

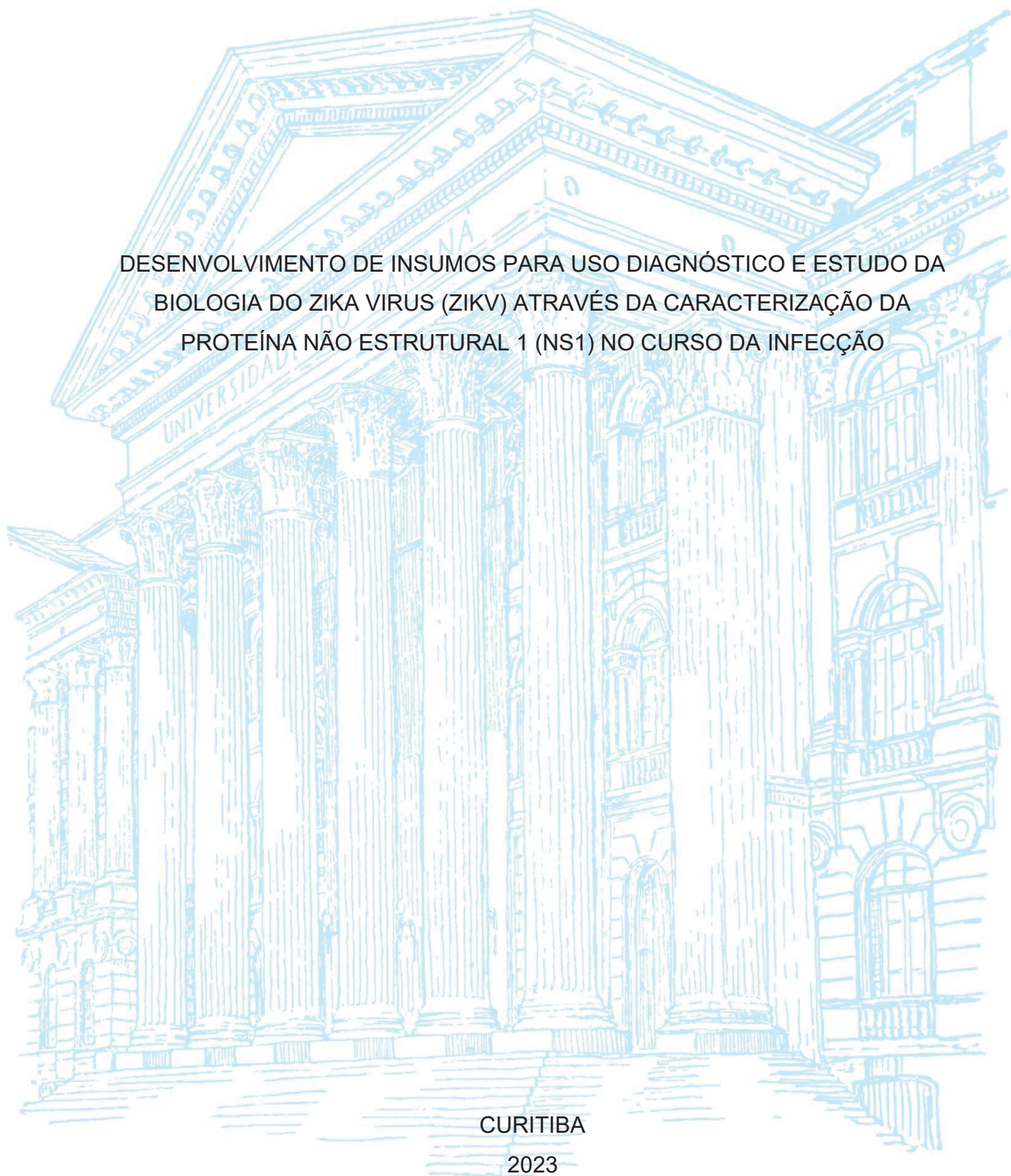
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

STEFANNY LUCÍA VILOCHE MORALES

DESENVOLVIMENTO DE INSUMOS PARA USO DIAGNÓSTICO E ESTUDO DA
BIOLOGIA DO ZIKA VIRUS (ZIKV) ATRAVÉS DA CARACTERIZAÇÃO DA
PROTEÍNA NÃO ESTRUTURAL 1 (NS1) NO CURSO DA INFECÇÃO

CURITIBA

2023



STEFANNY LUCÍA VILOCHE MORALES

DESENVOLVIMENTO DE INSUMOS PARA USO DIAGNÓSTICO E ESTUDO DA
BIOLOGIA DO ZIKA VIRUS (ZIKV) ATRAVÉS DA CATACTERIZAÇÃO DA
PROTEÍNA NÃO ESTRUTURAL 1 (NS1) NO CURSO DA INFECÇÃO

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como
requisito parcial à obtenção do título de Doutor em
Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Dra. Claudia Nunes Duarte dos
Santos

Coorientadora: Dra. Camila Zanluca

CURITIBA

2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Víloche Morales, Stefanny Lucía.

Desenvolvimento de insumos para uso diagnóstico e estudo da biologia do Zika vírus (ZIKV) através da caracterização da proteína não estrutural 1 (NSI) no curso da infecção. / Stefanny Lucía Víloche Morales. – Curitiba, 2023.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas.

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Dra. Claudia Nunes Duarte dos Santos.

Coorientadora: Dra. Camila Zanluca.

1. Infecção pelo Zika vírus. 2. Proteínas não Estruturais Virais. 3. Ensaio de Imunoabsorção Enzimática. 4. Diagnóstico virológico. I. Santos, Claudia Nunes Duarte dos. II. Zanluca, Camila. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. IV. Título.

Bibliotecária: Rosilei Vilas Boas CRB-9/939



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR - 40001016007P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **STEFANNY LUCÍA VILOCHE MORALES** intitulada: **Desenvolvimento de insumos para uso diagnóstico e estudo da biologia do Zika vírus (ZIKV) através da caracterização da proteína não estrutural 1 (NS1) no curso da infecção**, sob orientação da Profa. Dra. CLAUDIA NUNES DUARTE DOS SANTOS, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 30 de Outubro de 2023.

Assinatura Eletrônica

03/11/2023 10:05:45.0

CLAUDIA NUNES DUARTE DOS SANTOS

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

03/11/2023 09:32:30.0

SILVIA BOSCARDIN

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (USP))

Assinatura Eletrônica

06/12/2023 11:47:58.0

BEATRIZ GOMES GUIMARAES

Avaliador Externo (ICC-FIOCRUZ)

Assinatura Eletrônica

03/11/2023 15:54:43.0

DANIEL SANTOS MANSUR

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA)

Assinatura Eletrônica

05/12/2023 22:46:33.0

SILVIO MARQUES ZANATA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Rua Cel Francisco H. dos Santos, 100. - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-990 - Tel: (41) 3361-1676 - E-mail: pgbiocel@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 325642

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 325642

A todos que contribuíram direta e indiretamente para minha formação,
especialmente à minha família e amigos pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a minhas orientadoras Dra. Claudia Nunes Duarte dos Santos e Dra. Camila Zanluca por me aceitarem em seu laboratório e me proporcionaram a oportunidade de desenvolver este estudo. Agradeço o apoio e ensinamentos durante estes últimos seis anos.

Aos atuais e ex-integrantes do Laboratório de Virologia Molecular pelo convívio diário, suporte e colaborações. Agradeço em especial ao Dr. Juliano Bordignon pelo apoio constante e por disponibilizar seu *Flowjo* para que eu possa analisar meus resultados em horários “alternativos”. Um agradecimento especial a minhas grandes amigas Gabriela e Maria Luísa, que foram fonte inesgotável de risada e força nos momentos mais difíceis. Aos amigos Allan, Geison e Larissa, pelo suporte nos experimentos. Agradeço também a Dra. Beatriz Guimarães pela ajuda na otimização de protocolos e purificação por FPLC. Estendo meu agradecimento aos funcionários do Instituto Carlos Chagas pelo suporte, em particular ao Rodrigo que auxiliou na aquisição de amostras na plataforma de citometria.

Ao Charlie M. Rice e Peggy R. MacDonald por me receberem de braços abertos e pela orientação próxima mesmo sendo tão ocupados. Sou muito grata pelos ensinamentos e confiança depositada em mim. Aos integrantes do *Laboratory of Virology and Infectious Disease*, que sempre se mostraram abertos a colaboração e uma ida ao *Faculty club*. Um agradecimento especial à Mariana, Lauren, Hong, Elaine, Andrew e Inwha que tornaram a minha estada em NYC infinitamente especial.

Aos meus grandes amigos Thais e Giancarlo por sempre se fazerem presentes na minha vida, mesmo a distância.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Silvia B. Boscardin, Dr. Daniel S. Mansur, Dr. Silvio M. Zanata, Dra. Beatriz G. Guimarães, Dra. Daisy M. Strottmann e Dr. Allan H. D. Cataneo pela disponibilidade e sugestões para melhoria deste trabalho.

Ao BNDES, CNPq e CAPES pelo financiamento deste estudo.

Finalmente, agradeço à minha família pelo amor incondicional e por sempre terem me incentivado a trilhar este caminho. Muito obrigada!

“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood.”

Marie Curie

RESUMO

Os arbovírus (do inglês *arthropod-borne virus*), representam uma das principais causas de doenças infecciosas em animais e humanos e, por este motivo, causam grande impacto socioeconômico global. Sua distribuição está intimamente ligada à presença de vetores competentes, apresentando grande prevalência nas regiões tropicais e subtropicais, como é o caso do Brasil. A emergência do Zika vírus (ZIKV) na Polinésia e Américas entre os anos 2013 e 2016 colocou em alerta autoridades sanitárias no mundo, devido ao seu alto potencial de dispersão geográfica e, principalmente, pelo surgimento de novas manifestações clínicas. Diferentemente de surtos anteriores, além do aumento na gravidade da doença, a infecção por ZIKV foi associada pela primeira vez com complicações neurológicas em fetos e adultos. O diagnóstico é dificultado pela baixa viremia de curta duração, assim como pela reatividade cruzada em ensaios sorológicos devido à cocirculação de orthoflavivirus filogeneticamente relacionados, como o vírus da dengue (DENV) e febre amarela (YFV). Embora a proteína não estrutural 1 (NS1) tenha sido usada como marcador de infecção aguda por DENV e para o vírus do Oeste do Nilo (WNV), pouco se sabe sobre a expressão deste antígeno durante a infecção por ZIKV. Sendo assim, neste trabalho, um ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) baseado na captura de NS1 foi desenvolvido para estudar o padrão de produção e secreção deste antígeno *in vitro* e explorar a aplicação desta proteína como um possível marcador diagnóstico. Para isto, anticorpos monoclonais anti-NS1 foram produzidos e triados quanto a sua reatividade cruzada com outros orthoflavivirus. Os anticorpos selecionados foram produzidos em larga escala e modificados pela adição da enzima HRP. Proteínas NS1 recombinantes de ZIKV, DENV e YFV foram expressas em células S2 de *Drosophila melanogaster* e purificadas por cromatografia líquida de afinidade. A obtenção destes insumos possibilitou a padronização de um ELISA de captura quantitativo com limite de detecção de 19,5 ng/mL, sem reação cruzada contra os vírus YFV e DENV. Este teste foi aplicado para o estudo da dinâmica de expressão e secreção de NS1 em células C6/36, A549 e JEG-3 infectadas. Ainda que este antígeno possa ser detectado no sobrenadante de infecção, a quantificação por ELISA revelou uma maior concentração de proteína associada a células. Surpreendentemente, foi observado que nas linhagens de origem humana, a frequência de células NS1 positivas se mantém alta mesmo com uma queda significativa na infecção ao longo do tempo. Experimentos adicionais são necessários para determinar se este fenótipo é exclusivo de ZIKV ou também pode ser observado para outros orthoflavivirus. Embora mais testes com amostras humanas devam ser conduzidos para validar a aplicabilidade da detecção de NS1 para diagnóstico, os insumos produzidos neste estudo são promissores para a detecção específica de ZIKV, podendo eventualmente ser utilizados em outros ensaios diagnósticos, como imunofluorescência, imunohistoquímica e teste imunocromatográfico para aplicação *point of care*.

Palavras-chave: vírus Zika; proteína NS1; ELISA; diagnóstico.

ABSTRACT

Arthropod-borne viruses (arboviruses) represent one of the leading causes of human and animal infectious disease, resulting in considerable social and economic impact globally. Their distribution is intrinsically connected to the presence of competent vectors, presenting high prevalence in tropical and subtropical regions, which is the case for Brazil. Zika virus (ZIKV) emergence in Polynesia and the Americas from 2013 to 2016 raised concerns mainly due to reports of new clinical manifestations as well as its high potential for geographic spread. In addition to heightened disease severity, ZIKV infection was associated with neurological complications in fetuses and adults for the first time. Diagnostic accuracy is undermined by the short-term low viremia as well as cross-reactivity in serological assays due to the cocirculation of closely related orthoflaviviruses, such as dengue virus (DENV) and yellow fever virus (YFV). While the non-structural protein 1 (NS1) has been used as an early marker of DENV and West Nile virus (WNV) infection, little is known about ZIKV NS1 expression. In the present work, a NS1 capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed to study *in vitro* synthesis and secretion patterns of this antigen and assess the application of this protein as a potential diagnostic marker. Monoclonal antibodies raised against NS1 were screened for their cross-reactivity to other orthoflaviviruses. Selected antibodies were produced on large scale and modified by the addition of the HRP enzyme. Recombinant NS1 proteins of ZIKV, DENV, and YFV were expressed in S2 *Drosophila melanogaster* cells and purified by affinity liquid chromatography. These reagents were used to develop a quantitative antigen capture ELISA with a limit of detection of 19.5 ng/mL and no cross-reactivity to YFV, and DENV. NS1 expression and secretion dynamics in infected C6/36, A549, and JEG-3 cells were assessed with this assay. While detectable in culture supernatants, higher concentrations of this protein were predominantly cell-associated. Surprisingly, it was observed that in human cell lines, the frequency of NS1-positive cells remained high despite a significant reduction in infection over time. Additional experiments are necessary to determine if this phenotype is exclusive to ZIKV or can also be observed for other orthoflaviviruses. Although further testing with human samples is needed to validate the applicability of NS1 detection for diagnosis, the tools developed in this work are promising for specific detection of ZIKV and could be used for other diagnostic assays, such as immunofluorescence, immunohistochemistry, and an immunochromatographic test for point of care application.

Keywords: Zika virus; NS1 protein; ELISA; diagnostic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição geográfica de infecções causadas por ZIKV.	22
Figura 2 – Topologia da poliproteína viral de orthoflavivirus.	25
Figura 3 – Estrutura da partícula viral.	26
Figura 4 – Rearranjos conformacionais durante a fusão da membrana.	27
Figura 5 – Ciclo replicativo de orthoflavivirus.	29
Figura 6 – Diagramas esquemáticos e estrutura da NS1 de orthoflavivirus.	31
Figura 7 – Esquema representativo da produção e secreção de NS1.	32
Figura 8 – Ciclo de transmissão do ZIKV.	34
Figura 9 – Curso da infecção em humanos.	37
Figura 10 – Cinética expressão de rNS1.	63
Figura 11 – Expressão de rNS1 com concentrações variáveis de CuSO ₄	64
Figura 12 – Teste de expressão em meio SF900II.	66
Figura 13 – Piloto de expressão de rNS1 para comparação do rendimento em meio Schneider e SF900II.	67
Figura 14 – Purificação de rNS1 de ZIKV.	69
Figura 15 – Purificação de rNS1 de ZIKV precipitada com concentrações variáveis de sulfato de amônio.	69
Figura 16 – Purificação controle (Mock).	71
Figura 17 – Purificação de rNS1 de ZIKV.	72
Figura 18 – Otimização das condições de expressão de rNS1 de DENV.	73
Figura 19 – Purificação de rNS1 de DENV.	74
Figura 20 – Otimização das condições de expressão de rNS1 de YFV.	75
Figura 21 – Purificação de rNS1 de YFV.	76
Figura 22 – Reatividade cruzada dos mAbs anti-NS1.	77
Figura 23 – Validação dos mAbs anti-NS1 de ZIKV.	78
Figura 24 – Purificação e conjugação do mAb 12B8/2E3.	79
Figura 25 – ELISA indireto e direto para validação dos mAbs e rNS1.	81
Figura 26 – Purificação dos mAbs 2E6/2E6 e 1F12/2E11 e ELISA de captura para NS1 de ZIKV.	82
Figura 27 – Detecção de NS1 nativa.	83
Figura 28 – Teste de bloqueios para ELISA de captura.	85

Figura 29 – Padronização da concentração do mAb 12B8/2E3 para ELISA de captura.	86
Figura 30 – Padronização da concentração dos mAbs 12B8/2E3 e 12B8/2E3-HRP usados no ELISA de captura para NS1 de ZIKV.....	87
Figura 31 – Especificidade do clone 12B8/2E3 em ELISA de captura.	88
Figura 32 – ELISA de captura para NS1 em amostras de soro de pacientes RT-PCR positivas para ZIKV.	90
Figura 33 – Interferência de componentes do soro humano na reação do ELISA de captura para NS1.	91
Figura 34 – Teste de inativação de soro humano.	92
Figura 35 – Teste de inativação de soro humano contendo rNS1.....	93
Figura 36 – Teste de inativação do soro humano associado ao uso de diferentes mAbs.	94
Figura 37 – Cinética de inativação de soro humano.	94
Figura 38 – Efeito do tratamento com sulfato de amônio saturado e EDTA na detecção de rNS1 por ELISA de captura.	96
Figura 39 – Detecção de rNS1 em plasma humano.....	96
Figura 40 – Teste de combinações dos mAbs 12B8/2E3, 2E6/2E6 e 1F12/2E11.	97
Figura 41 – Purificação por troca iônica de mAb anti-CHIKV.....	99
Figura 42 – Purificação por troca iônica da enzima HRP.	100
Figura 43 – Purificação por troca iônica do mAb anti-CHIKV-HRP.	101
Figura 44 – Purificação por troca iônica de mAb 12B8/2E3-HRP.	102
Figura 45 – Eficiência de conjugação do mAb 12B8/2E3-HRP.....	103
Figura 46 – Comparação da eficiência de três mAbs conjugados no reconhecimento de rNS1 de ZIKV.	104
Figura 47 – ELISA de captura de NS1-ZIKV.	105
Figura 48 – Cinética de crescimento de ZIKV ZV BR 2015/15261, ZV BR 2016/16288 e MR766 em A549 e Huh7.5.....	107
Figura 49 – Cinética de crescimento de ZIKV ZV BR 2015/15261, ZV BR 2016/16288 e MR766 em BeWo e JEG-3.....	108
Figura 50 – Cinética de crescimento de ZIKV ZV BR 2015/15261, ZV BR 2016/16288 e MR766 em C6/36.	109
Figura 51 – Teste das condições para dosagem de NS1 nativa por ELISA de captura.	110

Figura 52 – Produção de NS1 durante a infecção por ZIKV em Huh7.5.	111
Figura 53 – Dinâmica de expressão de NS1 durante a infecção por ZIKV MR766.	114
Figura 54 – Dinâmica de expressão de NS1 durante a infecção por ZIKV ZV BR 2015/15261.	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição dos tampões usados para purificação de mAbs por afinidade.	44
Tabela 2 – Composição dos tampões usados para purificação de mAb-HRP por troca iônica.	46
Tabela 3 – Método 1 de purificação por troca iônica com coluna HiTrap Q HP 1mL.	46
Tabela 4 – Método 2 de purificação por troca iônica com coluna HiTrap Q HP 1mL.	46
Tabela 5 – Composição do tampão de lise celular.	51
Tabela 6 – Composição dos tampões usados para purificação por afinidade de rNS1 a partir da fração solúvel.	52
Tabela 7 – Composição dos tampões usados para purificação por afinidade de rNS1 a partir da fração insolúvel.	53
Tabela 8 – Caracterização dos mAbs anti-NS1 de ZIKV.	78
Tabela 9 – Condições selecionadas para infecção em diferentes linhagens celulares.	109

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC – do inglês *American Type Culture Collection*

BCIP – 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate

BSA – soro albumina bovina

C – proteína de capsídeo

CHIKV – vírus chikungunya (do inglês Chikungunya virus)

CPE – efeito citopático (do inglês *cytopathic effect*)

CZS – síndrome congênita causada por ZIKV (do inglês *congenital Zika syndrome*)

DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole

DENV – vírus da dengue (do inglês Dengue virus)

DMEM F-12 – meio Dulbecco modificado por Eagle/ Nutriente HAM F-12

E – proteína de envelope

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*)

g – força centrífuga

HAT – hipoxantina, aminopterina, timidina

HRP – *horseradish peroxidase*

HT – hipoxantina, timidina

IFI – imunofluorescência indireta

JEV – vírus da encefalite japonesa (do inglês Japanese encephalitis virus)

Kb – kilo bases

kDa – kilo daltons

m - massa

M – proteína de membrana

mAb – anticorpo monoclonal (do inglês *monoclonal antibody*)

MAC-ELISA – ELISA de captura de IgM

Mock – controle negativo

MOI – multiplicidade de infecção (do inglês *multiplicity of infection*)

NB3 – nível de biossegurança 3

NBT – nitroblue tetrazolium

NS1 – proteína não estrutural 1

ORF – fase aberta de leitura (do inglês *open reading frame*)

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – solução salina tamponada (do inglês *phosphate buffered saline*)

PBS-T – PBS contendo 0,05% de Tween 20

PEG – polietilenoglicol

prM – proteína pré membrana

RE – retículo endoplasmático

RNA – ácido ribonucleico

RPMI – meio *Roswell Park Memorial Institute*

RT-PCR – reação em cadeia de polimerase associada à transcrição reversa

SBF – soro bovino fetal

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil-sulfato de sódio (do inglês *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

SLEV – vírus da encefalite de Saint Louis (do inglês Saint Louis encephalitis virus)

TBS – tampão tris

TMB – 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

UTR – regiões não codificantes, do inglês *untranslated region*

v – volume

WNV – vírus do oeste do Nilo (do inglês West Nile virus)

YFV – vírus da febre amarela (do inglês Yellow fever virus)

ZIKV – vírus Zika (do inglês *Zika virus*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 JUSTIFICATIVA	18
1.2 OBJETIVOS	19
1.2.1 Objetivos específicos.....	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 ISOLAMENTO E EMERGÊNCIA DO VÍRUS ZIKA	21
2.1.1 Filogenia.....	23
2.2 ESTRUTURA E REPLICAÇÃO VIRAL.....	24
2.2.1 Classificação	24
2.2.2 Organização do genoma e estrutura da partícula viral	25
2.2.3 Ciclo replicativo	27
2.3 PROTEÍNA NÃO ESTRUTURAL 1 (NS1)	29
2.4 CICLO DE TRANSMISSÃO	34
2.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E PATOLOGIA	35
2.6 DIAGNÓSTICO	36
3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 LINHAGENS CELULARES	39
3.1.1 Células de mamíferos.....	39
3.1.2 Células de inseto.....	39
3.2 VÍRUS	40
3.3 PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CONJUGAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-NS1 DE ZIKV.....	41
3.3.1 Comitê de ética	41
3.3.2 Imunização de camundongos com ZIKV	41
3.3.3 Fusão de esplenócitos e células de mieloma	41
3.3.4 Triagem de hibridomas e obtenção de anticorpos monoclonais por diluição limitante	42
3.3.5 Caracterização de hibridomas.....	43
3.3.6 Produção e purificação de mAbs por afinidade	43
3.3.7 Conjugação com <i>horseradish peroxidase</i> (HRP)	44
3.3.8 Otimização da eficiência de conjugação de mAb-HRP	45
3.3.8.1 Adequações na reação de conjugação.....	45

3.3.8.2 Purificação de mAbs-HRP por troca iônica.....	45
3.4 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES RNS1 DE ZIKV, DENV E YFV EM CÉLULAS S2	47
3.4.1 Estratégia de clonagem.....	47
3.4.2 Obtenção de linhagens estáveis expressando rNS1	47
3.4.3 Cultivo dos clones recombinantes.....	49
3.4.3.1 Adaptação em meio SF900II	49
3.4.4 Otimização das condições de expressão de rNS1 em células S2.....	49
3.4.4.1 Cinética de expressão	49
3.4.4.2 Concentração de CuSO ₄	50
3.4.4.3 Concentração de células	50
3.4.5 Coleta das frações secretada e retida	50
3.4.5.1 Precipitação da fração secretada com sulfato de amônio	51
3.4.6 Purificação de rNS1 por afinidade.....	51
3.4.6.1 Purificação a partir da fração secretada	51
3.4.6.2 Purificação a partir da fração retida.....	52
3.4.7 SDS-PAGE e <i>Western Blot</i>	53
3.5 VALIDAÇÃO DOS INSUMOS PRODUZIDOS.....	54
3.5.1 Controle de qualidade dos mAbs anti-ZIKV.....	54
3.5.2 ELISA indireto	55
3.5.3 ELISA direto	55
3.6 PADRONIZAÇÃO DO ELISA DE CAPTURA PARA NS1 DE ZIKV.....	56
3.6.1 Otimização das condições da reação.....	56
3.6.2 Validação com NS1 nativa	56
3.6.3 ELISA de captura para NS1 de ZIKV	56
3.6.3.1 Comitê de ética.....	56
3.6.3.2 Procedimento	57
3.6.3.3 Tratamento de soro humano com sulfato de amônio saturado (SAS) ou EDTA	57
3.7 CINÉTICA DE EXPRESSÃO DE NS1 DE ZIKV EM CÉLULAS DE LINHAGEM DE ORIGEM HUMANA E DE MOSQUITO.....	58
3.7.1 Triagem das condições para infecção.....	58
3.7.1.1 Aquisição em imagens em Operetta <i>CLS High Content Analysis System</i>	59
3.7.2 Preparação das amostras para análise por citometria de fluxo (FACS).....	59

3.7.2.1	Análise da viabilidade celular com iodeto de Propídeo (PI)	59
3.7.2.2	Análise da taxa de infecção viral e expressão de NS1 associada à célula	60
3.7.3	Dosagem de NS1 livre e associada à célula por ELISA de captura	60
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	61
4	RESULTADOS	62
4.1	PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE RNS1 DE ZIKV	62
4.1.1	Otimização das condições de expressão de rNS1 de ZIKV	62
4.1.1.1	Cinética de expressão	62
4.1.1.2	Concentração do indutor	64
4.1.1.3	Meio de cultivo	65
4.1.1.4	Densidade celular	66
4.1.2	Concentração do sobrenadante por precipitação com sulfato de amônio	68
4.1.3	Controle negativo	70
4.1.4	Produção de lote de rNS1 de ZIKV	72
4.2	PRODUÇÃO DE LOTES DE PROTEÍNA RECOMBINANTE NS1 DE DENV E YFV	72
4.2.1	Otimização e produção de rNS1 de DENV	73
4.2.2	Otimização e produção de rNS1 de YFV	74
4.3	PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E MODIFICAÇÃO DE MABS ANTI-NS1	76
4.3.1	Obtenção e modificação de mAbs anti-NS1 de ZIKV	76
4.4	PADRONIZAÇÃO DO ELISA DE CAPTURA	84
4.4.1	Solução de bloqueio	84
4.4.2	Concentração do anticorpo de captura	85
4.4.3	Concentração de anticorpo de detecção	86
4.4.4	Teste de especificidade do ELISA de captura	87
4.5	TESTES PRELIMINARES COM AMOSTRAS HUMANAS	88
4.6	OTIMIZAÇÃO DO ELISA DE CAPTURA	92
4.6.1	Inativação do soro humano	92
4.6.2	Tratamento do soro humano	95
4.6.3	Uso de <i>pool</i> de mAbs para captura de NS1	97
4.6.4	Eficiência de conjugação de mAbs-HRP	97
4.6.4.1	Purificação por troca iônica	98
4.6.5	Comparação da eficiência dos mAbs anti-NS1-HRP	103
4.7	ELISA DE CAPTURA DE NS1-ZIKV	104

4.8 ESTUDO DA CINÉTICA DE EXPRESSÃO DE NS1 DURANTE A INFECÇÃO DE DIFERENTES LINHAGENS CELULARES	105
4.8.1 Triagem das condições para o estudo.....	105
4.8.2 Teste das condições para dosagem de NS1	109
4.8.3 Avaliação da expressão e secreção de NS1 durante a infecção por ZIKV	112
5 DISCUSSÃO	116
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	124
6.1 PERSPECTIVAS	124
REFERÊNCIAS.....	125
ANEXO I – ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO (<i>SCIENTIFIC REPORTS</i>)....	140
ANEXO 2 – CERTIFICADO DE COMITÊ DE ÉTICA (CEUA)	158
ANEXO 3 – CERTIFICADO DE COMITÊ DE ÉTICA.....	159

1 INTRODUÇÃO

Os arbovírus, do inglês *arthropod-borne virus*, são caracterizados por sua transmissão através da picada de vetores artrópodes hematófagos, principalmente por mosquitos da ordem Diptera, nos quais ocorre parte do seu ciclo replicativo. De forma geral, a manutenção destes vírus na natureza ocorre com o ciclo de transmissão entre vetores artrópodes e reservatórios vertebrados não humanos, que atuam como hospedeiros amplificadores (CLETON; KOOPMANS; REIMERINK; GODEKE *et al.*, 2012; GUBLER, 2001). A ocorrência de infecção em humanos é majoritariamente acidental e produz uma viremia baixa, não sendo suficiente para ocasionar a infecção de um novo vetor durante o repasto sanguíneo. Porém, embora a infecção em humanos usualmente leve à quebra do ciclo de transmissão, algumas espécies de arbovírus, como os vírus da febre amarela (YFV), Dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV) e Zika (ZIKV), se adaptaram a outros hospedeiros como os humanos, que podem atuar como amplificadores (CLETON; KOOPMANS; REIMERINK; GODEKE *et al.*, 2012; GUBLER, 2001; YOUNG, 2018).

Embora mais de 500 espécies de arbovírus sejam atualmente conhecidas, estima-se que este número represente menos de 1% da diversidade total (YOUNG, 2018), sendo esperado um crescimento exponencial na descrição de novas espécies, em parte devido ao advento do *deep-sequencing* (SHI; LIN; VASILAKIS; TIAN *et al.*, 2016). No entanto, é importante ressaltar que a grande maioria dos arbovírus é zoonótica e apenas um terço são considerados vírus de importância para saúde humana (YOUNG, 2018), estando agrupados principalmente nos táxons de vírus com genoma de RNA Bunyavirales, Reovirales, Orthomyxoviridae, Rhabdoviridae, Togaviridae e Flaviviridae (CLETON; KOOPMANS; REIMERINK; GODEKE *et al.*, 2012; GUBLER, 2001; RUST, 2012; WALKER; SIDDELL; LEFKOWITZ; MUSHEGIAN *et al.*, 2022; WEAVER; REISEN, 2010; YOUNG, 2018). Este grupo de vírus de RNA apresenta uma notável habilidade de adaptação a seus hospedeiros e ambiente, principalmente devido à elevada plasticidade genética e alta frequência de mutações e recombinação/ rearranjo, facilitando sua dispersão (COFFEY; FORRESTER; TSETSARKIN; VASILAKIS *et al.*, 2013).

Nos hospedeiros vertebrados, a infecção por arbovírus pode se manifestar em um quadro sintomático com doença febril indiferenciada podendo evoluir para síndromes febris hemorrágicas, neurológicas e artralgias. Esta variação de morbidade

se deve à diversidade de patógenos infectantes, assim como das condições imunológicas do paciente, sendo que nos casos mais graves podem ocorrer sequelas neurológicas irreversíveis ou ainda óbito (CLETON; KOOPMANS; REIMERINK; GODEKE *et al.*, 2012; DONALISIO; FREITAS; ZUBEN, 2017; GUBLER, 2001; YOUNG, 2018). Atualmente, a abordagem clínica preconizada se baseia apenas na administração de fármacos e manejo do paciente de forma a trazer alívio para os sintomas secundários da infecção, como o uso de analgésicos e antitérmicos.

Tendo em vista a ampla distribuição e diversidade de vetores, o controle profilático é dificultado. Embora estejam sendo testadas novas tecnologias para o controle de mosquitos em regiões endêmicas (LAMBRECHTS; FERGUSON; HARRIS; HOLMES *et al.*, 2015), atualmente a forma de controle de arboviroses ainda consiste no combate aos focos de proliferação do vetor, uso de repelentes e pulverização de inseticidas em áreas urbanas (LIMA-CAMARA, 2016). Diversos estudos vêm sendo realizados com o objetivo de desenvolver vacinas para estas enfermidades. Embora a Anvisa tenha aprovado o uso das vacinas para dengue Dengvaxia® (Sanofi) e QDenga® (Takeda), até o momento apenas a QDenga® juntamente com a vacina para febre amarela são fornecidas gratuitamente através do Sistema Único de Saúde (SUS). Apesar da atividade protetora da Dengvaxia®, foram relatadas diferenças em sua eficácia em indivíduos soropositivos versus soronegativos, restringindo assim a sua indicação em áreas não endêmicas (HADINEGORO; ARREDONDO-GARCÍA; CAPEDING; DESEDA *et al.*, 2015; SRIDHAR; LUEDTKE; LANGEVIN; ZHU *et al.*, 2018).

A distribuição geográfica dos arbovírus está intensamente relacionada a parâmetros ecológicos que afetam a presença de seus vetores e reservatórios como temperatura, precipitação e vegetação (GUBLER, 2001). Por este motivo, arbovírus apresentam alta prevalência em países com clima tropical e subtropical, como é o caso do Brasil, onde são considerados problemas de saúde pública (DONALISIO; FREITAS; ZUBEN, 2017). Atualmente, os orthoflavivirus (família Flaviviridae) são o grupo de maior importância médica (POSTLER; BEER; BLITVICH; BUKH *et al.*, 2023; YOUNG, 2018), dos quais fazem parte os vírus de distribuição global, DENV, YFV, ZIKV e o vírus do Oeste do Nilo (WNV). Além destes, o vírus da encefalite japonesa (JEV), o vírus da encefalite transmitida por carrapatos (TBEV) e o vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV) também causam agravos em humanos, embora no momento ainda estejam restritos a regiões específicas (YOUNG, 2018).

Nas últimas décadas, têm se observado crescentes eventos de emergência e reemergência de arboviroses (GIRARD; NELSON; PICOT; GUBLER, 2020; GUBLER, 2010), com destaque para membros da família Flaviviridae e Togaviridae. Dentre estes, é possível citar as epidemias de febre amarela na Angola e Brasil com importação de casos para China (WILDER-SMITH; LEONG, 2017), a expansão do vírus do Oeste no Nilo (WNV) nas Américas (GUBLER, 2007), assim como a constante expansão de DENV e CHIKV em regiões tropicais e subtropicais (BHATT; GETTING; BRADY; MESSINA *et al.*, 2013; MAYER; TESH; VASILAKIS, 2017).

Neste contexto, embora o Zika virus tenha circulado silenciosamente durante décadas na África subsaariana e no Sudeste Asiático, a sua emergência na Polinésia e nas Américas entre 2013 e 2016 (IOOS; MALLET; LEPARC GOFFART; GAUTHIER *et al.*, 2014; METSKY; MATRANGA; WOHL; SCHAFFNER *et al.*, 2017; ZANLUCA; MELO; MOSIMANN; SANTOS *et al.*, 2015) colocou em alerta as autoridades sanitárias no mundo devido à descrição de novas manifestações clínicas e à ocorrência de transmissão independente de vetores. Complicações neurológicas em fetos e adultos foram causalmente ligadas à infecção e o aumento na gravidade da enfermidade também foi relatado (ZANLUCA; DOS SANTOS, 2016). Apesar da morbidade associada à doença, no momento não existem vacinas, nem medicamentos específicos para terapia contra o ZIKV.

1.1 JUSTIFICATIVA

O aumento da frequência de epidemias associado à expansão global de arboviroses reforça a necessidade de abordagens efetivas para o controle e prevenção destes agravos. Embora as estratégias preconizadas estejam majoritariamente ligadas ao controle vetorial, sabe-se que outras formas de intervenção ajudam a reduzir o impacto destas doenças. Dentre elas, a vigilância epidemiológica, assim como o acesso a atendimento clínico e ao diagnóstico são essenciais para manejo clínico eficaz de pacientes (GIRARD; NELSON; PICOT; GUBLER, 2020).

Embora a infecção por ZIKV seja assintomática e autolimitada em grande parte dos casos, as graves consequências no desenvolvimento do feto devido à transmissão congênita (DE ARAÚJO; RODRIGUES; DE ALENCAR XIMENES; DE BARROS MIRANDA-FILHO *et al.*, 2016) reforçam a necessidade da detecção

inequívoca e precoce da infecção, sendo fundamental para o manejo clínico das gestantes. Desta forma, o desenvolvimento de testes diagnósticos que proporcionem não somente a detecção da doença, como também o diagnóstico diferencial em amostras de pacientes com suspeita de ZIKV deve ser considerado uma prioridade.

Neste contexto, a proteína não estrutural 1 (NS1) produzida na fase aguda da infecção tem sido sugerida como um potencial alvo para diagnóstico vírus-específico. Embora este antígeno tenha sido usado como marcador de infecção para DENV e WNV (ALCON; TALARMIN; DEBRUYNE; FALCONAR *et al.*, 2002; MACDONALD; TONRY; HALL; WILLIAMS *et al.*, 2005; YOUNG; HILDITCH; BLETCHLY; HALLORAN, 2000), pouco se sabe sobre a expressão e secreção desta proteína durante a infecção por ZIKV e, portanto, sua aplicação para o diagnóstico ainda é pouco explorada.

Visto que ainda há grandes lacunas no conhecimento relacionado à biologia deste vírus, o desenvolvimento de um ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) de captura com anticorpos específicos para NS1 de ZIKV, possibilitaria não apenas o diagnóstico, como também seria uma ferramenta importante para estudos da dinâmica de produção desta proteína em células de origem humana e de mosquito. O uso de anticorpos específicos para um diagnóstico discriminatório, sem reação cruzada, pode ter um impacto positivo no manejo dos pacientes na fase aguda da doença, principalmente quando consideramos a circulação concomitante de outros orthoflavivirus no país (BRASIL, 2023).

1.2 OBJETIVOS

Desenvolvimento de teste do tipo ELISA de captura para a detecção de NS1 de ZIKV e sua aplicação no estudo da dinâmica de expressão desta proteína durante a infecção em vertebrados e mosquitos.

1.2.1 Objetivos específicos

- I. Expressar a proteína NS1 de ZIKV, DENV e YFV em células S2 de *Drosophila melanogaster*, otimizando as condições de purificação de forma a aumentar a pureza da proteína;

- II. Padronizar e validar o ELISA de captura de NS1 para detecção de infecção por ZIKV em amostras de soro humano - Prova de conceito;
- III. Avaliar a dinâmica de expressão e secreção de NS1 em linhagens celulares infectadas por ZIKV;
- IV. Determinar a especificidade e limite de detecção do teste desenvolvido.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ISOLAMENTO E EMERGÊNCIA DO VÍRUS ZIKA

Embora o Zika virus tenha sido isolado pela primeira vez em 1947 a partir de um macaco Rhesus sentinela para febre amarela na floresta Zika, em Uganda (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952), o primeiro caso confirmado de infecção humana foi notificado apenas em 1962-63, neste mesmo país (SIMPSON, 1964). Desde seu isolamento, a circulação deste vírus ocorreu de forma silenciosa, com casos esporádicos de infecção humana reportados na África Subsaariana e Sudeste Asiático (HUNG; HUANG, 2021; ZANLUCA; DOS SANTOS, 2016). É possível que isto tenha ocorrido parcialmente devido à ausência de sintomas graves e de manifestações clínicas semelhantes a outros arbovírus presentes na região, como o vírus da dengue. Além disto, a reatividade cruzada com vírus filogeneticamente relacionados observada por sorologia podem ter gerado diagnósticos equivocados, levando à subestimação de casos (BAUD; GUBLER; SCHAUB; LANTERI *et al.*, 2017).

