegetais (35S de *Cauliflower mosaic virus* - CaMV) (Nagyova & Subr, 1984).

A RT polimeriza o cDNA, a partir do RNA genômico, e o promotor pode ser inserido na sequência através da PCR e a transcrição ocorre *in vitro*. Entretanto, existem algumas dificuldades na produção desses clones infecciosos. A produção completa do cDNA não garante que ele se torne um clone com capacidade de infecção: a amplificação pode ser comprometida devido a diferentes tipos de estruturas secundárias do RNA viral e podem surgir mutações nas regiões 5'UTR e 3'UTR que inibam a infectividade (Lee *et al.*, 2001).

Além disso, os cDNA são bastante instáveis quando inseridos em células procarióticas. As deleções de sequência genômica viral em plasmídeo são as mutações mais frequentes nesses casos, principalmente quando se trabalha com genomas grandes (Altschuler *et al.*, 1992). A utilização de vetores *low copy numbers* que possuem uma taxa de replicação menor por célula é uma alternativa para evitar a deleção pelas células procarióticas (Rosano & Ceccarelli, 2014). Para evitar, ainda, a presença de nucleotídeos não virais na região 3'UTR, utiliza-se estratégias de autoclivagem. A utilização de ribozimas de satélite do *Tobacco ringspot virus* (Bedoya & Daros, 2010) ou do vírus da hepatite D (HDV) (Ávila-Perez, 2018) tem sido reportada para contornar esse problema.

A produção de clones infecciosos permite estudar os mecanismos de infecção, transmissão, replicação e tradução, além de ser uma ótima ferramenta na expressão heteróloga de proteínas e desenvolvimento fármacos antivirais. Weger-Lucarelli *et al.*, (2016) desenvolveram um clone infeccioso do ZIKV com o uso do promotor T7 e a ribozima do HDV na extremidade 3'UTR. Os resultados revelaram que o clone infeccioso do ZIKV foi altamente

similar ou idêntico à linhagem selvagem utilizada no estudo. O clone foi capaz de infectar diferentes linhagens celulares e ainda foi reportada idêntica mortalidade entre os camundongos infectados, indicando que os clones podem ser utilizados no estudo da transmissão sexual, uterina e na neuropatogênese. O estudo de cDNA, derivado de linhagens asiáticas do ZIKV, demonstra que o vírus recombinante pode provocar desordens neurológicas e estabelecer altas viremias em modelos animais muito semelhantes ao vírus selvagem do qual o cDNA foi produzido. Além disso, clones infecciosos do ZIKV podem ser altamente infecciosos para o *Ae. aegypti* (Liu *et al.*, 2017).

No campo da virologia vegetal, a utilização de clones infecciosos pode ser tornar uma excelente ferramenta biotecnológica para a produção de proteínas heterólogas. Os tobamovírus foram estudados no campo da genética reversa desde a década de 80 e podem ser utilizados como ferramentas de expressão. Eles são vírus em forma de bastonetes, RNA fita simples e polaridade positiva possuindo um genoma de aproximadamente 6395 pb (Figura X). Duas proteínas com os tamanhos de 126 kDa e 183 kDa são as replicases do vírus que participam da replicação viral. Elas são traduzidas diretamente pelo RNA genômico. A proteína de movimento (MP) do vírus possui 30 kDa e atua na disseminação célula a célula. Já a CP, que atua na encapsidação viral e no movimento sistêmico, possui 17,5 kDa. Ambas são traduzidas pelo RNA subgenômico (Junqueira, 2014).

Em 1986, Mesh *et al.* realizaram a transcrição *in vitro* de um cDNA do TMV, mostrando que suas abordagens poderiam ser utilizadas para a inserção de sequências de interesse. Em trabalhos posteriores, a CP foi substituída por sequências de proteínas exógenas resultando em um híbrido (Takamatsu *et al.*, 1987; Dawson *et al.*, 1989). Entretanto, o rendimento da expressão proteica foi baixo. Isso levou os pesquisadores a modificarem cada vez mais as sequências. Donson *et al.* (1991) introduziram um promotor subgenômico de *Odontoglossom ringspot virus* (ORSV) e o gene de interesse sob o controle do promotor subgenômico da CP do TMV. A proteína de interesse foi produzida e manteve-se estável durante a infecção sistêmica. Entretanto, o rendimento da expressão heteróloga foi menor quando comparado à expressão da CP do TMV ou do ORSV. O gene da *green fluorescent protein* (GFP) foi introduzido entre a MP e CP do TMV em 1996 por Casper & Holt. A GFP foi eficientemente expressa de forma sistêmica na planta.

O *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) é outro tobamovirus utilizando na genética reversa. Alguns trabalhos (Kirita *et al.*, 1997; Tsuda *et al.*, 1998; Hagiwara *et al.*, 2002; Vasques *et al.*, 2018) utilizaram o cDNA de PMMoV, baseados na transcrição *in vitro*, para estudar os

sintomas induzidos pelo vírus bem como a proteção cruzada de cultivares. Em 2005, Ichili *et al.* estudaram a genética reversa do PMMoV com o objetivo de obter um vírus que provocasse sintomas atenuados nas plantas. Foi relatado que o gene *cp* do vírus é a responsável por induzir uma resposta protetiva na planta através de mutações provocados na CP (Hamada *et al.*, 2002). Vasques *et al.* (2018) clonaram o cDNA do PMMoV no vetor binário pJL89, deletando parte da CP. Nesta região deletada, foi possível clonar o gene da mGFP e o gene de multiepítipo do CHIKV para expressão em *N. bethamiana*. A expressão tanto da GFP quanto do multiepítipo foram eficientes, mostrando que o clone infeccioso do PMMoV é uma ferramenta biotecnológica promissora na expressão de proteínas em plantas.

### 1.6.2 Expressão em células de inseto

Os baculovírus, pertencentes à família *Baculoviridae*, são vírus que infectam células de inseto e podem ser utilizados na biotecnologia como vetores de expressão de proteínas recombinantes (Jehle, 2006). O genoma dos baculovírus são constituídos de DNA circular, fita dupla (80.000 pb) e é envolto por um capsídeo na forma de bastonete. Seu genoma codifica de 90 a 181 genes (Gramkow., 2010). Com o estabelecimento de culturas de células de inseto *in vitro*, o estudo da infectividade dos baculovírus avançou. O primeiro isolado veio da lagarta *Autografa californica* e é capaz de infectar diferentes células de inseto da ordem lepidóptera (Fauquet *et al.*, 2005).

Devido à capacidade de causar a morte de insetos, os baculovírus são ótimos inseticidas, pois são específicos e não infectam humanos. Assim, a utilização desses vírus como vetores de expressão é uma excelente alternativa para proteínas recombinantes (Barros, 2011). No campo das arboviroses, expressar proteínas recombinantes tem sido vantajoso, pois esses vetores permitem a clonagem de genes grandes, alto potencial para proteínas heterólogas em grandes quantidades (10-100mg/L de cultura) e por ser apropriado para síntese de proteína eucariótica (Kost *et al.*, 2005).

Barros *et al.* (2011) produziram um antígeno do envelope do YFV utilizando baculovírus recombinante. A proteína produzida foi testada contra soros de pacientes com Febre Amarela e Dengue. O ensaio revelou que o antígeno reagiu aos soros positivos para Febre Amarela e não reagiu contra o lisado celular controle que não continha o gene inserido. Além disso, não houve reação cruzada com o soro anti-DENV dos pacientes. Chua *et al.*, (2013) produziram um multiepítipo do DENV utilizando baculovírus recombinantes para produção de um diagnóstico sorológico. Já Yamaji & Konishi (2016) e Metz & Pijlman (2016) produziram

*Virus-like-particle* (VLP) dos Vírus da Encefalite Japonesa e do Vírus Chikungunya respectivamente.

A produção de baculovírus recombinantes pode ser realizada utilizando o sistema Bacto-Bac® (Thermo Fisher Scientific), o qual é baseado nos métodos de Luckow *et al.* (1993). O sistema contém o vetor pFastBac®, no qual os genes de interesse podem ser clonados. Tais genes são expressos sob o controle do promotor da poliedrina (Polh), uma proteína produzida em grandes quantidades pelo vírus. Quando as proteínas heterólogas estão sob o controle do promotor da Polh, aquelas podem resultar em até 50% do total de proteínas produzidas pelas células em cultivo (Dalal *et al.*, 2005).

O gene de interesse é clonado no vetor pFastBac e células competentes de *E. coli* são transformadas e o DNA é extraído. O vetor contendo o gene exógeno pode, então, ser transferido para outra cepa de *E. coli*, DH10Bac®. Esta contém o genoma completo do baculovírus (bacmídeo). A região do vetor pFastBac, na qual o gene de interesse está clonado, é um transpóson denominado Tn7, o qual se desloca e se liga a uma região do bacmídeo denominada mini-AttTn7. Assim, o DNA poderá ser extraído da bactéria DH10Bac® após a seleção com antibióticos adequados. Esse DNA, portanto, é utilizado para infectar células de insetos para posterior expressão e obtenção da proteína heteróloga (Luckow *et al.* 1993).

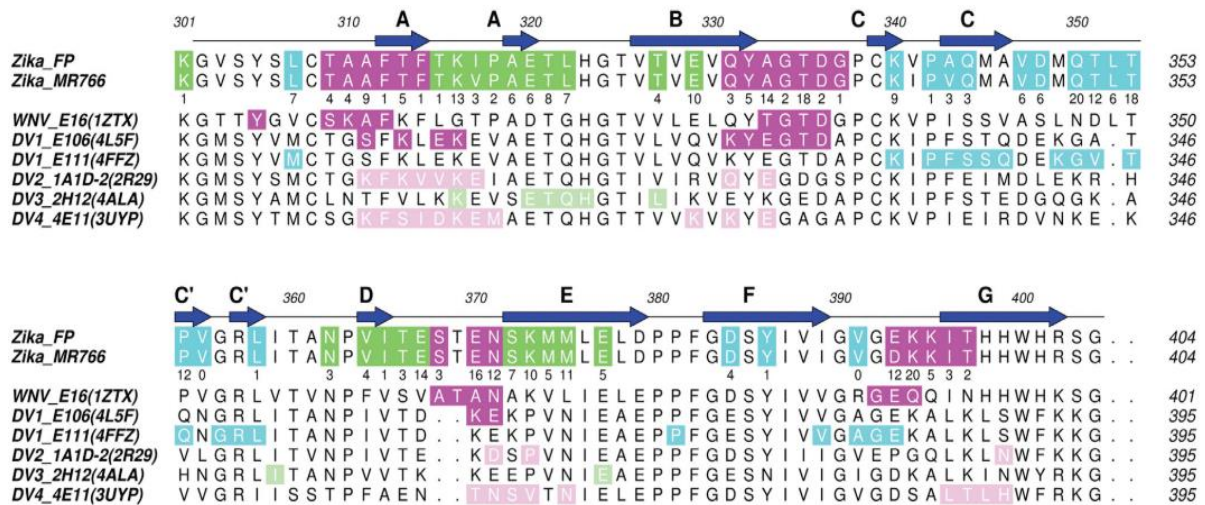
Ardisson-Araújo *et al.* (2013) modificaram o vetor de expressão pFastBac ao expressarem a CP completa de *Garlic mite-borne filamentous virus* (GarMbfV) fusionada a extremidade 3' da poliedrina e com a sequência 6xhis-tag na região N-terminal da CP. Essa fusão da CP com a poliedrina facilitou a purificação da proteína das células de inseto por centrifugação em gradiente de sacarose, e a sequência da 6xhis-tag permitiu a detecção da CP por *western blotting*. Esse vetor modificado, portanto, melhorou o sistema de expressão em células de inseto.

## 1.7 ANTÍGENOS RECOMBINANTES E NOVOS DIAGNÓSTICOS

Com o objetivo de melhorar os testes sorológicos para diagnóstico da DENV e ZIKV, especialmente, para diminuir a reatividade cruzada, torna-se interessante o estudo da antigenicidade das proteínas dos respectivos vírus, bem como a influência da conformação e modelo de expressão de antígenos. Rockstroh *et al.* (2015), expressaram a proteína E do envelope do DENV contendo mutações pontuais na região de fusão do *loop*. Tais modificações diminuíram as reações cruzadas de soros anti-DENV e anti-ZIKV no ensaio de ELISA indireto. Entretanto, o número de resultados falso-positivos ainda foi considerável. O ensaio utilizado

foi, portanto, modificado realizando um ELISA competitivo. Os soros de pacientes contendo anticorpos anti-DENV foram incubados com os antígenos de ZIKV e, em seguida, antígeno marcado do DENV foi inserido na reação. Essa adaptação do teste diminuiu consideravelmente os resultados falso-positivos, permitindo uma maior especificidade para o diagnóstico (Rockstroh et al. 2017).

Zhao et al. (2016), produziam anticorpos monoclonais contra o DIII da proteína E do ZIKV (EDIII) e realizaram o mapeamento de epítomos utilizando diferentes cepas de ZIKV, WNV e DENV (1-4) (Figura 3). O reconhecimento dos aminoácidos pelos anticorpos revelou quais regiões do EDIII poderiam ser exploradas para a produção de antígenos específicos ao DENV ou ao ZIKV. Esses antígenos específicos, portanto, poderiam ser utilizados com o objetivo de aumentar a especificidade dos testes sorológicos. Além disso, esse painel de antígenos é útil no desenvolvimento de anticorpos terapêuticos para potencialmente prevenir a persistência viral ou para o projeto de vacinas e diagnósticos específicos que utilizam epítomos mínimos.



**FIGURA 3. MAPEAMENTO DE EPÍTOMOS.** Alinhamento das sequências de aminoácidos do DIII de proteína E de ZIKV, WNV e DENV (1-4). Fonte: Zhao et al., 2016.

O mapeamento de epítomos (*epitope mapping*) e a expressão de antígenos na forma de multiepítomos são abordagens que permitem a expressão de regiões antigênicas reconhecidas por anticorpos mais específicos contra DENV ou ZIKV. Como mostra o estudo de Rockstroh et al. (2017), os anticorpos produzidos contra a região do *loop* de fusão (EDII) apresentam maior reatividade cruzada entre os flavivírus.

Premkumar et al. (2017), utilizando um multiepítomo do DENV contendo antígenos do DI e DIII desenvolvidos pelo mapeamento de epítomos, mostraram que apesar da diminuição da reatividade cruzada provocada pela conformação de seu multiepítomo, faz-necessário



direcionar os novos testes sorológicos conforme a classe da imunoglobulina. O estudo mostrou que anticorpos IgG apresentaram maior reatividade cruzada entre os multiepítotos.

Zhang *et al.* (2017), utilizando uma plataforma nanotecnológica com ouro ligada a multiepítotos, corrobora o fato de anticorpos IgM serem os melhores candidatos na diagnose da Dengue e Zika. O trabalho, ainda, demonstra que detectar anticorpos IgA também é uma alternativa interessante para diminuir a reatividade cruzada. Na presença de resultados duvidosos, o uso de testes de avidéz, utilizando ureia, são eficazes para medir a força de ligação da IgG com DENV ou ZIKV, permitindo diferenciar infecção primária de secundária, além de ajudar na interpretação de resultados com reatividade cruzada (Souza *et al.*, 2003; Zhang *et al.* (2017).