O primeiro grande surto de ZIKV ocorreu na ilha Yap (Micronésia) em 2007. Estima-se que 70% dos habitantes tenham sido afetados, no entanto, não houve relatos de hospitalizações e óbitos associados à infecção durante este período (DUFFY; CHEN; HANCOCK; POWERS *et al.*, 2009; LANCIOTTI; KOSOY; LAVEN; VELEZ *et al.*, 2008). Nos próximos anos, este vírus continuou circulando na Ásia e África (HUNG; HUANG, 2021; ZANLUCA; DOS SANTOS, 2016) até novos surtos serem relatados em ilhas do Pacífico. Durante o surto na Polinésia Francesa em 2013, cerca de 30 mil pessoas procuraram atendimento para infecções causadas por ZIKV. Pela primeira vez, casos clínicos graves apresentando complicações neurológicas e autoimunes associados à infecção foram descritos (IOOS; MALLET; LEPARC GOFFART; GAUTHIER *et al.*, 2014; OEHLER; WATRIN; LARRE; LEPARC-GOFFART *et al.*, 2014). O vírus Zika continuou se espalhando causando surtos menores em ilhas do Pacífico, como em Nova Caledônia, Ilhas Cook, Ilhas Solomon e Ilha de Páscoa, até sua introdução no continente americano (DERRAIK; SLANEY, 2015; TOGNARELLI; ULLOA; VILLAGRA; LAGOS *et al.*, 2016; ZANLUCA; DOS SANTOS, 2016).

Em maio de 2015, a transmissão autóctone de ZIKV foi confirmada no Brasil. Os primeiros casos foram notificados na região Nordeste e foram caracterizados por

erupções cutâneas, febre, conjuntivite e artralgia (CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015; ZANLUCA; MELO; MOSIMANN; SANTOS *et al.*, 2015). Em menos de um ano, a maior parte do território brasileiro havia confirmado a transmissão autóctone do vírus (ZANLUCA; DOS SANTOS, 2016). Pela primeira vez, complicações neurológicas em fetos foram causalmente ligadas à infecção por ZIKV (CALVET; AGUIAR; MELO; SAMPAIO *et al.*, 2016; OLIVEIRA MELO; MALINGER; XIMENES; SZEJNFELD *et al.*, 2016). Simultaneamente, o vírus se espalhou do Brasil para a região do Caribe e América Central, eventualmente sendo importada para os Estados Unidos (FARIA; QUICK; CLARO; THÉZÉ *et al.*, 2017; GRUBAUGH; LADNER; KRAEMER; DUDAS *et al.*, 2017; METSKY; MATRANGA; WOHL; SCHAFFNER *et al.*, 2017). Durante este período, continuou sua disseminação em outros países da Ásia e África, embora em alguns casos a linhagem do vírus não tenha sido determinada (HERRERA; CHANG; HAMEL; MBOUP *et al.*, 2017; HO; HAPUARACHCHI; BARKHAM; CHOW *et al.*, 2017; HUNG; HUANG, 2021; LOURENÇO; DE LOURDES MONTEIRO; VALDEZ; MONTEIRO RODRIGUES *et al.*, 2018). Estes eventos estão resumidos na **Figura 1**.

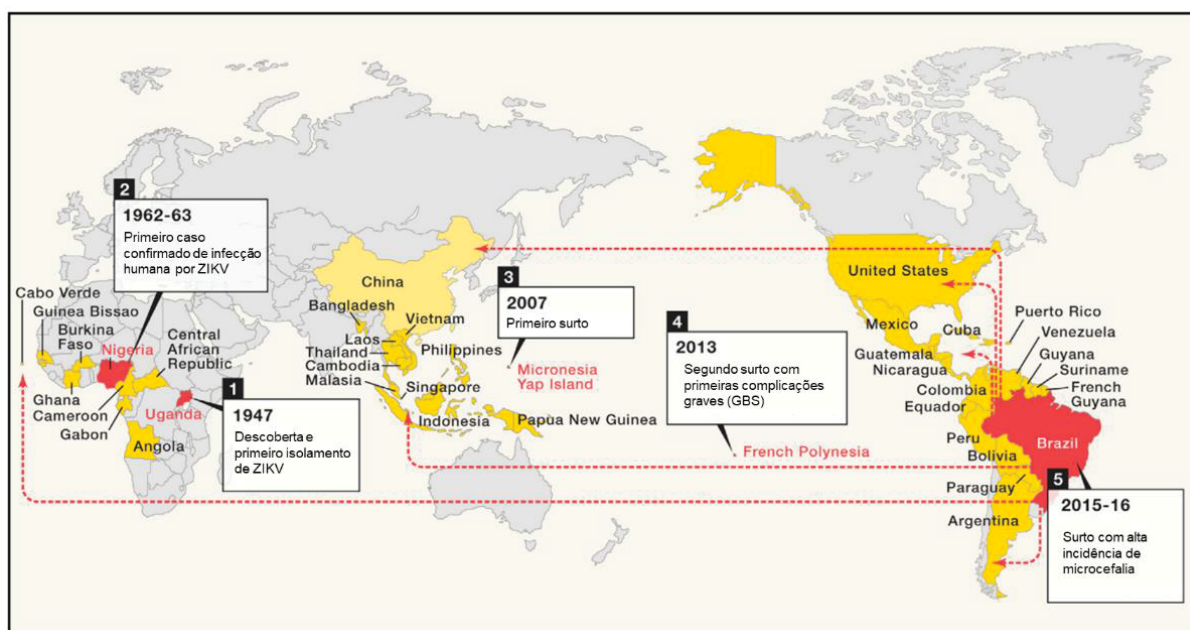


Figura 1 – Distribuição geográfica de infecções causadas por ZIKV. Eventos importantes estão destacados em vermelho e organizados numericamente por ordem cronológica. As setas tracejadas indicam as rotas de ZIKV durante a epidemia de 2015-2016. Áreas em amarelo representam regiões com evidência de transmissão do vírus de acordo com dados de 2017 pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Adaptado de Gao (2018).

Embora o número de casos de ZIKV tenha diminuído consideravelmente após 2016, a transmissão ainda é documentada em alguns países, sendo que a região das Américas apresenta o maior número de casos reportados anualmente (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2023). De acordo com o relatório mais recente da organização mundial da saúde (OMS), oitenta e nove nações e territórios notificaram evidências de transmissão autóctone vetorial de ZIKV até dezembro de 2021 (WHO, 2022).

Desde o início de 2015, quando a introdução e transmissão autóctone do ZIKV foi confirmada no Brasil (ZANLUCA; MELO; MOSIMANN; SANTOS *et al.*, 2015), estima-se que mais de 2 milhões de indivíduos tenham sido infectados. Considerando o boletim epidemiológico mais recente no Brasil, 9.204 casos prováveis de Zika foram reportados até a semana epidemiológica 48 de 2022, sendo que dentre estes, 591 eram de gestantes. Isto representa um aumento de 42% no número de casos em comparação com o ano de 2021. Neste período também foi confirmado um óbito decorrente da infecção pelo vírus no país (BRASIL, M. D. S., 2023).

2.1.1 Filogenia

De acordo com estudos filogenéticos da fase aberta de leitura completa (ORF, do inglês *open reading frame*), Haddow *et al.* (2012) mostraram o agrupamento de sequências genômicas de ZIKV por origem geográfica, classificando as cepas nas linhagens africana e asiática. A partir do estudo da evolução deste vírus, acredita-se que as cepas asiáticas se disseminaram em dois eventos distintos do Sudeste asiático para a região do Pacífico, primeiramente para a ilha Yap, e posteriormente para a Polinésia Francesa (DELATORRE; FERNÁNDEZ; BELLO, 2018; HUNG; HUANG, 2021). As cepas isoladas durante a epidemia no continente americano, incluindo no Brasil, mostraram proximidade filogenética e temporal com as cepas da Polinésia Francesa, apresentando mais de 99% de identidade nucleotídica em suas sequências (CALVET; AGUIAR; MELO; SAMPAIO *et al.*, 2016; LANCIOTTI; LAMBERT; HOLODNIY; SAAVEDRA *et al.*, 2016).

Embora vírus da linhagem asiática estejam associados às epidemias mais recentes, incluindo a de 2015-2016, isolados pertencentes à linhagem africana foram detectados em duas regiões distantes do Brasil, a partir de fontes independentes (ALENCAR; FERREIRA DE MELLO; BRISOLA MARCONDES; ÉRICO GUIMARÃES

et al., 2021; DE ALMEIDA; EHLERS; DEMOLINER; EISEN *et al.*, 2019). Estes dados sugerem que a linhagem africana pode ter circulado por um longo período sem ter sido detectada, podendo representar risco de uma nova epidemia (KASPRZYKOWSKI; FUKUTANI; FABIO; FUKUTANI *et al.*, 2020). Esta circulação gera preocupação, uma vez que estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem maior virulência associada à linhagem africana (SHAO; HERRLINGER; ZHU; YANG *et al.*, 2017; SIMONIN; LOUSTALOT; DESMETZ; FOULONGNE *et al.*, 2016; TRIPATHI; BALASUBRAMANIAM; BROWN; MENA *et al.*, 2017), sendo que cepas africanas de isolamento recente (2010 e 2015) apresentam não somente maior transmissibilidade em mosquitos, mas também maior letalidade em modelo de camundongos imunocomprometidos. Além disto, simulações com modelos epidemiológicos sugerem que estas cepas apresentam uma maior probabilidade de ocasionar epidemias de maiores proporções em humanos (AUBRY; JACOBS; DARMUZEY; LEQUIME *et al.*, 2021).

2.2 ESTRUTURA E REPLICAÇÃO VIRAL

2.2.1 Classificação

A família Flaviviridae, do latim flavus, “amarelo”, nomeada fazendo referência ao vírus protótipo YFV, é formada pelos gêneros *Hepacivirus*, *Pegivirus*, *Pestivirus* e *Orthoflavivirus*, previamente denominado *Flavivirus* (POSTLER; BEER; BLITVICH; BUKH *et al.*, 2023). A maior parte são arbovírus e por este motivo apresentam ciclos de transmissão complexos entre vetores, reservatórios, humanos e o meio ambiente. Apesar do tamanho reduzido do seu genoma, estes vírus conseguem subverter a maquinaria da célula através de interações entre proteínas virais e do hospedeiro, garantindo a sua replicação e manutenção do ciclo (CHAMBERS; HAHN; GALLER; RICE, 1990; FISHBURN; PHAM; KENASTON; BEESABATHUNI *et al.*, 2022). Diversos vírus de importância médica são *orthoflavivirus*, além do já citado YFV, o vírus da dengue, o vírus do oeste do Nilo, o vírus da encefalite de Saint Louis e o vírus Zika, tema deste trabalho, fazem parte desse táxon.

2.2.2 Organização do genoma e estrutura da partícula viral

O ZIKV, assim como os demais membros da família *Flaviviridae*, apresentam partículas de ~50 nm, envelopadas de estrutura esférica, que transportam em seu interior uma cópia única de RNA fita simples de polaridade positiva (ssRNA+) de aproximadamente 11 kb. O genoma apresenta duas regiões não codificantes (UTR, do inglês *untranslated region*) que flanqueiam nas posições 5' e 3' uma única fase aberta de leitura (ORF, do inglês *open reading frame*). Como resultado da tradução desta ORF, uma poliproteína viral é gerada que, após processamento por proteases virais e do hospedeiro, dá origem a 10 proteínas (**Figura 2**). As proteínas estruturais do capsídeo (C), precursora de membrana (prM) e de envelope (E) formam a partícula viral. As outras sete, chamadas de proteínas não estruturais NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 não fazem parte da partícula infecciosa, mas são essenciais para o estabelecimento da infecção pois estão envolvidas na replicação, virulência e patogenicidade do vírus. A presença de capeamento tipo 1 (m⁷GpppAmpN₂) e de estruturas secundárias conservadas nas extremidades UTR são importantes para conferir estabilidade ao RNA, estando envolvidas na replicação e tradução do genoma (ALVAREZ; DE LELLA EZCURRA; FUCITO; GAMARNIK, 2005; CHAMBERS; HAHN; GALLER; RICE, 1990; GEBHARD; FILOMATORI; GAMARNIK, 2011; LINDENBACH; THIEL; RICE, 2021).

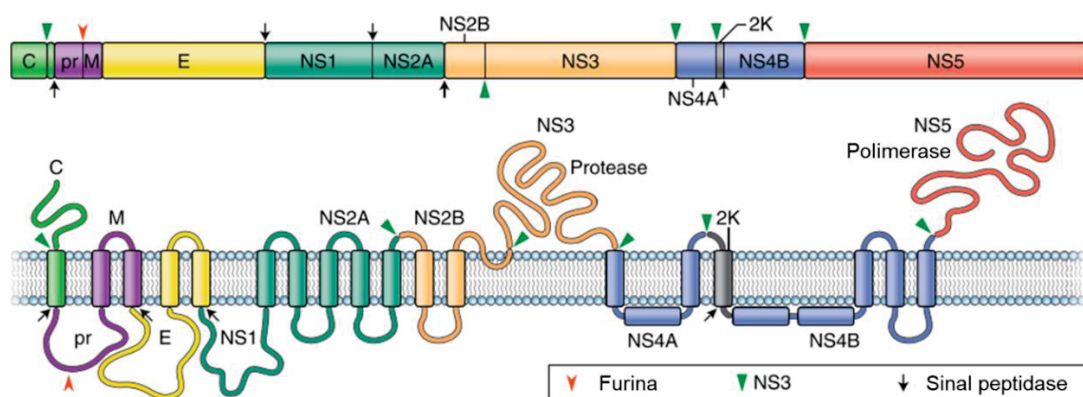


Figura 2 – Topologia da poliproteína viral de orthoflavivirus. A tradução da ORF gera uma poliproteína que é subsequentemente processada por proteases virais e do hospedeiro. Os sítios de clivagem estão indicados na figura por setas. Adaptado de Pierson & Diamond (2020).

A partícula viral é formada por um envelope lipídico derivado das células do hospedeiro no qual as três proteínas estruturais, E, M e C estão inseridas. Em seu

interior está presente o nucleocapsídeo, formado pela associação do RNA genômico a proteínas C. Durante o processo de maturação do vírus, a proteína de membrana é gerada pela clivagem da sua forma precursora prM e está ancorada à bicamada lipídica por duas hélices transmembrana. As proteínas de envelope se organizam em 90 homodímeros antiparalelos formando um arranjo tipo “espinha de peixe”, cobrindo a superfície da bicamada lipídica (**Figura 3A**) (CHAMBERS; HAHN; GALLER; RICE, 1990; PIERSON; DIAMOND, 2020).

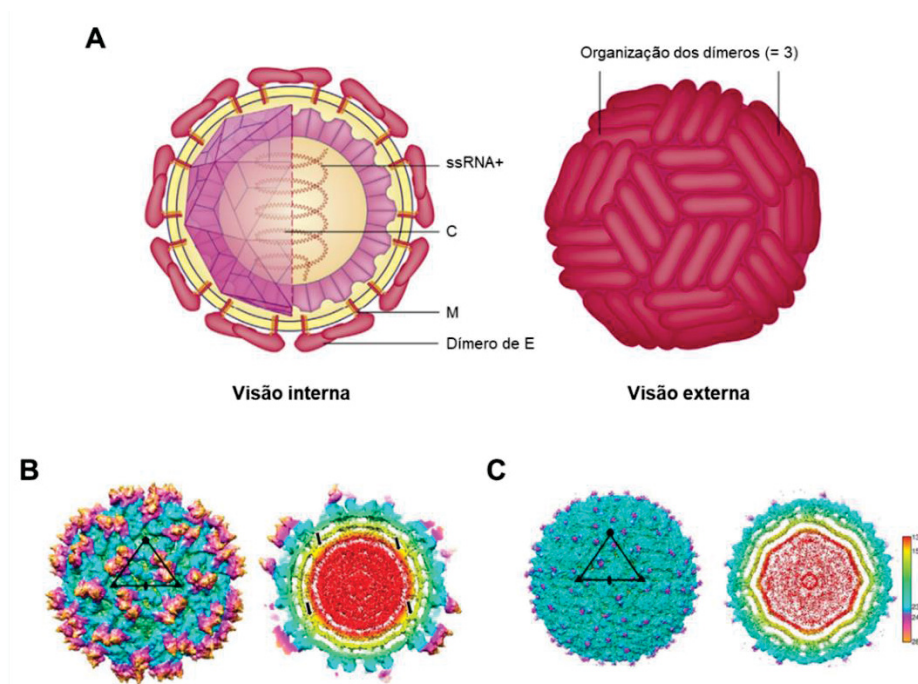


Figura 3 – Estrutura da partícula viral. (A) Representação esquemática de um vírion. O arranjo de três homodímeros de E formam um padrão tipo “espinha de peixe”. Visão de superfície e corte transversal de partículas virais de ZIKV imatura (B) e madura (C) visualizadas por Cryo-EM. Coloração radial representa tamanho em angströms. Adaptado de Payne (2017) e Hu & Sun (2019).

A glicoproteína de envelope dos orthoflavivirus (E) é um antígeno imunodominante que desempenha um papel fundamental na infecção viral, uma vez que permite a ligação do vírion à célula e promove a fusão da partícula à membrana do endossomo (CHAMBERS; HAHN; GALLER; RICE, 1990). Seu ectodomínio é composto por três domínios conectados por regiões de dobradiça, denominados DI, DII e DIII, que podem ser distinguidos por sorologia (CRILL; ROEHRIG, 2001; MANDL; GUIRAKHOO; HOLZMANN; HEINZ *et al.*, 1989) e por análise estrutural (MODIS; OGATA; CLEMENTS; HARRISON, 2003). Dentre estes, o domínio II desempenha

papel fundamental pois contém o peptídeo de fusão e promove a dimerização da proteína E na partícula viral madura (PIERSON; DIAMOND, 2020).

2.2.3 Ciclo replicativo

O início da infecção é marcado pela ligação da proteína E a moléculas de superfície presentes na célula do hospedeiro, desencadeando a internalização da partícula viral via endocitose mediada por clatrina. Durante este processo, o ambiente ácido do endossomo enfraquece as interações intra- e intermoleculares da proteína E, fazendo com que seus homodímeros se dissociem. A extensão dos monômeros projeta o peptídeo de fusão externamente promovendo sua inserção na membrana endocítica. Isto por sua vez leva ao rearranjo da proteína E em um estágio dinâmico trimerico que força a justaposição das membranas virais e do endossomo, catalisando a formação do poro de fusão e liberação do nucleocapsídeo no citosol (**Figura 4**) (CHAO; KLEIN; SCHMIDT; PEÑA *et al.*, 2014; LINDENBACH; THIEL; RICE, 2021; MEDITS; VANEY; ROUVINSKI; REY *et al.*, 2020).

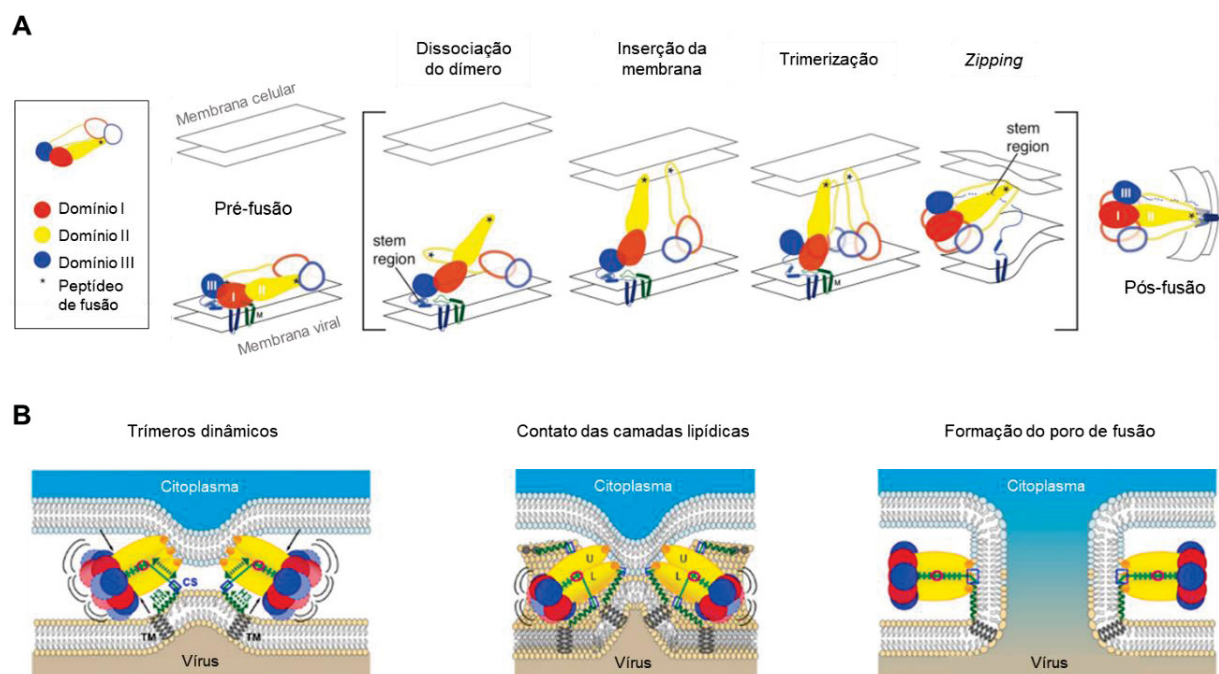


Figura 4 – Rearranjos conformacionais durante a fusão da membrana. (A) Esquema representativo das mudanças conformacionais da proteína E induzidas por baixo pH. (B) Formação do poro de fusão. Os domínios da proteína E estão identificados por cores e o peptídeo de fusão está indicado por um asterisco (*) em A ou em laranja em B. Adaptado de Chao *et al.* (2014) e Medits *et al.* (2020).

Uma vez no citosol, proteínas do hospedeiro atuam na desmontagem do nucleocapsídeo liberando o genoma viral (BYK; IGLESIAS; DE MAIO; GEBHARD *et al.*, 2016; RAMANATHAN; ZHANG; DOUAM; MAR *et al.*, 2020). A tradução do ssRNA⁺ dá origem à poliproteína viral que é processada co- e pós-traducionalmente, pela inserção dos domínios transmembrana no retículo endoplasmático (RE) e a clivagem do polipeptídeo em proteínas individuais pela ação de proteases virais e do hospedeiro.

A replicação dos orthoflavivirus ocorre em estruturas membranares complexas resultantes do remodelamento do RE promovido por fatores virais e do hospedeiro (*viral factories*). Estas invaginações formam compartimentos esféricos que protegem o material genético da detecção pela imunidade inata e maximizam a eficiência da replicação pelo acúmulo das proteínas não estruturais necessárias para a síntese de RNA. Nestes complexos de replicação, uma fita complementar de RNA de polaridade negativa é produzida e utilizada como molde para a síntese de novas ssRNA⁺.

O nucleocapsídeo é formado pela associação de uma cópia do genoma viral com múltiplas unidades de proteínas de capsídeo. O brotamento desta estrutura para o interior do RE leva à incorporação das proteínas estruturais e formação de uma partícula viral imatura (**Figura 3A**). Neste estágio, prM-E estão organizadas em heterotrímeros formando espículas, o que impede mudanças conformacionais da proteína E que poderiam ocasionar a fusão acidental durante a saída do vírus. O transporte destes pela rede *trans* de Golgi finaliza o processo de maturação através da clivagem de prM por furinas gerando partículas infecciosas que são liberadas por exocitose e podem então reiniciar o ciclo (**Figura 3B**). O resumo gráfico deste ciclo está representado na Figura 5.

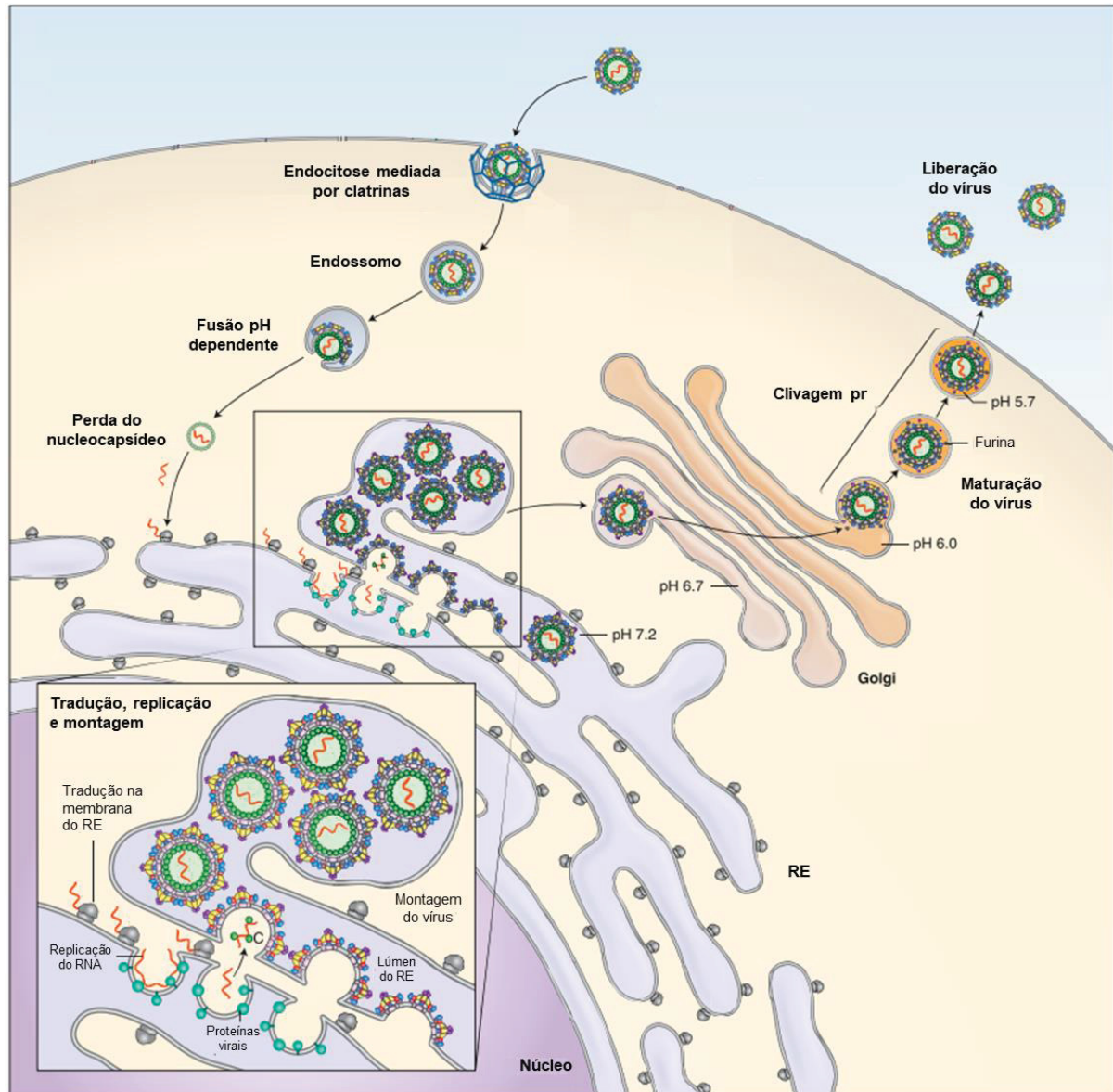


Figura 5 – Ciclo replicativo de orthoflavivírus. Orthoflavivírus infectam células de mamíferos através de interações com proteínas do hospedeiro e subsequente internalização via endocitose mediada por clatrina. A replicação do RNA viral ocorre em estruturas de membrana que coordenam espacialmente a morfogênese do vírus. A montagem da partícula viral ocorre no RE, onde elas se formam por brotamento e se deslocam pela via exocítica onde sua maturação é finalizada pela clivagem de pr e novos vírions ganham acesso ao meio extracelular. Adaptado de Pierson & Diamond (2020).

2.3 PROTEÍNA NÃO ESTRUTURAL 1 (NS1)

As proteínas não estruturais desempenham papéis cruciais no estabelecimento da infecção, podendo participar da replicação viral, evasão do sistema imune e contribuir para a patogenicidade do vírus. Embora a proteína NS1 de orthoflavivírus tenha sido descrita pela primeira vez em 1970 (BRANDT; CARDIFF; RUSSELL, 1970), suas funções ainda são apenas parcialmente conhecidas.

A glicoproteína não estrutural 1 (NS1) apresenta massa molecular de 46 a 55 kDa, dependendo do seu estado de glicosilação. Este antígeno é altamente conservado dentre diversos orthoflavivirus (RASTOGI; SHARMA; SINGH, 2016) e existe em diferentes estados de oligomerização durante a infecção (CROOKS; LEE; EASTERBROOK; TIMOFEEV *et al.*, 1994; FLAMAND; MEGRET; MATHIEU; LEPAULT *et al.*, 1999; GUTSCHE; COULIBALY; VOSS; SALMON *et al.*, 2011; WINKLER; RANDOLPH; CLEAVES; RYAN *et al.*, 1988). Durante a tradução da poliproteína viral, a NS1 é translocada para o lúmen do RE, clivada por proteases celulares, modificada por N-glicosilação e subsequentemente se associa em homodímeros, formando uma superfície hidrofóbica pela qual se acredita que esta proteína se associa à membrana do RE (ZHANG; HE; WU; WANG *et al.*, 2023). Após este processo, uma parte da NS1 produzida interage com outras proteínas e o RNA viral para formar o complexo de replicação (LINDENBACH; RICE, 1997; MACKENZIE; JONES; YOUNG, 1996; MUYLEAERT; GALLER; RICE, 1997; WESTAWAY; MACKENZIE; KENNEY; JONES *et al.*, 1997).

Dímeros de NS1 são expressos diretamente na membrana plasmática de células infectadas mesmo não apresentando um domínio transmembrana canônico (EDELING; DIAMOND; FREMONT, 2014). Análises por Cryo-EM das proteínas de DENV e WNV determinaram a presença de três domínios e dois subdomínios conectores (**Figura 6A**), sendo que a presença de um domínio hidrofóbico (β -roll) promove a dimerização desta proteína. Acredita-se que a face interna do dímero de NS1 se associa à membrana plasmática através de uma “protuberância hidrofóbica” formada pelos resíduos 10-11 do β -roll e resíduos 152-180 de um dos subdomínios conectores (**Figura 6B**) (AKEY; BROWN; DUTTA; KONWERSKI *et al.*, 2014). Adicionalmente, há evidências que a NS1 pode estar associada à membrana através de uma âncora GPI atípica ou ainda por *lipid rafts* (JACOBS; ROBINSON; BLETCHLY; MACKENZIE *et al.*, 2000; NOISAKRAN; DECHTAWEWAT; AVIRUTNAN; KINOSHITA *et al.*, 2008).

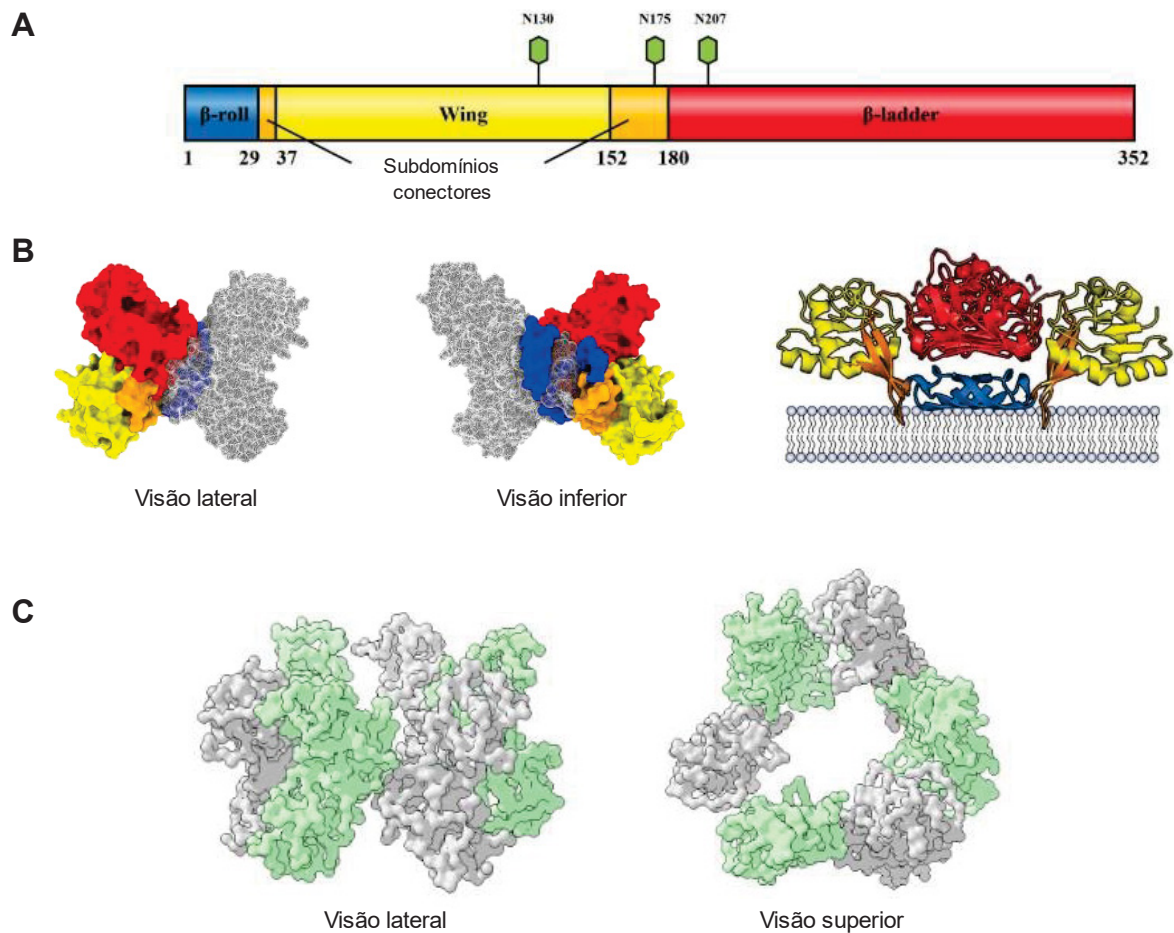


Figura 6 – Diagramas esquemáticos e estrutura da NS1 de orthoflavivirus. (A) Diagrama identificando os domínios da proteína NS1. (B) Estrutura do dímero de NS1 de ZIKV (PDB 5K6K) e diagrama representativo da sua associação à membrana plasmática. Os domínios estão identificados pelas mesmas cores usadas em (A). (C) Estrutura de um hexâmetro de NS1 de DENV (PDB 7WUV), os dímeros estão representados por um monômero em verde e um em cinza. Diagramas adaptados de Zhang *et al.* (2023). Imagens das estruturas em (B) e (C) foram geradas usando o *software* ChimeraX.

Uma parte dos dímeros associados à membrana é direcionado à periferia da célula por mecanismo ainda não completamente esclarecido. O restante trafega pela rede *trans*-Golgi onde passa por uma segunda etapa de processamento na qual os açúcares adicionados no RE são processados em carboidratos complexos, formando um hexâmetro solúvel (sNS1) que é ativamente secretado para o meio extracelular na forma de uma partícula lipoproteica (**Figura 6C**) (CROOKS; LEE; EASTERBROOK; TIMOFEEV *et al.*, 1994; FLAMAND; MEGRET; MATHIEU; LEPAULT *et al.*, 1999; POST; CARVALHO; GALLER, 1991). As proteínas NS1 formam uma estrutura de barril através de interações hidrofóbicas, apresentando uma região central rica em lipídeos. Sua organização apresenta os domínios *β -ladder* e *wing* na parte externa, mantendo o *β -roll* associado com o canal lipídico central (AKEY; BROWN; DUTTA;

KONWERSKI *et al.*, 2014; EDELING; DIAMOND; FREMONT, 2014). Estudos prévios mostraram que a proteína sNS1 pode se ligar novamente à membrana plasmática através de interação com glicosaminoglicanas (GAG) heparam sulfato (HS) e condroitina sulfato E (AVIRUTNAN; ZHANG; PUNYADEE; MANUYAKORN *et al.*, 2007). Além disto, sNS1 é encontrada no soro de hospedeiros infectados e pode ser adquirida por mosquitos durante o repasto sanguíneo, juntamente com as partículas virais (LIU; LIU; NIE; DU *et al.*, 2016). O processo de maturação e secreção da proteína NS1 está resumido na Figura 7.

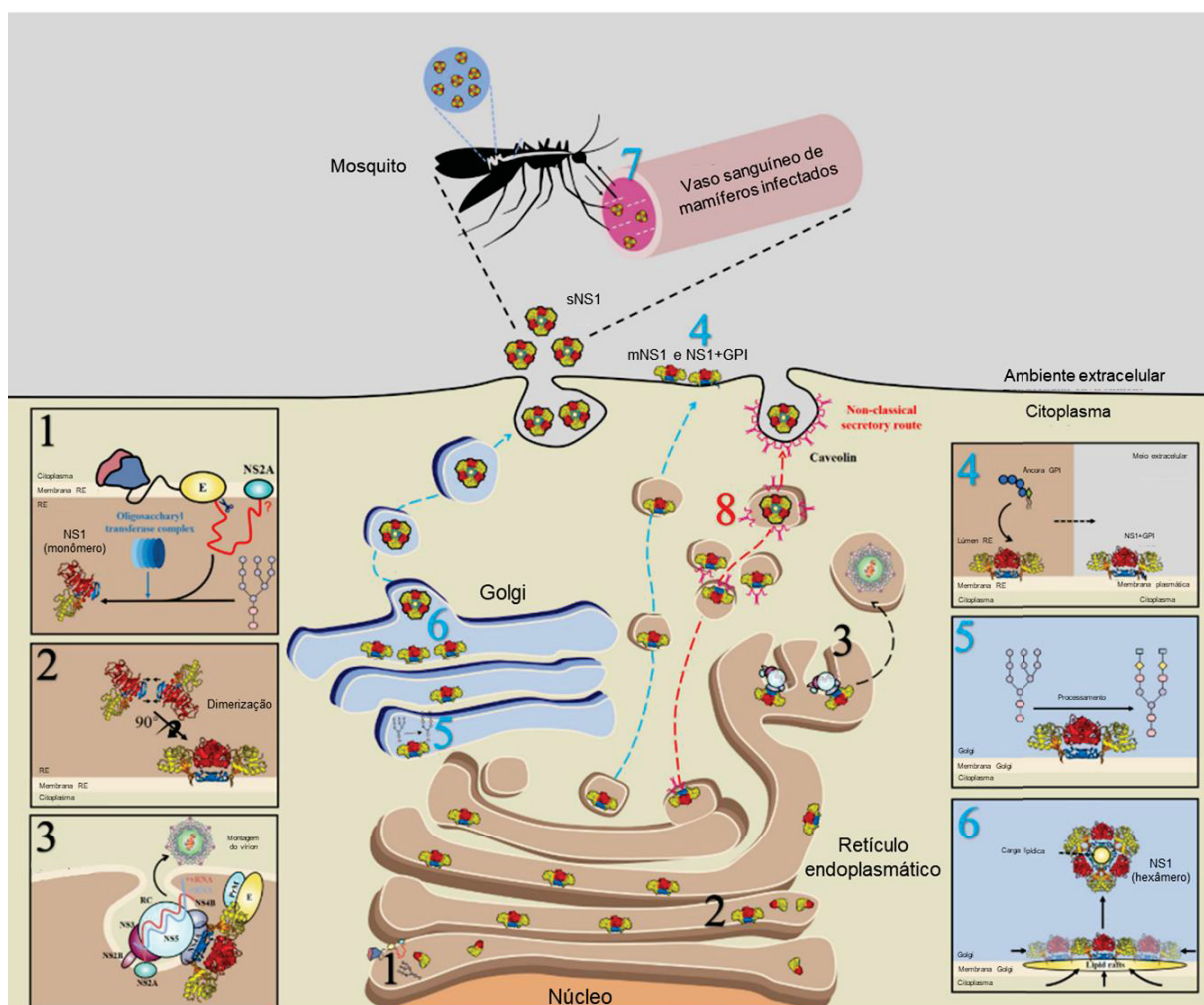


Figura 7 – Esquema representativo da produção e secreção de NS1. (1) Durante a tradução, a proteína NS1 é translocada para o lúmen do RE e glicosilada. (2) Em seguida, a proteína se dimeriza e se associa à membrana do RE. (3) Uma parte dos dímeros permanece junto aos complexos de replicação enquanto outra parte (4) é direcionada para a membrana plasmática, podendo se ligar por âncoras GPI. (5) A parte restante dos dímeros vai para o Golgi onde é processada novamente. (6) Os dímeros de NS1 se organizam em hexâmeros (sNS1) e são secretados para o meio extracelular. (7) A forma secretada desta proteína está presente no sangue dos hospedeiros e pode ser ingerida durante o repasto sanguíneo. (8) Em células de inseto, a secreção de sNS1 é independente do Golgi e ocorre por uma via dependente de caveolina. As etapas destacadas em azul e vermelho ocorrem em células de mamíferos e insetos, respectivamente. Adaptado de Zhang *et al.* (2023).