## 2 JUSTIFICATIVA

O diagnóstico da Dengue é realizado principalmente através da captura de anticorpos IgG ou IgM ou do antígeno NS1 através de testes de ELISA. (Rockstroh *et al.* 2015). Para a Zika, não existem diagnósticos baseados em ELISA no mercado. Como reportado por diversos estudos (Zhao *et al.*, 2016; Premkumar *et al.* 2017; Zhang *et al.* 2017; Rockstroh *et al.* (2017), soros de pacientes com Dengue e Zika reagem cruzadamente com antígenos preparados do DENV ou ZIKV devido aos epítomos conservados entre os vírus provocando resultados falso-positivos, uma vez que as proteínas estruturais e não estruturais de ambos possuem uma alta identidade. Entretanto, algumas regiões de proteína E mostram diferenças entre DENV e ZIKV. Como os testes disponíveis para a Dengue foram validados antes da epidemia da Zika, eles não apresentam a mesma acurácia quando utilizados em regiões endêmicas para o ambos os vírus, como no Brasil. Assim, este trabalho foi importante para desenvolver antígenos específicos de DENV e ZIKV, expressando antígenos em forma de multiepítomo para o desenvolvimento de novos kits de diagnósticos baseados em ELISA. O desenvolvimento de um teste sorológico no Brasil com alta especificidade e sensibilidade que possa distinguir pacientes com Dengue ou Zika é de extrema importância para a saúde pública do país devido a estes vírus endêmicos co-circulantes.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

Expressar antígenos de multiepítotos utilizando planta e baculovírus para o desenvolvimento de um diagnóstico sorológico Dengue e Zika específico

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Desenho e síntese dos genes de antígenos de multiepítoto de DENV e ZIKV;
- Montagem e inserção dos genes multiepítotos no vetor viral vegetal PMMoV;
- Transformação das células vegetais via *Agrobacterium tumefaciens*
- Clonagem dos genes de antígenos de multiepítoto em baculovírus;
- Transfecção de células de inseto com bacmídeo recombinante;
- Expressão e obtenção dos antígenos de multiepítoto preparados nos sistemas de planta e baculovírus;
- Testes de ELISA utilizando soros positivos e negativos para DENV e ZIKV

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 EXPRESSÃO EM PLANTAS

#### 4.1.1. Desenho das sequências de aminoácidos dos antígenos de multiepítotos

O desenho das sequências de aminoácidos do antígeno de multiepítoto específico de DENV e ZIKV foi baseado em duas considerações. Primeiramente, as sequências diferentes de aminoácidos do EDIII entre DENV e ZIKV foram alinhadas às sequências de aminoácidos da proteína EDIII de flavivírus importantes na saúde pública, tais como: WNV, YFV, ZIKV e os quatro sorotipos do DENV. O alinhamento foi realizado utilizando a sequência completa fornecida pelo *GenBank* e os números de acesso destas sequências de referências estão listados na tabela 1.

**TABELA 1. ISOLADOS DE FLAVIVÍRUS, IDENTIFICAÇÃO E NÚMERO DE ACESSO.** Baseado no estudo de Zhao *et al.* (2016), foi realizada uma busca nos bancos de dados do *GenBank* (*GenBank Home National Center for Biotechnology Information*) através dos números de acesso ou nome dos isolados fornecidos. Todos os isolados de DENV e o ZIKV foram encontrados no Brasil. O 17DD de YFV é o isolado utilizado na vacina atual contra febre amarela.

VÍRUS	ISOLADO	NÚMERO DE ACESSO ( <i>GENBANK</i> )
WNV	NY99	YP_001527880
YFV	17DD	AAC54267
ZIKV	BRPE243/15	ANC90426
DENV1	BRMGK58D1/13	AMD09599
DENV2	BRSJRP628/13	ANY58905
DENV3	BRBID-V2397/06	ACO06169
DENV4	BR005AM/11	AMP43484

A segunda consideração foi baseada no estudo de mapeamento de epítoto específico do ZIKV (Zhao *et al.*, 2016). Na publicação, mostrou-se quatro epítotos específicos do ZIKV (ABDE, 2 de C-C' e LR epítotos) (Figura 3). Estes epítotos são descontínuos, ou seja, as sequências de aminoácidos são afastadas (ou possui "gap") para formar um epítoto. Os locais

compatíveis de ABDE e LR epítomos foram escolhidos para formar os genes de multiepítopo. Para ZIKV, o multiepítopo consiste de epítomos de ABDE e LR que foram únicos com *linker* de tetraglicina ou hexaglicina. Este gene foi desenhado para ter repetição (*tandem repeat*) para aumentar a eficiência. Para o desenho do antígeno de multiepítopo do DENV (1-4), as mesmas regiões de epítomos do ZIKV foram escolhidas. Nas extremidades C de ambos os genes de multiepítopo, adicionou-se uma calda de seis histidinas (6xhis-tag) para que a detecção e purificação fossem facilitadas. Nas extremidades dos genes, foram adicionados sítios de restrição para a enzima NheI. Enfim, os dois genes foram sintetizados no *Epoch Life Science* (Missouri city, TX, EUA).

Células de *Escherichia coli*, cepa DH10B (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), foram transformadas com DNA plasmidial pClone EZ-NRS-Blunt-Amp DENGUE-multiepítopo\_tandem (pClone-Dengue) de 1.651 pb (Multi-DENV) e pClone EZ-NRS-Blunt-Amp ZIKA-multiepítopo\_tandem (pClone-Zika) de 2.342 pb (Multi-ZIKV) respectivamente. Ambos os plasmídeos possuem o marcador de seleção para ampicilina. O plasmídeo (10 ng) foi adicionado aos microtubos contendo as células de *E. coli* eletrocompetentes a serem transformadas. Em seguida, o conteúdo dos microtubos foi transferido para cubetas de eletroporação 0,1 cm (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Após o choque, 800 µL de Meio LB (Luria-Bertani) foram adicionados na cubeta e homogeneizou-se. A cultura foi levada para *shaker* a 28°C durante 1 hora e 30 minutos.

A seguir, 50 µL de cultura contendo as *E. coli* transformadas foram aplicadas em placa de Petri contendo meio LB com 1,5% de ágar e ampicilina (100 µg/mL) para seleção. As placas foram incubadas em estufa a 28°C por 48 horas até visualização das colônias. Foram escolhidas algumas colônias de *E. coli* contendo Multi-DENV e outras contendo Multi-ZIKV. Estas foram inoculadas em tubos contendo 3 mL de meio LB com ampicilina (100 µg/mL). Os tubos foram incubados a 28°C em shaker 180 r.p.m. por 24 horas.

Após o crescimento bacteriano, o DNA plasmidial foi purificado utilizando o kit Wizard® Plus *SU Miniprep DNA Purification System* da Promega (Madison, EUA), seguindo a instrução do fabricante. O DNA foi estocado no freezer -20 °C.

#### **4.1.2 Clonagem dos insertos no vetor pJL\_PMMoV por *Gibson Assembly***

A clonagem dos fragmentos gênicos contendo apenas os genes dos antígenos de multiepítomos Multi-DENV e Multi-ZIKV no vetor viral pJL\_PMMoV (Figura 4) foi realizada por *Gibson Assembly* (New England BioLabs, Ipswich, EUA), conforme a instrução do

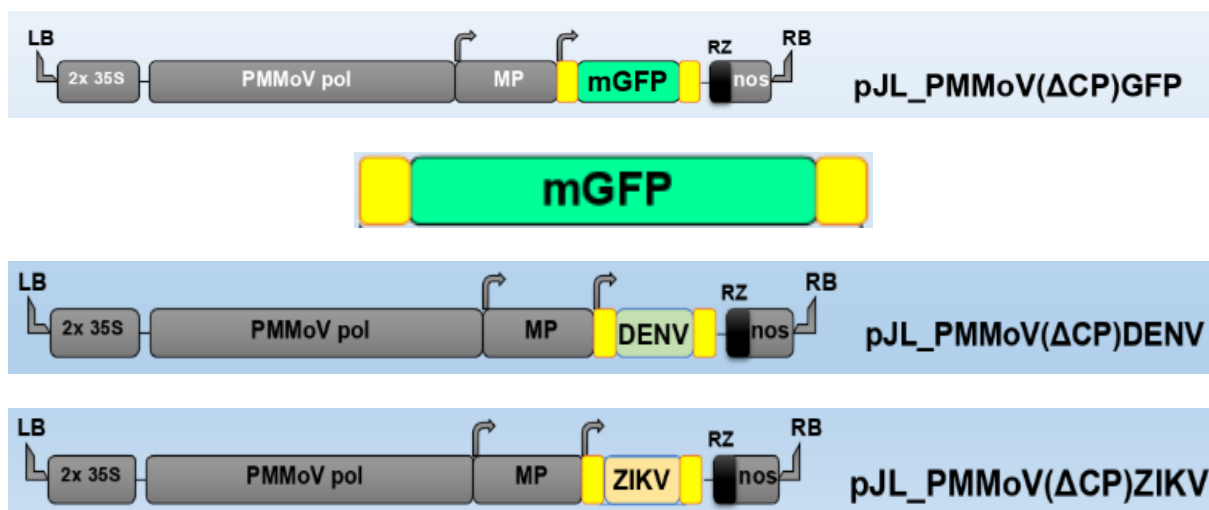
fabricante. Os *primers* utilizados na amplificação dos genes de multiepítotos encontram-se descritos na tabela 2. Os plasmídeos pClone-Dengue e pClone-Zika contendo cada gene foram utilizados na reação para amplificação de seus respectivos insertos. Já os *primers* utilizados na amplificação do vetor viral pJL\_PMMoV encontram-se descritos na tabela 3. Para esta reação, foi utilizada o vetor PMMoV ( $\Delta$ CP)GFP produzido por VASQUES *et al.* (2018).

**Tabela 2. SEQUÊNCIAS DOS *PRIMERS* UTILIZADO NA AMPLIFICAÇÃO DOS INSERTOS MULTI-DENV E MULTI-ZIKV.**

<b><i>PRIMER</i></b>	<b>SEQUÊNCIA</b>
PMMoV_MultiDENGUE_GA_For	5- CTT CGG CGT TAG GCA ATG CTA GCA CTG GGT CAT TCA AGT TGG AGA AG -3'
PMMoV_MultiDENGUE_GA_Rev	5'- ATG AGG TTA CTT ATA CTG CTA GCG TGA TGG TGG TGA TGA TGC CC - 3'
PMMoV_MultiZIKA_GA_For	5'- CTT CGG CGT TAG GCA ATG CTA GCA CTG CTG CAT TCA CCT TTA CT - 3'
PMMoV_MultiZIKA_GA_Rev	5'- ATG AGG TTA CTT ATA CTG CTA GCG TGA TGG TGG TGA TGA TGA AGC AT - 3'

**Tabela 3. SEQUÊNCIAS DOS *PRIMERS* UTILIZADO NA AMPLIFICAÇÃO DO VETOR VIRAL pJL\_PMMoV**

<b><i>PRIMER</i></b>	<b>SEQUÊNCIA</b>
PMMoV_GA_CP_6057_For	5'-AGT ATA AGT AAC CTC ATG AAT GAG TTA GTT C-3'
PMMoV_GA_CP_102_Rev	5'-ATT GCC TAA CGC CGA AGT ACA-3'



**FIGURA 4. CLONAGEM DOS GENES DE MULTIEPÍTOPO, MULTI-DENV E MULTI-ZIKV, NO VETOR VIRAL pJL\_PMMoV.** O clone pJL\_PMMoV(ΔCP)GFP (VASQUES *et al.* 2018) foi utilizado como molde para clonagem por *Gibson Assembly*, resultando nos clones pJL\_PMMoV(ΔCP)DENV (11.412 pb) e pJL\_PMMoV(ΔCP)ZIKV (11.103 pb). LB: *left border*; RB: *right border*; 2x 35S: promotor 35S duplicado de CaMV (*Cauliflower mosaic virus*); PMMoV pol: polimerase RNA dependente de RNA; MP: *movement protein*; mGFP: *green fluorescent protein*; DENV: *Dengue virus*; ZIKV: *Zika virus*; NOS: *Nopaline synthase gene*; RZ: *ribozyme*; CP: *coat protein*. Caixa amarela: extremidades 5' e 3' do gene da CP.

#### 4.1.3 Transformação de *Escherichia coli* DH10B com os vetores PMMoV(ΔCP)DENV e PMMoV(ΔCP)ZIKV e sequenciamento

As construções PMMoV(ΔCP)DENV e PMMoV(ΔCP)ZIKV foram transfectadas em *E. coli*, cepa DH10B, conforme protocolo descrito no item 4.1.2. Após o crescimento bacteriano nas placas com meio LB contendo canamicina (100 $\mu$ g/mL), foram preparados inóculos para extração do DNA plasmidial como previamente descrito. O DNA purificado foi visualizado utilizando eletroforese em gel de agarose 1%. As amostras foram preparadas para sequenciamento na Macrogen (Seoul, Coreia do Sul) utilizando os *primers* a seguir descritos na tabela 4.

**Tabela 4. PRIMERS UTILIZADOS NO SEQUENCIAMENTO PARA CONFIRMAÇÃO DAS CONSTRUÇÕES PMMoV\_(ΔCP)DENV E PMMoV\_(ΔCP)ZIKV**

PRIMER	SEQUÊNCIA
PMMoV_5509_Seq_For	5' – GTT CCA ATG GCT GAC AGA TT 3
PMMoV_6117_Seq_Rev	5'- GAG TTA TCG TAC TCG CCA C – 3'

#### 4.1.4 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens* com as construções PMMoV\_( $\Delta$ CP)DENV e PMMoV\_( $\Delta$ CP)ZIKV

Células eletrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101) foram transformadas com os vetores PMMoV\_( $\Delta$ CP)DENV e PMMoV\_( $\Delta$ CP)ZIKV. Foram transformadas com os plasmídeos contendo 10 ng. Após a eletroporação, 800  $\mu$ L de Meio LB3 (Luria-Bertani) foram introduzidos na cubeta e homogeneizou-se. A cultura foi levada para *shaker* a 28°C durante 2 horas.

A seguir, 40  $\mu$ L de cultura contendo as *A. tumefaciens* transformadas foram aplicados em placa de Petri contendo meio LB3 com 1,5% de ágar com canamicina (100 $\mu$ g/mL), rifampicina (100 $\mu$ g/mL) e gentamicina (7 $\mu$ g/mL). As placas foram incubadas em estufa a 28°C até visualização das colônias. Em seguida, algumas colônias foram escolhidas para preparação do inóculo. Foram adicionados 10 mL de meio LB3 contendo os antibióticos acima descritos em tubos de centrifugação (28°C por 48 horas).

#### 4.1.4. Agroinfiltração

Plantas de *Nicotiana benthamiana* com aproximadamente cinco semanas foram agroinfiltradas com *Agrobacterium tumefaciens* transformadas com PMMoV\_( $\Delta$ CP)DENV e PMMoV\_( $\Delta$ CP)ZIKV. As bactérias foram cultivadas e induzidas com tampão de indução contendo o composto fenólico acetoseringona e o meio MES [2-(*N*-morpholino) ethanesulfonic acid] sob agitação (180 r.p.m.) durante 24 horas a 28°C. Em seguida, centrifugaram-se as culturas e o *pellet* foi ressuspensionado com o meio MS (*Murashige and Skoog Basal Medium*) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), e as bactérias foram mantidas em repouso por 2 horas. Após obter as densidades ópticas (O.D) entre 0,5 e 0,7, as bactérias foram infiltradas utilizando seringas sem agulha. As plantas, portanto, foram incubadas durante um período de 10 dias. Como controle experimental, *A. tumefaciens* contendo o gene da GFP (pJL\_PMMoV( $\Delta$ CP)GFP) foram utilizadas. Além disso, *A. tumefaciens* contendo o gene do supressor do silenciamento gênico HC-Pro (*Helper Component Proteinase*) no vetor pBIN19 de *Cowpea aphidborne mosaic virus* foram utilizadas concomitantemente com PMMoV\_( $\Delta$ CP)DENV e PMMoV\_( $\Delta$ CP)ZIKV para aumentar a eficiência da expressão.



#### 4.1.5 Detecção de proteínas recombinantes por *Western Blotting*

Para analisar a expressão das proteínas recombinantes, as folhas de *N. benthamiana* foram coletadas com 10 d.p.i. e maceradas utilizando nitrogênio líquido. Em seguida, foi utilizado PBS 1X (10 mM PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, 137 mM NaCl, and 2.7 mM KCl) (1:1) e centrifugou-se por 7 minutos a 8.000 r.p.m a 4°C. O extrato coletado foi submetido a SDS-PAGE 1% (*Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) em duplicata utilizando o *Mini Protean System Casting Stand* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA). Um gel foi submetido à coloração com *Coomassie Blue* para observação das proteínas totais do extrato. O segundo gel foi transferido para membrana de nitrocelulose (Amersham Protain poro 0,45 µm) (GE Healthcare Life Sciences, Issaquah, EUA) utilizando tampão de transferência (25 mM Tris; 192 mM glicina; 20% isopropanol) para realização do *Western Blotting* (WB).

A membrana foi, então, incubada com PBS 1X com 0,1% de *Tween* 20 contendo 2% de leite desnatado (Molico) durante 2 horas à temperatura ambiente sob leve agitação para bloqueio de ligações inespecíficas. Em seguida, foi adicionado o anticorpo primário anti-HisTag (GE Healthcare Life Sciences) (1:3000) e incubou-se *overnight* a 4°C. A seguir, foi realizada a lavagem com PBS 1X com 0,1% de *Tween* 20 durante 30 minutos, trocando a solução de lavagem a cada 6 minutos. Então, o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à enzima fosfatase alcalina (Thermo Fisher Scientific) foi colocado em nova solução (PBS 1X com 0,1% de *Tween* 20 contendo 2% de leite desnatado) na diluição de 1:10.000, e a membrana foi incubada a 1 hora sob leve agitação em temperatura ambiente. Após a incubação, realizou-se novamente a lavagem conforme descrito anteriormente. Para confirmação de presença das proteínas, a membrana foi incubada no tampão da fosfatase alcalina por 20 minutos e os imunocomplexos foram revelados com o substrato da fosfatase alcalina, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-1-fosfato/Nitro Blue Tetrazolina – NBT/BCIP (Promega, Madison, EUA).

## 4.2 EXPRESSÃO EM CÉLULAS DE INSETO

### 4.2.1 Amplificação dos genes Multi-DENV e Multi-ZIKV com sítio de restrição para enzima *NcoI* e digestão

Foi realizada uma PCR dos vetores pClone-Dengue e pClone-Zika para amplificar os genes do Multi-Dengue e Multi-Zika trocando sítios de restrição para *NcoI* nos *primers* e para retirar a sequência 6xhis-tag, uma vez que o vetor de clonagem utilizado já contém a sequência para sua expressão (Figura 5). Os primers utilizados estão na tabela 5. A PCR foi realizada

utilizando a enzima *Q5 High-Fidelity DNA polymerase* (New England BioLabs) seguindo a instrução do fabricante. Foi realizada eletroforese em gel de agarose 2% para visualização dos resultados. Após a PCR, as regiões amplificadas (~650 pb e ~340 pb) foram purificadas utilizando o *Kit QIAEX II Gel Extraction* (Qiagen, Hilden, Alemanha) conforme a instrução do fabricante. Em seguida, foi realizada a digestão com a enzima *NcoI* e tampão correspondente a 37°C por 4 horas e outra purificação de DNA foi realizada.

**Tabela 5. SEQUÊNCIAS DOS PRIMERS UTILIZADOS NA PCR PARA INSERÇÃO DO SÍTIO DE RESTRIÇÃO PARA *NcoI***

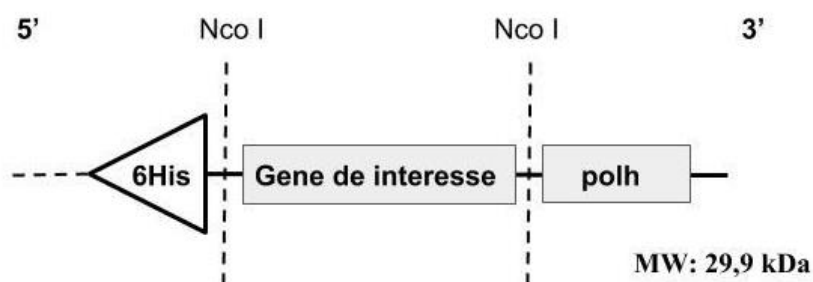
<b>PRIMER</b>	<b>SEQUÊNCIA</b>
DENGUE_MULTILEO_BACULO_For	5' – ATA <u>TCC ATG GAA</u> ACT GGG TCA TTC AAG TTG GAG 3'
DENGUE_MULTILEO_BACULO_Rev	5' – TAT <u>ACC ATG GGCC</u> CTC CTC CGA TGT TGG TA – 3'
ZIKA_MULTILEO_BACULO_For	5' ATA <u>TCC ATG GAA</u> ACT GCT GCA TTC ACC TTT ACT AA – 3'
ZIKA_MULTILEO_BACULO_Rev	5' TAT <u>ACC ATG GGAA</u> GCA TCA TCT TTG AGT TCT CAG TA – 3'

Os primers foram desenhados para inserir o sítio de restrição C/CATGG nas duas extremidades. As sequências de sítio de *NcoI* estão sublinhadas. For: Forward; Rev: Reverse

#### 4.2.2 Obtenção do vetor pFastBac-AMINO para clonagem e transformação

*E. coli* (DH10B) contendo o vetor pFastBac-AMINO (pFB-A) foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Baculovírus da Universidade de Brasília. O vetor pFB-A é uma construção modificada por Ardisson-Araújo *et al.*, (2013), os quais utilizaram o vetor pFastBac1 da Thermo Fisher Scientific para inserir dois sítios de restrição para *NcoI* que permitem a expressão de uma proteína de interesse fusiona à poliedrina. O pFB-A contém, ainda, a sequência para expressão de hexahistina (Figura 5). As bactérias transformadas foram cultivadas em meio LB contendo os antibióticos ampicilina (100ng/mL) e gentamicina (7mg/mL) a 37 °C e 220 r.p.m por 24 horas, e o vetor foi extraído utilizando o *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega) conforme a instrução do fabricante. O vetor foi, então, digerido com a enzima de restrição *NcoI* para linearização e foi desfosforilado com fosfatase alcalina (New England BioLabs) por 1 hora a 37 °C. A clonagem com os fragmentos obtidos, Multi-Dengue e Multi-Zika, foi realizada com a enzima T4 ligase e tampão correspondente a 16 °C *overnight*.

A seguir, o vetor pFB-A contendo os genes de interesse, pFBA\_DENV (pFastBac-AMINO Dengue) e pFBA\_ZIKV (pFastBac-AMINO Zika) foi inserido em células de *E. coli* (DH10B) por eletroporação e estas foram cultivadas em meio LB com ágar 1,5 % contendo os antibióticos ampicilina (100ng/mL) e gentamicina (7mg/mL) até observação das colônias. Após o crescimento, as colônias foram selecionadas e o vetor foi extraído para sequenciamento na Macrogen Inc.



**FIGURA 5. REGIÃO DE CLONAGEM DO pFastBac-AMINO.** O pFB-A permite a expressão das proteínas de interesse fusionado à principal proteína expressa por baculovírus, a poliedrina (polh). Além disso, a proteína também é expressa contendo a cauda de hexahistidina. O peso molecular da poliedrina fusionada a 6His, sem proteína exógena, é de aproximadamente 29,9 kDa. Fonte: Adaptado de Ardisson-Araújo *et al.*, (2013)

#### 4.2.3 Transformação de *E. coli* DH10Bac e transfecção das células de inseto

Após a confirmação por sequenciamento dos clones, células de *E. coli* DH10Bac foram transformadas com 5 ng de pFBA\_DENV e pFBA\_ZIKV e mantidas em gelo por 30 minutos. A seguir, realizou-se o choque térmico por 45 segundos a 42 °C. Imediatamente após o choque, transferiu-se os tubos para o gelo durante 2 minutos e 900 µl de meio S.O.C Médio (2% tryptone, 0,5 % yeast extract, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, e 20 mM glicose) foi introduzido nos tubos. Enfim, as bactérias foram incubadas em *shaker* por 4 horas a 37 °C e 220 r.p.m.

Após a tempo de incubação, 100 µL de DH10Bac foram aplicados em meio LB com 1,5 % de ágar contendo tetraciclina (10µg/mL), gentamicina (7µg/mL), canamicina (50ng/mL), X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-galactopiranosídeo) e IPTG (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida). Após o crescimento, as colônias brancas foram selecionadas e uma PCR com Taq DNA polimerase (Sinapse Biotecnologia, Tatuapé, SP, Brasil) foi realizada para confirmar a transposição do inserto contendo os genes de interesse para o bacmídeo. Todas essas etapas foram realizadas conforme recomendações do fabricante do sistema Bac-to-Bac do Baculovírus da Thermo Fisher Scientific. Os bacmídeos recombinantes, portanto, contendo os

genes de multiepítoto da Dengue e multiepítoto da Zika foram utilizados na transfecção de células da linhagem TN-5B de *Trichoplusia ni*. Sete dias após a infecção (7 d.p.i.), a cultura celular foi recolhida e centrifugada por 5 minutos a 5.000 r.p.m. O sobrenadante agora contendo os baculovírus recombinantes foi estocado em geladeira (4 °C) para futuras transfecções. O *pellet* de células contendo os antígenos de multiepítoto foi lavado com PBS 1X e ressuspendido com a mesma solução. Para verificar a expressão dos multiepítoto de DENV e ZIKV, foi realizado SDS-PAGE 12% e *Western Blotting* conforme descrito anteriormente no subitem 4.1.5.

#### 4.2.4 Purificação dos antígenos de multiepítoto por gradiente de sacarose

Para a obtenção dos antígenos de multiepítoto, DENV e ZIKV, os extratos celulares de TN-5B foram submetidos à purificação por ultracentrifugação em gradiente de sacarose. 2 mL de extrato foram aplicados em um gradiente de sacarose de 1,17 a 1,3g/mL e centrifugado a 24.000 r.p.m por 1 hora a 4°C em Optima L-90K Ultracentrífuga (Beckman Couter, CA, EUA). A banda de poliedros formada no terço inferior do tubo (Figura 6) foi coletada com pipeta *Pasteur* e diluída em tampão PBS 1X para nova centrifugação para precipitar proteínas. Por fim, o *pellet* contendo os antígenos foi ressuspendido em PBS 1X e estocado a -20°C. Em seguida, os antígenos foram submetidos novamente ao SDS-PAGE e *Western blotting* para confirmação da expressão e pureza.



**FIGURA 6. GRADIENTE DE SACAROSE.** Observa-se a fração no terço inferior do tubo contendo os antígenos fusionados à poliedrina.

### 4.3 ENSAIOS IMUNOENZIMÁTICOS

Os ensaios de ELISA foram realizados utilizando amostras de pacientes (Anexo I) gentilmente cedidas pelo Laboratório Central do Distrito Federal (LACEN-DF) e pelos pesquisadores do Centro de Produção de Anticorpos do Centro-Oeste (CEPRACO) da Universidade Federal de Goiás. Tanto os pacientes do LACEN-DF quanto do CEPRACO foram previamente confirmados com infecção por DENV ou ZIKV através de PCR e ensaios de ELISA para IgM quando coletadas na fase aguda da doença.

Os antígenos utilizados nos ensaios de ELISA foram os antígenos de multiepítomos de DENV e ZIKV produzidos neste trabalho e antígenos de controles gentilmente cedidos e produzidos pelo Laboratório de Baculovírus da UnB: peptídeo da proteína NS1 (NS1pep) de ZIKV, domínio III da proteína E de ZIKV (EDIII-ZIKV) e domínio III da proteína E de YFV (EDIII-YFV). Estes últimos antígenos foram testados para melhor controle da reação, avaliação e comparação dos resultados.

#### 4.3.1 ELISA indireto para detecção de IgG

Os ensaios de ELISA para detecção de IgG anti-DENV ou IgG anti-ZIKV em soros de pacientes foram realizados conforme padronização *in house*. Placas de 96 poços (Costar Corning, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foram sensibilizadas com 10 µg/mL de antígenos diluídos em PBS 1X (pH 7,2) (50µL/poço) e incubou-se *overnight* a 4°C. Em seguida, descartou-se os antígenos e realizou-se o bloqueio (100µL/poço) com PBS 1X com 0,05% de *Tween* 20 a 5% de leite desnatado (Molico) e incubou-se por 2 horas a 37°C. A seguir, a lavagem (200 µL/poço) foi realizada três vezes com o tampão de lavagem constituído por PBS 1X com 0,05% de *Tween* 20. Na etapa seguinte, a amostras dos pacientes (50µL/poço) foram preparadas na diluição de 1:50 em tampão diluente (PBS 1X com 0,05% de *Tween* 20 a 0,5% de leite desnatado) e incubou-se a 37°C por 1 hora. Realizaram-se a três lavagens conforme descrito e adicionou-se (50µL/poço) de anticorpo anti-IgG humana conjugada com enzima peroxidase (Sigma-Aldrich) na diluição de 1:1000 no tampão diluente descrito e incubou-se a 37°C por 1 hora. Realizaram-se, novamente, três lavagens com o tampão de lavagem e prosseguiu-se com a revelação. Esta foi realizada com solução (50µL/poço) contendo 5 mg de o-fenilenodiamina (OPD) (Sigma-Aldrich), 7µL de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Sigma-Aldrich) e 13 mL de tampão citrato-fosfato (pH 4,5). Após incubação em temperatura ambiente por 30 minutos, adicionou-se 50µL/poço de solução *stop* (HCl 2M) e realizou-se a leitura a 492 nm em espectrofotômetro (Epoch Life Science, Missouri City, EUA).

Dois métodos de controle negativo foram utilizados: o primeiro consistiu no C- utilizando soro humano *naive* (padrão negativo da BIOELISA Anti-HBs, Bioclin, MG, Brasil). O segundo C- baseou-se na utilização de soro de paciente sem histórico de infecção por DENV ou ZIKV, mas que já entrou em contato com outros patógenos e vacinação. Os resultados deste segundo C- foram utilizados para o cálculo do *cut-off*. A reação branca foi realizada utilizando apenas PBS 1X (sem antígeno) na etapa de sensibilização (*coating*) para análise da reação do soro com o fundo do poço.

#### 4.3.2 MAC-ELISA

Os ensaios para captura de IgM anti-DENV foi realizada com protocolo padronizado *in house* seguindo as instruções do CDC. A sensibilização de placas de 96 poços (50µL/poço) (Costar Corning, Sigma-Aldrich) foi realizada com anti-IgM humana produzida em camundongo BALB/c pelo CEPRACO na concentração de 10µg/mL e incubou-se *overnight* a 4°C. Em seguida, descartou-se o *coating* e realizou-se o bloqueio, durante 30 minutos, com PBS 1X com 1% de *Tween* 20 e 5% de leite desnatado. A lavagem do bloqueio foi realizada três vezes utilizando o tampão de lavagem anteriormente descrito. A adição dos soros humanos, positivos para IgM anti-DENV foi realizada utilizando o soro diluído em PBS 1X com 1% de *Tween* 20 (1:400) e incubou-se a 37°C por 1 hora. Após a realização de quatro lavagens, adicionou-se os respectivos antígenos (50µg/mL) diluídos em PBS 1X e incubou-se a 4°C *overnight*. A seguir, lavou-se três vezes e adicionou-se o conjugado anti-flavivirus diluído (1:4.000 para DENV e 1:2.000 para ZIKV) no tampão de bloqueio e incubou-se a 37°C durante 1 hora. Para a revelação foi utilizado substrato TMB (Tetrametilbenzidina) (Sigma-Aldrich) (75µL/poço) durante 20 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se solução *stop* contendo H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 M) e a leitura foi realizada a 450 nm em espectrofotômetro Epoch Life Science. Para controle negativo dos antígenos, foi utilizado apenas PBS 1X na etapa dos antígenos e para controle negativo dos pacientes foi utilizado soro de paciente negativo para DENV e ZIKV. Para controle positivo dos antígenos, foram utilizados *pool* de antígenos de DENV ou ZIKV produzidos pela inoculação dos respectivos vírus em cérebro de camundongo.

#### 4.3.3 Análise das absorbâncias

Para análise dos resultados, emitidos em valores de densidade óptica (O.D.), foi utilizada a seguinte fórmula matemática para cálculo do ponto de corte (*cut-off*):

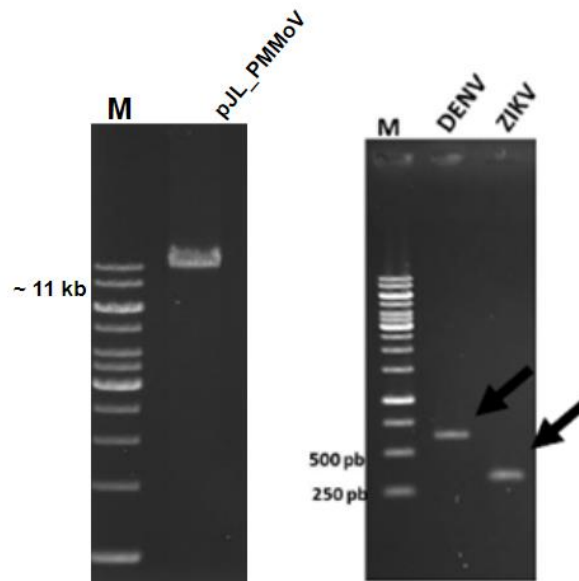
$$\textit{cut-off} = \text{MdC-} + (3 \times \text{DP})$$

no qual, Md: média, C-: controles negativos; DP: desvio padrão. Este último foi calculado utilizando algoritmos do programa Microsoft Excel. Considerou-se, portanto, que os valores acima do *cut-off* foram positivos e, os abaixo, negativos ou inconclusivos.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CONSTRUÇÃO PMMoV\_( $\Delta$ CP)DENV e PMMoV\_( $\Delta$ CP)ZIKV

Foi possível observar na eletroforese em gel de agarose 2 % (Figura 7) a banda de aproximadamente 11 kb do vetor pJL\_PMMoV clonado por GA e os *amplicons* de insertos do Multi-Dengue (651 pb) e Multi-Zika (342 pb) (setas).