Diferentes funções são atribuídas à proteína NS1 dependendo da sua localização e estado oligomérico. Estudos com membros da família Flaviviridae evidenciaram que esta proteína é essencial para o estabelecimento da infecção por participar na síntese de ssRNA- durante a replicação (LINDENBACH; RICE, 1997; LINDENBACH; RICE, 1999; MACKENZIE; JONES; YOUNG, 1996; WESTAWAY; MACKENZIE; KENNEY; JONES *et al.*, 1997). Adicionalmente, NS1 interage com as proteínas estruturais prM e E dentro do lúmen do RE, participando na movimentação da membrana, envelopamento do nucleocapsídeo e formação de partículas infecciosas (SCATURRO; CORTESE; CHATEL-CHAIX; FISCHL *et al.*, 2015).

Adicionalmente, a proteína secretada contribui para a evasão do sistema imune e patogenicidade, podendo apresentar adaptações evolutivas específicas para o tropismo de cada vírus. A contribuição desta proteína na patogênese é bem caracterizada para infecções causadas por DENV, onde participa da hiperpermeabilidade endotelial e vazamento vascular, característico de infecções graves (BARBACHANO-GUERRERO; ENDY; KING, 2020; BEATTY; PUERTA-GUARDO; KILLINGBECK; GLASNER *et al.*, 2015; MODHIRAN; WATTERSON; MULLER; PANETTA *et al.*, 2015).

A NS1 extracelular pode se ligar a proteínas do sistema complemento e antagonizar suas funções por diferentes vias (AVIRUTNAN; HAUHART; SOMNUKE; BLOM *et al.*, 2011; CHUNG; LISZEWSKI; NYBAKKEN; DAVIS *et al.*, 2006; CONDE; DA SILVA; ALLONSO; COELHO *et al.*, 2016; THIEMMECA; TAMDET; PUNYADEE; PROMMOOL *et al.*, 2016). Além disto, a disrupção da resposta imune inata também foi previamente descrita através da interação da NS1 com a via de ativação de receptores tipo Toll (TLR) e tipo RIG-I (RLR) (CROOK; MILLER-KITTRELL; MORRISON; SCHOLLE, 2014; WILSON; DE SESSIONS; LEON; SCHOLLE, 2008; WU; LIU; ZHOU; XIE *et al.*, 2017; ZHANG; YE; LIU; DENG *et al.*, 2017).

A presença desta proteína no soro de pacientes em fase aguda da doença tem sido usada com sucesso como um marcador para detecção de infecções agudas em pacientes acometidos por outros orthoflavivírus como DENV e vírus do oeste do Nilo (WNV) (ALCON; TALARMIN; DEBRUYNE; FALCONAR *et al.*, 2002; MACDONALD; TONRY; HALL; WILLIAMS *et al.*, 2005; YOUNG; HILDITCH; BLETCHLY; HALLORAN, 2000), tornando-a um alvo interessante para o diagnóstico precoce de infecções ativas por ZIKV.

2.4 CICLO DE TRANSMISSÃO

A manutenção do ZIKV na natureza ocorre em ambiente silvestre em um ciclo zoonótico entre mosquitos e primatas não humanos e no ambiente urbano pela transmissão do vírus por mosquitos antropofílicos (**Figura 8**). Estudos sugerem que *Aedes africanus*, *Ae. furcifer*, *Ae. lutocephalus*, *Ae. vittatus*, *Ae. dalzielli* e *Ae. taylori* estão envolvidos na transmissão silvestre, e *Ae. aegypti* como o principal vetor no ciclo urbano (GUTIÉRREZ-BUGALLO; PIEDRA; RODRIGUEZ; BISSET *et al.*, 2019).

A infecção de humanos ocorre principalmente através da picada de mosquitos infectados durante o repasto sanguíneo. Apesar disto, a disseminação entre humanos é amplamente relatada, principalmente por transmissão sexual e congênita (DAVIDSON; SLAVINSKI; KOMOTO; RAKEMAN *et al.*, 2016; FOY; KOBYLINSKI; FOY; BLITVICH *et al.*, 2011; MUSSO; ROCHE; ROBIN; NHAN *et al.*, 2015), mas há evidências de que também possa ocorrer através de outros fluidos corporais (BARJAS-CASTRO; ANGERAMI; CUNHA; SUZUKI *et al.*, 2016; MOTTA; SPENCER; CORDEIRO DA SILVA; ARRUDA *et al.*, 2016; SWAMINATHAN; SCHLABERG; LEWIS; HANSON *et al.*, 2016).

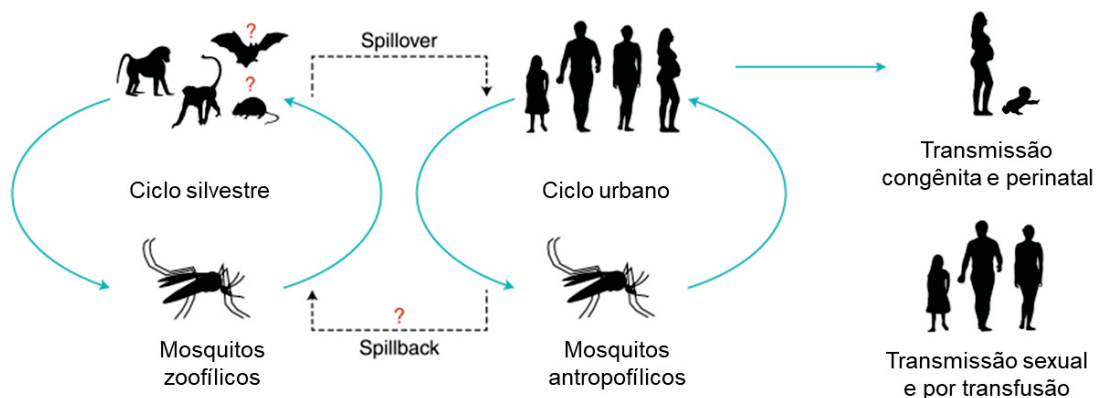


Figura 8 – Ciclo de transmissão do ZIKV. A transmissão ocorre em dois ciclos, o silvestre, no qual o vírus circula entre hospedeiros vertebrados não-humanos e mosquitos zoofílicos, e o ciclo urbano, onde a transmissão para humanos é feita por mosquitos antropofílicos. A transmissão também pode ocorrer através do contato de fluidos biológicos contaminados e por transmissão congênita. Adaptado de Gutiérrez-Bugallo *et al.* (2019)

ZIKV foi detectado no sangue, saliva, lágrimas, leite materno, líquido amniótico, urina, sêmen e muco cervical, assim como na placenta, cérebro, olhos, útero, vagina e testículos, mostrando um tropismo único entre os orthoflavivirus

(ADAMS WALDORF; STENCEL-BAERENWALD; KAPUR; STUDHOLME *et al.*, 2016; BARZON; PACENTI; FRANCHIN; LAVEZZO *et al.*, 2016; DUDLEY; ALIOTA; MOHR; WEILER *et al.*, 2016; DUPONT-ROUZEYROL; BIRON; O'CONNOR; HUGUON *et al.*, 2016; LI; SAUCEDO-CUEVAS; REGLA-NAVA; CHAI *et al.*, 2016; MINER; SENE; RICHNER; SMITH *et al.*, 2016; OLIVEIRA MELO; MALINGER; XIMENES; SZEJNFELD *et al.*, 2016; SUN; WU; ZHONG; GUAN *et al.*, 2016; ZAMBRANO; WAGGONER; LEÓN; PINSKY *et al.*, 2017).

2.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E PATOLOGIA

Previamente, a infecção humana era considerada uma doença febril leve e autolimitada, semelhante a uma gripe com quadro clínico clássico (febre, erupções cutâneas, artralgia e conjuntivite) que se manifestava em uma proporção reduzida das pessoas infectadas (DUFFY; CHEN; HANCOCK; POWERS *et al.*, 2009; HAMEL; LIÉGEOIS; WICHIT; POMPON *et al.*, 2016). No entanto, as epidemias mais recentes na Polinésia Francesa (2013) e no Brasil (2015 – 2016) evidenciaram aspectos clínicos que diferenciaram a infecção por ZIKV de surtos anteriores, particularmente a associação com complicações neurológicas em fetos e adultos, assim como aumento na severidade da doença e falha múltipla de órgãos (DE ARAÚJO; RODRIGUES; DE ALENCAR XIMENES; DE BARROS MIRANDA-FILHO *et al.*, 2016; SWAMINATHAN; SCHLABERG; LEWIS; HANSON *et al.*, 2016; YOKOYAMA; STARMER, 2017; ZHU; CHAN; TEE; CHOI *et al.*, 2016). É possível que a mudança observada na síndrome clínica pode ser atribuída à presença de mutações adquiridas durante a dispersão geográfica da linhagem asiática do ZIKV, levando a um aumento na virulência e alterações no *fitness* viral em humanos e mosquitos (LIU; LIU; DU; SHAN *et al.*, 2017; XIA; LUO; SHAN; MURUATO *et al.*, 2018; YUAN; HUANG; LIU; ZHANG *et al.*, 2017).

Estudos de caso sugerem que os sintomas agudos de uma infecção por ZIKV se resolvem dentro de 1 a 2 semanas (LESSLER; CHAISSON; KUCIRKA; BI *et al.*, 2016). Óbitos são raros e geralmente ocorrem em pacientes imunocomprometidos ou com comorbidades preexistentes (SARMIENTO-OSPINA; VÁSQUEZ-SERNA; JIMENEZ-CANIZALES; VILLAMIL-GÓMEZ *et al.*, 2016). Por outro lado, pessoas infectadas podem estar sob risco aumentado de desenvolver sequelas neurológicas, como a Síndrome de Guillain-Barré (GBS). Pacientes com GBS associado à infecção por ZIKV apresentam maiores títulos de anticorpos neutralizantes, embora ainda não

tenha sido descrito se há uma relação de causalidade entre estes anticorpos e o desenvolvimento de GBS. É possível que um dos mecanismos seja o mimetismo molecular, onde anticorpos específicos podem apresentar reação cruzada com neurônios, causando danos neurais devido à uma polineuropatia inflamatória desmielinizante (CHANG; LYNCH; MARTINS; ENCINALES *et al.*, 2018; LYNCH; MANTUS; ENCINALES; PACHECO *et al.*, 2019).

A característica mais agravante da infecção está ligada à transmissão vertical durante a gravidez, levando ao desenvolvimento da síndrome congênita associada à infecção por ZIKV (CZS, do inglês *congenital Zika syndrome*), caracterizada por calcificações cerebrais, microcefalia, restrição do crescimento intrauterino até morte fetal (HUNG; HUANG, 2021; LESSLER; CHAISSON; KUCIRKA; BI *et al.*, 2016; NORONHA; ZANLUCA; AZEVEDO; LUZ *et al.*, 2016).

Estudos *in vitro* mostraram a habilidade de ZIKV em infectar linhagens celulares derivadas da placenta e trato genital, ressaltando o alto risco de transmissão sexual e doenças congênitas (CHAN; YIP; TSANG; TEE *et al.*, 2016). Ao contrário de outros orthoflavivirus encefalíticos, como o WNV e SLEV, ZIKV raramente causa meningite e encefalite em adultos; o alvo primário parece ser células progenitoras neurais, principalmente considerando o dano associado ao desenvolvimento fetal quando há transmissão vertical (TANG; HAMMACK; OGDEN; WEN *et al.*, 2016). Análises epidemiológicas sugerem uma correlação entre infecções durante o primeiro e segundo trimestre de gestação e a letalidade dos casos (CAUCHEMEZ; BESNARD; BOMPARD; DUB *et al.*, 2016; PACHECO; BELTRÁN; NELSON; VALENCIA *et al.*, 2020). Aproximadamente 42% dos fetos de gestantes infectadas por ZIKV apresentaram anormalidades no desenvolvimento detectadas por ultrassom (BRASIL; PEREIRA; MOREIRA; RIBEIRO NOGUEIRA *et al.*, 2016).

2.6 DIAGNÓSTICO

Atualmente, o diagnóstico da doença é feito principalmente por critérios clínico-epidemiológicos associados ao diagnóstico laboratorial pela detecção do vírus, genoma viral, antígeno viral, anticorpos anti-ZIKV ou uma combinação destes. A abordagem é escolhida baseada no momento da coleta das amostras, já que isto restringe as técnicas que podem ser utilizadas (**Figura 9**).

As técnicas mais comumente utilizadas são o RT-PCR para detecção do RNA viral e testes sorológicos para detecção de anticorpos IgM, como o MAC-ELISA. Devido ao curto período de viremia dos pacientes acometidos, assim como os baixos níveis de partículas virais circulantes e a alta reatividade cruzada com outros orthoflavivirus, o uso das técnicas mencionadas é limitado (MUSSO; ROUAULT; TEISSIER; LANTERI *et al.*, 2017; ZANLUCA; DOS SANTOS, 2016). Além disso, a similaridade dos sintomas clínicos de infecções causadas por outros arbovírus que cocirculam no Brasil, como DENV, YFV e Chikungunya (CHIKV) (PESSÔA; PATRIOTA; LOURDES DE SOUZA; FELIX *et al.*, 2016), também compromete o diagnóstico e o manejo clínico dos pacientes.

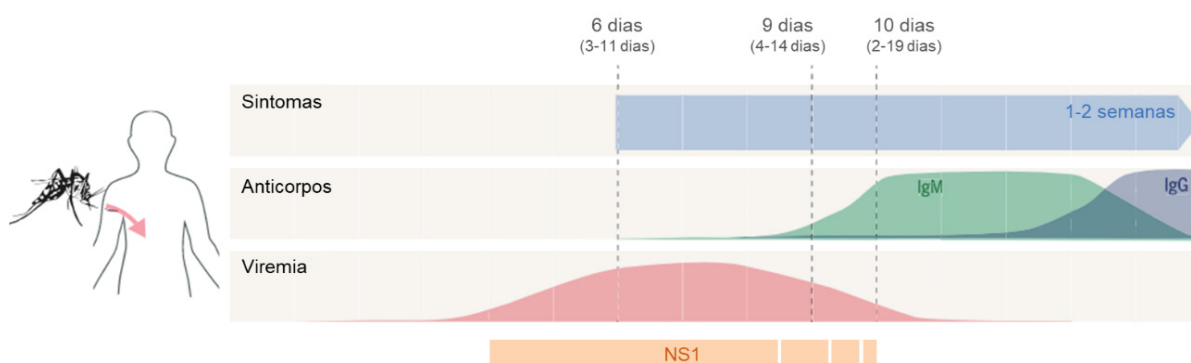


Figura 9 – Curso da infecção em humanos. Sintomas aparecem em média 6 dias após a infecção e anticorpos IgM começam a ser detectados em seguida. A concentração destes anticorpos cai com o tempo, enquanto a produção de anticorpos IgG aumenta. A viremia começa a aumentar antes do início dos sintomas e é acompanhada pela presença de NS1 no soro de pacientes. Adaptado de Lessler *et al.* (2016).

Grande parte dos *kits* comerciais para o diagnóstico sorológico disponíveis no mercado nacional é importada e não foram devidamente validados no Brasil. Ademais, foi verificado pela nossa equipe e outros grupos de pesquisa a ocorrência de reação cruzada com outros orthoflavivirus, como DENV e YFV (KOISHI; SUZUKAWA; ZANLUCA; CAMACHO *et al.*, 2018; SAFRONETZ; SLOAN; STEIN; MENDOZA *et al.*, 2017). Embora diversos testes no formato ELISA desenvolvidos para detecção de infecções por orthoflavivirus sejam baseados na proteína NS1, estes são majoritariamente voltados para detecção de anticorpos IgG ou IgM e não diretamente da proteína. Dois kits comerciais para detecção de NS1 estão disponíveis, sendo o *Zika Virus NS1 ELISA* (BioFront) e *Zika virus ZIKV-NS1 ELISA kit* (SinoBiological),

embora ambos não tenham sido validados com amostras biológicas de pacientes naturalmente infectados.

A partir da análise da literatura, é possível notar que existe uma grande variação nas concentrações de NS1 presentes nos soros de pacientes infectados por orthoflavivirus. A concentração deste antígeno pode flutuar entre 0,01 até 50 µg/mL durante a infecção por DENV (ALCON; TALARMIN; DEBRUYNE; FALCONAR *et al.*, 2002), enquanto no caso de YFV, pode variar de 0,1 a 4,5 µg/mL (RICCIARDI-JORGE; BORDIGNON; KOISHI; ZANLUCA *et al.*, 2017). Relatos da concentração de NS1 no soro de pacientes infectados com ZIKV sejam escassos, sendo que se acredita que na maior parte dos casos se encontre abaixo de 100 ng/mL (BEDDINGFIELD; HARTNETT; WILSON; KULAKOSKY *et al.*, 2021; BOSCH; DE PUIG; HILEY; CARRÉ-CAMPS *et al.*, 2017). Neste contexto, o potencial desta proteína como marcador de infecção aguda por ZIKV ainda é pouco explorado.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LINHAGENS CELULARES

3.1.1 Células de mamíferos

Células A549 (CCL-185, ATCC), derivadas do tecido epitelial pulmonar de um homem acometido por câncer pulmonar (GIARD; AARONSON; TODARO; ARNSTEIN *et al.*, 1973), foram cultivadas em meio DMEM-F12 (Dulbecco modificado por Eagle/Nutriente HAM F12, Gibco) contendo 14 mM de bicarbonato de sódio e suplementado com 7% (v/v) de soro bovino fetal (SBF, Gibco) inativado, 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. A cultura foi mantida em incubadora a 37°C, 5% de CO₂ com subcultivo na proporção de 1:5 a 1:7.

Células JEG-3 (HTB-36, ATCC), derivadas de coriocarcinoma humano (KOHLEH; BRIDSON, 1971), foram cultivadas nas mesmas condições descritas para A549 com subcultivo na proporção de 1:4 a 1:7.

Células Vero (CCL-81, ATCC) e Vero E6 (85020206, Sigma-Aldrich), derivadas de rim de macaco verde africano adulto (*Cercopithecus aethiops*), foram cultivadas em meio DMEM-F12 contendo 14 mM de bicarbonato de sódio e suplementado com 10% (v/v) de SBF inativado, 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. Ambas as culturas foram mantidas em incubadora a 37°C, 5% de CO₂, com subcultivo na proporção de 1:5 a 1:7.

Células P3X63Ag8.653 (CRL-1580, ATCC) e hibridomas foram mantidos em meio RPMI-1640 contendo 23,8 mM de bicarbonato de sódio, 0,2 mM de L-glutamina, 1,0 mM de piruvato de sódio, 9,6 mM de HEPES e suplementado com 20% (v/v) de SBF inativado, 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina B (Sigma-Aldrich). As culturas foram mantidas em incubadora a 37°C, 5% de CO₂.

3.1.2 Células de inseto

Células Schneider 2 (S2- R690-07, Invitrogen), derivadas de cultura primária de embriões de *Drosophila melanogaster* em estágio tardio (SCHNEIDER, 1972),

foram cultivadas em meio Schneider (*Schneider's Drosophila Medium*, Gibco) suplementado com 10% (v/v) de SBF inativado, 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina em incubadora a 28°C, com subcultivo na proporção de 1:7 a 1:10. Alternativamente, estas células também foram adaptadas para manutenção em meio SF-900 II (Gibco), suplementado com a mesma concentração de antibióticos.

Células C6/36 (ATCC CRL-1660), derivadas de larva de *Ae. albopictus* foram mantidas em cultivo em meio Leibovitz's L-15 (Gibco), suplementado com 5% de SBF inativado, 25 µg/L de gentamicina (Gibco) e 0,26% (m/v) de triptose em incubadora a 28°C, com subcultivo na proporção de 1:5 a 1:10.

3.2 VÍRUS

Neste estudo foram utilizados os vírus Zika MR766, pertencente à linhagem africana, ZV BR 2015/15261 (GenBank MF073358.1) e ZV BR 2016/16288 (GenBank MF073357.1), ambos isolados clínicos obtidos durante epidemia no Brasil entre 2015 e 2016 (STROTTMANN; ZANLUCA; MOSIMANN; KOISHI *et al.*, 2019), classificados como parte da linhagem asiática do vírus. Todos os estoques virais foram gerados e titulados em células C6/36.

O vírus da Dengue sorotipos 1 FGA/89 (GenBank AF226687.2) (NUNES DUARTE DOS SANTOS; FRENKIEL; COURAGEOT; FERNANDO S. ROCHA *et al.*, 2000), 2 ICC-265, 3 ICC-97 e 4 LRV13/422 (GenBank KU513441.1) (KUCZERA; BAVIA; MOSIMANN; KOISHI *et al.*, 2016) são isolados clínicos obtidos de pacientes acometidos com dengue. Os estoques virais foram gerados e titulados em C6/36.

A cepa vacinal do vírus da febre amarela YFV 17DD (GenBank U17066.1), foi atenuada através de passagem sucessivas (286 - 287) do isolado clínico Asibi (DOS SANTOS; POST; CARVALHO; FERREIRA *et al.*, 1995). Estoque viral foi gerado e titulado em C6/36.

Todos os estoques virais ou amostras contendo partículas virais foram manipulados em laboratórios com contenção de risco com nível de biossegurança 2 (NB-2) ou NB-3, de acordo com as normas vigentes.

3.3 PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CONJUGAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-NS1 DE ZIKV

3.3.1 Comitê de ética

Todos os procedimentos que envolvem camundongos usados neste estudo foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da Fiocruz (Protocolo LW-2/17). Os animais foram mantidos no biotério do Instituto Carlos Chagas/ Fiocruz- PR em regime *ad libitum* e fotoperíodo de 12h de claro/12h de escuro.

3.3.2 Imunização de camundongos com ZIKV

Três camundongos (*Mus musculus*) adultos jovens da linhagem Balb/c foram imunizados com um total de cinco doses, sendo quatro intraperitoneais (I.P.) e uma intravenosa (I.V.), com duas semanas de intervalo entre cada aplicação. Para cada dose, foram usadas 1×10^6 PFU/animal de partículas virais de ZV BR 2015/15261 purificadas por sedimentação em colchão de sacarose (30%/60%) a partir do sobrenadante de infecção de células Vero E6, previamente concentrado por precipitação com 7% de polietilenoglicol (PEG 8000) acrescido de NaCl a 2,3%.

3.3.3 Fusão de esplenócitos e células de mieloma

Três dias após a última dose, os animais foram anestesiados com 100 mg/kg de cloridrato de quetamina e 1mg/kg de cloridrato de xilazina (0,1 mL/10 g de peso, via I.P.) para coleta de soro pós imune por punção cardíaca. Após eutanásia, foi realizada a coleta asséptica dos baços em cabine de segurança biológica. Os órgãos foram macerados em meio RPMI-1640 e filtrados em malha de nylon para remoção da cápsula e obtenção de uma suspensão celular. Após a lise de hemácias e lavagens sucessivas em RPMI-1640, as células viáveis foram quantificadas em câmara de Neubauer pelo método de exclusão por Azul de Trypan a 0,4% (Gibco). Os esplenócitos obtidos ao final do processo foram fusionados com células de mieloma P3X63Ag8.653 utilizando o agente fusionante PEG (P.M. 3000-3700, Sigma-Aldrich), de acordo com protocolo previamente descrito por Mazzarotto *et al.* (2009). No dia

seguinte à fusão, RPMI-1640 completo (com os suplementos previamente relatados em 3.1) suplementado com HAT (100 μ M de hipoxantina, 0,4 μ M de aminopterina e 16 μ M de timidina, Sigma Aldrich) foi adicionado ao cultivo para seleção de células híbridas ao longo de 14 dias. A partir do décimo quinto dia após a fusão, as células foram mantidas em meio HT (meio HAT sem aminopterina, Sigma-Aldrich) e, finalmente, no vigésimo dia após a fusão, o meio foi substituído por RPMI-1640 completo isento dos componentes de seleção. As células que apresentaram crescimento durante este período foram triadas para produção de anticorpos reativos contra ZIKV.

3.3.4 Triagem de hibridomas e obtenção de anticorpos monoclonais por diluição limitante

O método escolhido para a triagem de hibridomas reativos contra ZIKV foi imunofluorescência indireta (IFI). Para isto, células C6/36 foram semeadas em placas de 96 poços e infectadas com ZIKV com multiplicidade de infecção (MOI) de 1. Três dias após a infecção, as células foram fixadas com solução de metanol:acetona 1:1 (v/v) a -20°C por pelo menos 1 h antes da marcação. Os sobrenadantes coletados do cultivo de hibridomas foram adicionados diretamente aos poços da placa, atuando como anticorpo primário da reação. A presença de anticorpos positivos foi visualizada com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 (Invitrogen) diluído 1:800 em PBS e o corante nuclear DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) em microscópio óptico invertido de fluorescência LEICA AF6000. Cada etapa de incubação foi realizada a 37°C por 1 h, seguida de três lavagens com PBS para remoção de anticorpos não ligados ou ligados com baixa afinidade. Além dos sobrenadantes a serem testados, foram usados como controle positivo o anticorpo pan-flavivirus 4G2 (produzido a partir do hibridoma D1-4G2-4-15, ATCC) e um anticorpo não relacionado como controle negativo. Os sobrenadantes foram considerados positivos quando apresentavam reatividade contra células infectadas e não apresentavam sinal em células não infectadas (*Mock*).

Os hibridomas positivos foram expandidos e submetidos a dois ciclos de congelamento e descongelamento para garantir sua estabilidade e testados novamente por IFI. As células que mantiveram a secreção de anticorpos ao final do

processo foram submetidas a dois ciclos de diluição limitante de forma a obter clones produzindo anticorpos contra um epítipo único (anticorpos monoclonais – mAbs).

3.3.5 Caracterização de hibridomas

Os alvos dos hibridomas positivos obtidos ao final da triagem foram determinados por *Western Blot* (WB) a partir de lisados de células não infectadas (*Mock*) e infectadas com ZIKV. Os clones que apresentaram banda de tamanho correspondente à proteína NS1 foram adicionalmente caracterizados quanto a sua reatividade cruzada com outros flavivírus, sendo eles YFV e DENV sorotipos 1 a 4 por IFI, da mesma maneira descrita previamente (item 3.3.4). Adicionalmente, o isotipo dos mAbs produzidos foi determinado por ensaio imunoenzimático do tipo ELISA com o *SBA Clonotyping HRP System* (Southern Biotech), de acordo com as instruções do fabricante.

3.3.6 Produção e purificação de mAbs por afinidade

Para produção de mAbs em maior escala, os hibridomas selecionados foram expandidos para garrafas de 300 cm² e, a cada passagem, o sobrenadante de cultivo foi coletado e armazenado a -20°C, até obter um volume total de 1 L. Os anticorpos foram concentrados por precipitação com sulfato de amônio (PERRIN, 1996) onde uma solução gelada saturada de (NH₄)₂SO₄ (Sigma-Aldrich) foi adicionada gota a gota em partes iguais (1:1) ao sobrenadante de cultivo, sob agitação constante. A mistura foi mantida a 4°C por 1 h e centrifugada a 5000 x g por 45 min para obtenção do precipitado. O *pellet* obtido foi recuperado em volume mínimo de PBS (aproximadamente 20 mL) e submetido à diálise contra 2 L de PBS em membranas de celulose de 30K MWCO (*SnakeSkin Dialysis Tubing*, Thermo Scientific), com quatro trocas de igual volume de PBS. Os mAbs obtidos ao final do processo foram armazenados a -20°C até o momento da purificação.

Os anticorpos foram purificados por cromatografia de afinidade em coluna HiTrap Protein G HP (GE Healthcare). Para isto, a amostra foi misturada com o mesmo volume de tampão de ligação e clarificada por centrifugação a 1363 x g por 4 min. A coluna foi conectada a uma bomba peristáltica e a purificação foi realizada seguindo as instruções do fabricante. Primeiramente, a coluna foi equilibrada em 10 volumes

de coluna (CV) de tampão de ligação antes da aplicação da amostra. Uma vez que os anticorpos presentes na amostra têm afinidade pela coluna, eles permanecem retidos na resina. A remoção de proteínas não ligadas ou ligadas com baixa afinidade é realizada através de duas etapas de lavagem com 5 CVs de tampão de ligação. Finalmente, foram adicionados de 2 a 5 CVs de tampão de eluição para realizar o desligamento dos anticorpos retidos na resina. Frações de aproximadamente 1 mL foram coletadas em microtubos contendo 60 µL de tampão de neutralização de forma a ajustar o pH da amostra final e evitar a degradação dos mAbs. Quando a densidade óptica (D.O.) a 280 nm das frações coletadas apresentou valores próximos a zero, a eluição foi interrompida e a coluna foi equilibrada com 15 CVs de tampão de ligação. Detalhes sobre a composição dos tampões utilizados estão discriminados na Tabela 1. As frações apresentando maior D.O._{280nm} foram selecionadas e analisadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 13% e/ou por IFI, para confirmar a presença e atividade do mAb após purificação. Amostras das etapas intermediárias de aplicação da amostra (*Flowthrough*) e lavagens também foram coletadas para controle da eficiência do processo. Após análise, as frações que apresentaram maior D.O._{280nm} e sinal mais intenso por IFI foram agrupadas e a amostra final dosada com o *Protein assay dye reagent concentrate* (Biorad).

Tabela 1 – Composição dos tampões usados para purificação de mAbs por afinidade.

Tampão	Composição
Ligação	<i>Tampão fosfato 20mM pH 7,0</i>
Eluição	<i>Glicina 0,1M pH 2,7</i>
Neutralização	<i>Tris-HCl 1M pH 9,0</i>

3.3.7 Conjugação com *horseradish peroxidase* (HRP)

A reação de conjugação foi realizada seguindo o protocolo descrito por Wisdom (2005) com algumas alterações. Tampão carbonato pH 9,5 foi adicionado ao mAb purificado de forma que a concentração final fosse 10 mM antes da conjugação. Primeiramente, 2 mg de peroxidase (Sigma-Aldrich) diluídos em 500 mL de H₂O foram incubados com 100 mL de periodato de sódio 0,1 M por 20 min a temperatura ambiente (T.A.) sob agitação e abrigo da luz. A mistura foi dialisada em membrana *SpectraPor 1 RC dialysis tubing 6K-8K MWCO 6,4 mm diameter* (Spectrum) contra 2

L de tampão acetato de sódio 1 mM pH 4,4 sob agitação, overnight a 4°C. A amostra foi recuperada, o pH da solução foi ajustado para 9,0 – 9,5 pela adição de 10 mL de tampão carbonato 0,2 M pH 9,5 e imediatamente adicionado a 4 mg de mAb purificado. Após 2 h de incubação a T.A. sob agitação e abrigo da luz, foram adicionados 50 mL de boroidreto de sódio a 4 mg/mL. A reação foi mantida nas mesmas condições por mais 2 h, ao final da qual é obtido o mAb-HRP. Embora Wisdom recomende a purificação do produto final por exclusão de tamanho, esta etapa não foi realizada pois não dispomos de colunas de gel filtração com resolução suficiente para separar proteínas com tamanhos próximos. Alternativamente, a amostra obtida após a conjugação foi precipitada com sulfato de amônio e dialisada contra PBS. O anticorpo conjugado com HRP obtido ao final do processo foi dosado e diluído 1:1 (v/v) em *Guardian Peroxidase Conjugate Stabilizer/Diluent* (Thermo Scientific) para armazenamento a 4°C.

3.3.8 Otimização da eficiência de conjugação de mAb-HRP

3.3.8.1 Adequações na reação de conjugação

Algumas modificações foram realizadas com o objetivo de melhorar a eficiência da reação de conjugação. Após dosagem, o volume necessário de mAbs (4 mg) foi dialisado em *SpectraPor 1 RC dialysis tubing 6K-8K MWCO 14,6 mm diameter* (Spectrum) contra 1L de tampão carbonato 10 mM pH 9,5 sob agitação, *overnight* a 4°C. O anticorpo foi então concentrado em Amicon Ultra-4 (Millipore) a 4000 x g em centrífuga refrigerada para volume final de 500 µL antes de ser adicionado à reação.

3.3.8.2 Purificação de mAbs-HRP por troca iônica

Para melhorar a pureza da amostra final obtida após o processo de conjugação, o mAb-HRP foi submetido a uma etapa de purificação por cromatografia líquida com o FPLC Äkta pure (GE Healthcare) em coluna de troca aniônica HiTrap Q HP 1 mL (GE Healthcare). Antes da realização da corrida, as amostras foram dialisadas em membrana *SpectraPor 1 RC dialysis tubing 6K-8K MWCO 14,6 mm diameter* (Spectrum) contra 1 L de tampão de ligação A e clarificadas por centrifugação para remoção de precipitados. O sistema foi previamente equilibrado

em tampão A antes do início da corrida. Detalhes sobre a composição dos tampões e métodos usados para eluição estão descritos abaixo. Ao final da corrida, as frações coletadas foram resolvidas por SDS-PAGE com gel a 13% e corados com Azul de Coomassie.

Tabela 2 – Composição dos tampões usados para purificação de mAb-HRP por troca iônica.

Tampão	Composição
A	<i>Fosfato de sódio 20mM pH 8,0</i>
B	<i>Fosfato de sódio 20mM pH 8,0; NaCl 1M</i>

Tabela 3 – Método 1 de purificação por troca iônica com coluna HiTrap Q HP 1mL.

Etapa	Composição
Fluxo	<i>0,5 mL/min</i>
Equilíbrio	<i>0,2 CV</i>
Injeção manual	<i>Loop 500μL</i>
Lavagem	<i>4 CV</i>
Eluição	<i>Gradiente de 0 – 100% de B em 15 CV</i>
Equilíbrio	<i>5 CV</i>

Tabela 4 – Método 2 de purificação por troca iônica com coluna HiTrap Q HP 1mL.

Etapa	Composição
Fluxo	<i>0,5 mL/min</i>
Equilíbrio	<i>0,2 CV</i>
Injeção manual	<i>Loop 1000μL</i>
Lavagem	<i>4 CV</i>
Eluição	<i>Gradiente de 0 – 50% de B em 15 CV e de 50 – 100% de B em 5 CV</i>
Equilíbrio	<i>5 CV</i>

3.4 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES RNS1 DE ZIKV, DENV E YFV EM CÉLULAS S2

3.4.1 Estratégia de clonagem

Para a expressão da proteína recombinante NS1 (rNS1) de ZIKV foi realizado um alinhamento das sequências completas deste vírus disponíveis no banco de dados GenBank, de forma a obter uma sequência consenso. No caso da proteína de YFV, a sequência foi baseada na cepa vacinal 17DD (GenBank U17066.1) com modificação para expressão em forma trimérica (RICCIARDI-JORGE; BORDIGNON; KOISHI; ZANLUCA *et al.*, 2017). A sequência utilizada para expressão de NS1 de DENV foi baseada no sorotipo 3. A região do genoma viral que codifica a proteína NS1 foi selecionada e teve seus códons otimizados para expressão em células S2 de *D. melanogaster*. Estas sequências foram sintetizadas (GenScript) com sítios para enzimas de restrição nas extremidades 5' e 3', permitindo sua clonagem no vetor para expressão de proteína secretada pMT/Bip/V5-His A, utilizando o kit *Drosophila Expression System* (Invitrogen). Após digestão e ligação dos insertos e vetor, *Escherichia coli* TOP10 quimiocompetentes (genótipo F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80/*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG*) foram transformadas e selecionadas quanto a sua resistência a ampicilina (100 μ g/mL). O DNA plasmidial obtido a partir das colônias positivas foi digerido com as enzimas específicas para cada construção de forma a confirmar a presença do inserto de interesse. Finalmente, foi realizado o sequenciamento pelo método de Sanger utilizando os iniciadores *MT Forward* e *BGH Reverse* (Invitrogen) para amplificar o sítio de clonagem múltipla do vetor e confirmar tanto a orientação quanto a fase de leitura do gene. Como resultado, a proteína de interesse apresentará o peptídeo sinal BiP em sua porção N-terminal, assim como a etiqueta V5 e cauda polihistidina na porção C-terminal.

3.4.2 Obtenção de linhagens estáveis expressando rNS1

Primeiramente, células S2 foram submetidas a uma transfecção transitória através da metodologia de fosfato de cálcio com as construções para expressão de rNS1 de ZIKV, DENV e YFV. Para isto, foram preparadas placas de 6 poços contendo

3×10^6 células/mL por poço em 3 mL de meio Schneider completo. A solução de transfecção foi preparada com a adição de 36 μ L de CaCl_2 2 M estéril a 19 μ g de DNA plasmidial (purificado com o kit *PureYield Plasmid Midiprep System* (Promega) e eluído em H_2O ultrapura estéril), completando o volume final para 300 μ L com H_2O ultrapura estéril. Esta solução foi adicionada lentamente sob homogeneização constante ao mesmo volume de tampão HBS 2x estéril (HEPES 50 mM, Na_2HPO_4 1,5 mM, NaCl 280 mM, pH 7,1). Após 40 min a T.A., o DNA precipitado foi adicionado lentamente sobre as células, seguido de incubação por 16 a 24h a 28°C. Finalmente, o fosfato de cálcio foi removido da cultura com duas lavagens usando meio de cultivo. A expressão da proteína recombinante foi induzida com 500 μ M de CuSO_4 e confirmada por IFI através da detecção da etiqueta V5 com o mAb anti-V5 (Invitrogen) diluído 1:5000 em PBS seguido de marcação com anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 (Invitrogen) diluído 1:800 em PBS e corante nuclear DAPI para visualização em microscópio óptico invertido de fluorescência LEICA AF6000.

Uma vez confirmado que os plasmídeos construídos eram funcionais, foi realizada a co-transfecção de células S2 com os plasmídeos pMT/Bip/V5-His A contendo o inserto de interesse e pCoBlast (Invitrogen). O plasmídeo pCoBlast apresenta o gene de resistência a blasticidina, permitindo a seleção de células transfectadas através do cultivo na presença deste antibiótico. A transfecção foi realizada da mesma forma descrita previamente, com a adição de 1 μ g de pCoBlast. No terceiro dia após transfecção, o meio de cultivo foi acrescido de 25 μ g/mL de blasticidina para dar início ao processo de seleção. Considerando que durante a transfecção as células podem internalizar apenas o vetor de seleção, as colônias celulares que apresentaram crescimento ao final de duas semanas foram triadas para verificar a expressão da proteína de interesse. A detecção de rNS1 foi realizada por IFI através da marcação contra a etiqueta V5, da mesma forma descrita previamente. Células que apresentaram sinal positivo foram selecionadas, expandidas e congeladas para geração de estoque. Além disto, os clones positivos foram sequenciados a fim de confirmar a presença da sequência de interesse e ausência de mutações.

3.4.3 Cultivo dos clones recombinantes

Células S2 foram mantidas em cultivo através de passagens bissemanais em meio Schneider suplementado com 7% de SBF, 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e, adicionalmente, 25 µg/mL do antibiótico de seleção blasticidina. A concentração de SBF foi reduzida para diminuir a presença de proteínas contaminantes provenientes da suplementação e facilitar a purificação da proteína de interesse.

3.4.3.1 Adaptação em meio SF900II

O processo de adaptação do clone selecionado em meio SF900II foi realizado ao longo de 4 passagens, onde o meio foi substituído gradualmente para remoção do SBF. Para isto, as células foram passadas nas seguintes preparações: 2 partes de Schneider completo para 1 parte de SF900II, 1 parte de Schneider completo para 1 parte de SF900II, 1 parte de Schneider completo para 2 partes de SF900II e, finalmente, apenas SF900II. As células foram mantidas em SF900II suplementado com 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, sem blasticidina até o momento do teste de expressão.

3.4.4 Otimização das condições de expressão de rNS1 em células S2

Uma vez selecionadas as linhagens estáveis expressando as proteínas de interesse, foi realizada a padronização das condições de expressão de forma a obter o maior rendimento possível.

3.4.4.1 Cinética de expressão

Após contagem em câmara de Neubauer, as células em cultivo foram diluídas até a concentração de 1×10^6 células/mL. A partir desta suspensão, 3 mL foram semeados em placas de cultivo com 6 poços de acordo com o teste a ser realizado. A indução das células com CuSO_4 a 500 µM foi realizada em diferentes tempos, sendo estes 24, 48, 72 ou 96 h após o plaqueamento. A coleta para processamento das amostras foi realizada 48, 72, 96 ou 120 h após a preparação das placas, descrita em

maior detalhe no tópico 3.4.5. A escolha da quantidade utilizada de células e a faixa de concentração do indutor foram baseadas nas instruções do fabricante do *kit*.

3.4.4.2 Concentração de CuSO₄

Células S2 recombinantes foram semeadas da mesma forma descrita previamente (item 3.4.4.1) e induzidas após 24 h para expressão de rNS1 de ZIKV e DENV, ou 48 horas para YFV. O estímulo foi realizado a partir de uma solução concentrada de CuSO₄ a 100 mM, usada de forma que a concentração final em cada poço fique a 300, 500, 700, 900 e 1200 μ M. As amostras foram coletadas após 96 horas para DENV e YFV ou 120 horas para ZIKV, seguindo os procedimentos descritos no tópico 3.4.5.

3.4.4.3 Concentração de células

O fabricante do *kit* de expressão em S2 recomenda a concentração de 1×10^6 células/mL para os testes de expressão em placas. Visando o escalonamento da expressão, foram usadas garrafas de cultivo com 300 cm², onde as células foram cultivadas em 70 mL de meio nas concentrações de 1×10^6 e $1,5 \times 10^6$ células/mL.

3.4.5 Coleta das frações secretada e retida

Após o tempo de expressão desejado, a monocamada de células foi coletada com auxílio de *cell scraper* e a suspensão total recuperada e centrifugada a 500 x g para separação do *pellet* de células e sobrenadante. O sobrenadante, que corresponde à *fração secretada*, foi transferido para um novo tubo/recipiente e armazenado a -20°C até o momento da análise e purificação da proteína de interesse.

Por outro lado, o *pellet* obtido foi incubado por 10 min em tampão de lise (**Tabela 5**) a 37°C para liberação do conteúdo intracelular. Após centrifugação, o sobrenadante (correspondendo à *fração retida*) foi separado dos *debris* celulares e transferido para um novo tubo. As amostras foram armazenadas a -20°C até o momento da análise e purificação.

Tabela 5 – Composição do tampão de lise celular

Componente	Concentração
Tris-HCl	50mM pH 7,8
NaCl	150mM
Nonidet P-40	1%
Coquetel inibidor de protease (Roche)	1x

3.4.5.1 Precipitação da fração secretada com sulfato de amônio

As quantidades necessárias de uma solução saturada de sulfato de amônio para realizar o *salting-out* foram determinadas seguindo a fórmula descrita por Wingfield (2001), de forma a ter saturação de 50, 70 e 90% na fração secretada. O processo foi realizado de forma similar ao descrito no item 3.3.6, onde a solução saturada gelada foi adicionada lentamente sob agitação a 4°C. O precipitado foi obtido por centrifugação e recuperado em volume mínimo de PBS, dialisado contra PBS para remoção de sulfato de amônio antes de dar continuidade ao processo de purificação.

3.4.6 Purificação de rNS1 por afinidade

A partir de uma suspensão de S2 expressando rNS1, 100×10^6 células foram semeadas em garrafas de 300 cm² em um volume total de 70 mL de meio Schneider suplementado com 7% de SBF, 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, sem blasticidina. As células foram induzidas com CuSO₄ e mantidas em cultivo até o momento da coleta, determinado a partir da cinética de expressão. As frações obtidas ao final da purificação foram quantificadas por SDS-PAGE com gel a 13% comparando a uma curva padrão de soro albumina bovina (BSA) em *software* de análise ImageJ (National Institutes of Health). Paralelamente, o mesmo procedimento foi realizado com células S2 selvagens, de forma a obter o antígeno negativo, usado como controle para o ELISA.

3.4.6.1 Purificação a partir da fração secretada

Antes de realizar a purificação, a fração secretada obtida do cultivo das células expressando rNS1 foi dialisada em membrana de 3,5K MWCO (*SnakeSkin Dialysis Tubing*, Thermo Scientific) contra o tampão de ligação *overnight* a 4°C, sob agitação

e com pelo menos uma troca do tampão, em um volume 25 vezes maior que o volume da amostra. Esta etapa garante a remoção do indutor CuSO_4 , uma vez que ele pode interferir na ligação da proteína à resina. Em seguida, a amostra foi clarificada por centrifugação para remoção de precipitado e incubada sob agitação a 4°C por 1 h com resina Ni-NTA (Qiagen) previamente equilibrada com tampão de ligação. A amostra com resina foi então empacotada em colunas Poly-Prep (Bio-rad) para dar início à purificação. O volume eluído nesta etapa corresponde à fração não ligada à resina, chamado de *flowthrough*. A remoção de moléculas ligadas com baixa afinidade à resina foi feita em duas lavagens com 5 vezes o volume de resina de tampão contendo uma baixa concentração de imidazol. A etapa de eluição foi realizada no formato *one-step* com tampão contendo uma alta concentração de imidazol e quatro vezes o volume da resina. Detalhes sobre a composição dos tampões usados estão discriminados na Tabela 6. A proteína purificada foi coletada em frações de $500\ \mu\text{L}$, aliquotada para análise por SDS-PAGE em gel a 13% e *Western blot* e o restante armazenado a -20°C . Com o objetivo de verificar a eficiência do processo, alíquotas de todas as etapas descritas foram coletadas, assim como uma pequena parte da resina após o término da purificação.

Tabela 6 – Composição dos tampões usados para purificação por afinidade de rNS1 a partir da fração secretada.

Tampão	Composição
Ligação	NaH_2PO_4 50 mM pH 8,0; NaCl 500mM
Lavagem	NaH_2PO_4 50 mM pH 8,0; NaCl 300mM; Imidazol 20mM
Eluição	NaH_2PO_4 50 mM pH 8,0; NaCl 300mM; Imidazol 500mM

3.4.6.2 Purificação a partir da fração retida

As células foram coletadas da garrafa com auxílio de um *cell scraper* e lavadas em PBS antes de serem submetidas a duas rodadas de lise (descrita em 3.4.5). A fração retida obtida do sobrenadante da centrifugação do lisado foi dialisada em membrana 3,5K MWCO contra o tampão de diálise *overnight* a 4°C sob agitação, com pelo menos uma troca de tampão. A amostra foi então incubada com resina Ni-NTA previamente equilibrada (tampão de equilíbrio) por 3 h a 4°C sob agitação, antes de ser empacotada em coluna Poly-Prep. O *flowthrough* foi coletado e a remoção de moléculas ligadas com baixa afinidade à resina foi feita com um tampão de lavagem

contendo uma concentração reduzida de imidazol. O processo de eluição foi realizado em duas etapas com alta concentração de imidazol, em pHs diferentes. Detalhes sobre a composição dos tampões usados estão discriminados na Tabela 7. As amostras resultantes do processo de purificação foram coletadas em frações de 500 μ L, aliquotadas para análise em gel SDS-PAGE e o restante armazenado a -20°C. Com o objetivo de verificar a eficiência do processo, alíquotas de todas as etapas descritas foram coletadas, assim como uma pequena parte da resina após o término da purificação.

Tabela 7 – Composição dos tampões usados para purificação por afinidade de rNS1 a partir da fração retida.

Tampão	Composição
Diálise	<i>Tris-HCl 50mM pH 8,0; NaCl 150mM</i>
Equilíbrio da resina	<i>Tris-HCl 50mM pH 8,0; NaCl 150mM; Imidazol 10mM</i>
Lavagem	<i>Tris-HCl 50mM pH 8,0; NaCl 150mM; Imidazol 20mM</i>
Eluição 1	<i>Tris-HCl 50mM pH 8,0; NaCl 150mM; Imidazol 500mM</i>
Eluição 2	<i>Tris-HCl 50mM pH 6,0; NaCl 150mM; Imidazol 500mM</i>

3.4.7 SDS-PAGE e *Western Blot*

As amostras obtidas ao longo do processo foram analisadas por SDS-PAGE sob condições desnaturantes com o sistema de eletroforese vertical *Mini-PROTEAN Tetra cell* (Bio-rad). Para isto, as amostras foram desnaturadas por 5 min a 95°C na presença de tampão de amostra 4x (três partes de amostra para uma parte de tampão) e aplicadas em gel formado por um gel de empacotamento a 4% e de separação a 13%. A corrida foi realizada inicialmente a 80 V até que as amostras entrassem no gel de separação, e então a corrente foi aumentada para 100 - 120V até o final da corrida. Em grande parte das análises, as amostras foram resolvidas simultaneamente em dois géis, sendo um destinado à coloração com Azul de *Coomassie* (Brilliant Blue R-250 0,1% (m/v) (Sigma-Aldrich), metanol 50% (v/v) e ácido acético 10% (v/v) em água pura) para visualização de proteínas totais e outro utilizado para *Western Blot* (WB) para detecção de antígenos específicos.

As proteínas resolvidas em SDS-PAGE foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Amersham Protran 0,45 μ M NC, Amersham Biosciences) em sistema

de transferência semisseca *Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell* (Bio-rad), a 12 V por 40 min. A eficiência do processo foi verificada por coloração com solução de vermelho Ponceau (Ponceau S a 0,5% (m/v) (Sigma-Aldrich), ácido acético 1% (v/v) em água pura). Após remoção do corante com água deionizada, a membrana foi bloqueada com TBS acrescido de 5% (m/v) de leite desnatado (Molico, Nestlé). A detecção da proteína de interesse rNS1 se deu pela marcação com o anticorpo primário anti-V5 (Invitrogen) 1:5000 (v/v) ou 12B8/2E3 1:100 (v/v), ambos diluídos em tampão de bloqueio. Em seguida, a membrana foi incubada com anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (Promega) diluído 1:7500 (v/v) em tampão de bloqueio. Todas as etapas foram incubadas por 1 h a T.A. sob agitação e intercaladas por três lavagens com TBS para remoção de proteínas não ligadas ou ligadas com baixa afinidade. A proteína de interesse foi visualizada com o substrato NBT (nitroblue tetrazolium) e BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) (Promega) diluído em tampão de fosfatase alcalina (Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM e MgCl₂ 5 mM em água pura), segundo instruções do fabricante. A reação foi interrompida com lavagem da membrana em água corrente.

3.5 VALIDAÇÃO DOS INSUMOS PRODUZIDOS

3.5.1 Controle de qualidade dos mAbs anti-ZIKV

Células S2 expressando rNS1 de ZIKV foram semeadas em placas de 96 poços para testar a reatividade dos anticorpos monoclonais selecionados por IFI, de forma semelhante ao descrito no item 3.3.4. Células foram induzidas com concentração pré-estabelecida de CuSO₄ e incubadas *overnight* a 28°C antes da fixação e permeabilização com metanol:acetona (1:1) a -20°C. Sobrenadante obtido do cultivo dos hibridomas foi adicionado aos poços e a marcação foi visualizada com anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 e DAPI em microscópio óptico invertido de fluorescência LEICA AF6000 ou em sistema automatizado Operetta CLS (Perkin Elmer). Além disto, a funcionalidade dos mAbs após a purificação, assim como a eficiência do processo também foi avaliada neste mesmo sistema. Alternativamente, as frações foram testadas em placas de C6/36 infectadas com ZIKV ZV BR 2015/15261 na multiplicidade de infecção de 1 (MOI = 1). Em ambos os casos,

as amostras obtidas foram utilizadas como anticorpo primário e a marcação visualizada como descrito anteriormente.

3.5.2 ELISA indireto

Módulos de placa de ELISA *Maxisorp* (Nalge Nunc) foram sensibilizados *overnight* a 4°C com a concentração desejada de proteína recombinante rNS1 diluída em tampão carbonato-bicarbonato (bicarbonato de sódio a 34,28 mM e carbonato de sódio a 15,72 mM, pH 9,6). Após 5 lavagens com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T), a placa foi bloqueada com 200 µL/poço de PBS-T contendo 2% de leite por 1 hora a 37°C. Anticorpos monoclonais purificados foram diluídos em tampão de bloqueio (PBS-T contendo 2% de leite) e adicionados aos poços. Além disto, como controle positivo foi utilizado o mAb anti-V5 (diluído 1:400 (v/v) em tampão de bloqueio). A reação foi revelada com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com HRP (Sigma) diluído em tampão de bloqueio. Todas as incubações com anticorpos foram realizadas em volume de 50 µL/poço por 1 h a 37°C, seguidas de cinco lavagens com 200 µL/poço de PBS-T para remoção de proteínas não ligadas. Ao final do processo, foram adicionados 50 µL/poço do revelador TMB (KPL) e, após 10 min de incubação a T.A. ao abrigo da luz, a reação foi interrompida pela adição de 50 µL/poço de ácido sulfúrico 2M. Os dados brutos foram obtidos em espectrofotômetro Synergy H1 (Biotek) a 450nm. Para interpretação dos resultados, o valor da D.O._{450nm} obtida para o branco da reação foi subtraído de todas as amostras. Além disto, o valor obtido para o antígeno negativo também foi descontado das amostras com antígeno positivo.

3.5.3 ELISA direto

Módulos de placa de ELISA *Maxisorp* foram sensibilizados por 4 h com a concentração desejada de proteína recombinante (rNS1 ou rNS1 precipitada com sulfato de amônio (PPT50)) diluída em tampão carbonato-bicarbonato. Os poços foram bloqueados com 200 µL/poço de tampão de bloqueio por 1 h a 37°C antes da adição dos mAbs conjugados 12B8-HRP, 1F12-HRP ou 2E6-HRP, produzidos *in house* (diluídos em PBS-T acrescido de SBF a 10% (v/v)). Após incubação de 1 h a

37°C, a reação foi revelada e os resultados analisados como descrito no item 3.5.2. Entre cada etapa foram realizadas cinco lavagens com PBS-T para remoção de proteínas não ligadas.

3.6 PADRONIZAÇÃO DO ELISA DE CAPTURA PARA NS1 DE ZIKV

3.6.1 Otimização das condições da reação

Diferentes parâmetros foram avaliados para a padronização do teste, entre eles, o tipo de bloqueio, a eficiência dos mAbs anti-NS1 de ZIKV 12B8, 1F12 e 2E6, assim como a eficiência dos anticorpos de detecção produzidos *in house* (12B8-HRP, 1F12-HRP e 2E6-HRP), em diferentes combinações. Para o bloqueio, foram testadas as soluções SBF a 10% (v/v), leite desnatado (Molico, Nestlé) a 2% e 5% (m/v) e BSA a 5% (m/v), todas preparadas em PBS-T. A concentração de anticorpos de captura e detecção foi determinada no formato *checkerboard*, no qual diluições seriadas de cada mAb foram avaliadas independentemente. As condições escolhidas para padronização do teste foram baseadas na menor concentração de mAbs possível sem haver queda significativa na D.O._{450nm}.

3.6.2 Validação com NS1 nativa

Para obter a proteína NS1 nativa, 5×10^5 células Vero foram semeadas em duas garrafas de cultura de 25 cm². No dia seguinte, uma destas foi infectada com ZIKV ZV BR 2015/15261 com MOI 1 e mantida a 37°C, 5% de CO₂ por 3 dias. O sobrenadante de ambas as garrafas foi coletado, centrifugado para remoção de restos celulares e usado no ELISA de captura, como a amostra contendo NS1 nativa (células infectadas) e o seu respectivo controle negativo, células não infectadas (*Mock*).

3.6.3 ELISA de captura para NS1 de ZIKV

3.6.3.1 Comitê de ética

Todos os procedimentos que envolvem amostras humanas usadas neste estudo foram previamente aprovados pela Comitê Nacional de Ética sob o número CAAE 42481115.7.0000.5248.

3.6.3.2 Procedimento

Módulos de placas de ELISA *Maxisorp* foram sensibilizados *overnight* a 4°C com 50 µL/poço de anticorpo de captura (12B8, 1F12 ou 2E6) diluído a 5 µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato. O bloqueio de sítios inespecíficos foi realizado com 200 µL/poço de SBF a 10% (v/v) em PBS-T por 1 h a 37°C. As amostras analisadas foram adicionadas à placa (50 µL/poço), sendo elas proteínas NS1 recombinantes de ZIKV ou de *orthoflavivirus* relacionados, ou ainda amostras biológicas (soro de pacientes com infecção natural por ZIKV) contendo NS1 nativa. Em cada caso, o controle positivo (rNS1) e branco da reação foram preparados no mesmo diluente da amostra analisada (tampão de bloqueio ou soro/urina de doador saudável). Após incubação por 1 h a 37°C, foram adicionados 50 µL/poço de anticorpo de detecção (12B8-HRP ou 1F12-HRP ou 2E6-HRP), mantendo as placas nas mesmas condições. Entre cada etapa do ELISA, foram realizadas 5 lavagens com 200 µL/poço de PBS-T, para remoção de proteínas não ligadas. A reação de revelação foi iniciada pela adição de 50 µL/poço do substrato TMB, mantendo a placa sob abrigo da luz por 10 min a T.A.. A reação foi interrompida com 50 µL/poço de ácido sulfúrico 2 M para leitura por espectrometria usando a leitora Synergy H1 no comprimento de onda de 450 nm. Os dados brutos obtidos foram corrigidos pela subtração do valor do branco da reação de todas as amostras testadas. Vale ressaltar que, no caso de manipulação de amostras biológicas, a diluição das amostras, adição à placa, assim como as lavagens ao final da incubação, foram realizadas em cabine de segurança biológica de nível 2.

3.6.3.3 Tratamento de soro humano com sulfato de amônio saturado (SAS) ou EDTA

Amostras de soro de doadores saudáveis foram tratadas com sulfato de amônio saturado na concentração final de 9% antes da adição da proteína alvo. Independentemente, também foi realizado o tratamento com EDTA em concentrações variando de 1 a 50 mM por 15 min antes da adição de rNS1 à amostra. Em ambos os

tratamentos, a proteína recombinante foi misturada em concentração conhecida e comparada ao grupo de soro sem tratamento, assim como ao grupo onde a proteína foi diluída em tampão de bloqueio.

3.7 CINÉTICA DE EXPRESSÃO DE NS1 DE ZIKV EM CÉLULAS DE LINHAGEM DE ORIGEM HUMANA E DE MOSQUITO

3.7.1 Triagem das condições para infecção

Foram selecionadas as linhagens humanas A549, Huh7.5, JEG-3 e BeWo, e a linhagem de inseto C6/36 para o estudo da expressão de NS1 durante a infecção por ZIKV. Para isto, primeiramente foi realizada uma triagem de diferentes MOI para infecção com ZIKV MR766, ZV BR 2015/15261 e ZV BR 2016/16288. As células foram semeadas em placas pretas de 96 poços (Greiner) na densidade de 1×10^4 para as linhagens humanas ou 2×10^4 /poço, no caso de C6/36, aproximadamente 16 h antes da infecção. Os estoques virais foram diluídos de forma seriada em DMEM-F12 ou L-15 na ausência de SFB. Após remoção do meio, 50 μ L da suspensão viral foram adicionados em cada poço, exceto no controle sem infecção (*Mock*). As placas foram mantidas por 1 h em incubadora a 37°C ou 28°C, antes da remoção do inóculo e adição de 200 μ L de meio completo de acordo com cada célula (descrito em 3.1). Após 24, 48 e 72 h do momento da infecção, o meio de cultivo foi removido e a monocamada fixada com 200 μ L de metanol:acetona (1:1). As placas foram mantidas a -20°C até o momento da marcação. A solução fixadora foi removida por inversão e as placas foram mantidas a T.A. até os poços estarem completamente secos. A infecção foi detectada pela marcação com o mAb panflavivirus 4G2, diluído 1:200 (v/v) em PBS contendo BSA a 1% (m/v), por 1 h a 37°C. Após três lavagens com PBS-T, foram adicionados o mAb anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 juntamente com os corantes DAPI e Azul de Evans, diluídos em PBS contendo BSA a 1% (m/v). Ao final da incubação de 1 h a 37°C, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T e armazenadas a 4°C em PBS até o momento da leitura.

3.7.1.1 Aquisição em imagens em Operetta CLS High Content Analysis System

A leitura das placas foi realizada em sistema automatizado no equipamento Operetta (PerkinElmer), com a objetiva de 40 vezes. Os resultados foram analisados com o *software* Harmony (PerkinElmer), no qual células positivas e negativas foram discriminadas baseadas no ponto de corte calculado como a média de fluorescência do *Mock* somado de três vezes o desvio padrão. Os limites celulares são reconhecidos pelo *software* através da marcação de núcleo (DAPI) e citoplasma (Azul de Evans), onde uma célula é considerada positiva quando o antígeno marcado se encontra na região citoplasmática e apresente intensidade de fluorescência acima do valor de corte.

3.7.2 Preparação das amostras para análise por citometria de fluxo (FACS)

3.7.2.1 Análise da viabilidade celular com iodeto de Propídeo (PI)

Células A549, JEG-3 e C6/36 foram semeadas em placas de 24 poços na densidade de 2×10^5 /poço, aproximadamente 16 h antes da infecção. Os estoques virais de ZIKV MR766 e ZV BR 2015/15261 foram diluídos em DMEM-F12 ou L-15 na ausência de SFB em diferentes concentrações, dependendo da linhagem celular. Após remoção do meio das placas, 200 μ L da suspensão viral foram adicionados em cada poço, exceto no *Mock*, onde foi adicionado apenas o meio. As placas foram mantidas por 1 h em incubadora a 37°C ou 28°C, antes da remoção do inóculo e adição de 600 μ L de meio suplementado (descrito em 3.1). Após 24, 48 e 72 h do momento da infecção, as células foram coletadas dos poços com auxílio de tripsina, no caso de células de origem humana, ou por jateamento da monocamada, no caso de C6/36. Vale ressaltar que o sobrenadante de infecção foi coletado e combinado à monocamada destacada, de forma a analisar as células que se encontravam em suspensão nos poços. As amostras foram centrifugadas a 600 x g e lavadas uma vez com PBS para remoção do meio de cultivo. O *pellet* obtido ao final do processo foi recuperado em 300 μ L de PBS, sendo que 100 μ L da suspensão foram transferidos para placas de 96 poços com fundo côncavo para marcação de viabilidade celular. Para isto, as células foram marcadas com 1 μ g/mL do corante iodeto de propídeo (PI, BD Biosciences) por 15 min a T.A. sob abrigo da luz. Como controle positivo, metade

de uma suspensão de células não infectadas foi morta por aquecimento (60°C, 10 min) e combinada ao restante da suspensão antes da marcação com PI. Sendo assim, espera-se que cerca de 50% da amostra seja PI+. As amostras foram adquiridas imediatamente após o término da incubação no citômetro de fluxo CytoFLEX LX (Beckman Coulter). Os dados brutos foram analisados com o *software* FlowJo v10, sendo que os dados obtidos foram normalizados com relação ao *Mock* correspondente.

3.7.2.2 Análise da taxa de infecção viral e expressão de NS1 associada à célula

O restante de cada amostra (200 µL) foi fixado com paraformaldeído (concentração final 2%) por 1 h a T.A.. As células foram centrifugadas e lavadas com 500 µL de PBS a 650 x g para remoção da solução fixadora. Cada amostra foi recuperada em 200 µL de PBS, sendo que o volume total foi dividido em dois, gerando dois poços por replicata, e transferido para placa de 96 poços de fundo côncavo. Isto permitiu que a mesma amostra fosse analisada com dois anticorpos com reatividades distintas (4G2, contra a proteína de envelope e 12B8/2E3, contra a proteína NS1). As amostras foram mantidas a 4°C até todos os *timepoints* serem coletados. Para marcação, primeiramente as células foram sedimentadas por centrifugação a 1962 x g por 3 min e o PBS removido por inversão. As células foram permeabilizadas com 200 µL/poço de *perm/wash* (P/W, BD Biosciences) por 40 min a 4°C, para permitir a marcação intracelular dos antígenos de interesse. Ao final da incubação, as placas foram centrifugadas e incubadas com o mAb 4G2 (diluído 1:200 ou 1:100, no caso de C6/36, (v/v) em P/W) ou 12B8 (diluído 1:400 (v/v) em P/W) por 1 h a 37°C. As células foram lavadas três vezes com 200 µL de P/W para remoção de anticorpos não ligados antes da marcação com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 (diluído 1:400 (v/v) em P/W). As placas foram lavadas três vezes, sendo duas com P/W e a última com PBS. Cada amostra foi recuperada em 200 µL de PBS para aquisição por citometria de fluxo no CytoFLEX LX.

3.7.3 Dosagem de NS1 livre e associada à célula por ELISA de captura

Células foram semeadas em placas de 96 poços ou 24 poços na densidade de 1×10^4 em 200 µL ou 2×10^5 em 600 µL, respectivamente. Após 24, 48 e 72 h do momento da infecção, o sobrenadante foi coletado e transferido para uma nova placa

para armazenamento. As placas contendo a monocamada infectada e as placas contendo o sobrenadante foram mantidas a -80°C até o momento de uso. No dia da dosagem, o sobrenadante foi descongelado a T.A., homogeneizado e 50 μL foram transferidos para a placa de ELISA previamente sensibilizada e bloqueada. Aos poços contendo a monocamada, foram adicionados 50 μL ou 200 μL de tampão de lise (**Tabela 5**), dependendo da área da placa. Após 10 min a 37°C , as amostras foram homogeneizadas e seu volume ajustado para 200 μL ou 600 μL com o meio de cultivo correspondente, de forma a manter o volume igual ao sobrenadante e diluir a concentração final de detergente usado. O ELISA de captura foi realizado conforme mencionado no item 3.6.3, embora a etapa de incubação com as amostras tenha sido realizada por 2 h e as lavagens realizadas em cabine de segurança biológica de nível 2. Além disto, foi realizada uma curva padrão através da diluição seriada da proteína rNS1, usada para interpolar os valores de D.O._{450nm} obtidos para as amostras, e determinar a concentração destas.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados com o *software* GraphPad Prism 8, utilizando o teste não pareado t de Welch. Os resultados foram apresentados pela média dos valores e desvio padrão de três experimentos independentes. Ns se $p > 0,05$; * se $p \leq 0,05$; ** se $p \leq 0,01$; *** se $p \leq 0,001$.

4 RESULTADOS

4.1 PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE RNS1 DE ZIKV

4.1.1 Otimização das condições de expressão de rNS1 de ZIKV

A sequência da proteína NS1 de ZIKV havia sido previamente clonada utilizando o Drosophila Expression System (Invitrogen) para expressão em células S2 de *D. melanogaster*. Esta estratégia de clonagem consiste no uso do vetor pMT/BiP/V5-His-A para produção e secreção da proteína de interesse após indução com CuSO₄. Desta forma, uma etiqueta V5 e cauda de histidina são adicionadas à proteína, permitindo sua identificação por imunomarcação. A integridade das sequências clonadas foi confirmada por sequenciamento, sendo que dentre os clones positivos obtidos, dois foram escolhidos para a triagem, a fim de selecionar o que apresentava maior nível de expressão.

4.1.1.1 Cinética de expressão

Diversos testes foram realizados com o objetivo de determinar quais as melhores condições para a obtenção da proteína recombinante no sobrenadante de cultura (fração secretada). Embora a purificação da proteína a partir da fração retida seja possível, o processo é dificultado pela presença de contaminantes proveniente da lise das células expressando a proteína de interesse.

Sendo assim, a primeira etapa de otimização foi realizada através de uma cinética de expressão de rNS1 com tempos variáveis de indução e coleta (**Figura 10**). Para isto, os clones em cultivo foram semeados em placas de 6 poços e induzidos com CuSO₄, seguindo as concentrações inicialmente sugeridas pelo fabricante. Uma vez atingido o tempo de incubação desejado, foram coletados o sobrenadante do cultivo e o pellet das células, a partir do qual é obtida a fração retida. Estas amostras foram então resolvidas em gel SDS-PAGE e analisadas por WB marcado com anticorpo anti-V5.

A expressão de rNS1 foi detectada com sucesso tanto no pellet quanto no sobrenadante do clone S2-rNS1-ZIKV1, sendo que em ambos os casos sua expressão é dependente da presença do indutor CuSO₄, uma vez que nas amostras

não induzidas não é observada nenhuma banda (**Figura 10A e B**). Por outro lado, no caso do clone S2-rNS1-ZIKV2, a proteína foi detectada somente na fração retida, em níveis mais baixos que os detectados para o clone S2-rNS1-ZIKV1 (**Figura 10 C**). Embora seja possível que este clone esteja secretando a proteína de interesse e isto seja verificado em um piloto de expressão em maior volume, os testes foram continuados apenas com o clone que apresentou maior expressão proteica.

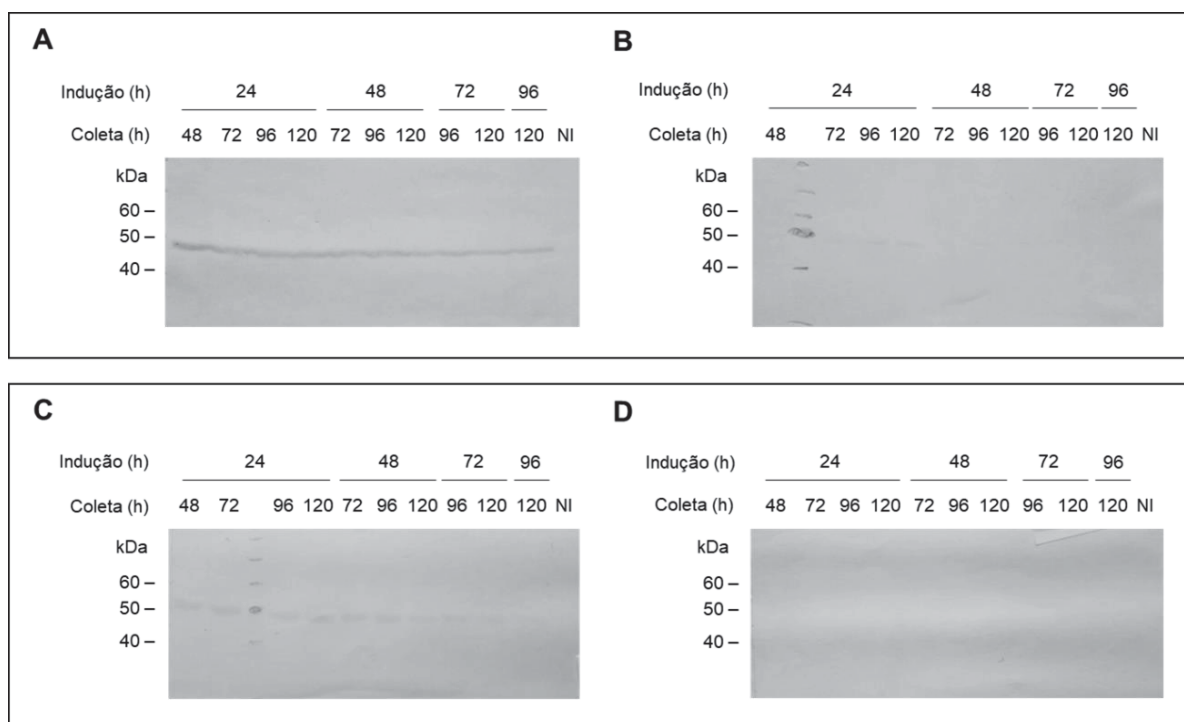


Figura 10 – Cinética expressão de rNS1. Células foram induzidas com CuSO_4 24, 48, 72 e 96 horas após o plaqueamento. As coletas de cada tratamento foram realizadas em diferentes timepoints para análise por WB com mAb anti-V5. *Pellet* (**A**) e *sobrenadante* (**B**) do clone S2-rNS1-ZIKV1. *Pellet* (**C**) e *sobrenadante* (**D**) do clone S2-rNS1-ZIKV2. NI – Controle não induzido. Tamanho esperado da banda referente à NS1: 46 – 55 kDa.

Observando a cinética de expressão do clone S2-rNS1-ZIKV1, é possível notar um nível constante de rNS1 ao longo do tempo nas amostras correspondentes à fração retida (**Figura 10A**). O mesmo não ocorre nas amostras da fração secretada, onde nota-se que a banda de maior intensidade corresponde à amostra “indução 24 h / coleta 120 h” (**Figura 10B**). Considerando que o uso da fração secretada como amostra inicial apresenta menos contaminantes e o processo de purificação é menos dispendioso, foi determinada que esta seria a melhor condição para expressão de rNS1.

4.1.1.2 Concentração do indutor

Uma vez otimizado o tempo para expressão da proteína de interesse, a próxima etapa consistiu em selecionar a melhor concentração de indutor a ser usado. Para isto, as células foram semeadas em placas de 6 poços e induzidas após 24 horas com concentrações crescentes de CuSO_4 , sendo estas 300, 500, 700, 900 e 1200 μM . As amostras foram coletadas, processadas 120 horas após a preparação da placa e analisadas da mesma forma descrita anteriormente.

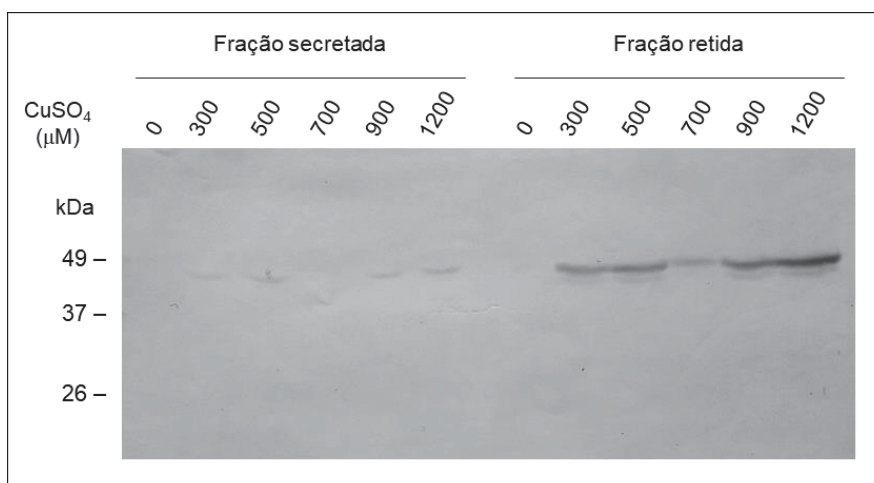


Figura 11 – Expressão de rNS1 com concentrações variáveis de CuSO_4 . Células S2-rNS1-ZIKV1 foram induzidas 24 horas após o plaqueamento com concentrações crescentes do indutor CuSO_4 . Após 120 horas do plaqueamento, as frações secretada e retida foram analisadas por WB marcado com mAb anti-V5. Tamanho esperado da banda referente à NS1: 46 – 55 kDa.

É possível notar que a intensidade das bandas referentes a rNS1 está diretamente ligada à concentração do indutor, sendo que a indução com 1200 μM de CuSO_4 resultou no maior nível de expressão da proteína recombinante, tanto na fração retida quanto na fração secretada (**Figura 11**). A indução com 700 μM apresentou as bandas de menor intensidade dentre todas as amostras (**Figura 11**, amostra 4). Isto pode ser devido a problemas na coleta e processamento da amostra, uma vez que o uso de maiores concentrações de CuSO_4 levou ao aumento da expressão de rNS1. Embora seja possível que concentrações acima das testadas levem ao aumento da produção da proteína de interesse, sabe-se que o excesso de CuSO_4 pode afetar o metabolismo celular (JOHANSEN; VAN DER STRATEN; SWEET; OTTO *et al.*, 1989), além de dificultar o processo de purificação, uma vez que a presença de cobre na amostra pode interferir na ligação proteína-resina (LEHR; ELEFANTE; KIKLY;

O'BRIEN *et al.*, 2000). Baseado nestas informações, foi determinado que a concentração de CuSO_4 a ser usada seria a de $1200 \mu\text{M}$.

4.1.1.3 Meio de cultivo

Embora amostras obtidas da fração secretada apresentem menos contaminantes que a fração retida, conforme discutido anteriormente, um dos principais contaminantes em amostras obtidas do sobrenadante é a albumina presente em altas concentrações no SBF utilizado na suplementação do meio de cultivo. Como uma tentativa de reduzir a quantidade de albumina presente na amostra a ser purificada, foi feito um teste para expressão de rNS1 em meio SF900II, cuja composição permite cultivo das células S2 sem adição de SBF.

Para não afetar a viabilidade das células S2-rNS1-ZIKV1, foi feita uma transição gradual do meio Schneider completo para SF900II até que o SBF fosse completamente removido e as células estivessem adaptadas ao novo meio antes da realização do ensaio. Apesar deste meio ser adequado para o crescimento de S2, em alguns casos a remoção total de SBF pode fazer com que as células parem de produzir a proteína recombinante. A fim de verificar se a expressão foi mantida após a transição para o novo meio de cultivo, o clone S2-rNS1-ZIKV1 foi induzido e comparado às células mantidas no meio de manutenção da cultura (Schneider). Por se tratar apenas de um teste confirmatório, as células foram induzidas logo após serem semeadas e as frações secretada e retida foram obtidas 24 horas após estimulação.