**FIGURA 7. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1%.** Foi realizado clonagem por GA utilizando o vetor pJL\_PMMoV\_( $\Delta$ CP)GFP para amplificação do vetor pJL\_PMMoV\_( $\Delta$ CP). Para amplificação dos insertos, utilizou-se os vetores pClone contendo as sequências dos antígenos de multiepítipo.

Após a ligação do pJL\_PMMoV com Multi-Dengue ou Multi-Zika, a construção (10 ng) foi inserido em *E. coli* (DH10B) competentes. O plasmídeo foi extraído conforme descrito anteriormente e sequenciado. Este, enfim, revelou que os genes de multiepítipo do DENV e ZIKV foram inseridos corretamente no vetor pJL\_PMMoV e, portanto, estavam prontos para serem transfectados em *A. tumefaciens* para agroinfiltração e expressão.

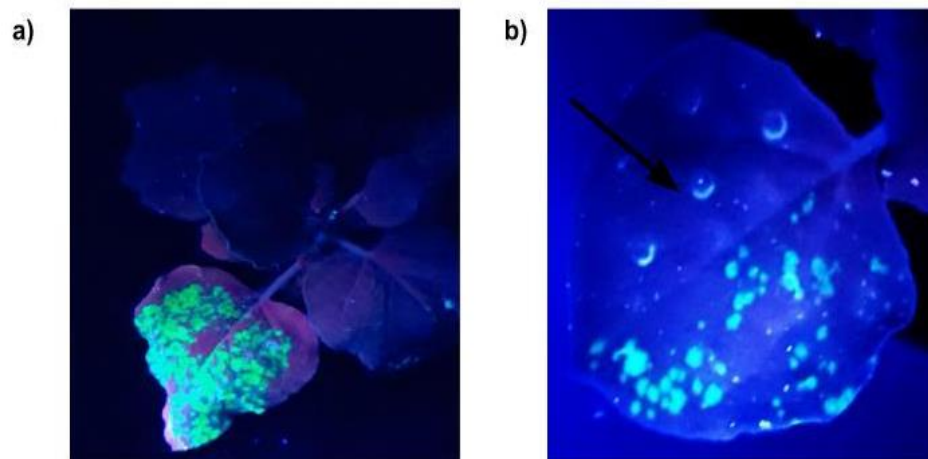
### 5.2 EXPRESSÃO EM *N. benthamiana*

#### 5.2.1 Expressão da GFP e ação do supressor HC-Pro

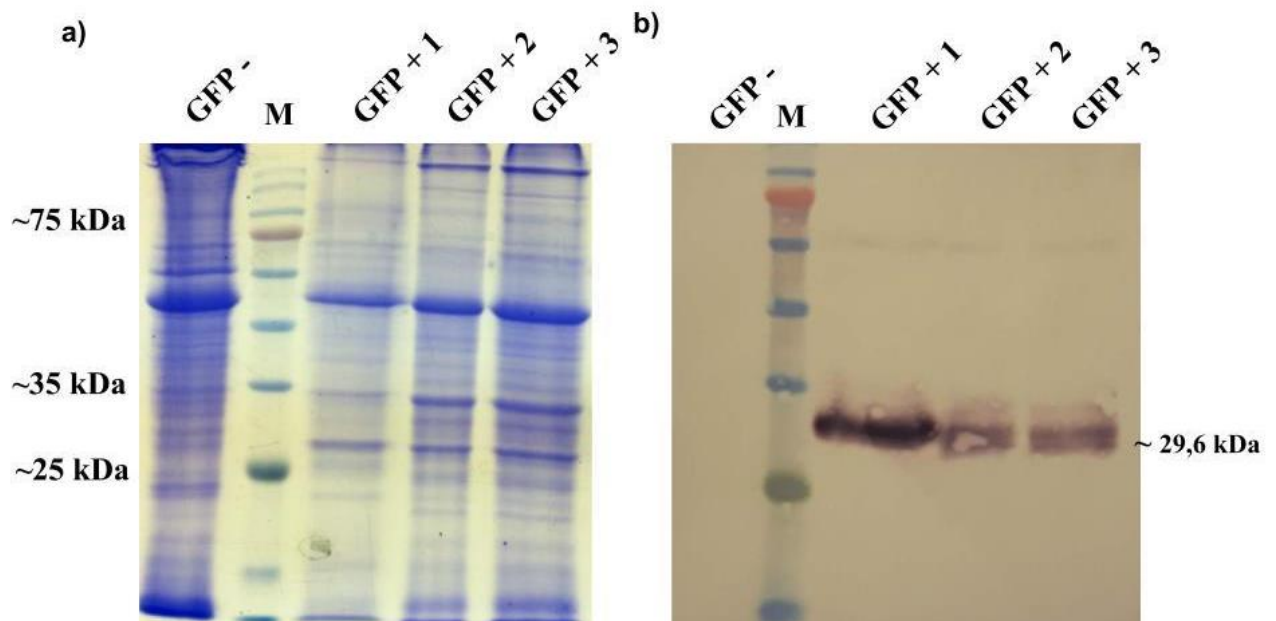
Após a agroinfiltração das *N. benthamiana* com PMMoV\_( $\Delta$ CP)GFP e pBIN19 HC-Pro, as folhas observadas em luz ultravioleta (Figura 8) em 10 d.p.i. para observar a intensidade do sinal da GFP. O sinal foi observado a partir de 5 d.p.i e a intensidade aumentou até o 12



d.p.i. Após esse período, a intensidade de GFP diminuiu gradativamente até desaparecer por volta de 20 a 25 d.p.i. As regiões da folhas infiltradas com PMMoV\_( $\Delta$ CP)GFP e que foram concomitantemente infiltradas com pBIN19 HC-Pro apresentaram maior expressão da GFP (Figura 8a). Já as regiões da folhas que não receberam o supressor teve pouca ou nenhuma expressão de GFP (Figura 8b).



**FIGURA 8. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GFP EM LUZ ULTRAVIOLETA.** a) observa-se folha agroinfiltrada com PMMoV\_( $\Delta$ CP)GFP + pBIN19 HC-Pro com 7 d.p.i. b) folha com 5 d.p.i com região agroinfiltrada com PMMoV\_( $\Delta$ CP)GFP + pBIN19 HC-Pro e agroinfiltrada com PMMoV\_( $\Delta$ CP)GFP sem o supressor pBIN19 HC-Pro (seta). Fonte: elaborado pelo autor.

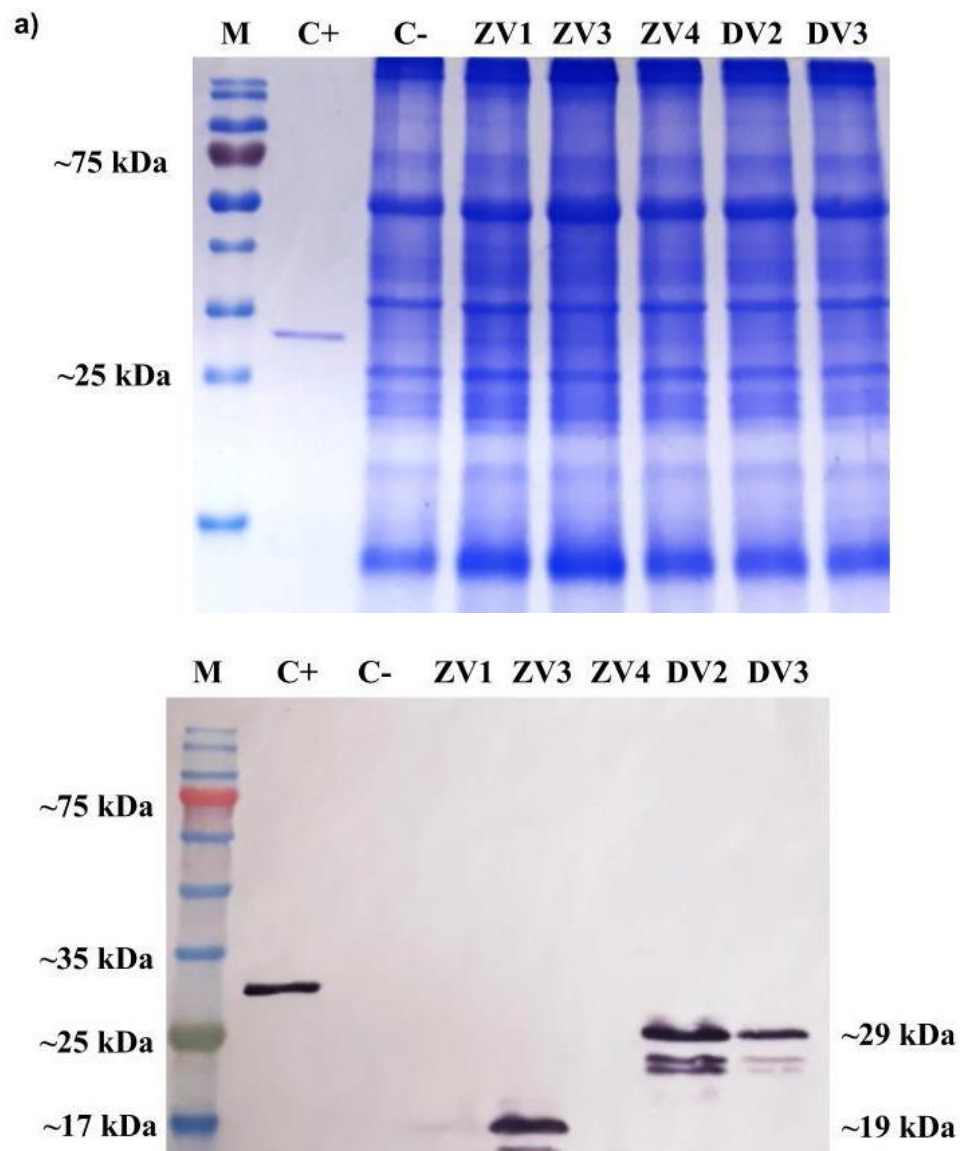


**FIGURA 9. EXPRESSÃO DE GFP EM *N. benthamiana*.** a) SDS-PAGE dos extratos coletados em 10 d.p.i. corados com *Coomassie blue*. b) *western blotting* realizado com anticorpo anti-GFP revelou bandas de massa molecular próximas a 29,6 kDa referes à GFP. GFP - folha não agroinfiltrada. M: marcador; GFP: *green fluorescent protein*. Da: Daltons.

Após análise em luz ultravioleta, os extratos foram submetidos a SDS-PAGE e *Western blotting* para análise da expressão e observação do tamanho das proteínas (Figura 9). Utilizando o anticorpo anti-GFP, observou-se a bandas de aproximadamente 29,6 kDa referentes às GFP. Os extratos de folhas que não foram agroinfiltradas com PMMoV\_( $\Delta$ CP)GFP não apresentaram expressão.

### 5.2.1 Expressão dos antígenos de multiepítipo de DENV e ZIKV

As folhas de *N. benthamiana*, agroinfiltradas com PMMoV\_( $\Delta$ CP)DENV e PMMoV\_( $\Delta$ CP)ZIKV, foram coletadas com 10 d.p.i e submetidas a análise através de SDS-PAGE (Figura 10a) e *Western blotting* (Figura 10b). Como controle negativo (C -), foi utilizado extrato de folhas não agroinfiltradas (sadias) e, como controle positivo (C +), foi utilizado proteína expressa em *N. benthamiana* contendo sequência de 6xhis-tag. A amostra ZV3 revelou maior expressão de antígeno de multiepítipo de ZIKV, mostrando massa molecular de aproximadamente 19 kDa, sendo 11 kDa referentes ao antígeno e 8 kDa referentes ao peptídeos da CP do PMMoV fusionado com antígeno. Em relação a antígeno de multiepítipo do DENV, as amostras DV2 e DV3 revelaram proteínas com massa molecular de aproximadamente 29 kDa, sendo 21 kDa do antígeno e 8 kDa do CP do PMMoV. Nota-se, também, a presença de bandas com pesos moleculares menores abaixo dos antígenos de multiepítipo, indicando degradação por proteases produzidas pelas folhas das plantas.

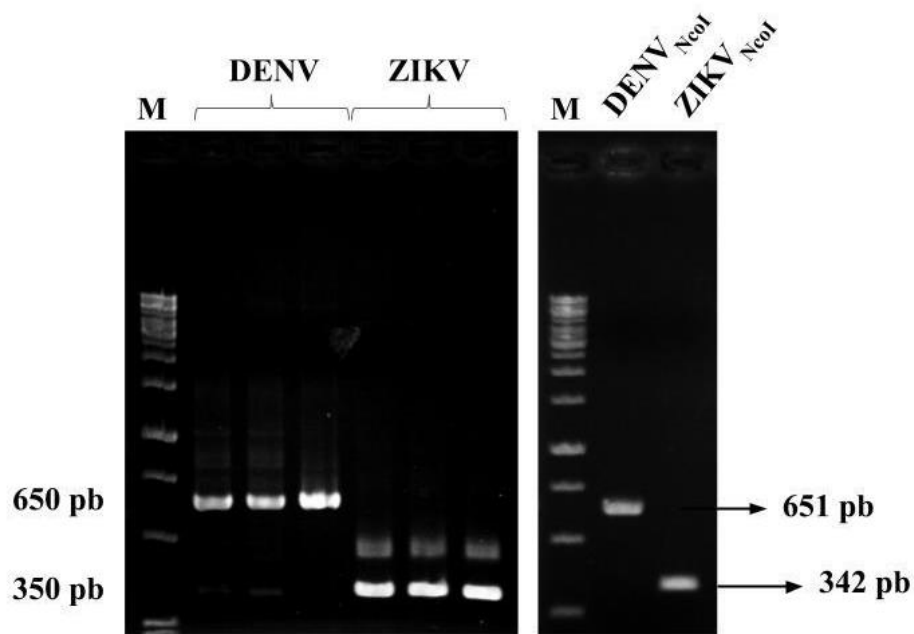


**FIGURA 10. EXPRESSÃO DOS ANTÍGENOS DE MULTIEPÍTOPO EM *N. benthamiana*.** a) SDS-PAGE corado com *Comassie blue*. b) *western blotting* com anti-His. C+ apresentando massa molecular de aproximadamente 30 kDa (Rdps de *Tymovirus* contendo sequência de 6xhis-tag). C- não revelou reação; ZV: ZIKV; DV: DENV. Da: Daltons. M: marcador.

### 5.3 BACMÍDEOS RECOMBINANTES

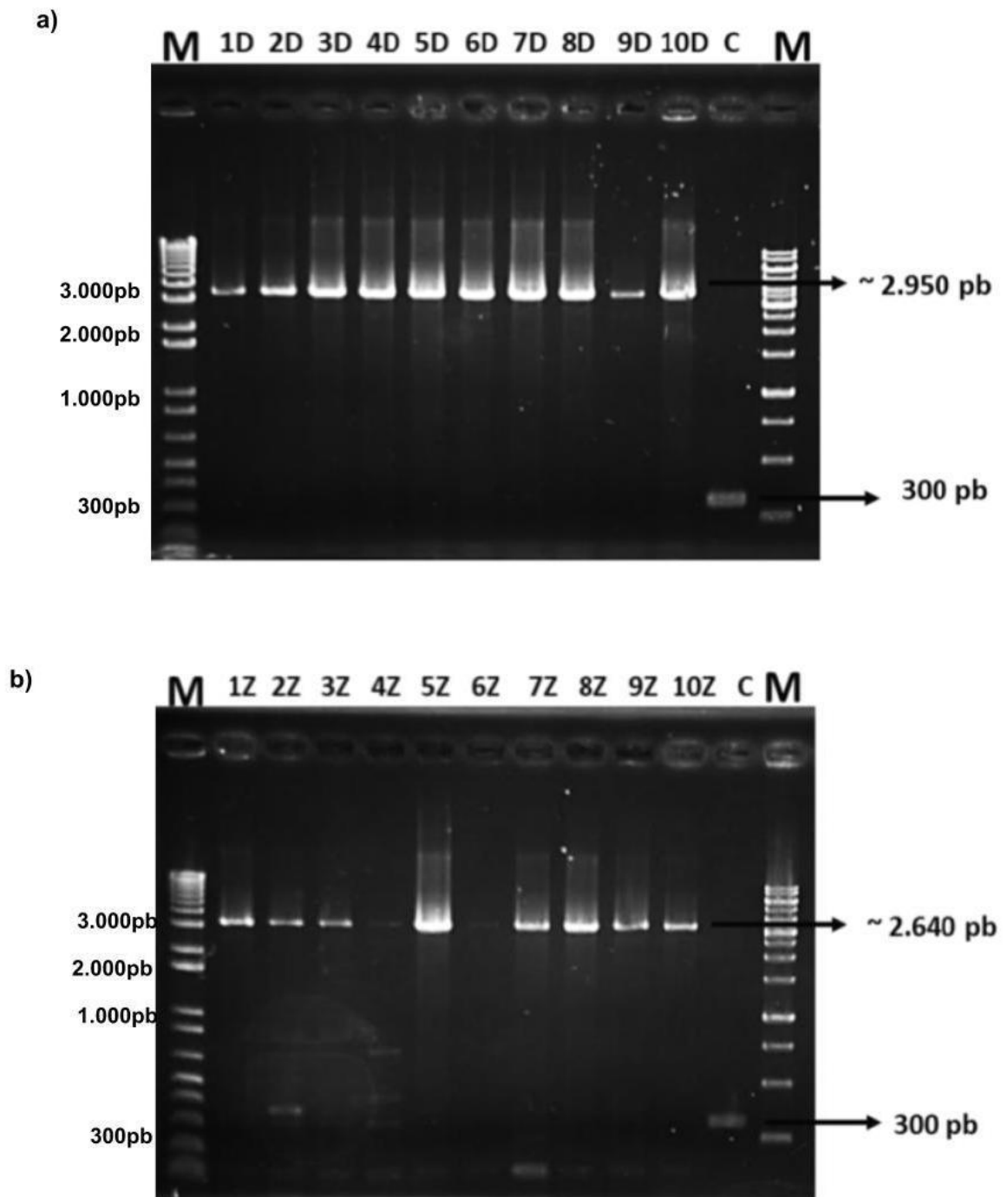
#### 5.3.1 Construção dos bacmídeos com antígenos de multiepítipo DENV e ZIKV

Em relação à expressão com baculovírus recombinantes, o resultado da PCR com Q5 DNA polimerase pode ser observado na Figura 11. O tamanho do DNA esperado para o gene de multiepítipo do DENV é de aproximadamente 650 pb. Já para o ZIKV são 340 pb.



**FIGURA 11. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 2%.** Os produtos da PCR com Q5 DNA polimerase para inserção do sítio de restrição para Nco I foram obtidos a partir do pClone\_Dengue e pClone\_Zika. As bandas dos genes amplificados foram purificadas conforme descrito e observou-se bandas de aproximadamente 650 pb para DENV e 340 para ZIKV. M: marcador; pb: pares de base.

Após a purificação dos fragmentos, clonagem em pFB-A e transformação em DH10B, o sequenciamento dos plasmídeos mostrou quais clones foram corretos e iriam ser utilizados na transformação de DH10Bac para produção dos bacmídeos recombinantes. Estes, enfim, foram confirmados utilizando a PCR de colônia com *Taq* DNA polimerase. O tamanho esperado para bacmídeo sem inserto é de aproximadamente 300 pb. Já os bacmídeos que receberam o transpóson de pFB-A precisam ter o tamanho próximo a 2.300 pb mais o tamanho do inserto. Nesse caso, para DENV o tamanho é de ~2.950 (Figura 12a) e para ZIKV é de ~2.640 (Figura 12b).

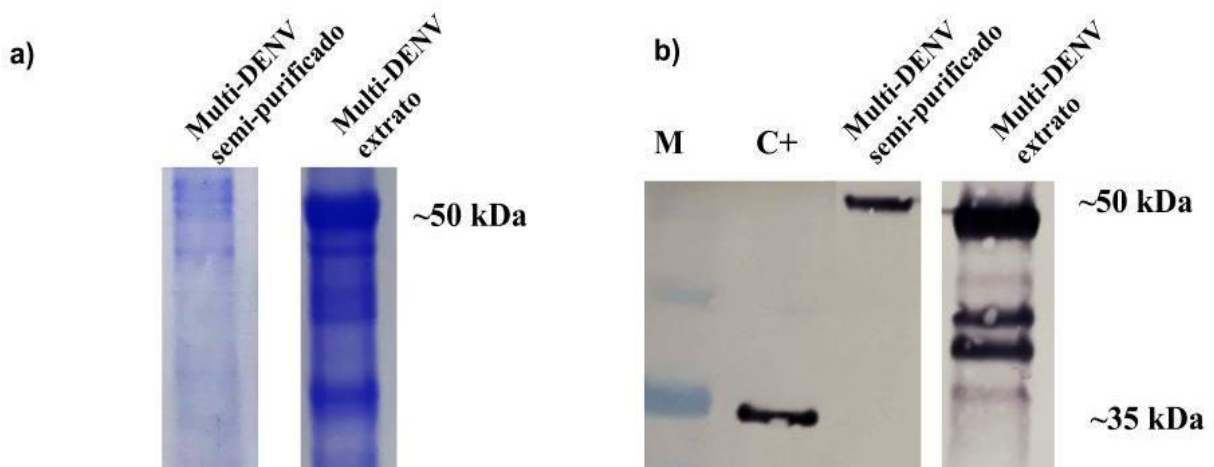


**FIGURA 12. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1,5 %.** O gel revela os produtos da PCR utilizando a DNA polimerase Taq, conforme recomendações do Bac-to-Bac. a) os clones 1D-10D foram positivos para a clonagem, uma vez que não se observou bandas com 300 pb e observou-se bandas com aproximadamente 2.640 pb. b) os clones 2Z e 4Z revelaram banda de 300 pb sugerindo bacmídeo não recombinante. Como controle, foi utilizada uma colônia com bacmídeo sem recombinação (colônia azul na presença de Xgal e IPTG). C: controle; M: marcador; pb: pares de base; D: DENV; Z: ZIKV.

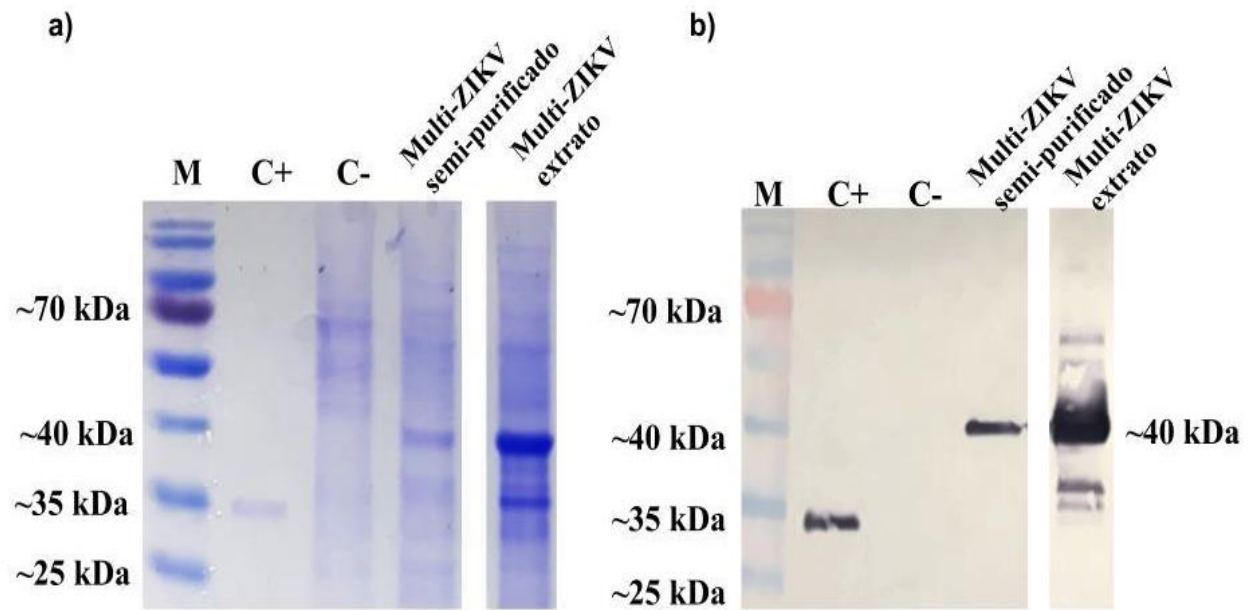
### 5.3.2 Transfecção das células de inseto, expressão e purificação dos antígenos

As células da linhagem TN-5B de *T. ni* transfectadas com bacmídeos contendo as sequências dos antígenos de multiepítopo do DENV e ZIKV foram observadas durante um período inicial de sete dias. O sobrenadante, contendo os baculovírus recombinantes são coletados e estocados para posteriores infecções. Já o extrato celular da TN-5B é coletado para análise da expressão e purificação para uso nos ensaios de ELISA. Ressalta-se que antígenos de ZIKV (NS1-ZIKV e EDIII-ZIKV) e EDIII-YFV, já construídos pelo Laboratório de Baculovírus da UnB, também foram produzidos.

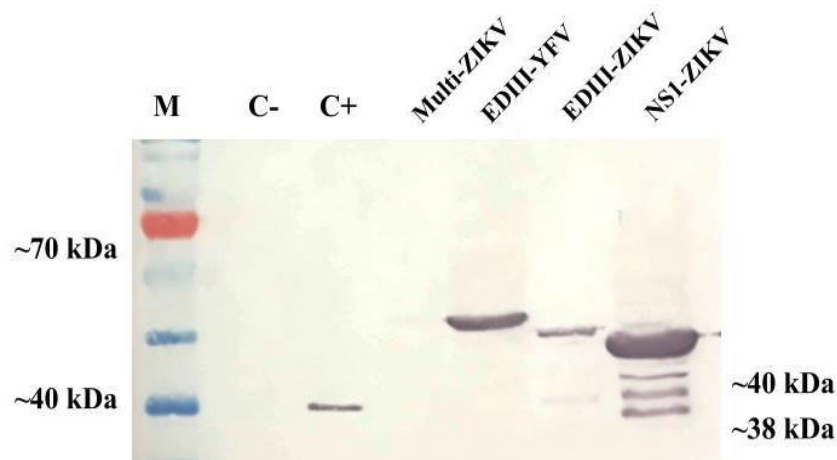
O SDS-PAGE realizado antes e após a purificação em gradiente de sacarose mostrou que os ambos os antígenos de multiepítopo, DENV e ZIKV, foram semi-purificados (Figura 13a e Figura 14a). No entanto, a análise de *western blotting* utilizando o anti-His mostrou a presença dos antígenos de multiepítopos nas massas moleculares esperadas. O antígeno de multiepítopo do DENV revelou massa molecular de aproximadamente 50 kDa, sendo 21 kDa referentes ao antígeno e 29 kDa referentes à poliedrina fusionada (Figura 13b). Já o antígeno de multiepítopo do ZIKV mostrou massa molecular de aproximadamente 40 kDa, sendo 11 kDa do antígeno e 29 kDa referentes à poliedrina (Figura 14b). Nota-se a presença da proteína C+ contendo 6xhis-tag. Por fim, observa-se (Figura 15) a detecção dos outros antígenos de ZIKV e também de YFV utilizando anti-His com massas moleculares entre 38 kDa e 40 kDa.



**FIGURA 13. EXPRESSÃO DE ANTÍGENO DE MULTIEPÍTOPO DO DENV EM *T. ni*.** a) SDS-PAGE de extrato bruto e semi-purificado de TN-5B. b) *western blotting* com anti-His mostrando a expressão do antígeno com peso molecular próximo a 50 kDa. C+: proteína com sequência de 6xhistag. M: marcador; Da: Daltons.



**FIGURA 14. EXPRESSÃO DE ANTÍGENO DE MULTIEPÍTOPO DO ZIKV EM *T. ni*.** a) SDS-PAGE de extrato bruto e semi-purificado de TN-5B. b) *western blotting* com anti-His mostrando a expressão do antígeno com peso molecular próximo a 40 kDa. C+: proteína com sequência de 6xhistag. C -: controle negativo de células TN-5B não infectadas; M: marcador; Da: Daltons.



**FIGURA 15. EXPRESSÃO DE ANTÍGENOS DE ZIKV E YFV em *T. ni*.** *Western blotting* com anti-His mostrando a expressão dos antígenos com seus respectivos pesos moleculares. C+: proteína com sequência de 6xhistag. C -: controle negativo de células TN-5B não infectadas; M: marcador; Da: Daltons. YFV: Yellow fever virus; NS1: non-structural protein 1..

## 5.4 ENSAIOS IMUNOENZIMÁTICOS

Para os ensaios de ELISA, serão mostrados apenas os resultados considerados conclusivos. Portanto, para o ELISA de detecção de IgG anti-DENV ou IgG anti-ZIKV, têm-se resultados das amostras de pacientes coletadas pelo CEPRACO (Anexo I). Os ensaios realizados no LACEN-DF, utilizando amostras positivas para IgM anti-DENV, revelaram

resultados insatisfatórios e faz-se necessário a padronização do MAC-ELISA utilizando os antígenos de multiepítomos produzidos.

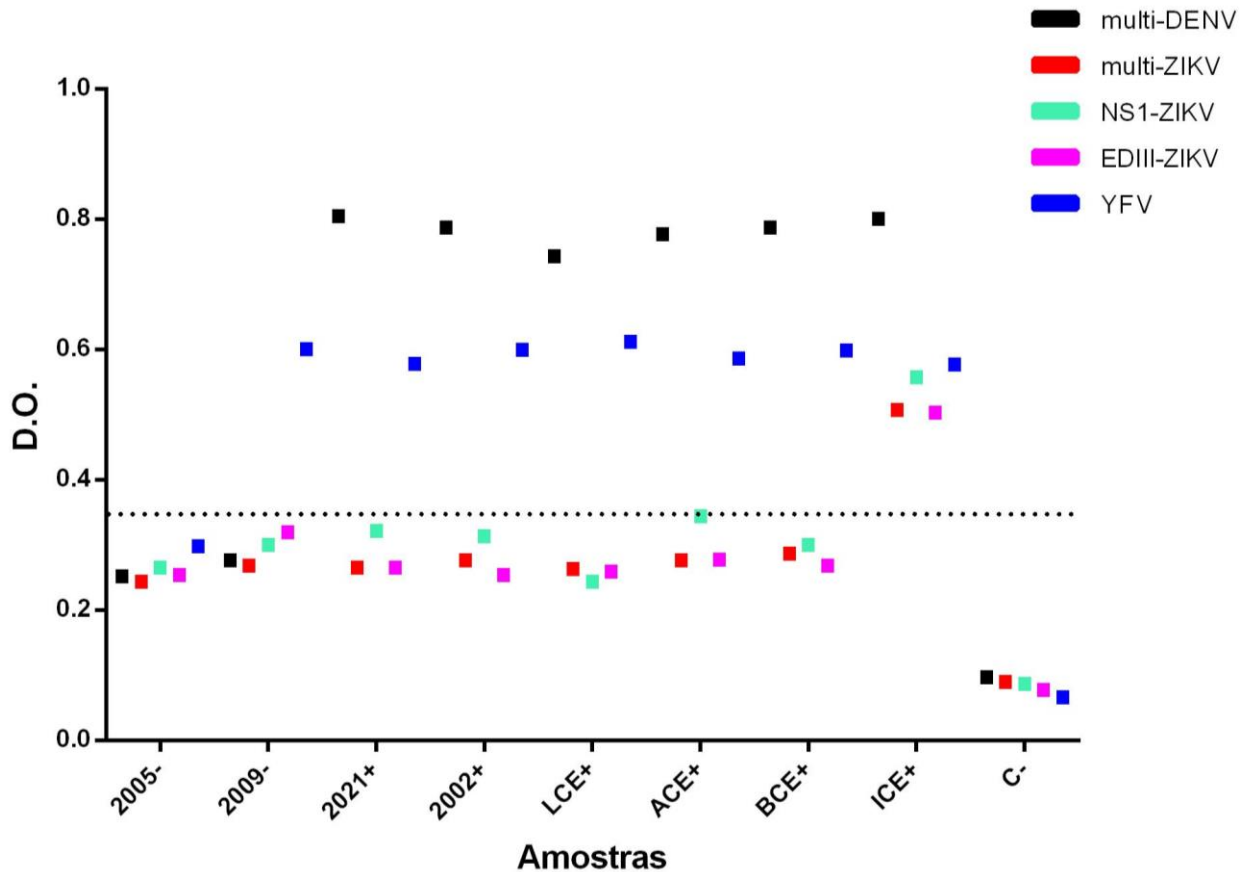
#### **5.4.1 ELISA indireto**

##### **5.4.1.1 IgG anti-DENV**

Os ensaios de ELISA para detecção de IgG anti-DENV (Figura 16) foram realizados utilizando seis amostras IgG anti-DENV positivas e duas amostras negativas para infecção por DENV ou ZIKV. No entanto, ambas os pacientes foram vacinados contra a Febre Amarela. O soro *naive* (padrão negativo da BIOELISA Anti-HBs, Bioclin, MG, Brasil) não reagiu com nenhum dos antígenos utilizados no teste: Multiepítomo do DENV, Multiepítomo do ZIKV, NS1 do ZIKV, EDIII do ZIKV e EDIII do YFV. As amostras de pacientes sem infecção por DENV ou ZIKV mostraram valor médio de absorbância de 0,278 e, a partir deste valor, o *cut-off* de 0,350 foi calculado. Os valores da reação do branco (*coating* sem antígenos) já estão subtraídos dos valores das absorbância das reações.