Como pode ser observado na Figura 12, o clone em questão continuou expressando rNS1, uma vez que a proteína foi detectada em ambas as frações secretada e retida quando cultivado em meio SF900II. Curiosamente, as células em meio SF900II não estimuladas expressam rNS1 na fração retida em níveis semelhantes aos observados na presença de CuSO_4 , o que não ocorre com o clone cultivado em Schneider. Por outro lado, a quantidade de proteína presente na fração secretada resultante da expressão em SF900II parece ser equivalente à proteína obtida com o meio Schneider, o que é um indicativo de que este meio pode ser usado, embora seja necessário realizar um piloto nas condições de expressão estabelecidas anteriormente para confirmar isto.

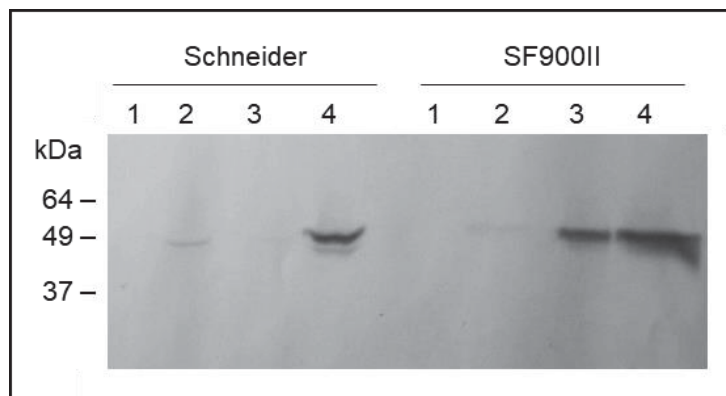


Figura 12 – Teste de expressão em meio SF900II. Células S2-rNS1-ZIKV1 foram induzidas em diferentes meios de cultivo contendo CuSO_4 (indução 0 h/ coleta 24 h). As amostras foram coletadas e analisadas por WB marcado com mAb anti-V5. Amostras: 1- Fração secretada sem indução, 2- Fração secretada após indução com CuSO_4 1200 μM , 3- Fração retida sem indução, 4- Fração retida após indução com CuSO_4 1200 μM . Tamanho esperado da banda referente à NS1: 46 – 55 kDa.

4.1.1.4 Densidade celular

Uma vez que as condições de expressão de rNS1 foram otimizadas, foi realizado o escalonamento para produção da proteína em garrafas de 300 cm^2 . Para isto, foram testadas duas concentrações diferentes de células, 1×10^6 células/mL ou $1,5 \times 10^6$ células/mL, sendo que a primeira corresponde a mesma quantidade usada nos testes anteriores (sugerido pelo fabricante). Valores superiores a estes poderiam levar à saturação do cultivo devido à proliferação celular, podendo levar à morte e menor rendimento de proteína. Ao realizar a manutenção do clone S2-rNS1-ZIKV1, foi notado que as células semeadas em meio SF900II apresentam um tempo maior de multiplicação em comparação com o meio Schneider, possivelmente pela ausência de SBF. Levando isto em consideração, para condição em meio SF900II foi realizado apenas um piloto com a concentração mais alta de células ($1,5 \times 10^6$ células/mL).

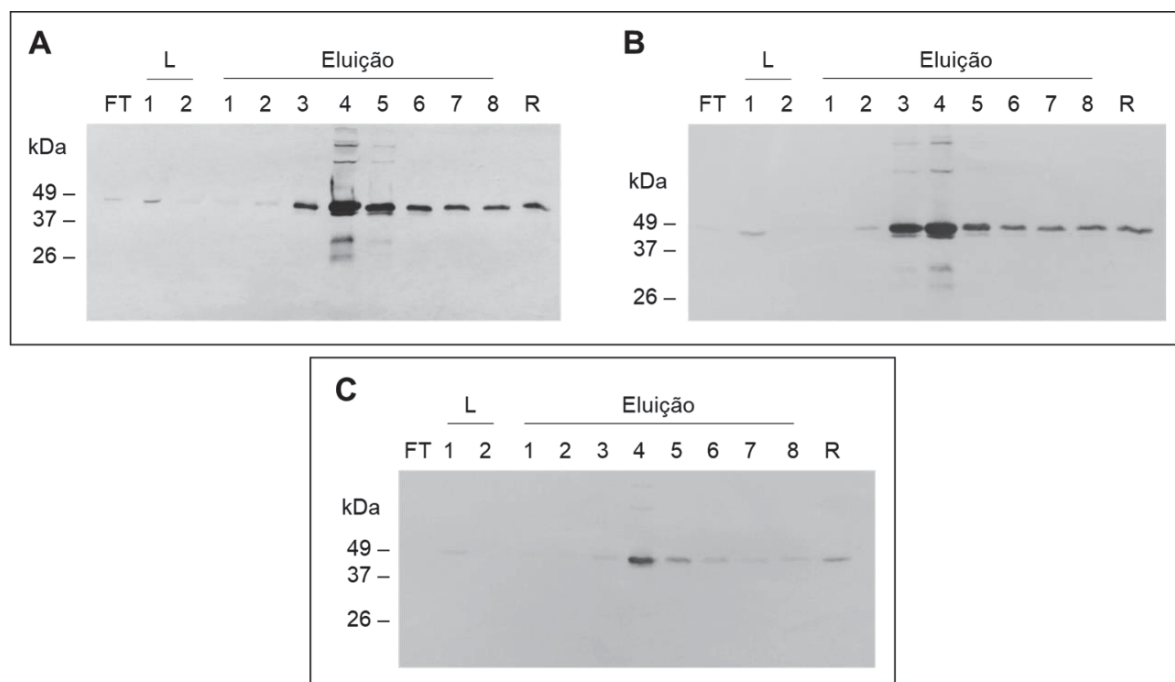


Figura 13 – Piloto de expressão de rNS1 para comparação do rendimento em meio Schneider e SF900II. Sobrenadante do cultivo foi purificado por afinidade à resina Ni-NTA. As amostras obtidas foram analisadas por WB marcado com mAb anti-V5. Purificação da fração secretada em Schneider com 1×10^6 células/mL (A) e $1,5 \times 10^6$ células/mL (B). Purificação da fração secretada em SF900II com $1,5 \times 10^6$ células/mL (C). Amostras: FT- *Flowthrough*, L- Lavagem da resina, R- Resina Ni-NTA. Tamanho esperado da banda referente à NS1: 46 – 55 kDa.

Primeiramente, podemos observar na Figura 13 que o protocolo utilizado para purificação por afinidade foi adequado para obtenção da proteína recombinante a partir do sobrenadante de cultivo (fração secretada). No entanto, a presença da banda referente a rNS1 no *flowthrough*, na etapa de lavagem e na resina após a eluição, é um indício que o protocolo ainda poderia ser otimizado para melhorar a eficiência do processo.

Analisando o WB, não é observada uma diferença expressiva no rendimento de rNS1 quando comparamos o piloto em Schneider com 1×10^6 ou $1,5 \times 10^6$ células/mL (Figura 13A e B) mas, a dosagem do conjunto das frações eluídas revelou que a concentração é mais alta quando a densidade celular é maior.

Embora a intensidade das bandas nas frações secretadas com os meios Schneider e SF900II 24 horas após indução tenham sido semelhantes (Figura 12), é possível notar que no piloto a quantidade de rNS1 produzida em SF900II é significativamente menor (Figura 13C) em comparação com o meio Schneider (Figura 13A e B). É possível que isto ocorra devido à diferença no tempo de

multiplicação das células no meio SF900II e, portanto, fica mais evidente quando a coleta é realizada 120 horas após o plaqueamento.

Apesar do uso do meio SF900II ser atraente pois proporciona uma amostra com menos contaminantes, o menor rendimento de rNS1 na fração secretada não é vantajoso, já que seria necessário um volume muito maior de sobrenadante em comparação com as células cultivadas em meio Schneider. Isto tornaria o processo mais oneroso e dificultaria a diálise da amostra antes da etapa de purificação. Sendo assim, é importante determinar se os contaminantes presentes na amostra após a purificação são realmente prejudiciais para o ensaio de ELISA que será desenvolvido, a fim de justificar a necessidade do uso do meio SF900II.

4.1.2 Concentração do sobrenadante por precipitação com sulfato de amônio

Um dos problemas decorrentes da purificação a partir do sobrenadante do cultivo das células é o volume da amostra. Quanto maior o lote de proteína produzido, maior o volume de amostra a ser processado e purificado, o que pode dificultar a etapa de diálise. Esta etapa é essencial para o processo uma vez que promove a remoção do CuSO_4 usado na indução, além de substituir o meio por um tampão adequado que permite a ligação da proteína recombinante à resina Ni-NTA. Algumas metodologias foram descritas para diminuição do volume da amostra através da precipitação de proteínas, sendo que uma delas consiste no uso de uma solução saturada de sulfato de amônio, técnica que já vinha sendo usada pelo nosso grupo para precipitação de anticorpos. Outra vantagem da utilização desta técnica consiste na remoção de contaminantes através da interação diferencial de proteínas com concentrações diferentes de sulfato de amônio (KING, 1972).

Considerando o escalonamento para produção de um lote de rNS1, a diminuição do volume da fração secretada a ser purificada seria interessante para facilitar o processo de purificação, assim como possivelmente gerar uma amostra mais limpa. Sendo assim, foi realizado um teste preliminar no qual a fração secretada proveniente da expressão de rNS1 em duas garrafas de cultura de 300 cm^2 (seguindo os parâmetros previamente estabelecidos) foi dividida em quatro partes iguais a fim de testar a precipitação com concentrações crescentes de sulfato de amônio (50, 70 e 90% de saturação) e comparar com a amostra purificada paralelamente sem precipitação.

Observando o perfil eletroforético das frações eluídas, podemos notar que o padrão de bandas obtido da purificação da amostra não precipitada é diferente das amostras precipitadas (**Figura 14** e **Figura 15**). Além disto, a retenção de rNS1 na resina parece ser afetada pela concentração de sulfato de amônio usada antes da purificação, uma vez que a partir de 70% de saturação a proteína elui principalmente em uma fração (**Figura 15B e C**).

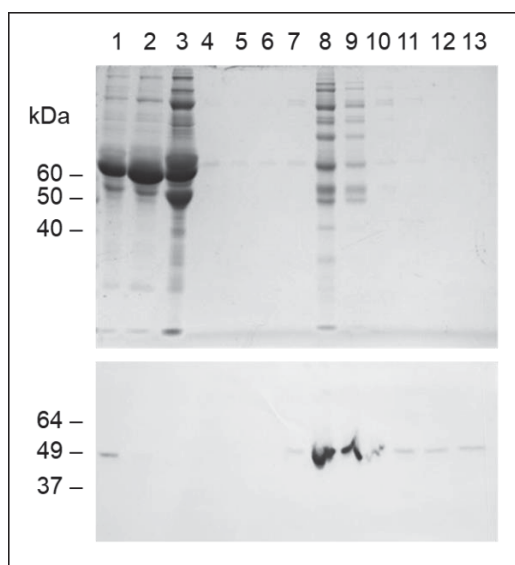


Figura 14 – Purificação de rNS1 de ZIKV. Perfil eletroforético em SDS-PAGE com gel a 13% corado com Azul de *Coomassie* das amostras obtidas após purificação por afinidade (painel superior). As mesmas amostras foram analisadas por WB marcado com mAb anti-V5 (painel inferior). Amostras: 1- Pré purificação, 2- *Flowthrough*, 3 e 4- Lavagem da resina, 5 a 12- Eluição, 13- Resina Ni-NTA. Tamanho esperado da banda referente à NS1: 46 – 55 kDa.

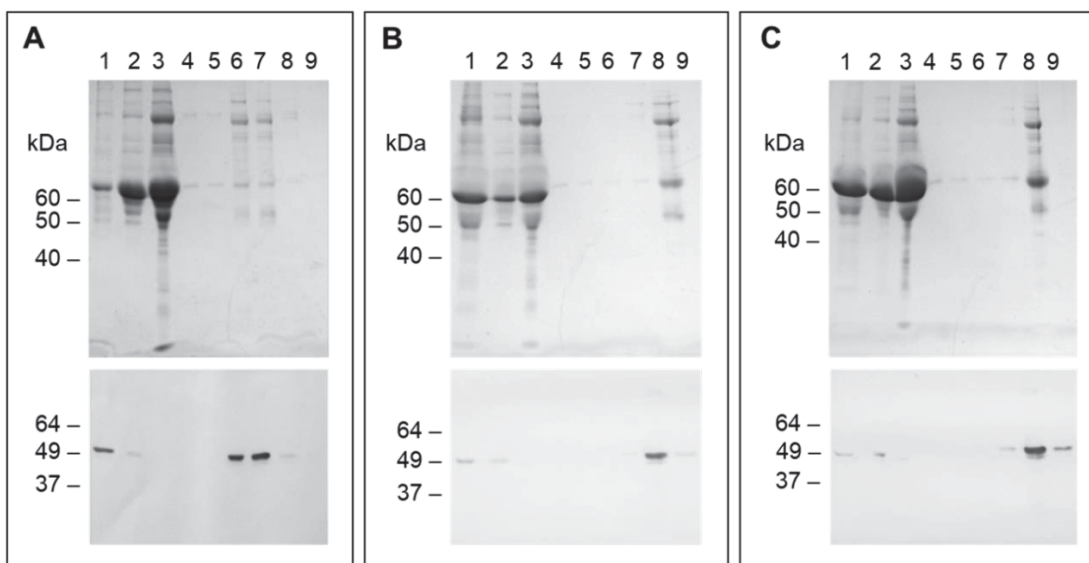


Figura 15 – Purificação de rNS1 de ZIKV precipitada com concentrações variáveis de sulfato de amônio. Perfil eletroforético em SDS-PAGE com gel a 13% corado com Azul de *Coomassie* (painel

superior) e WB marcado com mAb anti-V5 (painel inferior) de amostras precipitadas com 50, 70 e 90% de saturação de sulfato de amônio (**A**, **B** e **C**, respectivamente). Amostras: 1- Pré purificação, 2- *Flowthrough*, 3 e 4- Lavagem da resina, 5 a 8- Eluição, 9- Resina Ni-NTA. Tamanho esperado da banda referente à NS1: 46 – 55 kDa.

De forma geral, a intensidade do sinal obtido no WB das amostras precipitadas é visivelmente menor do que o obtido na purificação sem precipitação. Ao comparar a banda referente a rNS1 pré-purificação nas amostras precipitadas, é possível notar que nas condições com as maiores concentrações de sulfato de amônio houve perda da proteína de interesse durante o processo. Considerando que não parece haver diferença na composição das frações obtidas com diferentes níveis de saturação (**Figura 15A, B e C**), seria mais vantajoso optar pelo uso da menor concentração de sulfato de amônio.

É importante ressaltar que, embora a rNS1 obtida através da precipitação por sulfato de amônio tenha sido reconhecida com sucesso por WB, a marcação foi realizada contra a etiqueta V5. Sabe-se que o processo de precipitação pode alterar a conformação de proteínas (RUPLEY; GRATTON; CARERI, 1983), portanto, é importante analisar esta proteína por técnicas não desnaturantes comparando com rNS1 obtida sem precipitação, de forma a garantir sua aplicabilidade para o ELISA.

4.1.3 Controle negativo

Conforme discutido anteriormente, a estratégia utilizada para obtenção da proteína rNS1 consiste em apenas uma etapa de purificação por afinidade e, portanto, apresenta diversos contaminantes na amostra final, muitos destes em quantidades equivalentes à proteína de interesse (**Figura 14**). Para determinar se estes contaminantes poderiam interferir no sinal do ELISA a ser desenvolvido, foi feita uma expressão controle com células S2 não transfectadas (aqui denominada *Mock*) seguindo as mesmas etapas previamente descritas para purificação de sNS1. Desta forma, foi obtida a amostra *Mock*, que será usada como controle para rNS1, e *Mock* PPT50, usada como controle para rNS1 PPT50 (ambos submetidos à precipitação com 50% de saturação de sulfato de amônio). Tendo em vista que o objetivo é reproduzir o mesmo conjunto de contaminantes observado durante a expressão na amostra *Mock*, a eluição foi realizada em um tubo único.

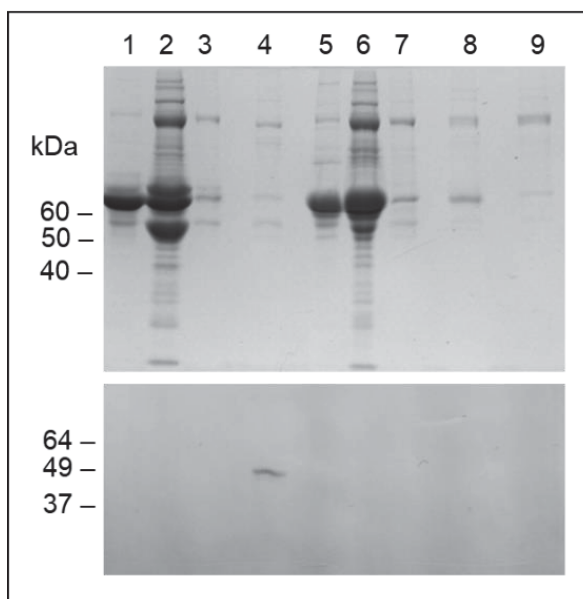


Figura 16 – Purificação controle (Mock). Sobrenadante da célula S2-rNS1-ZIKV1 foi coletado e uma parte foi precipitada com saturação de 50% de sulfato de amônio. Perfil eletroforético em SDS-PAGE com gel a 13% corado com Azul de *Coomassie* (painel superior) e WB marcado mAb anti-V5 (painel inferior) das amostras obtidas após purificação de afinidade. Amostras: 1- *Flowthrough*, 2 e 3- Lavagem da resina, 4- rNS1, 5- *Flowthrough* (PPT50), 6 e 7- Lavagem da resina (PPT50), 8- Eluição e 9- Eluição (PPT50). Tamanho esperado da banda referente à NS1: 46 – 55 kDa.

As amostras obtidas foram analisadas por SDS-PAGE, no qual o perfil eletroforético do *Mock* e *Mock* PPT50 pôde ser comparado com a amostra de rNS1 purificada (**Figura 16**). A marcação anti-V5 por WB também foi realizada como uma etapa confirmatória, garantindo que ambos *Mock* produzidos não estão contaminados com a proteína de interesse.

Embora os contaminantes não estejam presentes nas mesmas concentrações, duas bandas principais foram observadas na coloração por Azul de *Coomassie*. Considerando que o volume total da eluição foi coletado em apenas um tubo, é possível que as outras bandas não tenham sido visualizadas por se tratar de uma amostra mais diluída. Além disto, contaminantes presentes na purificação são frequentemente carregados durante o processo através de interações com a proteína de interesse e, conseqüentemente, não estarão presentes na ausência da rNS1, já que não têm afinidade pela resina. Estas amostras obtidas serão usadas em paralelo com a rNS1 purificada como controle negativo na padronização do ELISA.

4.1.4 Produção de lote de rNS1 de ZIKV

Um lote maior de rNS1 de ZIKV foi produzido seguindo as condições determinadas previamente, com escalonamento para expressão em 3 garrafas de 300cm². A amostra foi purificada diretamente do sobrenadante de cultivo e apresentou o mesmo perfil de bandas em SDS-PAGE e WB observado no piloto. As frações obtidas que apresentaram bandas de maior intensidade foram agrupadas para uso (**Figura 17**). O rendimento estimado de rNS1 de ZIKV é de 2,5mg/L, no entanto, é importante ressaltar que a concentração da amostra foi calculada a partir de análise por ImageJ a partir das bandas totais observadas na canaleta. Sendo assim, não pode ser excluída a contribuição dos contaminantes presentes na amostra na concentração final obtida.

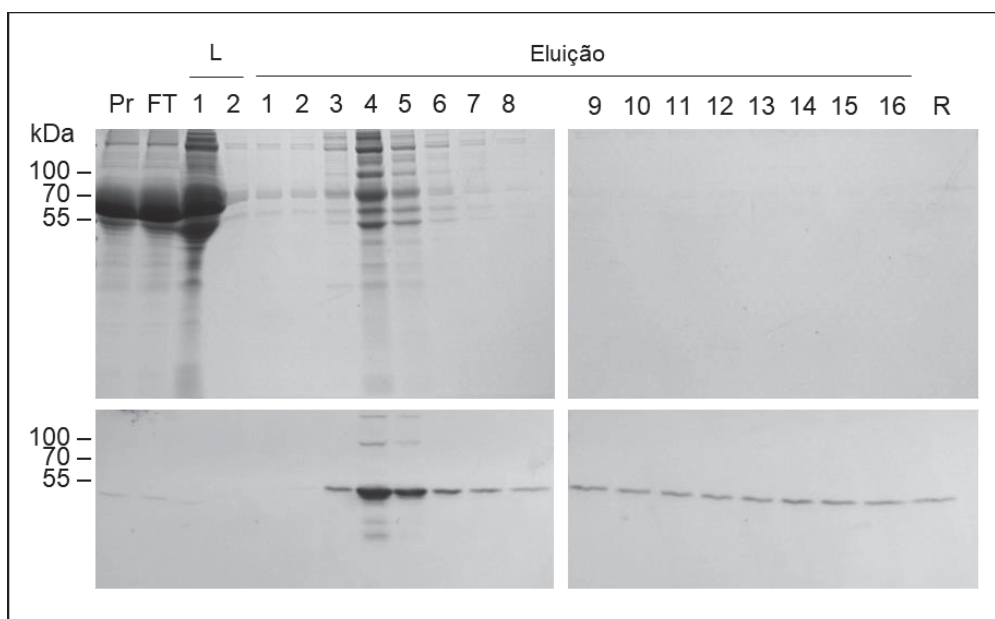


Figura 17 – Purificação de rNS1 de ZIKV. Perfil eletroforético em SDS-PAGE com gel a 13% corado com Azul de Coomassie das amostras obtidas após purificação por afinidade (painel superior) e WB marcado com mAb anti-V5 (painel inferior). Amostras: Pr - Pré purificação; FT - *Flowthrough*; R - Resina Ni-NTA. Tamanho esperado da banda referente à NS1: 46 – 55 kDa.

4.2 PRODUÇÃO DE LOTES DE PROTEÍNA RECOMBINANTE NS1 DE DENV E YFV

Com o intuito de validar a especificidade do ELISA de captura, foram produzidos lotes de rNS1 dos orthoflavivirus DENV e YFV. Nosso grupo havia previamente realizado a clonagem da sequência da proteína NS1 de DENV e YFV no

mesmo sistema usado para obtenção da proteína de ZIKV, através da expressão em células S2 de *D. melanogaster* sob indução de CuSO_4 com a etiqueta V5 e cauda de histidina. Sendo assim, as condições de expressão foram testadas de forma a obter maior rendimento.

4.2.1 Otimização e produção de rNS1 de DENV

Primeiramente foi realizada uma cinética de expressão de rNS1 com tempos variáveis de indução e coleta (**Figura 18A e B**), conforme descrito anteriormente. Células foram induzidas com CuSO_4 e uma vez atingido tempo de expressão desejado, as frações secretada e retida foram coletadas.

Análise por SDS-PAGE e WB com marcação para a etiqueta V5 indicaram a presença da proteína recombinante de DENV no sobrenadante de cultivo e *pellet* (**Figura 18**). Considerando que a purificação da proteína a partir da fração secretada é favorecida, a condição selecionada para a produção de rNS1 foi indução após 24 horas e a coleta após 96 horas, contadas a partir da preparação das placas (**Figura 18A**). Esta condição apresentou uma banda de intensidade semelhante com relação à amostra coletada após 120 horas, mas tem a vantagem de facilitar a logística de processamento da amostra.

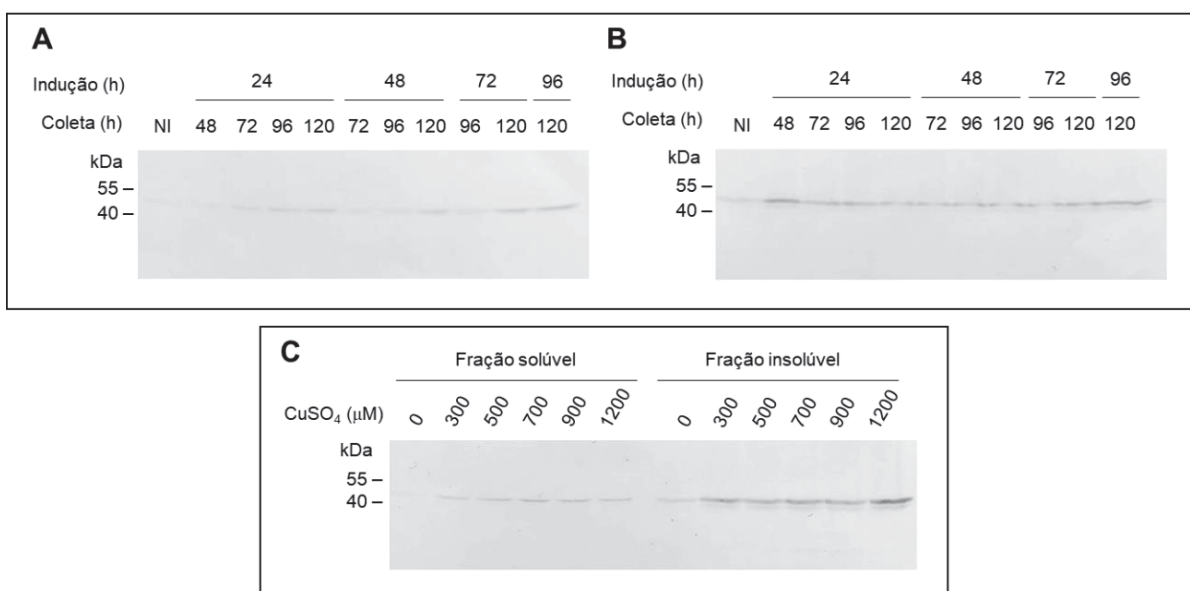


Figura 18 – Otimização das condições de expressão de rNS1 de DENV. WB da cinética de expressão da proteína rNS1 a partir do sobrenadante (**A**) e *pellet* (**B**) de células S2-rNS1-DENV. A identificação das amostras representa o momento de indução e coleta com relação ao plaqueamento; NI: não induzido. Expressão de rNS1 com concentrações variáveis do indutor CuSO_4 nas frações secretada e retida (**C**). Resolução em SDS-PAGE com gel a 13% e marcação com mAb anti-V5. Tamanho esperado da banda referente à NS1: 46 – 55 kDa.

Após otimização do intervalo ideal para expressão da proteína de interesse, foram testadas concentrações crescentes do indutor CuSO_4 . As células foram semeadas em placas de 6 poços, induzidas após 24 horas e processadas após 96 horas, de acordo com as condições determinadas anteriormente.

A partir deste resultado, é possível notar que, embora a quantidade de proteína detectada aumente proporcionalmente à concentração de indutor utilizado, isto é observado principalmente nas amostras referentes à fração retida (**Figura 18C**). A concentração de $700\mu\text{M}$ foi selecionada para a indução, já que não há aumento significativo na intensidade da banda nas concentrações mais altas. Levando em consideração que a densidade celular e meio para expressão já foram padronizados, um lote de proteína foi produzido seguindo os mesmos parâmetros. As amostras obtidas da purificação foram resolvidas em SDS-PAGE e *Western Blot*, sendo que as frações que apresentaram maior intensidade de marcação foram agrupadas para uso (**Figura 19**).

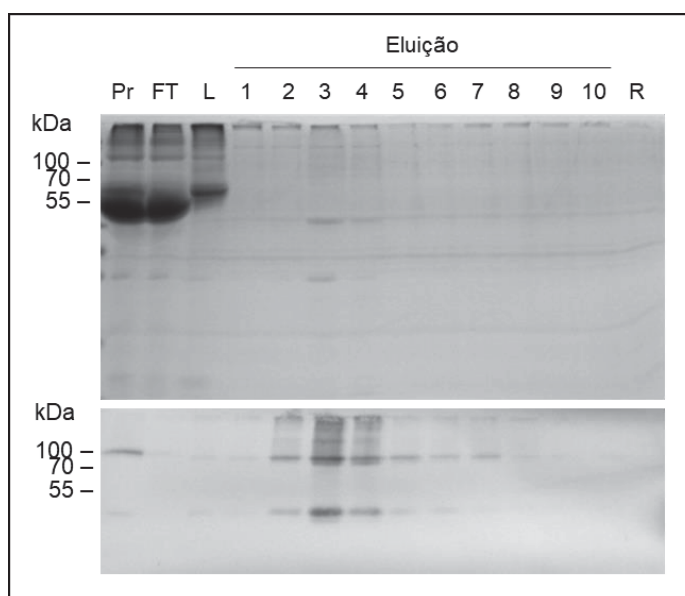


Figura 19 – Purificação de rNS1 de DENV. Perfil eletroforético em SDS-PAGE com gel a 13% corado com Azul de Coomassie (painel superior) e WB (painel inferior) marcado com mAb anti-V5. Amostras: Pr - Pré purificação; FT - *Flowthrough*; L - Lavagem da resina; R - Resina Ni-NTA. Tamanho esperado da banda referente à NS1 monomérica: 46 – 55 kDa.

4.2.2 Otimização e produção de rNS1 de YFV

A clonagem da NS1 de YFV havia sido realizada em trabalho prévio do nosso grupo, no qual a sequência da cepa 17DD foi utilizada para expressão da proteína de

interesse em sua forma trimérica (RICCIARDI-JORGE; BORDIGNON; KOISHI; ZANLUCA *et al.*, 2017). É possível que a modificação inserida na sequência para estabilização dos oligômeros prejudicou a secreção da proteína, uma vez que esta é detectada somente na fração retida (**Figura 20A e B**). Análises por SDS-PAGE e WB com marcação para a etiqueta V5 revelaram a presença de três bandas distintas, correspondentes às formas monomérica, dimérica e trimérica da proteína, conforme caracterizado anteriormente (RICCIARDI-JORGE; BORDIGNON; KOISHI; ZANLUCA *et al.*, 2017). Visto que níveis similares da proteína recombinante foram observados nas coletas mais tardias das amostras referentes ao *pellet*, foi selecionado o esquema de indução e coleta 48 e 96 horas após a preparação da placa, respectivamente, pois facilitaria a logística de processamento da amostra (**Figura 20B**).

Com relação ao teste com concentrações crescentes do indutor CuSO_4 , é possível notar que a partir de 700 μM , não é observado um aumento significativo na quantidade de proteína detectada na fração retida. Além disto, o uso de concentrações mais altas do indutor não foi suficiente para que a rNS1 seja detectada no sobrenadante (dados não mostrados). Sendo assim, a concentração escolhida para expressão foi 700 μM (**Figura 20C**).

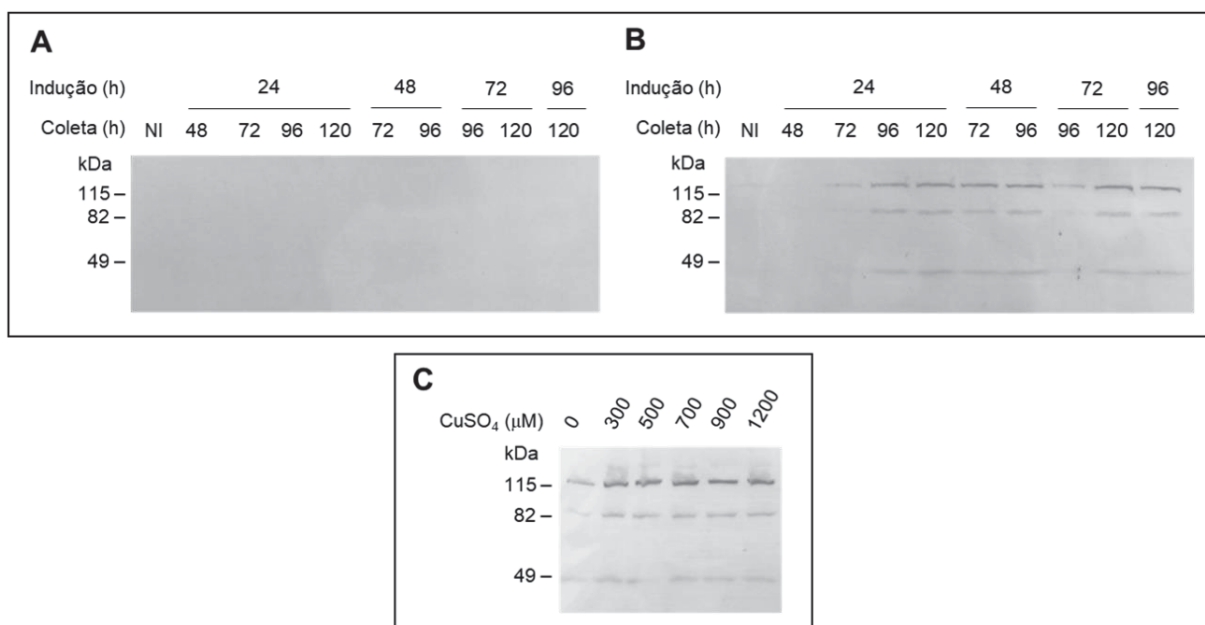


Figura 20 – Otimização das condições de expressão de rNS1 de YFV. WB da cinética de expressão do sobrenadante (**A**) e *pellet* (**B**) de células S2-rNS1-YFV. A identificação das amostras representa o momento de indução e coleta com relação ao momento do plaqueamento; NI: não induzido. Expressão de rNS1 com concentrações variáveis do indutor CuSO_4 na fração retida (**C**). Resolução em SDS-PAGE com gel a 13% e marcação com o mAb anti-V5. Tamanho esperado da banda referente à NS1 monomérica: 46 – 55 kDa.

Um lote de proteína foi produzido utilizando a densidade celular e meio padronizados anteriormente. A análise das amostras obtidas a partir da purificação da fração retida mostra a presença de rNS1 nas duas primeiras frações após eluição (**Figura 21**). A presença de bandas referente à proteína de interesse no *flowthrough* sugere que a capacidade de ligação da resina foi saturada, levando a uma perda no rendimento de rNS1. É importante ressaltar que, por se tratar de uma amostra obtida a partir do *pellet*, há presença de uma grande quantidade de contaminantes celulares (**Figura 21**). Embora isto não tenha afetado o uso da proteína para ELISA (RICCIARDI-JORGE; BORDIGNON; KOISHI; ZANLUCA *et al.*, 2017), o uso de um controle negativo adequado é necessário. Em função disso, o *Mock* obtido a partir de uma expressão controle com células S2 não transfectadas foi produzido para ser utilizado para descontar o *background* do sinal no ELISA.

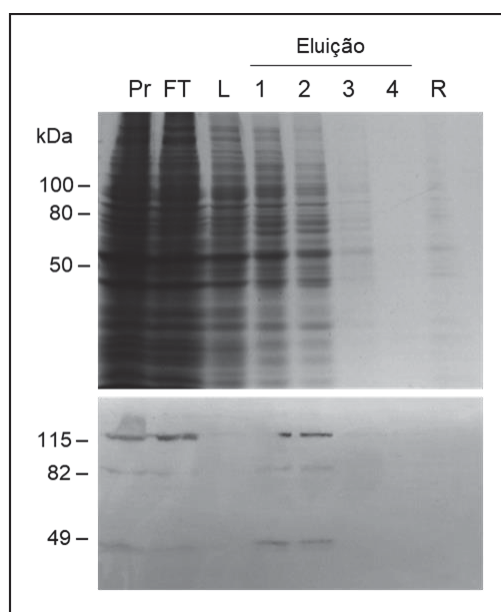


Figura 21 – Purificação de rNS1 de YFV. Perfil eletroforético em SDS-PAGE com gel a 13% corado com Azul de *Coomassie* (painel superior) e WB (painel inferior) marcado com mAb anti-V5. Amostras: Pr - Pré purificação; FT - *Flowthrough*; L - Lavagem da resina; R - Resina Ni-NTA. Tamanho esperado da banda referente à NS1 monomérica: 46 – 55 kDa.

4.3 PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E MODIFICAÇÃO DE MABS ANTI-NS1

4.3.1 Obtenção e modificação de mAbs anti-NS1 de ZIKV

Visto que a proteína recombinante foi obtida com sucesso, a próxima etapa deste projeto visou a obtenção de mAbs capazes de reconhecer NS1 de ZIKV. Os

hibridomas gerados através da imunização de camundongos Balb/c com partículas purificadas de ZIKV foram triados quanto à sua capacidade de reconhecer a proteína de interesse a partir do lisado de células infectadas (dados não mostrados). A especificidade dos clones positivos foi confirmada por IFI em células infectadas com DENV sorotipos 1 a 4, YFV e com as linhagens africana (MR766) e asiática (ZV BR 2015/15261) de ZIKV. Ao final destas etapas de triagem, três clones foram selecionados para uso neste estudo, denominados 12B8/2E3, 2E6/2E6 e 1F12/2E11. O teste de reatividade cruzada mostrou que os hibridomas 12B8 e 2E6 reconhecem especificamente ZIKV, enquanto o 1F12 apresenta reatividade contra ZIKV e DENV-3 (**Figura 22**). A caracterização destes anticorpos quanto a sua classe e isotipo está descrita na Tabela 8.

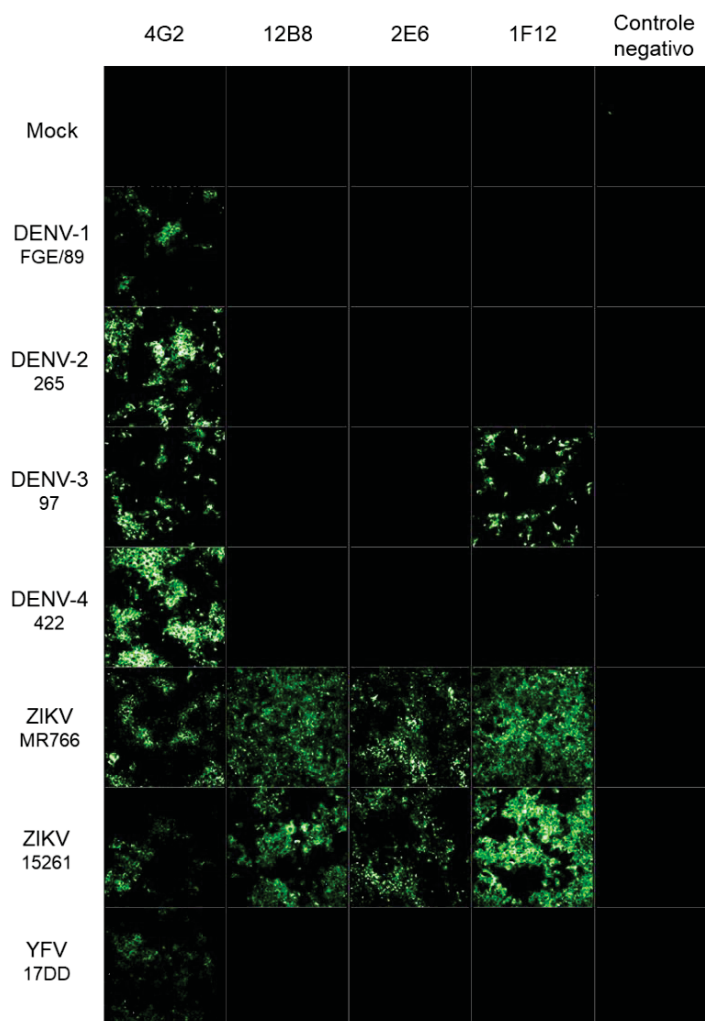


Figura 22 – Reatividade cruzada dos mAbs anti-NS1. Células Huh7.5 foram analisadas por IFI 48 horas após infecção com diferentes orthoflavivirus (MOI = 0,25). A marcação foi realizada com os sobrenadantes de cultivo dos hibridomas 12B8/2E3, 2E6/2E6 e 1F12/2E11, seguido do anticorpo secundário anti-IgG Alexa Fluor 488. O mAb panflavivirus 4G2 e um mAb anti-GFP foram usados como controle positivo e negativo da reação, respectivamente.