Assim sendo, os pacientes IgG anti-DENV positivos reagiram melhor com o antígeno de Multiepítomo do DENV (OD: 2021: 0,850; 2002: 0,744; LCE: 0,744; ACE: 0,777; BCE: 0,788 e ICE: 0,801). Já a reação dos soros com os antígenos da ZIKV (Multiepítomo, NS1 e EDIII) foram consideradas negativas, exceto para o paciente ICE (0,508, 0,558 e 0,504, respectivamente). Este paciente, por sua vez, tem histórico de infecção por DENV e ZIKV confirmados por PCR durante a fase aguda das doenças. Os seis pacientes reagiram com o antígeno do YFV (EDIII-YFV). No entanto, os valores de absorbância foram menores que os das reações com o Multiepítomo do DENV.

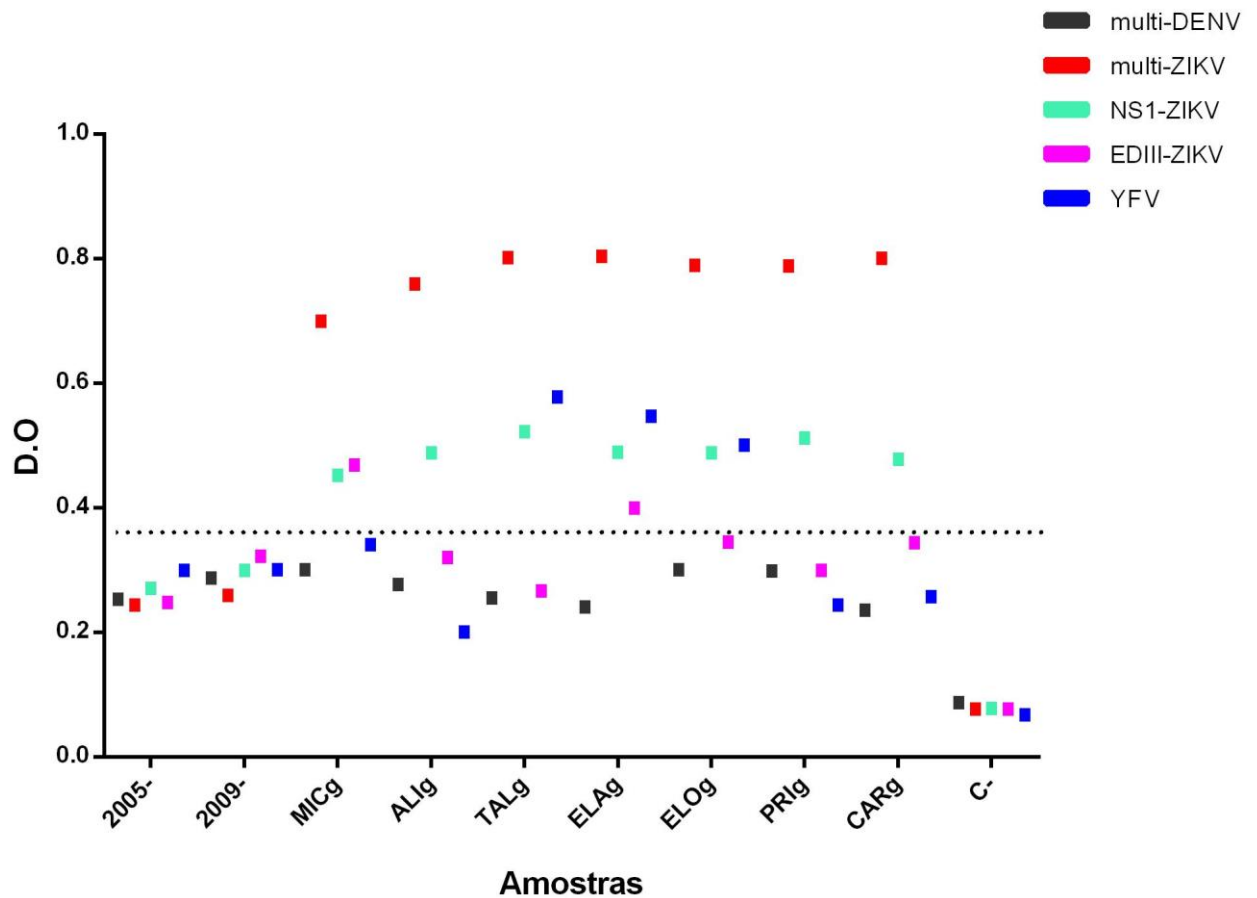




**FIGURA 16. ELISA DE DETECÇÃO DE IgG anti-DENV.** Neste ensaio realizado em triplicata, os valores plotados no gráfico foram calculados pela média das absorvâncias medidas a 492 nm. *Cut-off* = 0,350 (linha pontilhada) D.O.: densidade óptica. C-: controle negativo com soro *naive*.

#### 5.4.1.2 IgG anti-ZIKV

Os ensaios de ELISA para detecção de IgG anti-ZIKV (Figura 17) foram realizados utilizando sete amostras IgG anti-ZIKV positivas e duas amostras negativas para infecção por DENV ou ZIKV. No entanto, ambas os pacientes foram vacinados contra a febre amarela. O soro *naive* (padrão negativo da BIOELISA Anti-HBs, Bioclin, MG, Brasil) não reagiu com nenhum dos antígenos utilizados no teste: Multiepítipo do DENV, Multiepítipo do ZIKV, NS1 do ZIKV, EDIII do ZIKV e EDIII do YFV. As amostras de pacientes sem infecção por DENV ou ZIKV mostraram valor médio de absorvância de 0,278 e, a partir deste valor, o *cut-off* de 0,353 foi calculado. Os valores da reação do branco (*coating* sem antígenos) já estão subtraídos dos valores das absorvância das reações.



**FIGURA 17. ELISA DE DETECÇÃO DE IgG anti-ZIKV.** Neste ensaio realizado em triplicata, os valores plotados no gráfico foram calculados pela média das absorvâncias medidas a 492 nm. *Cut-off* = 0,353 (linha pontilhada) D.O: densidade óptica. C-: controle negativo com soro *naive*.

Desta forma, os pacientes IgG-anti-ZIKV positivos mostraram valores de absorvância maiores com antígenos de multiepítipo da ZIKV (média 0,777) e com NS1-ZIKV (média 0,489), ambos os resultados acima do *cut-off*. Para o antígeno EDIII-ZIKV apenas uma paciente (PRIG) mostrou valor considerado positivo. Já para o antígeno EDIII-YFV, apenas três pacientes (TALg, ELAg. e ELOg.) mostraram resultados acima do *cut-off* e, portanto, positivos. Os pacientes deste ensaio não mostraram reação satisfatória contra o antígeno do Multiepítipo do DENV.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 ANTÍGENO DE MULTIEPÍTOPO

O estudo de Zhao *et al.* (2016) desenvolveu um painel de anticorpos monoclonais anti-ZIKV que forneceu informações sobre os epítomos que são reconhecidos por anticorpos neutralizantes. Sendo assim, espera-se que as regiões reconhecidas por esses anticorpos sejam sequências mais específicas. A partir dessa análise, portanto, três epítomos ZIKV espacialmente distintos e com propriedades funcionais diferentes foram definidos e utilizados na síntese dos antígenos de multiepítomo. Além disso, o alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos de outros flavivírus (YFV, WNV) importantes em saúde pública foi realizada com o objetivo de excluir sequências conservadas entre os vírus e diminuir a reatividade cruzada.

Os multiepítomos do DENV e ZIKV foram, então, construídos com sequências das regiões do DIII da proteína E (EDIII) unidos por *linkers* de glicina. Como demonstrado (Dai *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2016; Prekumar *et al.*, 2017; Rockstroh *et al.*, 2017) a produção de anticorpos neutralizantes e, portanto, mais específicos é direcionada para regiões presentes no EDIII. Regiões do EDII, como o *loop* de fusão, são mais conservadas e geram reatividade cruzada. Além disso, a construção de epítomos com *linkers* de tetra ou hexaglicina permite a formação de epítomos conformacionais e descontínuos, o que melhora a eficiência no reconhecimento de anticorpos tipo específicos, pois a especificidade dos epítomos não se limita apenas a sequências variáveis de aminoácidos escolhidas, mas depende também das conformações estruturais do antígeno. A repetição em *tandem*, ainda, desses epítomos aumenta a eficiência de exposição do antígeno. Assim, os multiepítomos de DENV e ZIKV construídos neste trabalho podem ser úteis para ensaios diagnósticos que distinguem os antígenos entre os flavivírus.

### 6.2 EXPRESSÃO EM PLANTAS

Para a expressão dos antígenos de multiepítomos do DENV e ZIKV foi necessária a clonagem no vetor de expressão PMMoV\_ΔCP desenvolvido por Vasques *et al.* (2018). Tal clonagem pode ser realizada tradicionalmente por enzimas restrição ou, mais recente, por *Gibson Assembly* (GA). A inserção do sítio de restrição para a enzima Nhe I nas regiões N e C-terminal dos antígenos foi realizada para a realização da clonagem por enzima de restrição. No entanto, a clonagem por GA, que demonstrou mais eficiência, foi realizada. Tendo como

vantagem uma clonagem isotérmica, o método permite a montagem simples de múltiplos fragmentos de DNA na orientação desejada, sem a necessidade incluir nucleotídeos indesejados e ainda geram produtos totalmente ligados (Bodat *et al.*, 2015; Kalva *et al.*, 2018). Além disso, as enzimas de restrições perdem com facilidade sua capacidade catalítica com alterações de temperatura durante o manuseio e transporte.

Uma vez clonadas as sequências dos antígenos de multiepítotos no vetor PMMoV\_ $\Delta$ CP), a escolha de um bom e eficiente sistema de expressão é importante. Como mencionado, a expressão utilizando planta é vantajoso no que tange à biossegurança do sistema, processamento pós-traducional das proteínas, escalabilidade e custo (Scotti & Cardi., 2012). A utilização, ainda, de vírus vegetal como vetor de expressão melhora a eficiência da expressão Cãzizares *et al.*, 2005. Assim sendo, o clone infeccioso de PMMoV\_ $\Delta$ CP), construído por Vasques *et al.* (2018), demonstrou ser uma excelente ferramenta de expressão quando utilizado na presença do supressor do silenciamento gênico, como HC-Pro. As folhas de *N. benthamiana* agroinfiltradas com PMMoV\_ $\Delta$ CP)GFP + pBin HC-Pro demonstraram fluorescência aumentada nas áreas infiltradas e muitos anéis foram observados sob luz ultravioleta. Sugere-se, então, que o supressor de silenciamento do RNA viral melhorou a eficiência de expressão. Em contraste, a região sem co-infiltração de pBin HC-Pro não demonstrou fluorescência.

A fluorescência da GFP não foi observada em folhas não infiltradas evidenciando ausência de movimento sistêmico do clone infeccioso. Esse fato era esperado, pois parte da sequência da CP do PMMoV foi deletada. Como essa proteína atua no movimento sistêmico (Rybicki, 2010), a produção de GFP limitou-se as regiões infiltradas. Apenas movimento célula-a-célula e/ou a curta distância foram esperados. A fluorescência diminuiu gradativamente a partir de 12 d.p.i., sendo que em 20 a 25 d.p.i. já não era mais observada. Sugere-se, então, que a idade da planta é o fator mais influente na expressão. Plantas com mais de 5 semanas apresentaram menor expressão de GFP provavelmente devido a degradação das proteínas que são expressas.

Em seguida, esperou-se que a expressão dos antígenos de multiepítotos do DENV e ZIKV fosse semelhante à expressão da GFP, uma vez que o gene repórter GFP (PMMoV\_ $\Delta$ CP)GFP) foi substituído por GA pelos genes do antígenos no mesmo vetor de expressão: PMMoV\_ $\Delta$ CP)DENV e PMMoV\_ $\Delta$ CP)ZIKV. A sequência de 6xhis-tag da região C - terminal foi utilizada para a detecção dos antígenos através do anti-his. A produção dos antígenos de multiepítotos foram, então, confirmadas pela presença da proteína de peso esperado de 19 kDa para o ZIKV e 29 kDa para o DENV. A massa molecular do multiepítoto

do ZIKV é 11 kDa e do DENV, 21 kDa. No entanto, a deleção da CP do PMMoV não foi completa, restando uma sequência da CP de aproximadamente 8 kDa referentes aos 102 nucleotídeos em cada extremidade da CP. Os antígenos, portanto, foram expressos fusionados às regiões da 5' e 3' da CP.

A deleção da CP não prejudica a antigenicidade dos antígenos e traz vantagens importantes na produção de proteínas em plantas. Conforme afirma Lidbo (2007), permite clonar sequências gênicas grandes, reduz riscos de escape do vetor viral para o ambiente (biossegurança) e a energia celular para a tradução da CP é utilizada na tradução da proteína de interesse. É importante ressaltar, no entanto, que a modificação da CP pode danificar a região do promotor subgenômico e reduzir a produção subgenômica do RNA, o que resulta em menor produção de proteínas (Man & Epel, 2004).

Os resultados da expressão em planta ainda sugerem que os antígenos de multiepítotos são degradados por proteases vegetais, diminuindo sua capacidade antigênica. A análise de *western blotting* com anti-his detectou bandas com massas moleculares menores que as esperadas (Figura 10) Além disso, os resultados de *western blotting* dos extratos de folha realizados dias ou semanas após a coleta não foram capazes de detectar os antígenos expressos ou os sinais de detecção foram insuficientes (Observar ZV1 e ZV4 na Figura 10). Sendo assim, faz-se necessária a utilização de tampões de extração contendo inibidores de proteases, tais como o PMSF (*phenylmethane sulfonyl fluoride*), o qual deve ser utilizado em solução de etanol ou isopropapol devido sua meia-vida curta. No entanto, o PMSF não inibe toda protease presente no extrato (Prouty & Goldberg, 1972) Assim, sugere-se realizar a purificação das proteínas expressas em planta antes da estocagem. A inserção da sequência de 6xhis-tag na região C- terminal dos antígenos, além de ajudar na detecção, auxilia na purificação através de coluna de níquel, como *HisLink™ Protein Purification Resin Technical Bulletin* (Promega).

## 6.2 EXPRESSÃO EM CÉLULAS DE INSETO

A confirmação da expressão dos antígenos de multiepítoto do DENV e ZIKV em células de inseto, TN5-B, foi realizada, inicialmente, por microscopia óptica. Após a infecção, as células perderam sua morfologia e sofreram hipertrofia nuclear. Em seguida, os extratos de TN5-B foram submetidos a SDS-PAGE e *western blotting*, e as proteínas foram detectadas com anti-his. Suas massas moleculares foram 50 kDa para o DENV e 40 kDa para o ZIKV. Da massa total dos multiepítotos, aproximadamente 30 kDa referem-se à poliedrina que foi expressa

fusionada aos antígenos. Como demonstrado em trabalhos semelhantes de expressão de antígenos (Batista, 2010; Domingues, 2013), essa fusão melhora a eficiência da expressão e aumenta a quantidade de proteína produzida devido ao promotor da poliedrina. Além disso, a poliedrina diminui a atividade catalítica de proteases sobre as proteínas heterólogas expressas, diminuindo a necessidade de inibidores de proteases, que em muitos casos são tóxicos, e protege a capacidade antigênica em caso de antígenos A produção de proteínas de interesse fusionadas à poliedrina permite, ainda, a purificação por gradiente de sacarose como descrito por Ardisson-Araújo (2013). Após a purificação, portanto, ainda foi possível detectar considerável quantidade de antígenos de multiepítomos do DENV e ZIKV.