Tabela 8 – Caracterização dos mAbs anti-NS1 de ZIKV.

	Isotipo	Reatividade cruzada
12B8/2E3	IgG2b/κ	–
2E6/2E6	IgG2a/κ	–
1F12/2E11	IgG2a/κ	DENV-3

Embora estes clones consigam reconhecer a proteína nativa, é necessário confirmar se eles também são capazes de reconhecer a proteína recombinante produzida. Para isto, foi realizada uma IFI com células S2-rNS1-ZIKV1 utilizando os sobrenadantes de cultivo dos hibridomas selecionados.

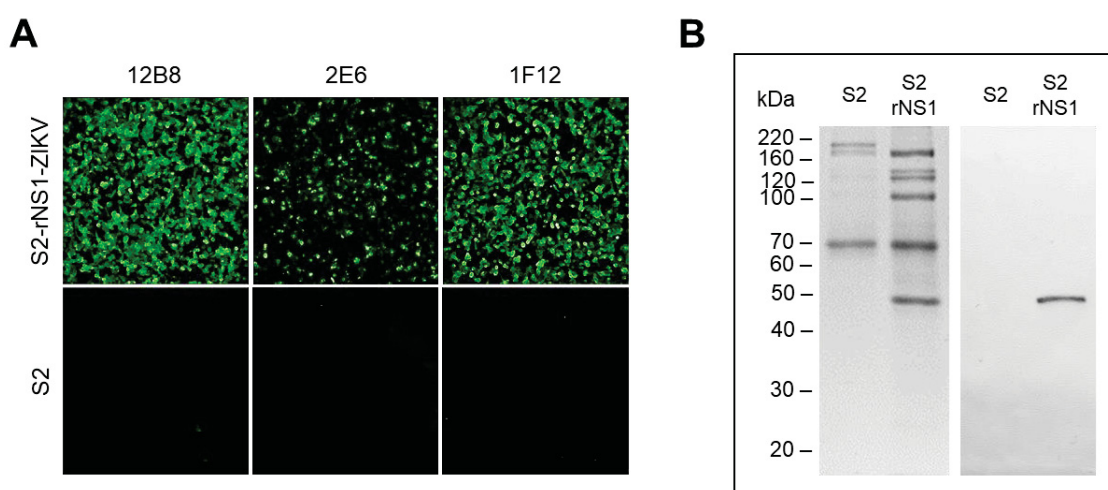


Figura 23 – Validação dos mAbs anti-NS1 de ZIKV. (A) Células S2 não transfectadas e células S2 expressando rNS1 (S2-rNS1-ZIKV1) foram induzidas com CuSO_4 e marcadas com o sobrenadante de cultivo dos hibridomas monoclonais 12B8/2E3, 2E6/2E6 e 1F12/2E11, seguido do anticorpo secundário anti-IgG de camundongo Alexa Fluor 488. Reconhecimento da proteína rNS1 sob condições desnaturantes (B). Proteínas purificadas a partir de células S2 (*Mock*) e S2-rNS1-ZIKV foram marcadas com o sobrenadante do hibridoma 12B8/2E3. Painel esquerdo: SDS-PAGE com gel a 10% corado com Azul de Coomassie; painel direito: WB. Tamanho esperado da banda referente à NS1: 46 – 55 kDa.

Como pode ser observado na Figura 23A, todos os hibridomas testados foram capazes de reconhecer a proteína recombinante, embora com intensidades de marcação variáveis. Dentre os mAbs testados, o 12B8/2E3 apresentou o melhor sinal, seguido do mAb 1F12/2E11. Considerando que o objetivo é desenvolver um ELISA de captura quantitativo específico para ZIKV, não seria interessante escolher o hibridoma 1F12/2E11 como o mAb de captura do ensaio devido à reatividade cruzada com DENV-3. Uma vez que o clone 12B8/2E3 apresenta um ótimo ritmo de crescimento e marcação de maior intensidade em comparação ao outro clone

específico para ZIKV (2E6/2E6), ele foi selecionado como primeiro candidato à purificação e conjugação. Considerando que este mAb é capaz de detectar a proteína rNS1 por WB, é possível afirmar que o anticorpo reconhece um epítipo linear desta proteína (**Figura 23B**). Os mAbs 2E6/2E6 e 1F12/2E11 também são capazes de reconhecer a proteína recombinante por esta metodologia (dados não mostrados).

O clone em questão foi expandido e o mAb purificado por afinidade em coluna de proteína G. As frações obtidas na etapa de eluição foram lidas em espectrômetro para seleção das amostras com maior D.O. a 280 nm e então analisadas por SDS-PAGE (**Figura 24**).

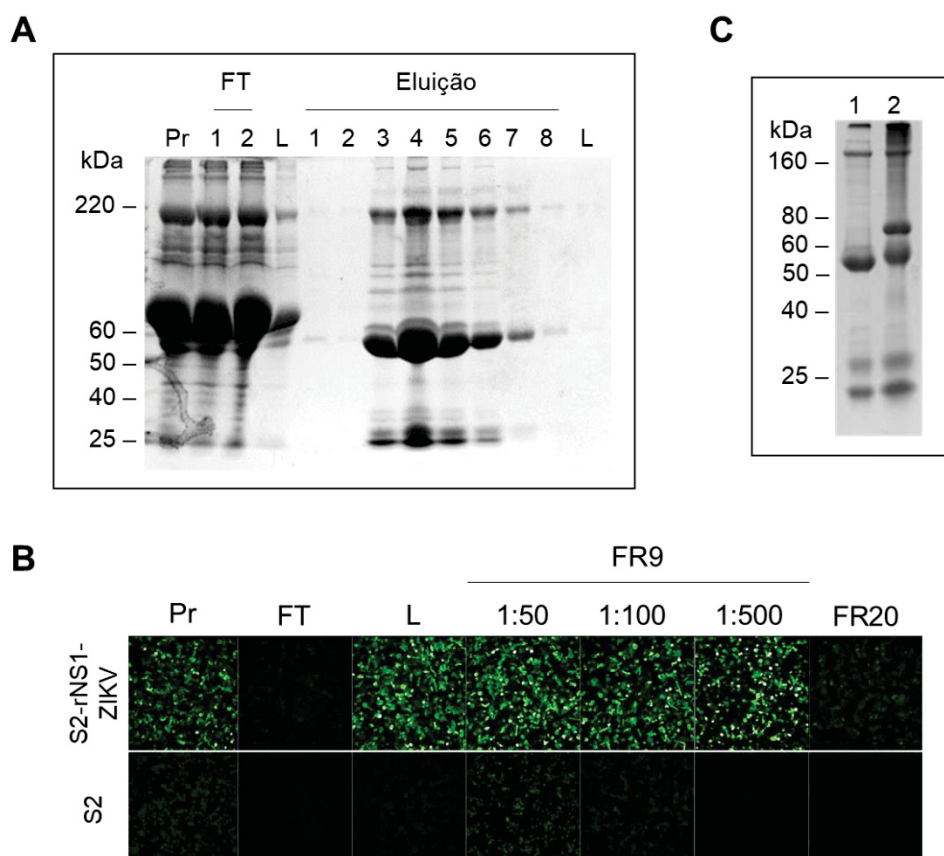


Figura 24 – Purificação e conjugação do mAb 12B8/2E3. As frações obtidas após a purificação foram analisadas em SDS-PAGE com gel a 13% (**A**) e por IFI (**B**). Amostras: Pr- Pré purificação, FT- *Flowthrough*, L- Lavagem, Eluição 4 - FR9 da purificação, Eluição 8 - FR20 da purificação. Perfil eletroforético do anticorpo purificado após conjugação (**C**). Amostras: 1- 12B8/2E3, 2- 12B8/2E3-HRP. Tamanho esperado das bandas referentes à IgG: 25 e 50 kDa.

A partir da análise em gel de poliacrilamida com as amostras da purificação, foram selecionadas duas frações da eluição, a mais concentrada (Eluição FR9) e a mais diluída (Eluição FR20) (**Figura 24**) para teste por IFI. A marcação em células S2-

rNS1-ZIKV1 mostrou que os mAbs obtidos após este processo estão funcionais (**Figura 24B**). Embora não tenha sido visto anteriormente a marcação das células S2 não transfectadas com o sobrenadante do hibridoma, nesta IFI é possível perceber um sinal fraco nas amostras pré purificação, lavagem e Eluição FR9 nas concentrações mais altas. Considerando que a saturação de mAbs pode levar a ligações inespecíficas, é provável que esta marcação ocorra devido à alta concentração da amostra, como consequência do escalonamento da produção e do processo de precipitação. Outro resultado que reforça esta observação é o forte sinal obtido na marcação de células S2-rNS1-ZIKV1 com o lavado da coluna, indício de que a capacidade máxima de ligação da resina foi atingida.

Visto que a atividade do mAb purificado foi confirmada, as frações eluídas que apresentaram maior D.O. foram agrupadas e a amostra final obtida foi dosada por Bradford. Uma alíquota deste mAb foi conjugada com a enzima HRP para uso como anticorpo de detecção no ELISA. O aparecimento de uma banda com maior massa molecular na amostra conjugada sugere que a modificação ocorreu, embora a eficiência do processo não tenha sido muito alta (**Figura 24C**).

Para determinar se o anticorpo monoclonal 12B8/2E3 e o conjugado 12B8/2E3-HRP são adequados para uso em ELISA, foram feitos dois testes. Primeiramente, para confirmar a atividade do anticorpo de captura, foi realizado um ELISA indireto onde os poços foram sensibilizados com a proteína rNS1, incubado com o mAb 12B8/2E3 ou anti-V5 e revelado com um anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com HRP (**Figura 25A**). Paralelamente também foi realizado um ELISA direto onde a proteína rNS1 adsorvida no poço foi reconhecida diretamente pelo anticorpo 12B8/2E3-HRP (**Figura 25B**), para garantir que a modificação realizada é funcional. A validação dos anticorpos foi realizada com rNS1 obtida sem precipitação com sulfato de amônio, uma vez que ainda não tinha sido avaliada a interferência desta técnica na conformação final da proteína.

Como pode ser observado na Figura 25, o teste preliminar comprovou que ambos os anticorpos estão funcionais, já que foi possível obter uma D.O. alta com as duas abordagens testadas. Não foi observada uma grande variação nos valores de D.O. nas diferentes diluições testadas dos anticorpos, portanto, diluições maiores poderiam ser testadas para verificar se a intensidade do sinal é mantida. Tendo isto estabelecido, a proteína rNS1 obtida após precipitação com sulfato de amônio (rNS1-

PPT50) também foi testada em ELISA direto a fim de comparar o sinal com o sinal obtido para a proteína rNS1 purificada diretamente do sobrenadante de cultivo.

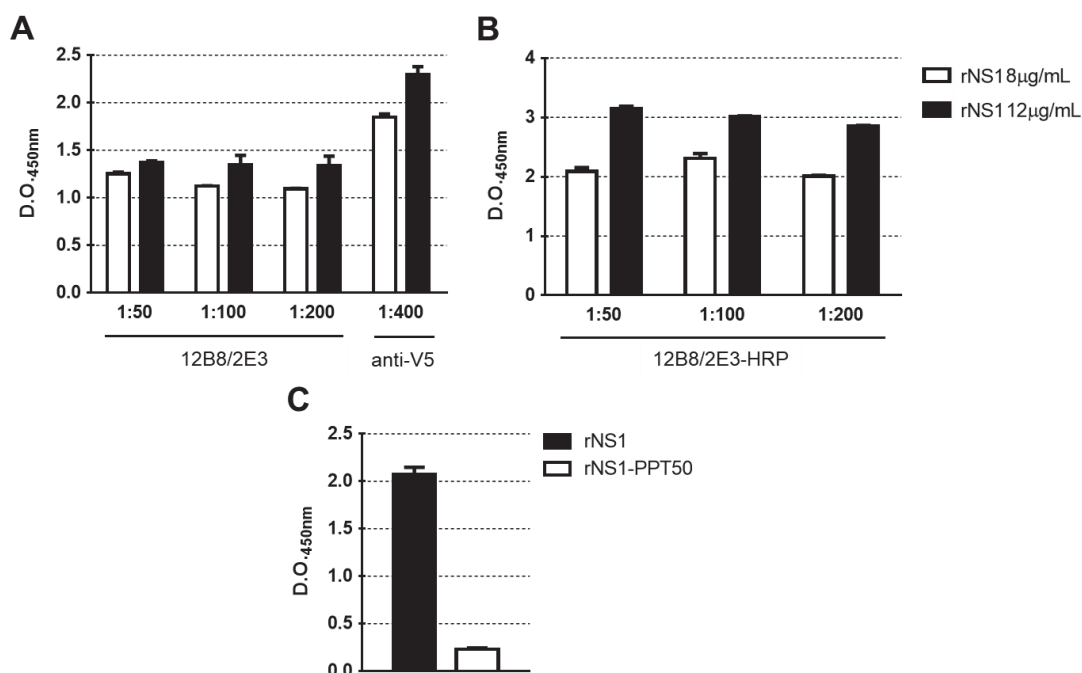


Figura 25 – ELISA indireto e direto para validação dos mAbs e rNS1. ELISA indireto com adsorção de rNS1, anticorpo primário 12B8/2E3 ou anti-V5 e anticorpo secundário anti-IgG-HRP (**A**). ELISA indireto com adsorção de rNS1 e revelação com anticorpo 12B8/2E3-HRP (**B**). ELISA direto com adsorção de rNS1 ou rNS1-PPT50 e revelação com anticorpo 12B8/2E3-HRP (**C**). Os valores de D.O. apresentados foram corrigidos pela subtração do valor obtido para o branco e para o *Mock* correspondente à amostra testada. Dados apresentados como média e desvio padrão de um experimento realizado em triplicata.

Observando o resultado do ELISA, fica evidente que não será possível usar a precipitação com sulfato de amônio como abordagem para diminuir o volume do sobrenadante antes da purificação. O uso da proteína rNS1-PPT50 fez com que o sinal obtido diminuísse aproximadamente 10 vezes em relação a sensibilização realizada com a proteína rNS1 (**Figura 25C**). Este fato pode ser decorrente de uma mudança conformacional em função da precipitação com sulfato de amônio, como discutido anteriormente.

Tendo em vista que o objetivo deste projeto é o desenvolvimento de ELISA de captura, há necessidade do uso de dois anticorpos, o anticorpo de captura que fica adsovido ao poço e o anticorpo de detecção conjugado à enzima HRP. Sabe-se que durante infecção natural por orthoflavivirus a secreção de NS1 raramente ocorre na forma de monômeros (FLAMAND; MEGRET; MATHIEU; LEPAULT *et al.*, 1999; WINKLER; RANDOLPH; CLEAVES; RYAN *et al.*, 1988). Desta forma, o uso do mesmo clone nas etapas de captura e detecção é possível. Considerando que os

epítomos específicos dos mAbs produzidos neste projeto não foram mapeados, foi realizado um teste variando os anticorpos usados na sensibilização, a fim de determinar a melhor combinação de anticorpos a ser usada.

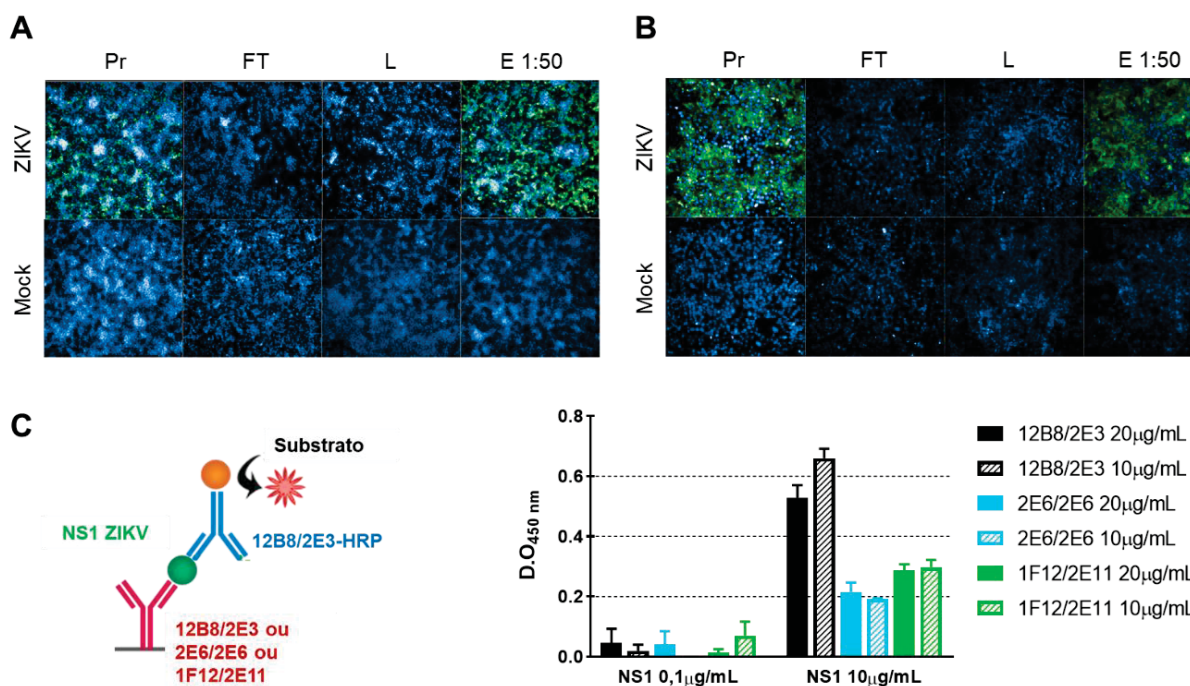


Figura 26 – Purificação dos mAbs 2E6/2E6 e 1F12/2E11 e ELISA de captura para NS1 de ZIKV. IFI das frações obtidas da purificação de 2E6/2E6 (A) e 1F12/2E11 (B) em células infectadas com ZIKV ou Mock. Amostras: Pr – Pré purificação, FT - Flowthrough, L - Lavagem e E - Eluição 1:50. Esquema representativo do ensaio (C) e resultado do ELISA de captura (D). A sensibilização foi realizada com os mAbs 12B8/2E3, 2E6/2E6 ou 1F12/2E11 e a detecção do antígeno se deu com o mAb 12B8/2E3-HRP a 10 µg/mL (C). Os valores de D.O. apresentados foram corrigidos pela subtração do valor obtido para o branco e para o Mock correspondente à amostra testada. Dados apresentados como média e desvio padrão de um experimento realizado em triplicata.

Após expansão dos hibridomas 2E6/2E6 e 1F12/2E11, foi realizada a purificação por afinidade da mesma maneira descrita anteriormente. As amostras de maior D.O. a 280 nm foram agrupadas e testadas por IFI em células infectadas com ZIKV, onde foi confirmado que a purificação foi bem-sucedida (Figura 26A e B).

O uso de diferentes anticorpos na etapa de sensibilização (Figura 26C) gerou D.O. variáveis, sendo que o mAb que apresentou o melhor sinal foi o 12B8/2E3, o mesmo anticorpo usado na etapa de detecção (Figura 26D). É possível que os outros anticorpos apresentem afinidade mais baixa em comparação ao mAb 12B8/2E3, ou ainda que a ligação do anticorpo de detecção seja menos favorável por impedimento estérico decorrente da ligação do anticorpo de captura ao antígeno.

Ainda que nos testes iniciais o ELISA de captura tenha reconhecido a proteína recombinante produzida, é necessário garantir que o sistema é capaz de detectar a proteína nativa, produzida ativamente durante a infecção. Sendo assim, células Vero foram infectadas com ZIKV ZV BR 2015/15261 para coleta do sobrenadante da cultura. Uma vez que não é possível determinar a concentração de NS1 presente no sobrenadante coletado por metodologias convencionais de dosagem de proteínas, a amostra foi testada em diferentes diluições (puro, 1:2 e 1:10).

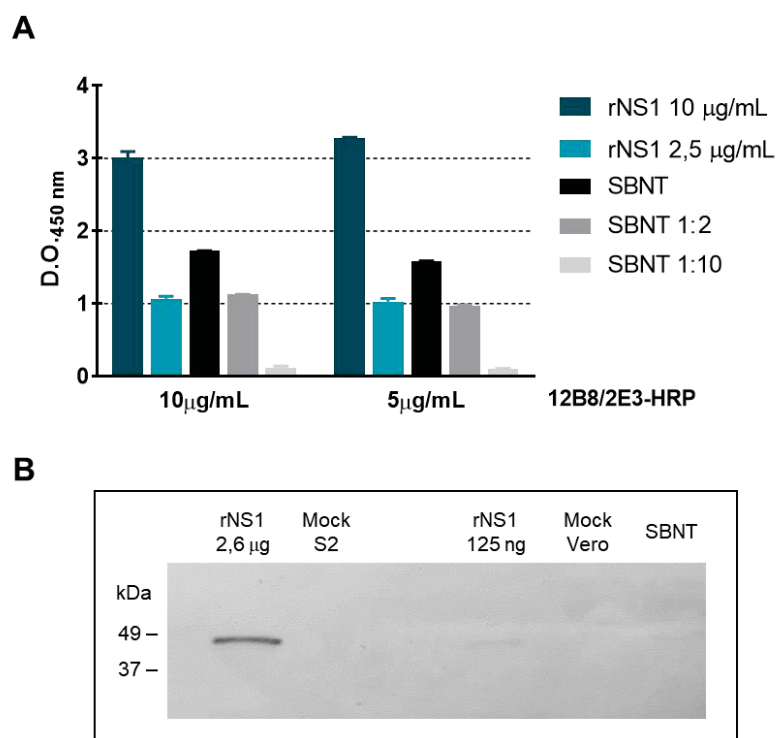


Figura 27 – Detecção de NS1 nativa. Sobrenadante (SBNT) de células Vero infectadas com ZV BR 2015/15261 (MOI=1) foi coletado 72 horas após infecção e analisado por ELISA de captura (**A**) e WB (**B**). (**A**) O mAb 12B8/2E3 foi utilizado nas etapas de captura e detecção. Os valores de D.O. apresentados foram corrigidos pela subtração do valor obtido para o branco e para o *Mock* correspondente à amostra testada. Dados apresentados como média e desvio padrão de um experimento realizado em triplicata. (**B**) rNS1 foi testada em uma concentração alta como controle positivo (2,6 µg / poço) e em uma concentração baixa de 2,5 µg/mL (125 ng / poço). WB foi marcado com o mAb 12B8/2E3 1:100 (v/v). Tamanho esperado da banda referente à NS1: 46 – 55 kDa.

Com esse ELISA de captura foi possível detectar com sucesso as proteínas presentes no sobrenadante de infecção, sendo que a diluição de 1:1 apresentou uma D.O. bastante similar à concentração de rNS1 2,5µg/mL (**Figura 27 A**). Além disto, não houve diferença significativa na intensidade do sinal obtido com as duas concentrações testadas de mAb 12B8/2E3-HRP (10 e 5 µg/mL).

Conforme discutido previamente, a proteína NS1 secretada durante a infecção está normalmente agregada em oligômeros, no entanto, quando corremos a amostra em gel desnaturante SDS-PAGE é observada uma banda única correspondente à massa molecular do monômero (**Figura 27B**). A partir da análise por WB, é possível ver que a banda obtida na amostra de sobrenadante de infecção é de intensidade similar à banda obtida com a proteína rNS1 na menor concentração testada (125 ng). Considerando que a quantidade de amostra aplicada no gel foi a mesma utilizada no ELISA, tanto do sobrenadante quanto de proteína recombinante, é possível afirmar que o resultado foi reprodutível com ambas as técnicas.

4.4 PADRONIZAÇÃO DO ELISA DE CAPTURA

A partir dos testes realizados, foi possível escolher quais insumos seriam utilizados na padronização preliminar do ELISA de captura, sendo estes o uso da rNS1 purificada sem uso de sulfato de amônio e o uso dos mAbs purificados 12B8/2E3 e 12B8/2E3-HRP conjugado. Embora o protocolo do ELISA usado até o momento tenha funcionado, ele foi baseado em outro teste desenvolvido pelo nosso grupo (RICCIARDI-JORGE; BORDIGNON; KOISHI; ZANLUCA *et al.*, 2017) com outros reagentes e para outra especificidade, sendo importante realizar a validação das etapas do processo para o ELISA de captura que está sendo desenvolvido.

4.4.1 Solução de bloqueio

Levando isto em consideração, foi realizado um teste para determinar qual seria o melhor bloqueio a ser usado no ELISA. Para isto, foram testadas diferentes condições frequentemente usadas na literatura, sendo estas SBF a 10%, leite em pó a 2% e 5% e BSA a 2% e 5% em PBS-Tween 20 a 0,05%.

Podemos notar que, embora a albumina (BSA) leve a D.O. mais alta dentre todos os grupos, ela apresenta o branco de maior intensidade, chegando próximo a uma D.O. de 1.0. O leite em pó gerou a D.O. mais baixa para o branco, no entanto, gerou também o menor sinal para detecção de rNS1 (**Figura 28**). Considerando que é preconizada uma D.O. máxima de aproximadamente 0,2 para as amostras negativas (CROWTHER, 2009), é importante escolher a condição que otimize a razão do sinal positivo e sinal negativo (branco). Levando isto em consideração, o melhor bloqueio

testado foi o SBF 10% pois apresenta um sinal alto e branco relativamente baixo. Embora o sinal do branco obtido para esta condição esteja um pouco acima de 0,2, vale ressaltar que ainda não foi realizada a otimização das concentrações dos anticorpos usados no ELISA de captura, o que pode afetar o ruído observado na reação.

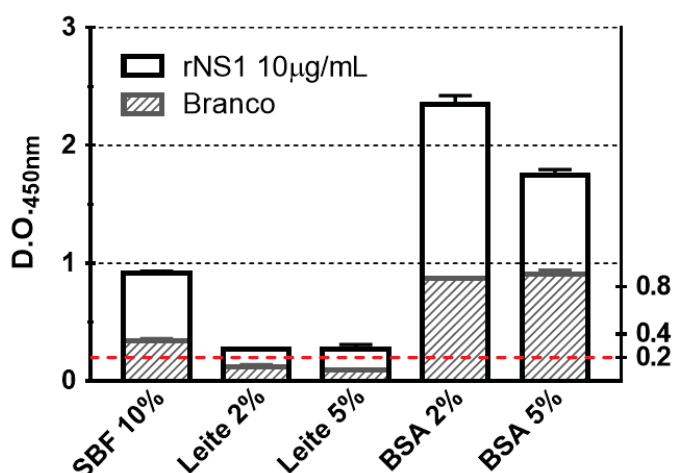


Figura 28 – Teste de bloqueios para ELISA de captura. Diferentes soluções foram preparadas com SBF, leite desnatado e BSA. A linha vermelha tracejada representa o limite ideal para D.O. das amostras negativas (Branco). Dados apresentados como média e desvio padrão de um experimento realizado em triplicata.

4.4.2 Concentração do anticorpo de captura

A próxima etapa da padronização consistiu em realizar um ELISA de captura no formato *checkerboard*, que consiste em diluições seriadas dos reagentes usados no ensaio para determinar as concentrações necessárias e suficientes dos anticorpos de captura e detecção. Neste primeiro ELISA *checkerboard* foi realizada a diluição seriada do anticorpo de captura e do antígeno, mantendo a concentração do anticorpo de detecção constante (5 µg/mL). Podemos perceber que na faixa de 10 a 1,25 µg/mL do anticorpo 12B8/2E3, a D.O. obtida apresenta pouca variação, mostrando que seria possível reduzir em até 8 vezes a concentração usada (**Figura 29**). Por outro lado, nesta janela de concentração do anticorpo de captura, é possível observar que o limite de detecção de rNS1 está próximo de 0,62 µg/mL. Deve-se levar em conta que a concentração do anticorpo de detecção também influencia no sinal obtido, é necessário selecionar a concentração ideal de 12B8/2E3-HRP para determinar a sensibilidade do ensaio.

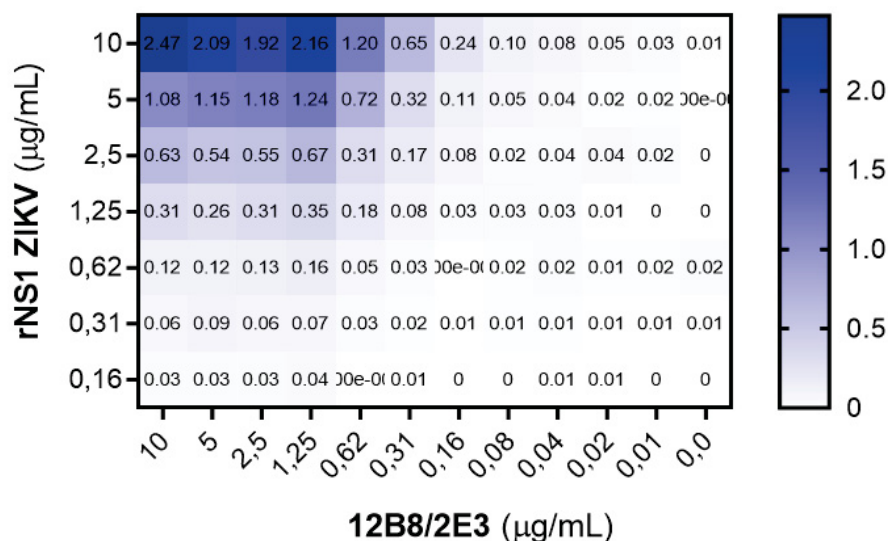


Figura 29 – Padronização da concentração do mAb 12B8/2E3 para ELISA de captura. *Heatmap* do ensaio no formato *checkerboard* com concentrações variáveis de anticorpo de captura e antígeno rNS1. Os valores em D.O. de cada amostra estão representados por poço seguindo a escala mostrada à direita.

4.4.3 Concentração de anticorpo de detecção

Para otimizar a concentração de anticorpo de detecção foi realizado outro ensaio no formato *checkerboard*, sendo que desta vez, a diluição seriada foi feita para ambos os mAbs 12B8/2E3 e 12B8/2E3-HRP. A faixa de concentração do anticorpo de captura foi selecionada de acordo com o resultado obtido anteriormente, pelo qual 5 µg/mL foi escolhido como o limite superior e 0,31 µg/mL como limite inferior, por ser a menor concentração capaz de gerar sinal nas concentrações intermediárias testadas de rNS1. Adicionalmente, as concentrações de 5 e 0,62 µg/mL de antígeno foram selecionadas para este teste, a primeira sendo de fácil detecção e a segunda próxima ao limite estipulado previamente.

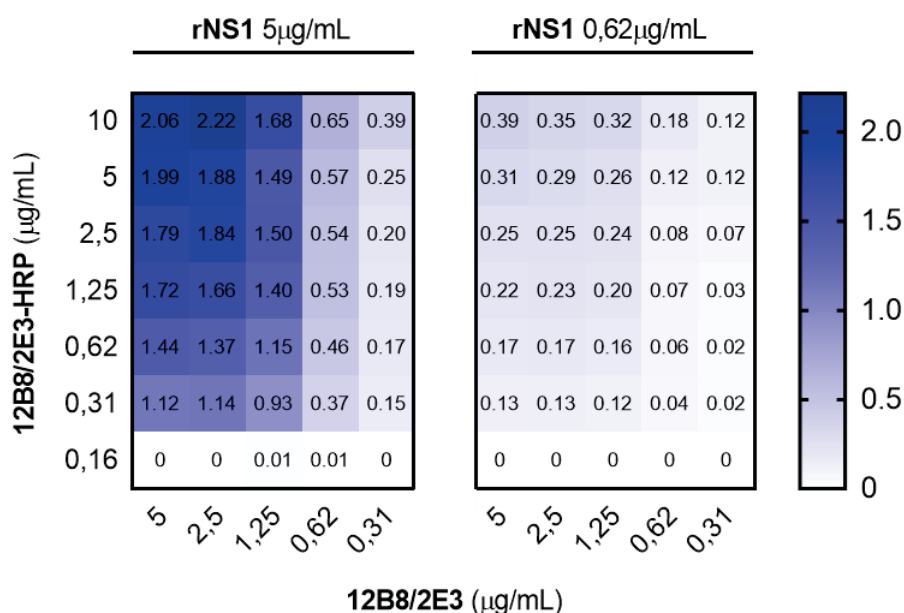


Figura 30 – Padronização da concentração dos mAbs 12B8/2E3 e 12B8/2E3-HRP usados no ELISA de captura para NS1 de ZIKV. *Heatmap* do ensaio no formato *checkerboard* com concentrações variáveis dos anticorpos de captura e detecção. A concentração utilizada do antígeno está identificada na parte superior do gráfico. Os valores em D.O. de cada amostra estão representados por poço seguindo a escala mostrada à direita.

Observa-se que na faixa de 10 µg/mL a 5 µg/mL da diluição seriada do anticorpo de detecção há pouca variação no valor de D.O. quando a concentração de 12B8/2E3 se mantém na faixa de 5µg/mL a 2,5µg/mL. Levando em consideração estes parâmetros no ensaio, é possível detectar a proteína rNS1 na concentração de 0,62µg/mL, embora o sinal obtido seja fraco (**Figura 30**, painel direito).

De acordo com os resultados obtidos, foi determinado que as melhores condições para o ELISA de captura consistem no uso de SBF a 10% como bloqueio, uso do anticorpo de captura a 5 µg/mL e o anticorpo de detecção na faixa de 5 a 10 µg/mL.

4.4.4 Teste de especificidade do ELISA de captura

Uma vez que as proteínas recombinantes NS1 de orthoflavivirus relacionados foram obtidas, foi avaliada a especificidade do ELISA de captura em desenvolvimento. É possível observar que mesmo quando é usada uma concentração alta de antígeno de outros vírus, somente a proteína de ZIKV é detectada, confirmando que os clones triados anteriormente são específicos e não apresentam reação cruzada neste

formato de teste (**Figura 31**). Embora as proteínas usadas tenham sido validadas por outros ensaios, controles positivos da detecção com anticorpos específicos para DENV e YFV devem ser incluídos em uma repetição deste ensaio.

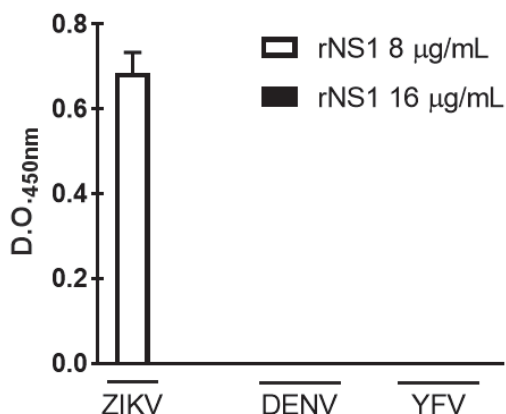


Figura 31 – Especificidade do clone 12B8/2E3 em ELISA de captura. Anticorpo de captura e detecção foram usados a 5 µg/mL em todas as condições testadas. Proteínas rNS1 de cada flavivírus foram testadas na concentração de 8 µg/mL e adicionalmente a 16 µg/mL no caso de DENV e YFV. Os valores de D.O. apresentados foram corrigidos pela subtração dos valores obtidos para o branco e *Mock* correspondentes à amostra testada. Dados apresentados como média e desvio padrão de um experimento realizado em triplicata.

4.5 TESTES PRELIMINARES COM AMOSTRAS HUMANAS

Uma vez que os testes preliminares permitiram a determinação dos parâmetros do ensaio, a próxima etapa consistiu no uso de amostras de soro humano do Laboratório de Referência do Ministério da Saúde para Vírus Emergentes (LRV, Instituto Carlos Chagas - Fiocruz), que dispõe de uma coleção de amostras obtidas de pacientes infectados naturalmente durante a epidemia de ZIKV no Brasil. Embora as etapas de padronização realizadas até o momento sejam relevantes para delinear o ensaio, deve-se levar em consideração que foram realizadas utilizando a proteína NS1 recombinante produzida e armazenada em condições controladas, o que não reproduz a complexidade das amostras humanas.

Primeiramente foi selecionado um painel de soros coletados de pacientes naturalmente infectados que apresentaram sorologia IgM positiva para ZIKV, um indicativo de infecção recente, assim como soro de doadores saudáveis como controle negativo. Por se tratar de um teste inicial, foi feito um *pool* com as amostras sabidamente positivas e testadas diluições de 1:25, 1:50 e 1:100. Embora não tenha sido detectado sinal para as amostras testadas, os poços contendo a proteína rNS1

reagiram, indicando que ausência de sinal para os soros positivos não foi devido a algum problema no ensaio (dados não mostrados).

Foi levantada a possibilidade de que o tempo de coleta das amostras possa não ser adequado para uso, uma vez que a produção e liberação de NS1 em infecções por flavivírus ocorre no início da infecção (ALCON; TALARMIN; DEBRUYNE; FALCONAR *et al.*, 2002; MACDONALD; TONRY; HALL; WILLIAMS *et al.*, 2005; YOUNG; HILDITCH; BLETCHLY; HALLORAN, 2000). Durante uma infecção primária típica por orthoflavivirus, anticorpos IgM podem ser detectados entre 6 e 14 dias após infecção, atingindo o pico de secreção em duas semanas seguido de um período de queda nos próximos 2 a 3 meses, embora, em alguns casos, seja possível a persistência por maiores períodos (KUNO, 2001). Considerando que a presença de NS1 circulante está associada à viremia, um grupo de amostras RT-PCR positivas para ZIKV foi selecionado para testagem.

Novamente, foi realizado um *pool* a partir de 7 soros positivos, testados nas mesmas diluições descritas anteriormente. Foi observado o mesmo resultado, com detecção de sinal somente para o controle positivo (dados não mostrados). Analisando estes dados, foi discutida a implicação das diluições usadas na perda de sinal e, para fins de comparação, foi verificada qual diluição é recomendada para dosagem em soro humano em um teste comercial para detecção de NS1 de DENV (*Panbio Dengue Early Rapid*, Abbot). Um novo ensaio utilizando a diluição recomendada de 1:2 foi realizado, apresentando novamente sinal somente para o controle positivo (dados não mostrados). Embora neste último teste o antígeno presente na amostra tenha sido pouco diluído, é importante ressaltar que outros componentes do soro também ficam mais concentrados, podendo ocasionar maior interferência no sinal. Sendo assim, foram testadas adicionalmente as diluições dos soros de 1:3, 1:5 e 1:10, embora nenhuma tenha apresentado resultados reagentes (dados não mostrados).

Levando em consideração a variação nas respostas a infecções naturais por orthoflavivirus, é esperado uma grande flutuação nos níveis de NS1 circulante entre indivíduos. Por este motivo, o uso de um *pool* das amostras pode acabar diluindo a concentração de proteína presente em amostras mais concentradas. Foi então realizado um novo ensaio com 4 amostras RT-PCR positivas de histórico conhecido, testadas individualmente com seus devidos controles. Adicionalmente, um soro obtido de doador saudável, usado como controle negativo da reação, foi utilizado para

diluição da proteína recombinante, simulando as condições nas quais a proteína nativa se encontra. Embora os soros tenham sido usados puro e em baixas diluições (1:1 e 1:5), após a correção dos valores de D.O., foi observado um sinal muito fraco para apenas duas amostras testadas na diluição 1:1 (**Figura 32**). É importante ressaltar que o uso de soro humano para diluição do controle positivo ocasionou uma redução de aproximadamente cinco vezes no valor de D.O. da reação quando comparado com a rNS1 diluída em tampão de bloqueio, mostrando que componentes do soro estão interferindo no sinal detectado.

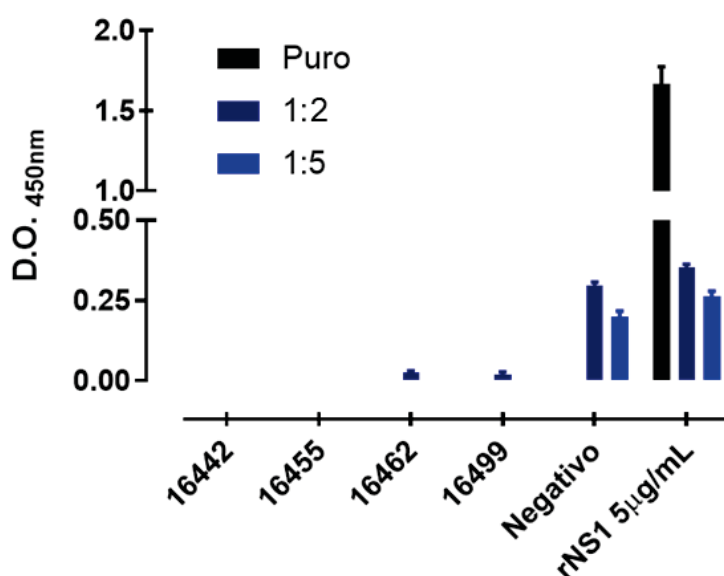


Figura 32 – ELISA de captura para NS1 em amostras de soro de pacientes RT-PCR positivas para ZIKV. Quatro amostras individuais foram testadas; ao soro de um doador saudável (negativo) foi adicionado rNS1 como um controle positivo. A proteína rNS1 diluída em tampão de bloqueio foi utilizada como controle positivo da reação. O grupo puro para rNS1 corresponde à proteína diluída em tampão de bloqueio. Os valores de D.O. apresentados foram corrigidos pela subtração do valor obtido para o branco e *Mock* correspondente à amostra testada. Dados apresentados como média e desvio padrão de um experimento realizado em triplicata.

A partir destes testes preliminares foi levantada a hipótese de que a concentração de NS1 presente no soro de pacientes é baixa, podendo estar abaixo do limite de detecção do ensaio, ou ainda que os componentes do soro estejam impedindo a detecção do antígeno. Para determinar o limite de diluição do soro de forma que não ocorra interferência na detecção da proteína de interesse, foi realizado um novo ELISA de captura com amostras de quatro doadores saudáveis nas diluições de 1:1, 1:5, 1:10, 1:20 e 1:50. Uma quantidade conhecida de rNS1 foi adicionada a cada amostra para comparação com o controle positivo.

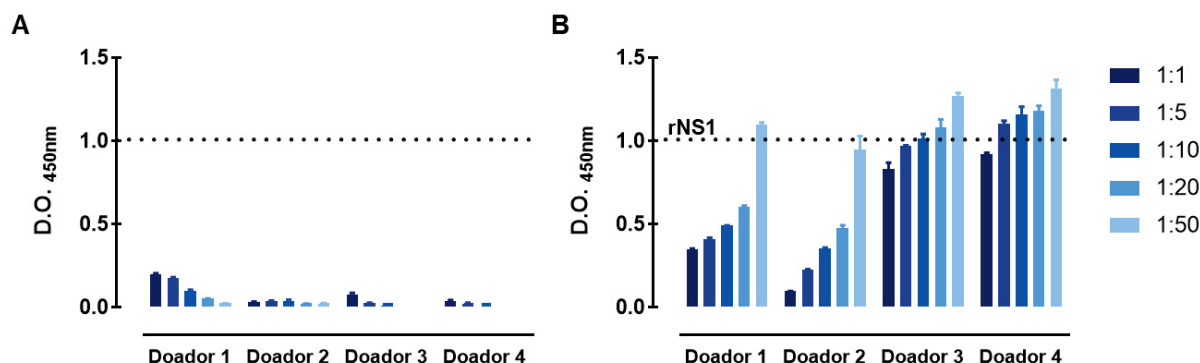


Figura 33 – Interferência de componentes do soro humano na reação do ELISA de captura para NS1. Soros de doadores saudáveis foram testados em diluições crescentes na ausência (**A**) e presença da proteína rNS1 a 5µg/mL (**B**). A linha pontilhada representa a D.O. obtida para o controle positivo, que consiste na proteína diluída em tampão de bloqueio. As amostras obtidas dos doadores 1 e 2 foram armazenadas a -80°C, enquanto as amostras 3 e 4 foram armazenadas a -20°C. Os valores de D.O. apresentados foram corrigidos pela subtração do valor obtido para o branco e para o *Mock* correspondente à amostra testada. Dados apresentados como média e desvio padrão de um experimento realizado em triplicata.

Embora já tenha sido observado que o soro negativo gera um certo nível de *background* na reação (dados não mostrados), analisando o resultado deste experimento, é possível notar que este ruído é reduzido à medida que os componentes da amostra são diluídos (**Figura 33A**). Como esperado, a interferência do soro na detecção da proteína de interesse é dependente da diluição, sendo possível observar uma queda de pelo menos 50% do sinal nas diluições até 1:20 das amostras provenientes dos doadores 1 e 2 (**Figura 33B**). Considerando que as amostras do LRV são armazenadas em *ultrafreezer*, dentre as condições testadas, somente a diluição de 1:50 apresentou D.O. similar ao controle positivo em todas as amostras, sendo a mais indicada para uso no ensaio.

Adicionalmente, é possível notar uma grande diferença no perfil dos resultados obtidos para os doadores 1 e 2 em comparação com os doadores 3 e 4. A estocagem dos soros em uma temperatura mais alta parece ter levado à degradação do(s) componente(s) presente(s) na amostra biológica que causam interferência na reação, uma vez que não se observa uma alteração significativa nos valores de D.O. mesmo na diluição mais baixa quando comparado com o controle positivo do ensaio (**Figura 33B**, doadores 3 e 4).

Levando em consideração a diluição mínima do soro sugerida, a concentração de NS1 circulante deve estar na faixa dos microgramas por mL para ser detectada

pelo ensaio. Estes resultados evidenciam a necessidade de outras abordagens para o refinamento do ensaio com o intuito de melhorar o limite de detecção do ELISA.

4.6 OTIMIZAÇÃO DO ELISA DE CAPTURA

4.6.1 Inativação do soro humano

Os resultados obtidos até o momento sugerem que a falha na detecção de NS1 no soro de pacientes pode ser parcialmente atribuída a interferência de componentes do soro. Sendo assim, com o objetivo de reduzir a interferência, foi testada a inativação do soro antes da realização do ELISA de captura. Após aquecimento a 56 °C por 40 minutos, a amostra foi diluída em diferentes proporções e uma quantidade conhecida de NS1 foi adicionada.

Primeiramente, não foi observada uma diferença significativa entre o sinal obtido na ausência da proteína de interesse, ou seja, a inativação prévia da amostra não alterou o *background* do ensaio (**Figura 34A**). Por outro lado, quando a NS1 é adicionada ao soro inativado, é possível notar um aumento considerável no sinal em comparação ao soro que não foi aquecido. Embora a inativação não tenha eliminado totalmente a interferência de componentes do soro, já que a D.O. obtida é inversamente proporcional à diluição testada, fica evidente que uma diluição baixa seria suficiente para detecção da proteína sem perda de sensibilidade (**Figura 34B**).

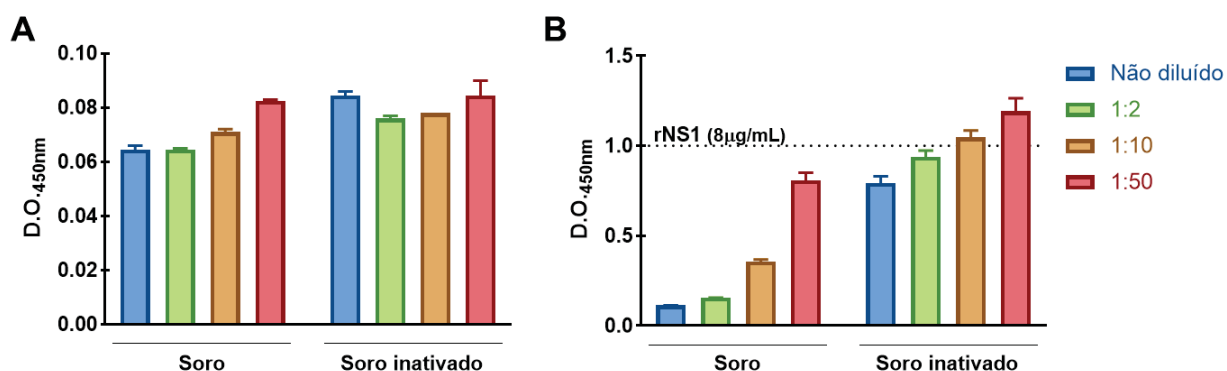


Figura 34 – Teste de inativação de soro humano. Soro não inativado e inativado de doador saudável foi testado em diluições crescentes na ausência (**A**) ou presença de rNS1 a 8 µg/mL (**B**) por ELISA de captura. A linha pontilhada representa a D.O. obtida para o controle positivo, que consiste na proteína diluída em tampão de bloqueio. Os valores de D.O. apresentados em **B** foram corrigidos pela subtração dos valores obtidos para o branco e *Mock* correspondentes à amostra testada. Dados apresentados como média e desvio padrão de um experimento realizado em triplicata.

O resultado deste experimento sugere que a inativação prévia da amostra poderia resolver o problema relacionado a falha de detecção de NS1 no soro de pacientes, no entanto, é importante ressaltar que ele não reproduz as condições reais das amostras obtidas em uma infecção natural. Desta forma, foi realizado um novo experimento no qual a proteína recombinante foi adicionada ao soro em duas concentrações diferentes antes do aquecimento a 56 °C por 40 minutos. Neste caso, é possível observar que o aquecimento da amostra contendo a proteína alvo levou à perda total de sinal detectado no ensaio em ambas as concentrações testadas (**Figura 35**).

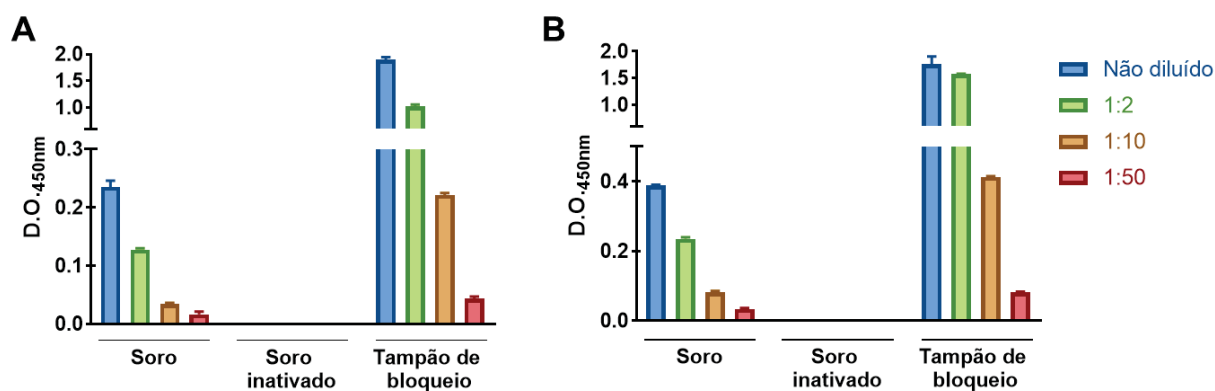


Figura 35 – Teste de inativação de soro humano contendo rNS1. Soro não inativado e inativado de doador saudável contendo 8 µg/mL (**A**) ou 16 µg/mL (**B**) de rNS1 foi testado em diluições crescentes por ELISA de captura. Como controle, tampão de bloqueio contendo rNS1 também foi testado. Os valores de D.O. apresentados foram corrigidos pela subtração dos valores obtidos para o branco e *Mock* correspondentes à amostra testada. Dados apresentados como média e desvio padrão de um experimento realizado em triplicata.

É possível que o aquecimento da amostra tenha ocasionado uma mudança conformacional na proteína recombinante e, conseqüentemente, possa ter afetado a capacidade de ligação do anticorpo monoclonal ao seu epítipo. Embora a rNS1 não tenha sido caracterizada quanto ao seu estado oligomérico, o uso do mesmo anticorpo nas etapas de captura e detecção do ELISA sugerem que ela esteja majoritariamente complexada. Caso o aquecimento leve à dissociação dos oligômeros, a proteína em seu estado monomérico não teria epítipo disponível para ligação do anticorpo conjugado, o que também poderia explicar a queda no sinal observado por ELISA.

Para testar esta hipótese, foi realizado um novo teste no qual os anticorpos monoclonais 2E6/2E6 e 1F12/2E11, caracterizados anteriormente, foram usados na

etapa de captura. No entanto, como pode-se observar na Figura 36, a substituição do anticorpo monoclonal usado não foi suficiente para reverter a perda de sinal.

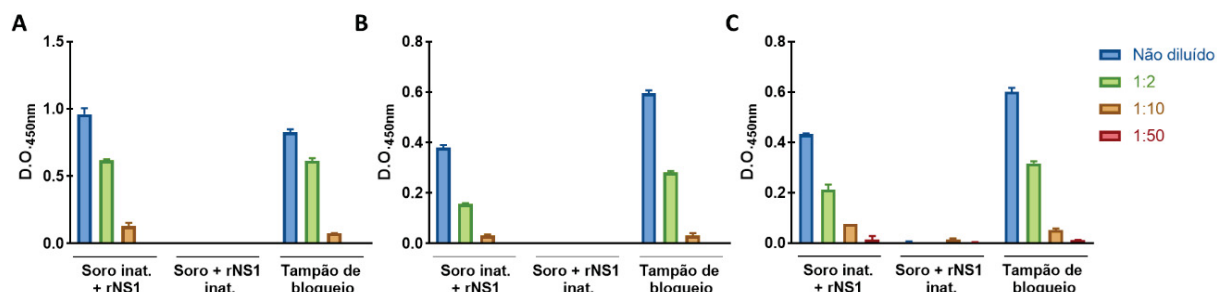


Figura 36 – Teste de inativação do soro humano associado ao uso de diferentes mAbs. ELISA de captura com os mAbs 12B8/2E3 (A), 2E6/2E6 (B) e 1F12/2E11 (C). Soro inativado de doador saudável foi testado em diluições crescentes na presença de rNS1 a 8 µg/mL por ELISA de captura. Amostras: rNS1 adicionada após inativação do soro (Soro inat. + rNS1); rNS1 adicionada antes da inativação do soro (Soro + rNS1 inat.); controle positivo (rNS1 em tampão de bloqueio). Os valores de D.O. apresentados foram corrigidos pela subtração dos valores obtidos para o branco e *Mock* correspondentes à amostra testada. Dados apresentados como média e desvio padrão de um experimento realizado em triplicata.

Considerando que protocolos diferem quanto ao tempo de inativação de soro, foi feita uma cinética (10, 20 e 40 minutos a 56 °C) com o intuito de determinar se o aquecimento por um tempo menor seria capaz de diminuir a interferência do soro sem afetar a detecção da proteína alvo. Todos os tempos testados levaram a uma redução significativa do sinal obtido no ELISA de captura (**Figura 37**), sendo assim, esta inativação prévia da amostra não é uma alternativa viável para otimização do ensaio.

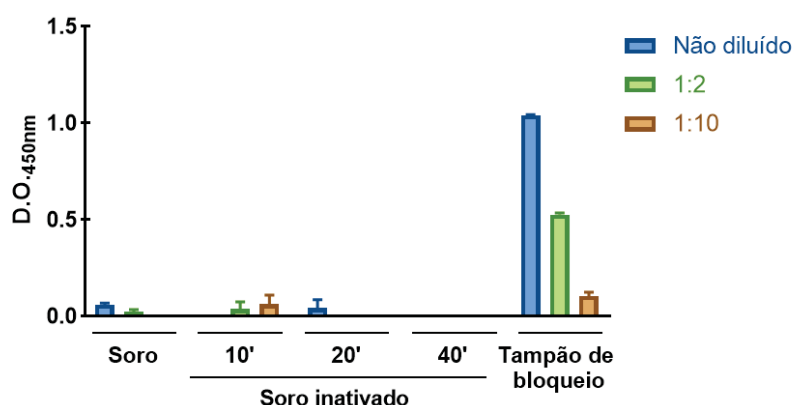


Figura 37 – Cinética de inativação de soro humano. Soro não inativado e inativado de doador saudável contendo 8 µg/mL de rNS1 foram testados em diluições crescentes por ELISA de captura. Como controle a proteína rNS1 foi testada em tampão de bloqueio. Os valores de D.O. apresentados foram corrigidos pela subtração dos valores obtidos para o branco e *Mock* correspondentes à amostra testada. Dados apresentados como média e desvio padrão de um experimento realizado em triplicata.

4.6.2 Tratamento do soro humano

Diferentes metodologias para resolver a perda de sinal nas amostras biológicas por interferentes presentes no soro humano foram descritos na literatura. Dentre estas, primeiramente foi testado o tratamento com sulfato de amônio saturado (SAS). Para isto, seguindo a metodologia descrita por Karakus *et al.* (2005), ao soro de doador saudável foi adicionado SAS na concentração final de 9%. Embora tenha sido observado um pequeno aumento na D.O. da amostra de soro contendo rNS1 com o tratamento quando comparada à amostra não tratada, esta diferença não é significativa e os valores brutos ainda são inferiores à proteína diluída no tampão de bloqueio (**Figura 38A**). Além disto, também foi observado que o tratamento com SAS por si só ocasiona aumento da D.O. no branco, o que não é ideal, uma vez que aumenta o *background* do ensaio (dados não mostrados).

Levando em conta resultados prévios onde foi mostrado que a inativação por calor do soro é capaz de eliminar a interferência da amostra na detecção do antígeno, foi levantada a possibilidade de que este fenômeno poderia estar sendo causado por proteínas do complemento. Sabe-se que os cátions Ca^{2+} e Mg^{2+} , presentes no soro humano, são essenciais para o funcionamento deste sistema e, além disto, eles podem ocasionar mudanças conformacionais ao se ligar ao antígeno, impactando diretamente na detecção do analito (TATE; WARD, 2004). Uma vez que o EDTA, por se tratar de um quelante de Ca^{2+} e Mg^{2+} , é um conhecido inibidor do sistema complemento, verificamos se sua adição ao ELISA poderia diminuir a interferência observada. Embora concentrações crescentes de EDTA tenham sido testadas, variando de 1 a 50 mM, foi observado aumento no valor da D.O. do branco acima de 10mM (dados não mostrados). Nas concentrações mais baixas, não foi observada nenhuma vantagem associada ao uso deste quelante na otimização do ensaio (**Figura 38B**).

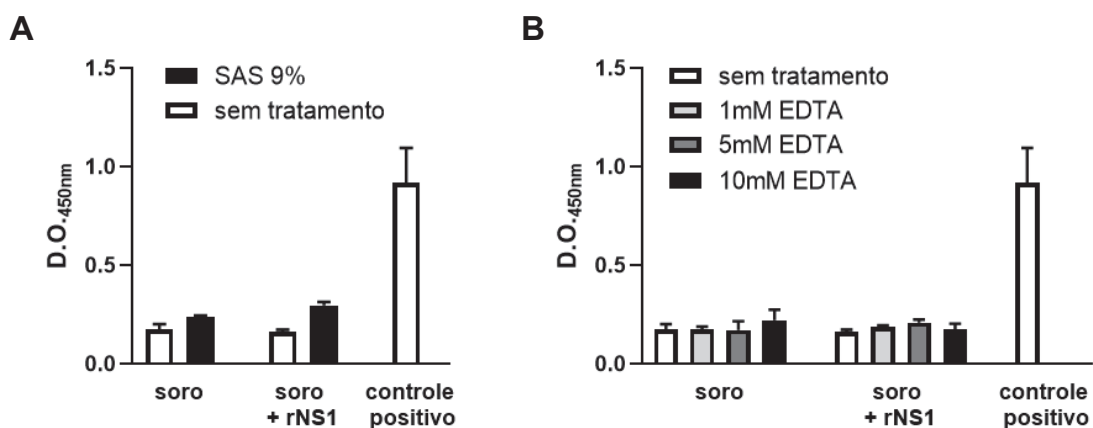


Figura 38 – Efeito do tratamento com sulfato de amônio saturado e EDTA na detecção de rNS1 por ELISA de captura. Detecção da proteína recombinante (10 µg/mL) em soro de doador saudável tratado com SAS 9% (A) e EDTA em concentrações crescentes (B). Os valores de D.O. para o controle positivo foram corrigidos pela subtração dos valores obtidos para o branco. Dados apresentados como média e desvio padrão de um experimento realizado em triplicata.

Finalmente, a última abordagem testada consistiu em verificar se a detecção de rNS1 em plasma, coletado com tubos de heparina sódica, EDTA e citrato de sódio, apresentaria a mesma interferência detectada na análise a partir de amostras de soro. Como pode ser observado na Figura 39, o uso de plasma ao invés de soro também não proporcionou nenhuma vantagem na eficiência do ELISA de captura.

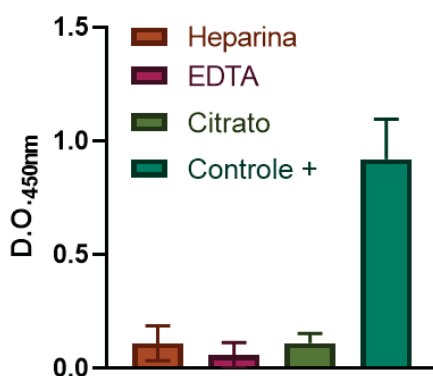


Figura 39 – Detecção de rNS1 em plasma humano. Dosagem da proteína recombinante por ELISA de captura em plasma de doador saudável, coletado em tubos de heparina sódica, EDTA e citrato de sódio. Os valores de D.O. para o controle positivo foram corrigidos pela subtração dos valores obtidos para o branco. Dados apresentados como média e desvio padrão de um experimento realizado em triplicata.

4.6.3 Uso de *pool* de mAbs para captura de NS1

Embora em testes anteriores o clone 12B8/2E3 α -ZIKV1 tenha se mostrado mais eficiente na marcação por IFI e gerado uma D.O. mais alta que os outros mAbs por ELISA, não havia sido testado se a associação de anticorpos na etapa de captura poderia melhorar o sinal da reação. Sendo assim, os três clones foram avaliados em diferentes combinações e isoladamente como controle.

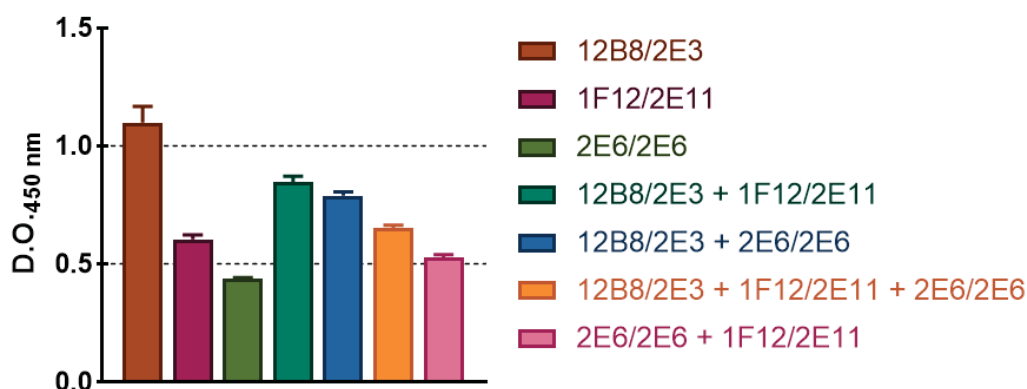


Figura 40 – Teste de combinações dos mAbs 12B8/2E3, 2E6/2E6 e 1F12/2E11. A concentração total de anticorpos usada em cada grupo foi de 5 μ g/mL, independentemente do número de clones utilizado. Os valores de D.O. apresentados foram corrigidos pela subtração do valor obtido para o branco e para o *Mock* correspondente à amostra testada. Dados apresentados como média e desvio padrão de um experimento realizado em triplicata.

Os resultados obtidos para os mAbs testados isoladamente reproduziram o mesmo perfil observado previamente. Embora os anticorpos 2E6/2E6 e 1F12/2E11 tenham apresentado melhora no sinal quando associados ao clone 12B8/2E3, nenhuma combinação atingiu uma D.O. superior ao uso do mAb 12B8/2E3 isoladamente (**Figura 40**). Resta realizar a conjugação dos mAbs com HRP para avaliar se outras combinações na etapa de detecção podem levar a melhora do sinal e consequente redução do limite de detecção.

4.6.4 Eficiência de conjugação de mAbs-HRP

Uma das etapas passível de otimização consiste na conjugação do anticorpo monoclonal usado para a detecção no ELISA de captura. O lote de 12B8/2E3-HRP produzido anteriormente não foi submetido a uma etapa de purificação após as reações de conjugação. Portanto, se a eficiência do processo não for alta, a amostra

final consistirá em uma mistura onde anticorpos não conjugados podem se ligar à proteína alvo, diminuindo a disponibilidade do analito para ligação do anticorpo que gerará o sinal.

Com o objetivo de melhorar a pureza do 12B8/2E3-HRP, duas abordagens foram testadas. Primeiramente, o protocolo usado foi revisado e alterado de forma a melhorar a eficiência de conjugação. Em seguida, a amostra foi submetida a uma etapa de purificação por troca iônica em FPLC, com o objetivo de separar os anticorpos e HRP livres dos anticorpos conjugados. O protocolo descrito por Wisdom (2005) havia sofrido algumas alterações para produção do primeiro lote de anticorpo, em parte devido a limitações de materiais disponíveis no momento. Sendo assim, desta vez o protocolo foi seguido de forma mais fidedigna, sem alterações no volume das reações de conjugação.

4.6.4.1 Purificação por troca iônica

Tendo em vista que a afinidade da amostra com a coluna de troca aniônica HiTrap Q HP era desconhecida, foi realizado um teste com outro anticorpo monoclonal conjugado (anti-CHIKV-HRP) para determinar o perfil de eluição da amostra. Isto permitiu ajustes no método de purificação preservando a amostra de interesse. Para isto, o sobrenadante precipitado por sulfato de amônio foi descongelado, purificado e conjugado de acordo com a metodologia descrita previamente. Embora o mAb usado para esta padronização pertença a subclasse IgG1 κ diferente do anticorpo usado no ELISA de captura (IgG2b κ), os procedimentos para obtenção, purificação e conjugação foram repetidos de forma que a amostra fosse o mais próxima possível ao mAb usado no teste em desenvolvimento.

Para avaliar o perfil de eluição da amostra, foram realizadas três corridas independentes, uma com o mAb não conjugado, uma com a proteína HRP e, finalmente, uma com o anti-CHIKV-HRP. A análise das proteínas isoladas fornece informações quanto ao tempo de retenção de cada pico, embora não haja garantia de que a amostra submetida à reação de conjugação se comporte da mesma maneira.

Primeiramente foi realizada uma corrida com o anticorpo não conjugado. Nas condições de purificação testadas, é possível observar que, embora uma pequena porção da amostra injetada não tenha se ligado à coluna (**Figura 41A e B** - fração 5), o anticorpo eluiu majoritariamente em um pico único com aproximadamente 25% do

tampão B (**Figura 41A**). Além disto, a base larga do pico obtido durante a etapa de eluição evidencia a presença de uma população mista, que pode ser resultado de agregados de anticorpos, ou ainda da presença de contaminantes que não foram totalmente eliminados na etapa prévia de purificação por afinidade (**Figura 41**).

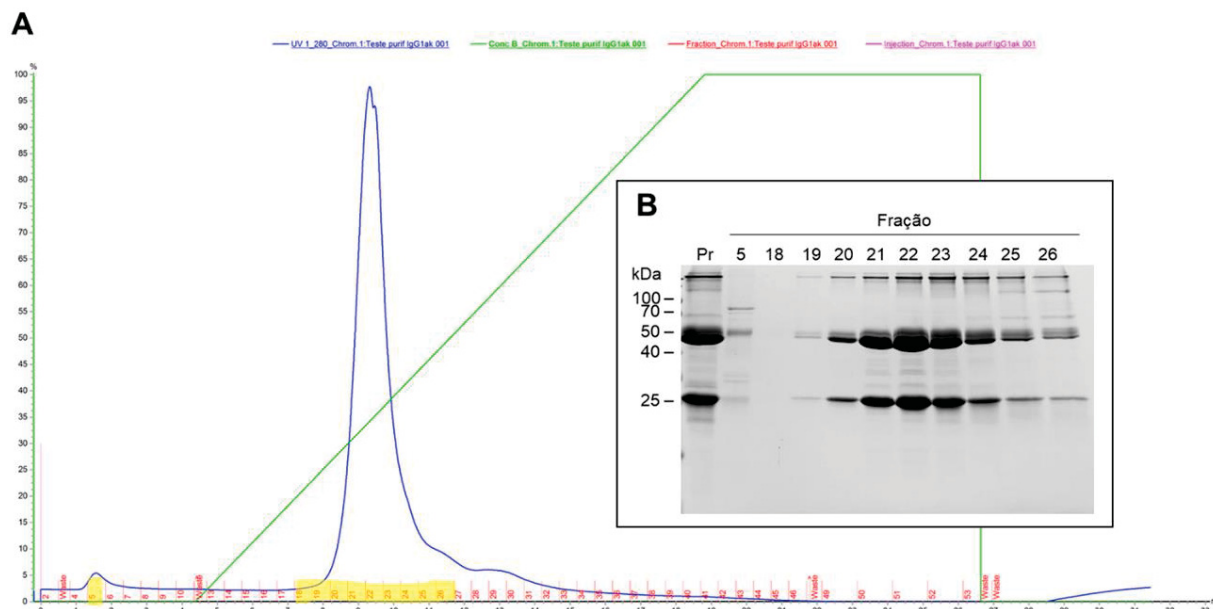


Figura 41 – Purificação por troca iônica de mAb anti-CHIKV. Cromatograma da purificação do anticorpo anti-CHIKV em coluna HiTrap Q HP 1mL (**A**). As frações destacadas em amarelo foram resolvidas em SDS-PAGE com gel a 13% corado com Azul de *Coomassie* (**B**). Amostra: Pr – Pré purificação. Tamanho esperado das bandas referentes à IgG: 25 e 50 kDa.

Embora o mesmo método tenha sido utilizado para purificação da proteína HRP, esta não apresentou afinidade pela coluna e, portanto, foi eliminada durante a etapa de lavagem, antes mesmo da eluição (**Figura 42A e B**). Considerando que o objetivo da troca iônica do anticorpo conjugado é a eliminação de contaminantes, o fato da HRP não se ligar à coluna facilitará o processo de purificação.

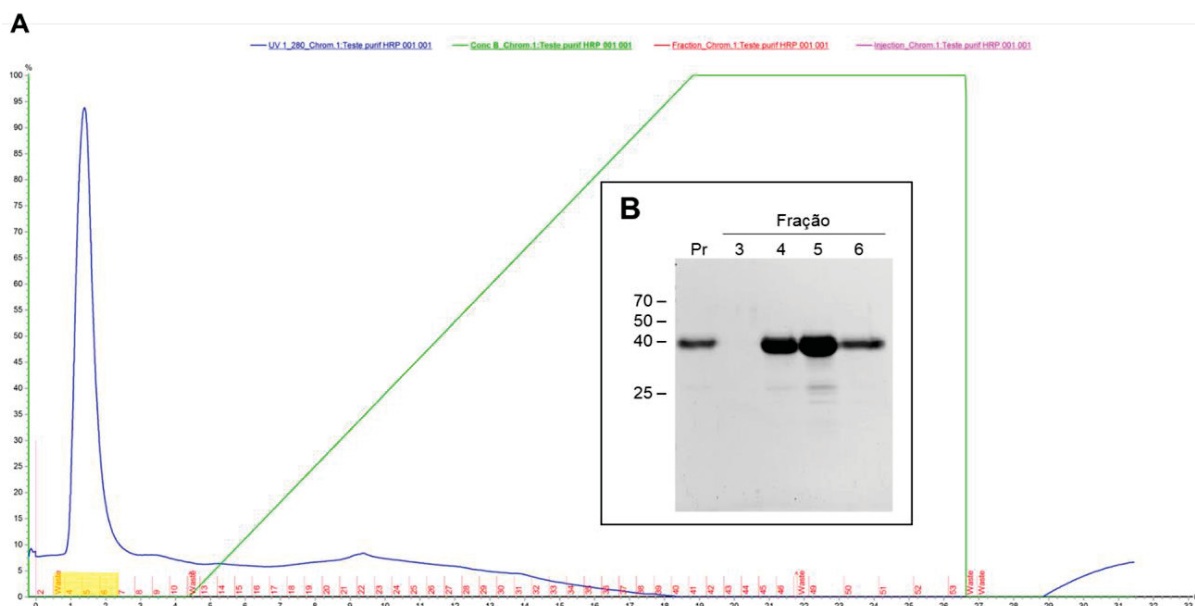


Figura 42 – Purificação por troca iônica da enzima HRP. Cromatograma da purificação de HRP em coluna HiTrap Q HP 1mL (A). As frações destacadas em amarelo foram resolvidas em SDS-PAGE com gel a 13% corado com Azul de Coomassie (B). Amostra: Pr – Pré purificação. Tamanho esperado da banda referente à HRP: 44 kDa.

Uma vez analisado o perfil de eluição das proteínas isoladamente, foi realizada uma corrida com o anticorpo conjugado, na qual foram observados três picos, sendo que os dois primeiros apresentaram o mesmo tempo de retenção observado nas corridas prévias (**Figura 43 A**). O primeiro pico foi detectado nas mesmas frações referentes à corrida com HRP e análise em SDS-PAGE confirmou a presença desta proteína como componente principal da fração (**Figura 43 B**, fração 5). Com o objetivo de melhorar a separação da amostra, foi realizado o *hold* manual da concentração de B a partir do momento em que o segundo pico começou a eluir. Com isto dois picos foram obtidos, possivelmente um referente ao anti-CHIKV e outro referente ao mAb conjugado.

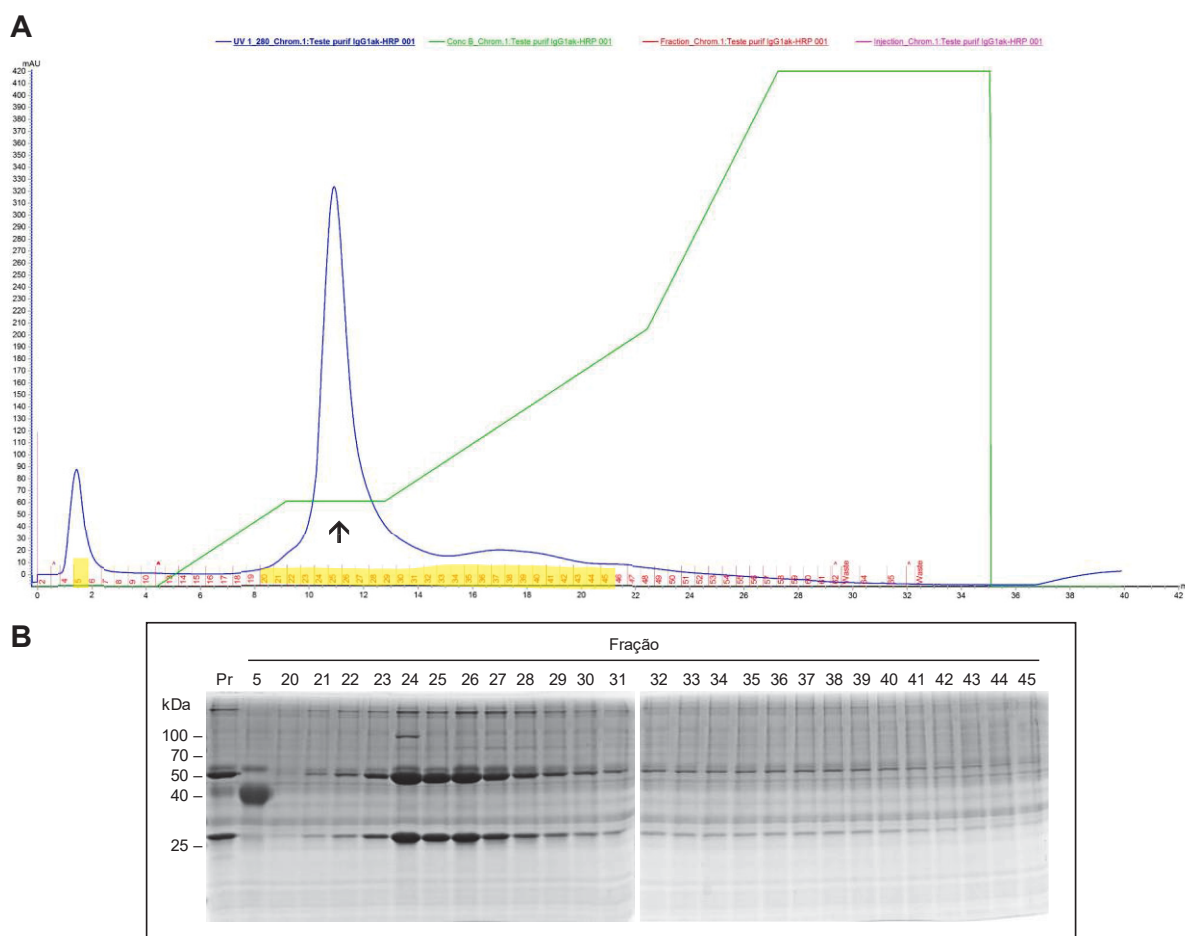


Figura 43 – Purificação por troca iônica do mAb anti-CHIKV-HRP. Cromatograma da purificação do anticorpo conjugado anti-CHIKV-HRP em coluna HiTrap Q HP 1mL (A). A seta indica o *hold* manual do gradiente de eluição. As frações destacadas em amarelo foram resolvidas em SDS-PAGE com gel a 13% corado com Azul de Coomassie (B). Amostra: Pr- Pré purificação. Tamanho esperado das bandas referentes à IgG: 25 e 50 kDa. Tamanho da banda referente à HRP: 44kDa.

O perfil eletroforético das frações referentes aos dois picos evidenciou uma maior quantidade de anticorpo no primeiro pico, representados pelas bandas de aproximadamente 25 e 50 kDa, referentes às cadeias leve e pesada de IgG. Além disto, foi possível observar uma banda próxima a 100 kDa na fração 24, que poderia corresponder ao peso da cadeia pesada somado a proteína HRP (**Figura 43B**). Desta forma, estes resultados sugerem que o método escolhido para purificação da amostra é capaz de separar em três populações os componentes do mAb-HRP, sendo que pela análise das frações, o anticorpo conjugado estaria presente no primeiro pico obtido após início da eluição.