### 6.3 ENSAIOS DE ELISA

A produção de antígenos DENV e ZIKV específicos é importante para o desenvolvimento de novos testes sorológicos que possam diagnosticar e diferenciar as infecções causadas por esses vírus. Como reportado (Lima, 2014; Zhang *et al.*, 2016; Felix *et al.*, 2017; Tsai *et al.*, 2017), os ensaios de ELISA para detecção de IgG anti-DENV atuais e disponíveis no mercado não apresentam alta confiabilidade nos resultados devido à baixa especificidade dos testes que é provocada pela alta identidade entre as sequências de aminoácidos dos entre o DENV e o ZIKV. Além disso, o diagnóstico padrão-ouro, o MAC-ELISA, não é um teste disponível no mercado para o ZIKV, requer o desenvolvimento de antígenos específicos e necessita que as amostras de sangue dos pacientes sejam coletadas na fase aguda da doença (2-6 dias). Caso contrário, a detecção de IgM não é possível (Huillier *et al.*, 2017)

Assim sendo, os antígenos de multiepítomo construídos neste trabalho, considerados específicos pela exclusão de regiões conservadas entre os flavivírus, pela utilização de *linkers* de tetra e hexaglicina que permitem a expressão como antígenos conformacionais e pela repetição em *tandem* para formação de multiepítomos foram expressos para ensaios pilotos de ELISA com amostras de pacientes IgG positivas pra DENV e ZIKV.

No ensaio para detecção de IgG anti-DENV, seis amostras de pacientes positivas para DENV foram utilizadas, sendo uma positiva também para ZIKV. Os resultados mostram reação positiva na presença do antígeno de multiepítomo do DENV desenvolvido, sugerindo reconhecimento de IgG de exposição prévia ao DENV. Além disso, os cinco pacientes que se infectaram apenas com DENV não reagiram com antígenos de ZIKV (multi-ZIKV, NS1 e EDIII) sugerindo especificidade dos antígenos na detecção de IgG anti-DENV. A reação

positiva da amostra ICE com os antígenos de multi-ZIKV, NS1 e EDIII corrobora a hipótese de que os antígenos produzidos apresentam especificidade, pois a amostra ICE é a única que deve conter IgG anti-ZIKV.

Excetuando-se a amostra negativa 2005-, todas as outras amostras foram consideradas positivas na reação frente ao antígeno EDIII da YFV. Sugere-se que devido às campanhas de vacinação contra YFV, os pacientes apresentam IgG anti-EDIII de YFV. A amostra 2009 - corrobora essa hipótese, pois o paciente não teve infecção por DENV ou ZIKV, mas reagiu com o antígeno de YFV. Apesar de a amostra 2005- não ser considerada positiva nesse ensaio, o valor de absorbância é considerável quando se compara às reações do controle C -, cujas amostras são soros humanos *naives* para qualquer tipo de infecção, indicando reatividade cruzada de anticorpos contra outro flavivírus, possivelmente o YFV.

Nota-se uma ausência de estudos realizados fora do Brasil que discutem sobre a imunidade contra YFV quando se deseja desenvolver novos diagnósticos sorológicos para DENV ou ZIKV, pois as campanhas de vacinação são limitadas a regiões endêmicas de alto risco como no Brasil. Como a vacina é produzida com o vírus atenuado, há uma produção de anticorpos de alta especificidade, mas também de baixa especificidade. Todavia, como sugerido por Rockstroh (2017), o estabelecimento de *cut-off* através de bons modelos matemáticos permite excluir resultados falso-positivos que refletem a reatividade cruzada com anticorpos provenientes da vacina. Além disso, os ensaios baseados na detecção ou captura de IgM não enfrentam esse obstáculo.

Nos ensaios para detecção de IgG anti-ZIKV, sete amostras ZIKV positivas coletadas de pacientes grávidas três meses após o aparecimento dos sintomas e confirmadas por PCR durante a fase aguda foram utilizadas. Todas as amostras foram positivas frente ao antígeno de multiepítipo do ZIKV. Além disso, todas as pacientes reagiram positivamente para o antígeno NS1-ZIKV. Como os valores frente ao NS1-ZIKV foram menores aos valores frente ao multi-ZIKV, indica-se além de especificidade, uma melhor sensibilidade do antígeno de multiepítipo. Sabe-se que a produção de anticorpos anti-NS1 é alta nas infecções por DENV e ZIKV (Balsameda *et al.*, 2017; Ngonu & Shresta, 2018), sendo que alguns testes comerciais (*Panbio Pan Early ELISA 2nd geração*, *SD Dengue virus NS1 Ag ELISA*, *Platelia NS1 antigen Assay*, *Dengu e NS1 Ag STRIP*, *Dengue Early Rapid*) utilizam ELISA “sanduiche” para diagnóstico precoce da Dengue ao capturar o antígeno NS1.

Além disso, duas amostras foram consideradas positivas frente ao antígeno EDIII-ZIKV. Este, como mencionado (Zhao *et al.*, 2016; Prekumar *et al.*, 2017), carrega sequências

imunodominantes que atuam na produção de anticorpos neutralizantes que são mais específicos. No entanto, como se trata da sequência completa do EDIII, é possível que regiões conservadas entre os flavivírus foram reconhecidas por anticorpos menos específicos das amostras. Três amostras, ainda, foram positivas para o antígeno YFV, sugerindo, novamente, reatividade cruzadas de IgG anti-YFV produzidas através das campanhas de vacinação.

Ambos os ensaios, IgG anti-DENV e IgG anti-ZIKV, foram considerados satisfatórios, pois os antígenos de multiepítomos DENV e ZIKV demonstraram especificidade e a não houve reatividade cruzada entre antígenos de ambos os vírus considerando o *cut-off* calculado. As amostras DENV positivas não reagiram com antígenos do ZIKV, e as amostras ZIKV positivas não reagiram com antígenos do DENV. Portanto, os antígenos produzidos são excelentes candidatos no desenvolvimento de kits de diagnósticos mais específicos para Dengue e Zika, diminuindo a importação de kits comerciais que já não são tão eficazes.

Os kits comerciais atuais para diagnose da Dengue, apesar de demonstrarem 100% de especificidade para o DENV conforme mencionado pelos fabricantes, não demonstram resultados satisfatórios quando utilizados com amostras coletadas no Brasil. Sugere-se que a entrada do ZIKV em meados de 2014/2015 no Brasil aumentou a quantidade de pacientes soropositivos para ZIKV, e como os testes foram validados antes da emergência do ZIKV, os testes comerciais não podem mais diferenciar as infecções com a mesma acurácia. No Rio de Janeiro e no Recife, por exemplo, 90% dos doadores de sangue são soropositivos para Dengue (Sabino *et al.*, 2016).

Felix *et al.* (2017) realizaram testes utilizando três kits comerciais disponíveis: *Dengue Virus IgG DxSelect™ and DengueVirus IgM Capture DxSelectT*, *Euroimmun Anti-Dengue Virus ELISA IgG and IgM* e *Panbio Dengue IgG and IgM capture ELISA*. 61 amostras de pacientes em fase aguda pelo ZIKV coletadas de uma região endêmica para o DENV no Brasil foram testadas, sendo que apenas 27% havia exposição prévia ao DENV. O estudo mostrou que todas das amostras (100%) foram positivas para IgG e 13,1% a 37,7% foram positivas na detecção de IgM.

Tsai *et al.*, (2017), utilizando um ensaio *in house* de captura de NS1 recombinante produzidas em células de *Drosophila*, demonstrou que não é possível diferenciar uma infecção aguda por ZIKV de uma infecção aguda por DENV quando o paciente já teve uma exposição anterior a um flavivírus. O autor utilizou amostras do Brasil e da Nicarágua, outro país endêmico para DENV. A amostras *naive* utilizadas como controle foram coletadas na Califórnia, EUA, e não demonstraram reatividade cruzada.



Portanto, para o desenvolvimento de novos testes sorológicos específicos para DENV e ZIKV, faz-se necessária a produção de antígenos específicos que possam ser utilizados na captura ou detecção de anticorpos que não provoquem reatividade cruzada, promovendo resultados falso-positivos. Assim, este trabalho sugere a expressão de antígenos recombinantes do tipo multiepítipo. Além disso, é importante considerar o tipo de anticorpo para captura ou detecção, uma vez que há diferença de especificidade entre IgG e IgM conforme a progressão da infecção. Para isso, então, as amostras devem ser coletas nos períodos corretas de infecção.

## 7. CONCLUSÃO

A emergência do ZIKV em meados de 2014 e 2015, especialmente no Brasil, dificultou o diagnóstico clínico e sorológico de doenças semelhantes como a Dengue. Devido à alta identidade das sequências de aminoácidos de suas proteínas, os testes sorológicos comerciais não podem diagnosticar a Dengue ou Zika com a mesma acurácia. Os anticorpos produzidos em uma infecção por DENV ou ZIKV reagem cruzadamente com antígenos conservados entre *Flavivirus*. Sendo assim, faz-se necessária a produção de novos antígenos para o desenvolvimento de kits de diagnósticos mais específicos. A produção de antígenos recombinantes do tipo multiepítopo é uma estratégia promissora.

Para essa produção, sistemas de expressão heteróloga baseados em planta são excelentes ferramentas, pois possuem maior biossegurança, capacidade de escalabilidade, processamento pós-traducional adequado, custo reduzido e maior rendimento proteico. O uso, ainda, de vírus vegetais como vetores de expressão, utilizados na forma de clones infecciosos, melhora a eficiência de expressão de antígenos recombinantes. Neste trabalho, o uso do clone PMMoV\_ΔCP para expressão dos antígenos de multiepítopo do DENV e ZIKV mostrou-se eficiente. No entanto, ainda é necessário a utilização de um supressor do silenciamento gênico para aumento da expressão, como o HC-Pro.

A expressão utilizando baculovírus recombinantes também demonstrou ser um excelente sistema de produção de antígenos. O sistema já padronizado permite um alto rendimento das proteínas em um curto período, sendo que as proteínas, quando expressas fusionadas à poliedrina, podem ser facilmente purificadas e não sofrem ação catalítica de proteases do meio.

Portanto, os antígenos de multiepítopos de DENV e ZIKV produzidos neste trabalho nos sistemas de planta e baculovírus são excelentes candidatos para o desenvolvimento de novos testes sorológicos para diagnose da Dengue e Zika. Os testes de ELISA pilotos realizados não demonstraram reatividade cruzada entre os multiepítopos na presença de soros positivos para o DENV e para o ZIKV. Além disso, o uso de outros antígenos, tais como o NS1-ZIKV, EDIII-ZIKV e EDIII-YFV foram importantes para análise da antigenicidade, sensibilidade e especificidade dos antígenos de multiepítopos.

## REFERÊNCIAS

- Anvisa. **Anvisa registra kits que ampliam acesso ao diagnóstico de zika, dengue e chikungunya.** 2016. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/noticias/saude/2016/02/anvisa-registra-kits-que-ampliam-acesso-ao-diagnostico-de-zika-dengue-e-chikungunya>. Acessado em: 22/01/2019.
- Aguiar M, et al. The impact of the newly licensed dengue vaccine in endemic countries. **Plos Neglected Tropical Diseases** DOI:10.1371/journal.pntd.0005179, 2016.
- Ahlgvist, P. *et al.* Multicomponent RNA plant virus infection derived from cloned viral cDNA. **Proc Natl Acad Sci USA** 81(22): 7066-7070, 1984.
- Alwis, R. *et al.* Identification of human neutralizing antibodies that bind to complex epitopes on dengue virions. **Proc Natl Acad Sci USA** 109(19): 7439-7444, 2012.
- Alwis, R. *et al.* In-depth analysis of the antibody response of individuals exposed to primary dengue virus infection. **Plos Negl Trop Dis** 5(6): doi: 10.1371/journal.pntd.0001188, 2011.
- Andrade G, et al. Arboviruses and the eye. **Int J Retin Vitr** 3:4: 1-7, 2017.
- Araújo, T. V. B. *et al.* Association between Zika virus infection and microcephaly in Brazil, January to May, 2016: preliminary report of a case-control study. **Lancet Infect Dis** 16: 1356-1363, 2016.
- Ardisson-Araújo, D. M. *et al.* A baculovirus-mediated strategy for full-length plant virus coat protein expression and purification. **Virology Journal** 10(262): 1-9, 2013.
- Balsameda A. et al. Comparison of four serological methods and two RT-PCR assays for diagnosis and surveillance of Zika. **J Clin Microbiol**, 2018.
- Barba-Spaeth, G. *et al.* Structural basis of potent Zika-dengue virus antibody cross-neutralization. **Nature** 536, 48–53 (2016)
- Barros, M. C. E.S. *et al.* Yellow fever virus envelope protein expressed in insect cells is capable of syncytium formation in lepidopteran cells and could be used for immunodetection of YFV in human sera. **Virology Journal** (8): 261, 2011.
- Bedoya, L. C.; Darós, J. A. Stability of Tobacco etch virus infectious clones in plasmid vectors. **Virus Res** 149(2): 234-240, 2010.
- Bijora, T. *et al.* Construction of an agroinfectious clone of bean rugose mosaic virus using Gibson Assembly. **Virus Gene** DOI 10.1007/s11262-017-1446-, 2017.
- Bodat, A. Houvenaghel, M. C.; Renata, S. G. Gibson assembly: an easy way to clone potyviral full-length infectious cDNA clones expressing an ectopic VPg. **Virol J** 12: 89, 2015.
- Boonnak, K.; *et al.* Human FcγRII cytoplasmic domains differentially influence antibody-mediated dengue virus infection. **J Immunol** 190(11): 5659-5665, 2013.

Braveny, I. Daschner, F. Waldmann, G. Different antibody tests (IgG, IgM) from children with chronic recurrent urinary tract infections. **Zentralbl Bakteriolog Orig** 234(1): 60-67, 1976.

Cafferata, M. L. *et al.* Dengue epidemiology and burden of disease in Latin America and the Caribbean: a systematic review of the literature and meta-analysis. **Value Health Reg Issues** 2:347-356, 2013.

Cañizares, M. C.; Nicholson, L.; Lomonosoff, G. P. Use of viral vectors for vaccine production in plants. **Immunol Cell Biol** 83(3): 263-270, 2005.

Cao-Lormeau V, et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika Virus infection in French Polynesia: a case-control study. **Lancet** 387: 1531-1539, 2016.

Carvalho, F. D.; Moreira, L. A. Why is *Aedes aegypti* Linnaeus so Successful as a Species? **Neotrop Entomol** 43(3): 243-255, 2017.

Casper, S. J.; Holt, C. A. Expression of the green fluorescent protein-encoding gene from a tobacco mosaic virus-based vector. **Gene** 173(1): 69-73, 1996.

Chen, D. J. *et al.* Delivery of foreign antigens by engineered outer membrane vesicle vaccines. **Proc Natl Acad Sci** 107(7): 3099-3104, 2010.

Chen, Q.; Lai, H. Plant-derived virus-like particles as vaccines. **Hum Vaccin Immunother** 9(1): 26-49, 2013.

Chen, Q. *et al.* Agroinfiltration as an Effective and Scalable Strategy of Gene Delivery for Production of Pharmaceutical Proteins. **Adv Tech Biol Med** 1(1): 103, 2013.

Chua, A. J. S. *et al.* A novel platform for virus-like particle-display of flaviviral envelope domain III: induction of Dengue and West Nile virus neutralizing antibodies. **Virology** 453: 129-137, 2013.

Dai, L. *et al.* Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. **Cell Host & Microbe** 19: 696-704, 2017.

Dalal, N. G. *et al.* Facile monitoring of baculovirus infection for foreign protein expression under very late polyhedrin promoter using green fluorescent protein reporter under early-to-late promoter. **Biochemical Engineering Journal** (24): 4. 2005

Dawson, W. O. *et al.* A tobacco mosaic virus-hybrid expresses and loses an added gene. **Virology** 172(1): 285-292, 1989.

Dejnirattisai, W. *et al.* Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with Zika virus. **Nat. Immunol.** 17, 1102–1108 (2016).

Donalisio, M. R. *et al.* Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Rev Saúde Pública** 51(30): 1-6, 2017.

Donson, J. *et al.* Systemic expression of a bacterial gene by a tobacco mosaic virus-based vector. **PNAS** 88(6): 7204-7208, 1991.

Felix, A. C. *et al.* Cross reactivity of commercial anti-dengue immunoassays in patients with acute Zika virus infection. **Journal of Medical Virology** 89(8): 1477-1479, 2017.

Focus Diagnostics. **Dengue Virus IgM Capture DxSelect™ EL1500M**. 2019. Disponível em: [https://www.focusdx.com/pdfs/pi/OUS/EL1500M\\_P.pdf](https://www.focusdx.com/pdfs/pi/OUS/EL1500M_P.pdf). Acessado em: 22/01/2019.

Gibsson, R. V.; e Vaughn, DW. Dengue: an escalating problem. **BMJ** 324: 1563-1566, 2012.

Gohlke, J.; Deeken, R. Plant responses to *Agrobacterium tumefaciens* and crown gall development. **Front Plant Sci** 5:155, 2014.

Gong, T. *et al.* Expression of mouse beta defensin 2 in Escherichia coli and its broad-spectrum antimicrobial activity. **Braz J. Microbiol** 42(3): 1180-1187, 2011.

Gottschamel, J. *et al.* Production of dengue virus envelope protein domain III-based antigens in tobacco chloroplasts using inducible and constitutive expression systems. **Plant Molecular Biology** (91): 497-512, 2016.

Gramkow, A. W. **Patologia dos baculovírus: efeito da ação de enzimas heterólogas e análise da resposta transcricional do hospedeiro durante a infecção viral**. 2010. 157 f. Tese (Doutorado em Patologia Molecular), Universidade de Brasília, 2010.

Guzman, M. G. *et al.* Domain III of the envelope protein as a dengue vaccine target. **Expert Review Of Vaccine** 9(9): 87-89, 2010.

Hagiwara, K. *et al.* A single amino acid substitution in 126-kDa protein of Pepper mild mottle virus associates with symptom attenuation in pepper; the complete nucleotide sequence of an attenuated strain, C-1421. **Arch Virol** 147(4): 833-840, 2002.

Hamada, H. *et al.* Amino Acid Changes in Pepper mild mottle virus Coat Protein That Affect L 3 Gene-mediated Resistance in Pepper. **Journal Of General Plant Pathology** 68(2): 155-165, 2002.

Hamer, D. H. *et al.* Epidemiology, prevention, and potential future treatments of sexually transmitted Zika virus infection. **Curr Infect Dis Rep** 19:16, 2017.

Hasan, S. S. *et al.* Structural biology of Zika virus and other flaviviruses. **Nat Struct e Mol Biol** 25: 13-20, 2018.

Huillier, A. G. *et al.* Evaluation of Euroimmun Anti-Zika Virus IgM and IgG Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Zika Virus Serologic Testing. **J Clin Microbiol** 55(8): 2462-2471, 2017.

Hunsperger EA. *et al.* Evaluation of commercially available diagnostic tests for the detection of dengue virus NS1 antigen and anti-dengue virus IgM antibody. **Plos Neglected Tropical Disease** 8(10): doi: 10.1371/journal.pntd.0003171 PMID:25330157, 2014.

Jehle, J. A. *et al.* On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision. **Arch Virol** 151: 1257-1266, 2006.

Johnson BW, et al. Differential Diagnosis of Japanese Encephalitis Virus Infection With the Inbios JE Detect and DEN detect MAC-ELISA Kits. **Am J Trop Med Hyg** 94(4): 820-828, 2016.

Junqueira, B. R. T. **Estabelecimento de um sistema de genética reversa para *Pepper mild mottle virus* e uso da capa proteica como apresentador de epítomos**. 2014. 90 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular), Universidade de Brasília, 2014.

Kalva, S. Boeke, J. Mita, P. Gibson Deletion: a novel application of isothermal in vitro recombination. **Bio Proced Online** 20:2, 2018.

Kaufmann, B. *et al.* West Nile virus in complex with the Fab fragment of a neutralizing monoclonal antibody. **Proc Natl Acad Sci** 103(33): 12400-12404, 2006.

King, J. G. *et al.* Variation in *Wolbachia* effects on *Aedes* mosquitoes as a determinant of invasiveness and vectorial capacity. **Nature Commun** 1483, 2018.

Kirita, M. *et al.* Nucleotide Sequence of the Japanese Isolate of Pepper Mild Mottle Tobamovirus (TMV-P) RNA. **Japanese Journal of Phytopathology** 63(5): 373-376, 1997.

Kost, T. A.; Condeary, J. P. Jarvis, D. L. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. **Nat Biotechnol** 23(5): 567-575, 2005.

Lee, Y. S. *et al.* The relationship of histologic activity to serum ALT, HCV genotype and HCV RNA titers in chronic hepatitis C. **J Korean Med Sci** 16(5): 585-591, 2001.

Lindgren, G. *et al.* Optimized diagnosis of acute dengue fever in Swedish travelers by a combination of reverse transcription-PCR and immunoglobulin M detection. **J Clin Microbiol** 43(6): 2850-5, 2005.

Lim, S.K.; Lim, J. K.; Yoon, I. K. An update on Zika virus in Asia. **Infect Chemother** 49:91–100, 2017.

Lima, M. R. Q. **Antígeno NS1 dos Vírus Dengue: desempenho de testes disponíveis comercialmente e aplicações alternativas para o diagnóstico precoce das infecções por dengue**. 218. 218 f. Tese (Doutorado em Virologia), Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2018.

Lin, A. V. Indirect ELISA. **Methods Mol Biol** 1318:51-59, 2015.

Lindbo, J. A. High-efficiency protein expression in plants from agroinfection-compatible Tobacco mosaic virus expression vectors. **BMC Biotechnol** 27: 07-52, 2007.

Liu, Y. *et al.* Evolutionary enhancement of Zika virus infectivity in *Aedes aegypti* mosquitoes. **Nature** 545(7655): 482-486, 2017.

Lok, S. M. *et al.* Binding of a neutralizing antibody to dengue virus alters the arrangement of surface glycoproteins. **Nat Struct Mol Biol** 15(3): 312-317, 2008.

Luckow, V. A. *et al.* Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. **J Virol** 67(8): 4566-4579, 1993.

Malabadi, R. B. *et al.* Plant Viral Expression Vectors and Agroinfiltration: A Literature Review Update. **RSIS** 3(4): 32-36, 2016.

Man, M; Epel, B. L. Characterization of regulatory elements within the coat protein (CP) coding region of Tobacco mosaic virus affecting subgenomic transcription and green fluorescent protein expression from the CP subgenomic RNA promoter. **Gen Virol** 85:1727-1738, 2004.

Martínez-Vega RA, et al. ADE and dengue vaccination. **Vaccine** <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.06.004>, 2017.

Metz, S. W.; Piljman, G. P. Production of Chikungunya Virus-Like Particles and Subunit Vaccines in Insect Cells. **Methods Mol Biol** 1426: 297-309, 2016.

Messina, J. P, *et al.* Global spread of dengue virus types: mapping the 70-year history. **Trends Microbiol** 22: 138-146, 2014.

Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico**. Brasil. 2018. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/02/2018-067.pdf>. Acessado em: 11/01/2019.

Mysorekar IU, Diamond MS. Modeling zika virus infection in pregnancy. **N Engl J Med** 375: 481-484, 2016.

Nagyová, A.; Subr, Z. Infectious full-length clones of plant viruses and their use for construction of viral vectors. **Acta Virologica** 51(4): 223-237, 2007.

Ngono, A. E.; Shrestha, S. Immune Response to Dengue and Zika. **Annual Review of Immunology** 36(1): 10-30, 2018.

Nunes AR, et al. Improved reverse transcription-polymerase chain reaction assay for the detection of flaviviruses with semi-nested primers for discrimination between dengue virus serotypes and Zika virus. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 113(5): 1-9, 2018.

Oliveira M. A. S.. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? **Ultrasound Obstet Gynecol** 47:6-7, 2017.

Paixão ES, et al. History, epidemiology, and clinical manifestations of Zika: A systematic review. **Am. J. Public Health** 106: 606-612, 2016.

Panbio. **Dengue IgG Indirect ELISA**. 2019. Disponível em: <https://www.alere.com/en/home/product-details/panbio-dengue-igg-indirect-elisa.html>. Acessado em: 22/01/2019.

Patterson J. Sammon M. Garg M. Dengue, Zika and Chikungunya: emerging arboviruses in the new world. **West J Emerg Med** 17(6): 671-679, 2016

Paz-Bailey G. et al. Persistence of Zika Virus in body fluids – preliminary reports. *The New England Journal of Medicine* doi: 10.1056/NEJMoa1613108, 2017.

Prekumar, L. *et al.* Development of envelope protein antigens to serologically differentiate Zika from dengue virus infection. *J Clin Microbiol* doi:10.1128/JCM.01504-17, 2017.

Premaratna R. et al. Should colloid boluses be prioritized over crystalloid boluses for the management of dengue shock syndrome in the presence of ascites and pleural effusions? *BMC Infectious Diseases* 11: 52, 2011.

Premkumar L. et al. Development of envelope protein antigens to serologically differentiate Zika from dengue virus infection. *Journal of Clinical Microbiology* 13(11), 2015.

Prouty, W. F.; Goldberg, A. L. Effects of Protease Inhibitors on Protein Breakdown in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* 247(10): 3341-3352, 1972.

Rabe IB. et al. Interim guidance for interpretation of Zika virus antibody tests results. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 65: 543-546, 2016.

Ramos-Castãnedo, J. *et al.* Dengue in Latin America: Systematic Review of Molecular Epidemiological Trends. *Plos Negl Trop Dis* 11(1): e0005224. doi:10.1371/journal.pntd.0005224, 2017.

Regadas, V. C. *et al.* Microcephaly caused by congenital Zika virus infection and viral detection in maternal urine during pregnancy. *Rev Assoc Med Bras* 64(1): 56-62, 2018.

Rockstroh, A. *et al.* Recombinant envelope-proteins with mutations in the conserved fusion loop allow specific serological diagnosis of dengue-infections. *PLoS Negl Trop Dis* 9: e0004218, 2015.

Rockstroh, A. *et al.* Specific detection of dengue and Zika virus antibodies using envelope proteins with mutations in the conserved fusion loop. *Emerging Microbes & Infectious* 6: e99; doi:10.1038/emi.2017.87, 2017.

Rosano, G. L.; Ceccarelli, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol* 5(172): 10.3389/fmicb.2014.00172, 2014.

Rybicki, E. P. Plant-made vaccines for humans and animals. *Plant Biotechnology Journal* 8(5): 620-637, 2010.

Sabino, E. C. *et al.* Transfusion-Transmitted Dengue and Associated Clinical Symptoms During the 2012 Epidemic in Brazil. *J Infect Dis* 213(5): 694-702, 2016.

Saejung, W. *et al.* Production of dengue 2 envelope domain III in plant using TMV-based vector system. *Vaccine* 25(36), 6646–6654, 2007.

Savidis G, et al. Identification of Zika virus and dengue virus dependency factors using functional genomics. *Cell Rep* 16: 232–246, 2016.

Schmidt CW. Zika in United States: How are we preparing? *Environ Health Perspect* 124 (9): 157-165, 2016.



Scholthof, K. B. G. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. **Mol Plat Pathol** doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00752.x, 2011.

Scotti, N.; Cardi, T. Plastid transformation as an expression tool for plant-derived biopharmaceuticals. **Methods Mol Biol** 847: 451-466, 2012.

Shah, K.; Maghsoudlou, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. **Br J Hosp Med** 77(7): 98-101, 2016.

Shrivastava S, et al. Co-circulation of all the four dengue virus serotypes and detection of a novel clade of DENV-4 (genotype I) virus in Pune, India during 2016 season. **Plos one** 13(2): doi: 10.1371/journal.pone.0192672, 2018.

Souza, S. *et al.* Evaluation of an in-house specific immunoglobulin G (IgG) avidity ELISA for distinguishing recent primary from long-term human cytomegalovirus (HCMV) infection. **Rev Inst Med Trop** 45(6), 2003.

Takamatsu, N. *et al.* Expression of bacterial chloramphenicol acetyltransferase gene in tobacco plants mediated by TMV-RNA. **EMBO J** 6(2): 307-311, 1987.

Tamas, L.; Shewry, P. R. Heterologous expression and protein engineering of wheat gluten proteins. **Journal Of Cereal Science** 43(3): 259-274, 2006.

Teixeira, M. G. *et al.* Epidemiological trends of dengue disease in Brazil (2000–2010): a systematic literature search and analysis. **PLoS Negl Trop Dis** 7: e2520. doi: 10.1371/journal.pntd.0002520 PMID: 24386496, 2013.

Tiwari, S. *et al.* Plants as bioreactors for the production of vaccine antigens. **Biotechnol Adv** 27(4): 449-467, 2009.

Tsai WY. *et al.* Distinguishing secondary dengue virus infection from Zika Virus infection with previous dengue by a combination of three simple serological tests. **Clin Infect Dis** 65(11): 1829-1836, 2017.

Twyman, R. M. *et al.* Molecular farming in plants: host systems and expression technology. **Trends Biotechnol** 21(12): 2003.

Ubol, S.; Halstead, S. B. How Innate Immune Mechanisms Contribute to Antibody-Enhanced Viral Infections. **Clin Vaccine Immunol** 17(12): 1829-1835, 2017.

Vasques, R. M. *et al.* Development of a new tobamovirus-based viral vector for protein expression in plants. **Mol Biol Rep** 10.1007/s11033-018-4449-4, 2018.

Walling AD, Dickson G. Guillain-Barré Syndrome. **American Family Physician** 87: 191-197, 2013.

Weaver, S. C; Reisen, W. K. Present and future arboviral threats. **Antiviral Res** 85(2):328-45. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.10.008>, 2010.

Weaver, SC. *et al.* Zika virus: history, emergence, biology and prospects for control. **Antiviral Research** 130: 69-80, 2016.

Weger-Lucarelli, J. *et al.* Development and Characterization of Recombinant Virus Generated from a New World Zika Virus Infectious Clone. **J Virol** 91(1): e01765-16, 2016.

Yamaji, H.; Konishi, E. Production of Japanese Encephalitis Virus-Like Particles Using Insect Cell Expression Systems. **Methods Mol Biol** 1404: 365-375, 2016.

Yoneyama, M. *et al.* The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. **Nature Immunology** 5: 730-737, 2004.

Zhang, B. *et al.* Diagnosis of Zika virus infection on a nanotechnology platform. **Nature Medicine** doi:10.1038/nm.4302, 2017.

Zhang, Y. *et al.* Structures of immature flavivirus particles. **EMBO J** 22: 2604-2613, 2003.

Zhang, W. *et al.* Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. **Nat Struct Biol** 10(11): 907-912, 2003.

Zhao, H. *et al.* Structure basis of zika virus-specific antibody protection. **Cell Press** 166: 1016-1027, 2016.

## ANEXOS

### ANEXO I - AMOSTRAS DE PACIENTES UTILIZADAS NA PESQUISA

Os pacientes negativos para ambas as infecções, dengue e zika, foram testados através de ELISA para IgG utilizando kit comercial disponível, assim como os pacientes positivos para DENV, tanto IgM quanto IgG. As amostras de pacientes grávidas (g) foram confirmadas por PCR *in house* com amostras coletadas na fase aguda pela infecção por ZIKV. No entanto, as amostras utilizadas nos ensaios foram coletadas entre 1 mês e 3 meses após o aparecimento dos sintomas. Já as oito amostras cedidas pelo LACEN-DF foram confirmadas utilizando ensaio *in house* para captura de IgM (MAC-ELISA).

AMOSTRAS	ORIGEM	CONDIÇÕES DA AMOSTRA
2005	CEPRACO	Negativo DENV e ZIKV
2009	CEPRACO	Negativo DENV e ZIKV
2012	CEPRACO	Negativo DENV e ZIKV
2022	CEPRACO	Negativo DENV e ZIKV
2025	CEPRACO	Negativo DENV e ZIKV
2015	CEPRACO	DENV IgM + / ZIKV -
4047	CEPRACO	DENV IgM + / ZIKV -
2021	CEPRACO	DENV IgG + / ZIKV -
2002	CEPRACO	DENV IgG + / ZIKV -
LCE	CEPRACO	DENV IgG + / ZIKV -
ACE	CEPRACO	DENV IgG + / ZIKV -
BCE	CEPRACO	DENV IgG + / ZIKV -
ICE	CEPRACO	DENV IgG + / ZIKV +
MIC <sub>g</sub>	CEPRACO	ZIKV IgG + / DENV -
ALIG	CEPRACO	ZIKV IgG + / DENV -
TAL <sub>g</sub>	CEPRACO	ZIKV IgG + / DENV -
ELAG	CEPRACO	ZIKV IgG + / DENV -
ELOG	CEPRACO	ZIKV IgG + / DENV -
PRIG	CEPRACO	ZIKV IgG + / DENV -
CARG	CEPRACO	ZIKV IgG + / DENV -
1LDF	LACEN-DF	DENV IgM + / ZIKV -

2LDF	LACEN-DF	DENV IgM + / ZIKV -
3LDF	LACEN-DF	DENV IgM + / ZIKV -
4LDF	LACEN-DF	DENV IgM + / ZIKV -
5LDF	LACEN-DF	DENV IgM + / ZIKV -
6LDF	LACEN-DF	DENV IgM + / ZIKV -
7LDF	LACEN-DF	DENV IgM + / ZIKV -
8LDF	LACEN-DF	DENV IgM + / ZIKV -

---