Uma vez que o método foi validado, a amostra de interesse foi purificada nas mesmas condições. É possível notar pela análise do cromatograma que o perfil do 12B8/2E3-HRP foi o mesmo, com três picos, embora desta vez, o segundo pico tenha

apresentado uma leitura menor quando comparado ao terceiro pico (**Figura 44 A**), contrariamente ao que foi observado para α -CHIKV. Esta mudança no perfil de eluição dos anticorpos pode ser devido a uma diferença na eficiência da reação de conjugação, uma vez que o pico referente à HRP livre está menor em comparação à corrida com α -CHIKV-HRP. Isto também poderia explicar o aumento no tamanho do terceiro pico observado durante a eluição e, por este motivo, é possível que o anticorpo conjugado esteja eluindo no terceiro pico e não no segundo, como foi proposto após análise do cromatograma da Figura 43. Embora a resolução das amostras por SDS-PAGE esteja baixa, possivelmente por problemas durante a corrida, é possível ver bandas de maior intensidade para o pico 2 em comparação ao pico 3. No entanto, considerando que a base do terceiro pico é mais larga, é possível que isto seja devido ao fato dos anticorpos estarem mais diluídos.

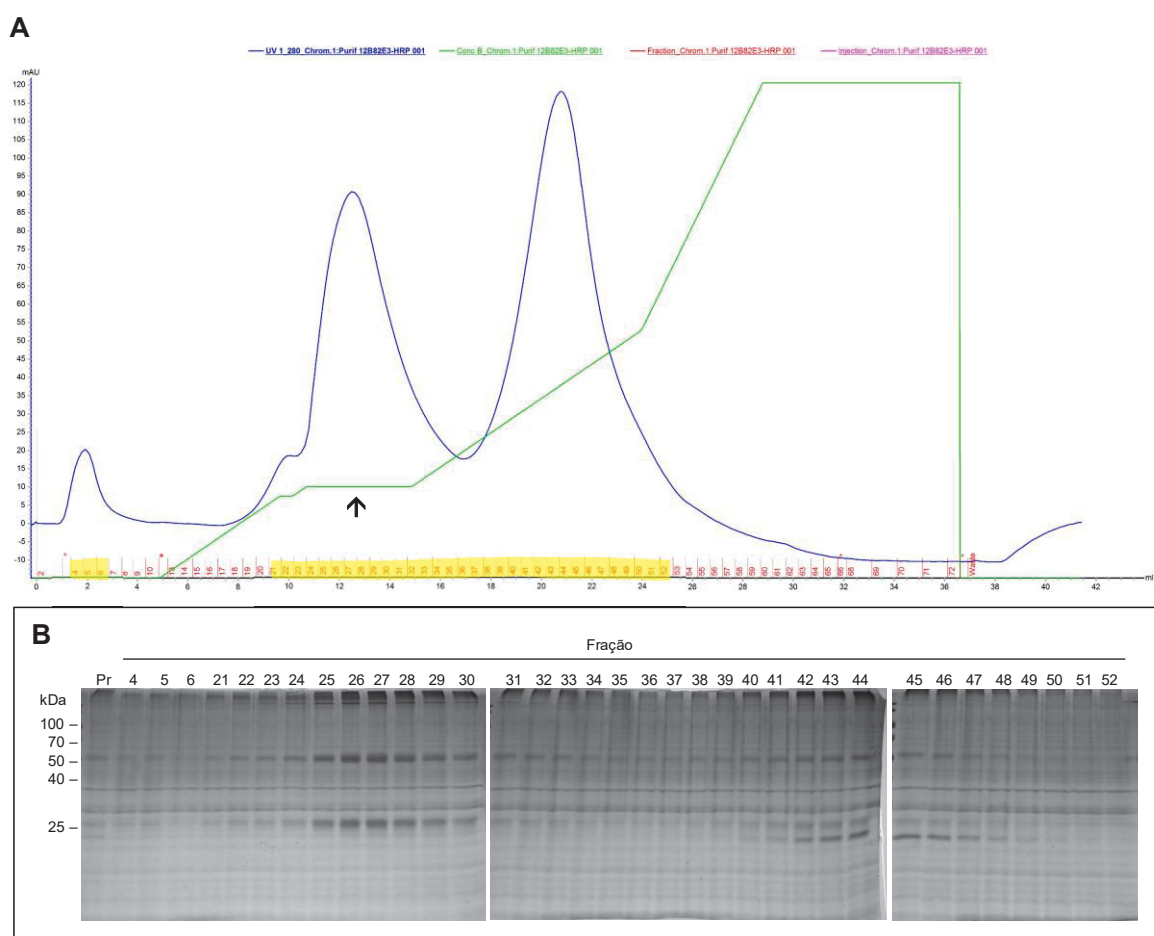


Figura 44 – Purificação por troca iônica de mAb 12B8/2E3-HRP. Cromatograma da purificação do anticorpo conjugado 12B8/2E3-HRP em coluna HiTrap Q HP 1mL (**A**). A seta indica o *hold* manual do gradiente de eluição. As frações destacadas em amarelo foram resolvidas em SDS-PAGE com gel a 13% corado com Azul de Coomassie (**B**). Amostra: Pr- Pré purificação. Tamanho esperado das bandas referentes à IgG: 25 e 50 kDa. Tamanho da banda referente à HRP: 44kDa.

Para verificar se os picos obtidos na eluição correspondem à separação dos anticorpos livres dos anticorpos conjugados com HRP, foi realizado um ELISA de captura comparando estas amostras com a amostra injetada no sistema, assim como o primeiro lote de 12B8/2E3-HRP gerado com o protocolo anterior. Primeiramente, é possível observar que as modificações no protocolo melhoraram a eficiência de conjugação, uma vez que o lote novo apresentou maior sinal em comparação com o lote antigo. Além disto, a comparação do sinal obtido para os picos 2 e 3, revela que após purificação, o anticorpo conjugado está presente nas frações que constituem o terceiro pico (**Figura 45**). No entanto, embora este resultado confirme que o método escolhido para purificação é capaz de separar mAbs-HRP de anticorpos e HRP livre, o sinal obtido após a troca iônica é menor quando comparado à amostra inicial. Sendo assim, a modificação no protocolo é suficiente para melhorar a eficiência da reação.

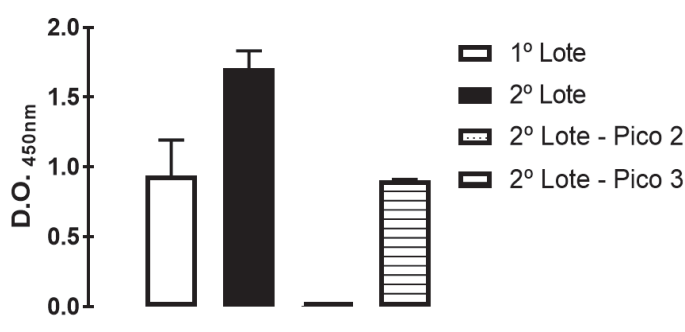


Figura 45 – Eficiência de conjugação do mAb 12B8/2E3-HRP. ELISA de captura revelado com os dois lotes de anticorpo conjugado e amostras após purificação por troca iônica. O anticorpo de detecção foi usado a 5 µg/mL e o antígeno rNS1 foi usado a 8 µg/mL em todas as condições usadas. Os valores de D.O. apresentados foram corrigidos pela subtração dos valores obtidos para o branco e *Mock* correspondentes à amostra testada. Dados apresentados como média e desvio padrão de um experimento realizado em triplicata.

4.6.5 Comparação da eficiência dos mAbs anti-NS1-HRP

Novos lotes dos anticorpos monoclonais 2E6/2E6 e 1F12/2E11 foram produzidos, precipitados, purificados e conjugados seguindo as modificações testadas. Os anticorpos obtidos foram testados em ELISA direto para verificar se a reação ocorreu com sucesso e em ELISA de captura para analisar se o uso destes mAbs oferece alguma vantagem com relação ao 12B8/2E3-HRP. Como pode ser observado na Figura 46A, ainda que as reações tenham ocorrido com sucesso, a atividade dos mAbs gerados foi inferior ao 12B8/2E3-HRP, anticorpo utilizado

atualmente nos ensaios. Apesar do sinal do 1F12/2E11 ser superior ao 2E6/2E6-HRP, vale ressaltar que este é um anticorpo que reconhece NS1 de ZIKV e DENV-3. Este resultado se repetiu no ELISA de captura, no qual todas as combinações de mAbs foram testadas, mas nenhuma se mostrou mais promissora que o uso do monoclonal 12B8/2E3 na etapa de captura e detecção (**Figura 46B**). O uso do mAb 1F12/2E11 para captura e 12B8/2E3 para detecção apresentou sinal semelhante ao uso de 12B8/2E3 em ambas as etapas. Resta testar o uso desta combinação ofereceria alguma vantagem na detecção da proteína nativa presente em amostras humanas.

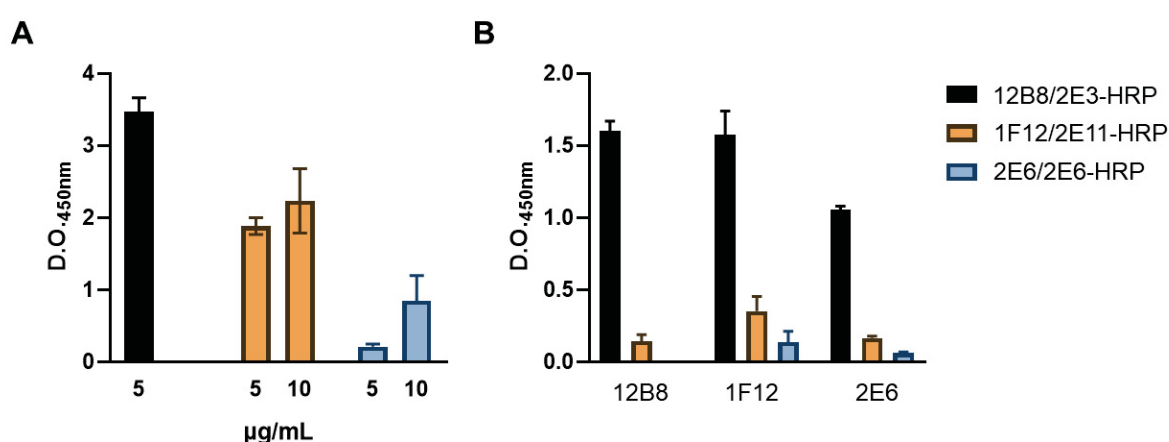


Figura 46 – Comparação da eficiência de três mAbs conjugados no reconhecimento de rNS1 de ZIKV. Detecção da proteína recombinante por ELISA direto com os anticorpos 12B8/2E3, 2E6/2E6 e 1F12/2E11 em concentrações crescentes (**A**). ELISA de captura com diferentes combinações dos anticorpos de captura e detecção, ambos usados a 5µg/mL (**B**). Os valores de D.O. apresentados foram corrigidos pela subtração dos valores obtidos para o branco correspondente à amostra testada. Dados apresentados como média e desvio padrão de um experimento realizado em triplicata.

4.7 ELISA DE CAPTURA DE NS1-ZIKV

Após todos os testes realizados para otimização do ensaio, foi realizada a diluição seriada da proteína recombinante rNS1 de ZIKV de 40 a 0,019 µg/mL para determinar o limite de detecção do ELISA. O limite de detecção do teste é 19,5 ng/mL, apresentando uma resposta concentração dependente até 10 µg/mL (**Figura 47**). Sendo assim, esta foi a faixa escolhida para a interpolação de valores desconhecidos para determinar a concentração de uma amostra desconhecida.

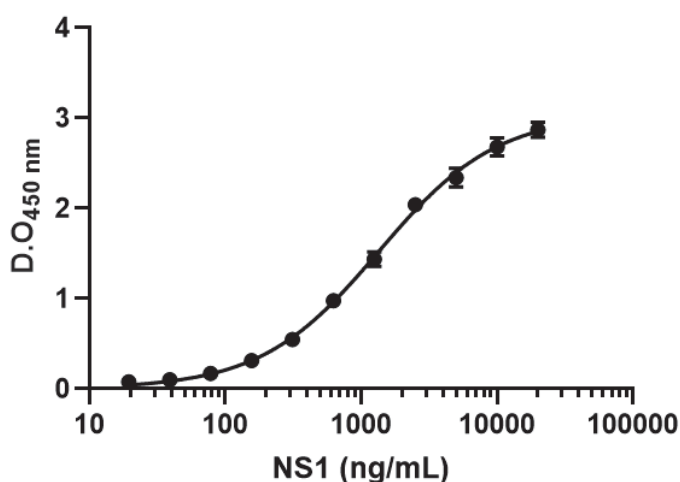


Figura 47 – ELISA de captura de NS1-ZIKV. Regressão não linear da curva padrão construída a partir de diluições seriadas de rNS1 de ZIKV. Os valores de D.O. apresentados foram corrigidos pela subtração dos valores obtidos para o branco. Dados representativos de três experimentos independentes, apresentados como média e desvio padrão.

4.8 ESTUDO DA CINÉTICA DE EXPRESSÃO DE NS1 DURANTE A INFECÇÃO DE DIFERENTES LINHAGENS CELULARES

4.8.1 Triagem das condições para o estudo

Embora o ELISA de captura desenvolvido não tenha sido validado para detecção de NS1 em amostras sorológicas, sabe-se que ele é capaz de detectar a proteína nativa secretada em infecções *in vitro*. Sendo assim, para estudar os padrões de expressão de NS1 durante a infecção por ZIKV, selecionamos linhagens celulares de origem humana, sendo elas a A549, Huh7.5, JEG3 e BeWo, assim como a linhagem celular C6/36, derivada de *Ae. albopictus*.

Visto a escassez de informações relacionadas a concentração de NS1 produzida durante a infecção por ZIKV, primeiramente foi necessário determinar as melhores condições para dosagem deste antígeno por ELISA. Para garantir que as amostras estejam dentro do limite de detecção do ensaio, é importante que uma porção significativa da cultura esteja infectada. Por outro lado, uma taxa de infecção muito alta pode ser desvantajosa caso leve a morte celular. Uma vez que tínhamos como objetivo não somente quantificar, mas também discernir a NS1 secretada (sNS1) da NS1 associada à célula, a lise celular poderia influenciar a dosagem, já que neste caso proteínas intracelulares estariam presentes no sobrenadante. Sendo

assim, foram testados diferentes MOIs para cada linhagem celular, com o objetivo de escolher a condição na qual o inóculo fosse alto o suficiente para obter uma porcentagem significativa de células infectadas, mas que, preferencialmente, apresentasse pouco efeito citopático (CPE).

Para este estudo, selecionamos três cepas virais distintas, a cepa MR766 da linhagem africana e a ZV BR 2015/15261 e ZV BR 2016/16288, pertencentes à linhagem asiática, isoladas pelo nosso grupo durante a epidemia de ZIKV no Brasil (STROTTMANN; ZANLUCA; MOSIMANN; KOISHI *et al.*, 2019). A triagem de diferentes MOI foi realizada por IFI em placas de 96 poços em 3 *timepoints*, 24, 48 e 72 horas, através da marcação com anticorpo 4G2 contra a proteína de envelope do vírus. É possível observar que em todas as linhagens de origem humana, a cepa viral MR766 apresenta maior infectividade, quando comparado com os isolados clínicos ZV BR 2015/15261 e ZV BR 2016/16288 (**Figura 48 e Figura 49**). Por outro lado, o inverso é visto quando a infecção ocorre em C6/36 (**Figura 50**).

No caso das células A549 e Huh7.5, foi necessário usar o MOI mais alto dos isolados ZV BR 2015/15261 e ZV BR 2016/16288 para que uma quantidade significativa das células estivesse infectada pelos isolados clínicos nos *timepoints* de 48 e 72 horas (**Figura 48**, painéis à direita). Em contrapartida, é possível notar que todas as condições testadas para o vírus MR766 são capazes de infectar uma grande parte da monocamada 48 e 72 horas após infecção. É importante ressaltar que no grupo MR766 MOI 1, a partir de 48 horas, foi possível observar efeito citopático (CPE) na monocamada de Huh7.5, sendo que 72 horas após a infecção havia sinais claros de morte celular. Efeito semelhante foi observado em A549, embora em menor escala. Sendo assim, para a cepa africana, foi escolhido o MOI de 0,1 para infecção de ambas as linhagens.

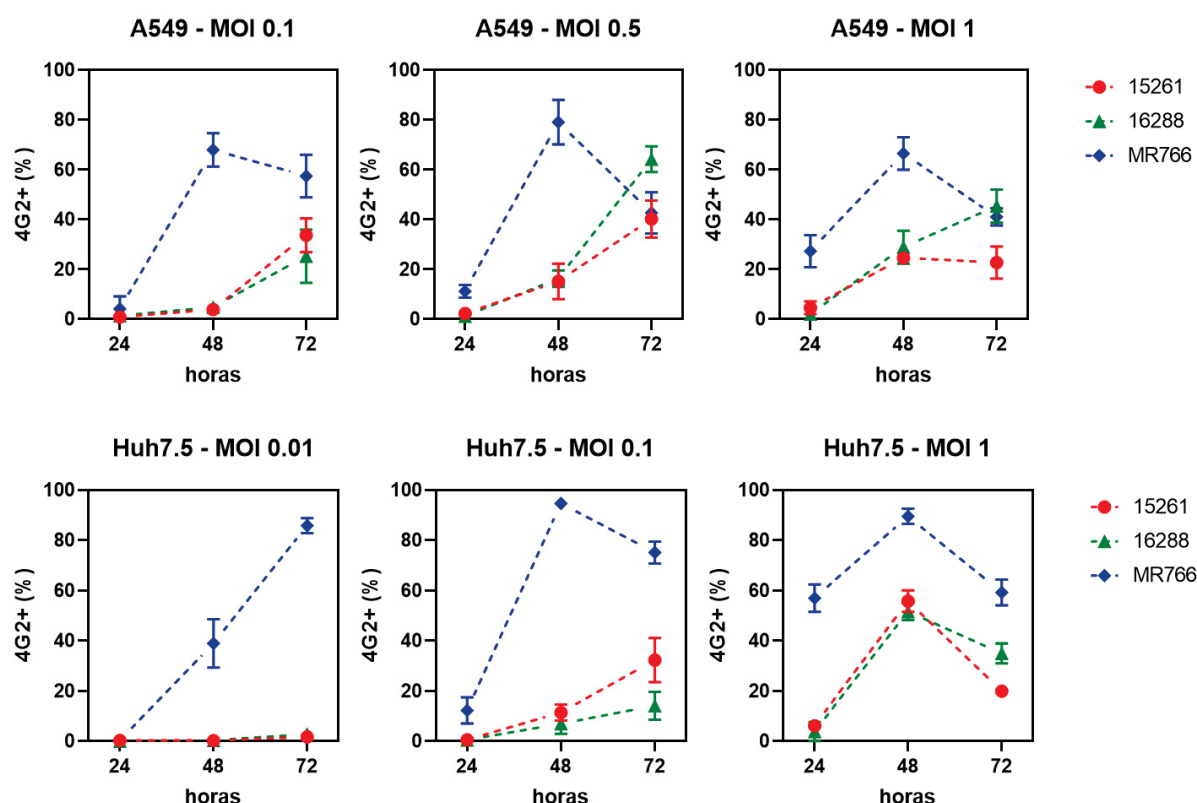


Figura 48 – Cinética de crescimento de ZIKV ZV BR 2015/15261, ZV BR 2016/16288 e MR766 em A549 e Huh7.5. Células foram semeadas em placas de 96 poços, infectadas e fixadas após 24, 48 e 72 horas. As amostras foram analisadas por IFI no *Operetta CLS High content analysis system*, através da marcação com mAb 4G2, DAPI e Azul de Evans. A frequência de células infectadas foi determinada com o *software Harmony*. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes, apresentados como média e desvio padrão.

Quanto às células de origem placentária, BeWo e JEG-3, novamente foi observada maior infectividade para a linhagem africana (**Figura 49**). No entanto, três dias após a infecção, grande parte da monocamada de JEG-3 estava destacada em todas as condições, embora este efeito tenha ocorrido em menor escala no MOI de 0,05. Sinais de CPE também foram observados durante a infecção em BeWo, ainda que de forma menos importante em comparação ao observado para JEG-3. Sendo assim, para a linhagem BeWo foi selecionado o MOI de 0,1. Considerando que mesmo no MOI mais baixo testado ainda foi visto muito CPE em JEG-3, foi determinado que uma concentração mais baixa deveria ser utilizada (MOI = 0,01).

De forma geral, os isolados clínicos ZV BR 2015/15261 e ZV BR 2016/16288 apresentaram baixa infectividade, sendo que em BeWo a infecção com o inóculo mais concentrado de ZV BR 2015/15261 levou a infecção de apenas 10% da cultura em 72 horas (**Figura 49**). Embora comparativamente um número maior de células positivas é observado na monocamada de JEG-3, a infecção ainda é baixa na maioria das

condições testadas. Somente na infecção com ZV BR 2015/15261 MOI de 1 foi observada uma infecção significativa da monocamada ao final da cinética (**Figura 49**).

De forma semelhante ao observado para MR766, para as infecções com os isolados ZV BR 2015/15261 e ZV BR 2016/16288 em culturas de JEG-3 com o MOI mais alto, o dano à monocamada é perceptível após 72 horas, ainda que de forma menos proeminente. Levando isto em consideração, o MOI de 1 foi selecionado como a melhor condição, uma vez que não seria possível aumentar o inóculo devido ao risco de causar morte da maior parte da cultura.

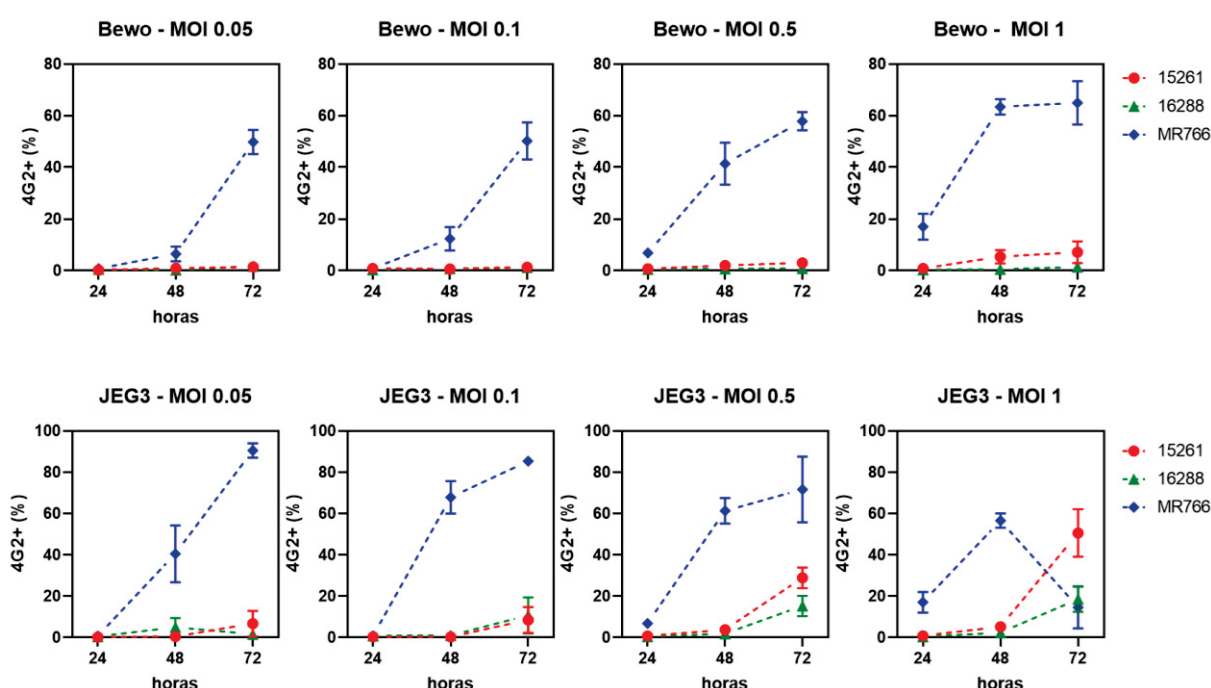


Figura 49 – Cinética de crescimento de ZIKV ZV BR 2015/15261, ZV BR 2016/16288 e MR766 em BeWo e JEG-3. Células foram semeadas em placas de 96 poços, infectadas e fixadas após 24, 48 e 72 horas. As amostras foram analisadas por IFI no *Operetta CLS High content analysis system*, através da marcação com mAb 4G2, DAPI e Azul de Evans. A frequência de células infectadas foi determinada com o *software Harmony*. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes, apresentados como média e desvio padrão.

No caso das células de linhagem de mosquito C6/36, independente do MOI testado, 72 horas após a infecção a maior parte da cultura está positiva para ZIKV. Entretanto, com o inóculo mais concentrado é possível observar uma maior porcentagem de células infectadas 48 horas após a infecção, principalmente para a cepa MR766 (**Figura 50**). Considerando que estas células não apresentaram efeito citopático, o MOI de 1 foi selecionado para todos os vírus testados.

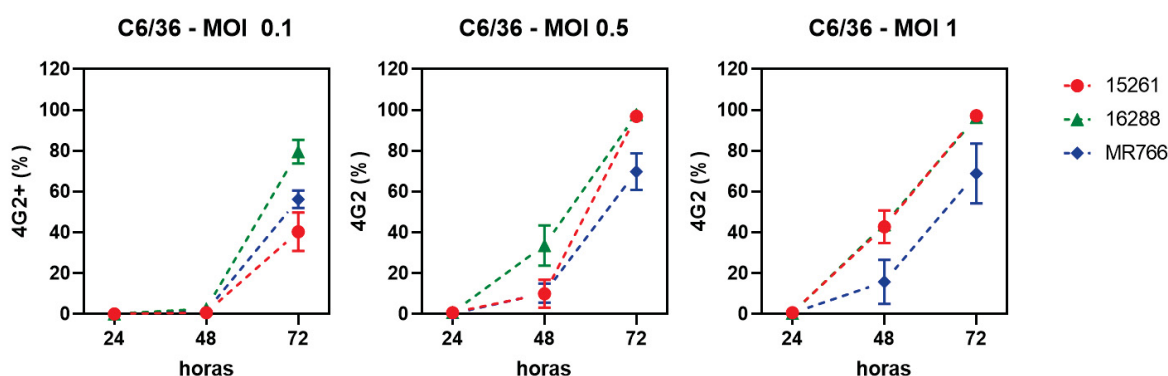


Figura 50 – Cinética de crescimento de ZIKV ZV BR 2015/15261, ZV BR 2016/16288 e MR766 em C6/36. Células foram semeadas em placas de 96 poços, infectadas e fixadas após 24, 48 e 72 horas. As amostras foram analisadas por IFI no *Operetta CLS High content analysis system*, através da marcação com mAb 4G2, DAPI e Azul de Evans. A frequência de células infectadas foi determinada com o *software Harmony*. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes, apresentados como média e desvio padrão.

Devido a limitações como *fitness* viral e virulência, nem todas as condições selecionadas levam à infecção da maioria da cultura. As condições escolhidas para cada linhagem estão resumidas na Tabela 9. Cabe ressaltar que os MOI foram selecionados baseados somente na infectividade e na observação da presença de CPE por microscopia ótica, portanto, é importante que a avaliação da morte celular seja realizada.

Tabela 9 – Condições selecionadas para infecção em diferentes linhagens celulares.

Linhagem	Origem	MR766 (MOI)	15261 (MOI)	16288 (MOI)
A549	Pulmonar	0,1	1	1
Huh7.5	Hepática	0,1	1	1
BeWo	Placentária	0,1	1	1
JEG-3	Placentária	0,01	1	1
C6/36	Mosquito	1	1	1

4.8.2 Teste das condições para dosagem de NS1

Uma vez que as condições de infecção para dosagem da proteína de interesse foram determinadas para cada linhagem celular, a próxima etapa consistiu em realizar um piloto em pequena escala. Para este teste, foi selecionada apenas a linhagem Huh7.5 infectada com MR766 e analisada dois dias após a infecção, condição que corresponderia a cerca de 90% de infecção.

Primeiramente foi realizado um teste para verificar se a diluição da proteína rNS1 em meio de cultivo não levaria a uma diminuição do limite de detecção. Para isto, a proteína recombinante foi diluída de forma seriada de 20 µg/mL a 0,078 µg/mL em DMEM-F12 suplementado ou em tampão de bloqueio do ELISA, sendo que ambos diluentes apresentam a mesma concentração de SBF (10%). Não foi observada interferência do meio na captura do antígeno (dados não mostrados). Uma vez que as amostras a serem analisadas nos testes subsequentes seriam alíquotas de sobrenadante de infecção, as curvas padrão utilizadas nos ensaios foram preparadas de acordo com a composição do meio utilizado para o cultivo de cada tipo celular.

Além disto, foi avaliado o efeito do armazenamento das amostras na detecção por ELISA, onde metade das amostras referentes ao sobrenadante e *pellet* foi submetida a um ciclo de congelamento e descongelamento em *ultrafreezer*, enquanto a outra parte foi mantida a 4°C. Embora não tenha sido observada uma diferença relevante na quantidade de NS1 associada à célula, a concentração do antígeno no sobrenadante foi um maior na amostra congelada (**Figura 51**). Uma vez que o sobrenadante não foi centrifugado para remoção de quaisquer células que possam ter se desprendido da monocamada, é possível que isto seja devido à lise celular como consequência do ciclo de congelamento e descongelamento.

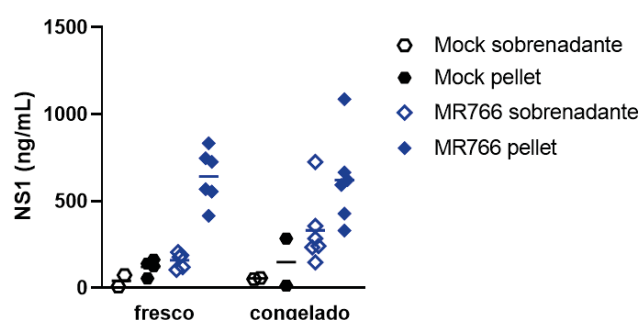


Figura 51 – Teste das condições para dosagem de NS1 nativa por ELISA de captura. Comparação entre a dosagem de amostras frescas e dosagem de amostras armazenadas a -80°C. Células Huh7.5 foram infectadas com ZIKV MR766 (MOI = 0,1) e o sobrenadante e *pellet* foram coletados 48h após infecção para análise. Os valores brutos de D.O. foram corrigidos pela subtração do branco e a concentração foi calculada pela interpolação destes com a curva padrão.

Este teste inicial mostrou que é possível quantificar tanto a proteína nativa presente no sobrenadante de infecção, como a proteína associada a células, embora seja possível notar que há pouca proteína sendo secretada. Considerando que 48 horas após a infecção temos aproximadamente 90% das células infectadas, é possível

que seja necessária uma maior densidade celular para obter níveis mais elevados de NS1 no sobrenadante. Sendo assim, este experimento foi repetido nas mesmas condições, porém em placas de 24 poços, usando um volume total de 600 μ L de meio. Como pode ser observado na Figura 52, quando usada uma concentração maior de células, a detecção de NS1 é facilitada tanto no sobrenadante quanto no *pellet*. Desta forma, os próximos experimentos serão realizados em placas de 24 poços.

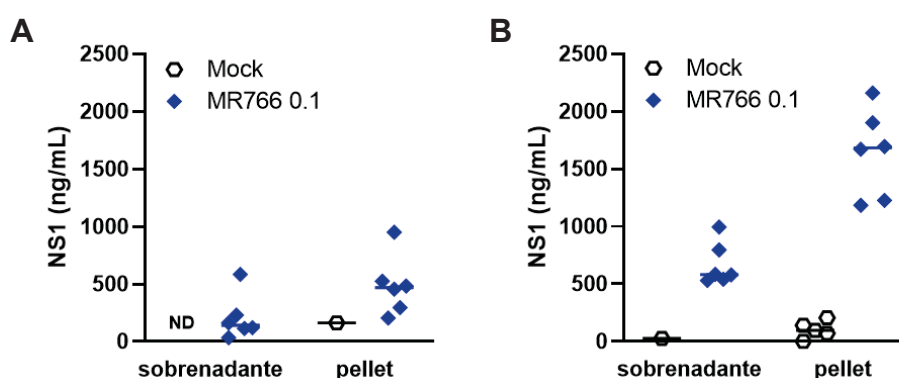


Figura 52 – Produção de NS1 durante a infecção por ZIKV em Huh7.5. Dosagem de NS1 no sobrenadante e pellet 48 horas após infecção com ZIKV MR766 (MOI = 0,1). As amostras foram obtidas a partir de placas de 96 (A) e 24 (B) poços. Os valores brutos de D.O. foram corrigidos pela subtração do branco e a concentração foi calculada pela interpolação destes com a curva padrão.

Com o objetivo de permitir comparações diretas entre infectividade e produção de NS1, é importante que as mesmas condições sejam usadas para análise da expressão da proteína e frequência de células infectadas. Como a densidade celular seria mais alta em placa 24 poços, a aquisição dos dados por imagem poderia gerar dados imprecisos, uma vez que em decorrência da proliferação celular, o *software* poderia apresentar problemas ao discernir os limites celulares. Além disto, há limitações para análise de células pequenas como a C6/36; devido à espessura da placa de 24 poços, não é possível encontrar o foco para obtenção das imagens no *Operetta CLS High content analysis system*. Levando isto em consideração, optamos por realizar a leitura do experimento por citometria de fluxo.

De forma geral, ZV BR 2016/16288 apresentou crescimento similar ou inferior ao ZV BR 2015/15261 no MOI escolhido para infecção das linhagens celulares testadas (**Figura 48, Figura 49 e Figura 50**). Devido ao baixo título deste estoque viral, o volume necessário para infecção de um poço seria muito próximo ao volume do inóculo. Consequentemente, a infecção seria prejudicada pela quantidade de soro presente no estoque viral. Sendo assim, optamos por remover este vírus do estudo.

Tendo visto que a infecção em células BeWo é muito baixa com o isolado clínico e que na linhagem Huh7.5 há muito efeito citopático ao final da cinética, estas linhagens foram excluídas dos próximos experimentos.

4.8.3 Avaliação da expressão e secreção de NS1 durante a infecção por ZIKV

As linhagens celulares selecionadas (C6/36, A549 e JEG-3) foram infectadas seguindo as condições determinadas na etapa de triagem, coletadas 24, 48 e 72 horas após infecção e analisadas por citometria de fluxo quanto à porcentagem de células infectadas e frequência de células NS1 positivas, através da marcação com os mAbs 4G2 e 12B8/2E3, respectivamente. Em paralelo ao experimento realizado por citometria, foi realizada a infecção das mesmas linhagens celulares nas mesmas condições para quantificação do antígeno pelo ELISA de captura desenvolvido.

De forma geral, a cepa ZIKV MR766 apresentou maior infectividade, exceto em C6/36, repetindo as observações feitas anteriormente (**Figura 53** e **Figura 54**). A cinética de infecção de ambos os vírus na linhagem C6/36 seguiu o mesmo perfil observado na etapa de triagem. Em contrapartida, as demais células testadas apresentaram uma frequência inicial de células 4G2 positivas superior ao observado por IFI para ambos os vírus (**Figura 48B-C** e **Figura 49 B-C**).

Isto fica mais evidente quando comparamos os resultados obtidos para JEG-3 pelas duas técnicas com o isolado clínico ZV BR 2015/15261. Por IFI, até dois dias após infecção a população 4G2+ é menor que 10%, atingindo o pico no terceiro dia, com 50% das células infectadas (**Figura 49**). Já quando analisamos os dados de citometria, aproximadamente 40% da cultura está positiva no primeiro e segundo dia pós infecção (**Figura 54C**). Como não havia sido realizada a infecção com MOI de 0,01 para o vírus MR766, não há parâmetro de comparação nesta linhagem celular (**Figura 53C**).

Na infecção das linhagens celulares de origem humana A549 e JEG-3, o pico de infecção foi atingido em até 48 horas após a infecção, sendo que há uma redução da frequência de células 4G2 positivas ao final da cinética, para ambos os vírus testados. É possível que esta queda seja decorrente do aumento de morte celular, evidenciado pela marcação com o corante iodeto de propídeo (PI) (**Figura 53B-C** e **Figura 54B-C**, painel esquerdo).

Por outro lado, em C6/36 há um aumento gradual na porcentagem de células infectadas ao longo da cinética, sendo que o vírus ZV BR 2015/15261 parece apresentar melhor *fitness* viral, uma vez que apresenta uma maior taxa de infecção em todos os *timepoints* em comparação ao MR766. Apesar disto, a frequência de células NS1 positivas e a concentração total de NS1 quantificada por ELISA são similares, (**Figura 53A** e **Figura 54A**, painel central), o que pode ser atribuído a diferenças na carga viral. Dentre todas as linhagens testadas, em C6/36 foi detectada a maior concentração de NS1 total ao final da cinética (**Figura 53A** e **Figura 54A**, painel central). Apesar disto, os níveis de secreção foram baixos, estando fora do limite de detecção 24 e 48 horas após infecção (**Figura 53A** e **Figura 54A**, painel direito). Embora a frequência de células NS1 positivas tenha aumentado ao longo do tempo seguindo o mesmo padrão observado para a taxa de infecção viral, este fenótipo não foi observado para as linhagens de origem humana.

Na infecção de A549 e JEG-3, esta proteína é detectada em abundância mesmo quando há uma diminuição significativa no número de células infectadas ao final da cinética. Isto é observado tanto pela quantidade de células NS1 positivas quanto pela quantificação de NS1 total produzida por ELISA, onde os níveis se mantêm constantes entre 48 e 72 horas após infecção (**Figura 53B-C** e **Figura 54B-C**, painel esquerdo e central). Este fenótipo é particularmente evidente nas células JEG-3, nas quais a frequência de células NS1 positivas é de 4 a 8 vezes maior que a de células 4G2 positivas durante a infecção por MR766 e ZV BR 2015/15261, respectivamente (**Figura 53C** e **Figura 54C**, painel esquerdo e central).

A partir da quantificação por ELISA é possível observar um aumento na concentração de NS1 solúvel ao longo da cinética. Considerando o efeito citopático decorrente da infecção por ZIKV em células de mamíferos, o extravasamento de componentes celulares de células com a membrana danificada pode ter contribuído para a quantidade de NS1 solúvel detectada por ELISA. Uma vez que não foi observado aumento na morte celular durante a infecção em C6/36 (**Figura 53A** e **Figura 54A**, painel esquerdo), é provável que o antígeno presente no sobrenadante tenha sido secretado ativamente. Por outro lado, nas linhagens A549 e JEG-3, esta interferência não pode ser descartada, uma vez que uma porção significativa da população é PI positiva na infecção com ambos os vírus utilizados (**Figura 53B-C** e **Figura 54B-C**, painel direito). Neste contexto, uma maior viabilidade celular poderia sustentar a replicação viral por maiores períodos e com uma carga viral maior,

permitindo assim o acúmulo de NS1, o que pode ser o caso durante a infecção em C6/36.

Além disto, em JEG-3, apesar da taxa de infecção e concentração de NS1 total ser mais baixa durante a infecção com o vírus ZV BR 2015/15261 em comparação com o MR766, a quantidade de sNS1 é similar. Uma vez que ambas as culturas apresentam níveis semelhantes de dano celular, é possível que isto seja devido a uma maior secreção durante a infecção com ZV BR 2015/15261 (**Figura 53C** e **Figura 54C**).

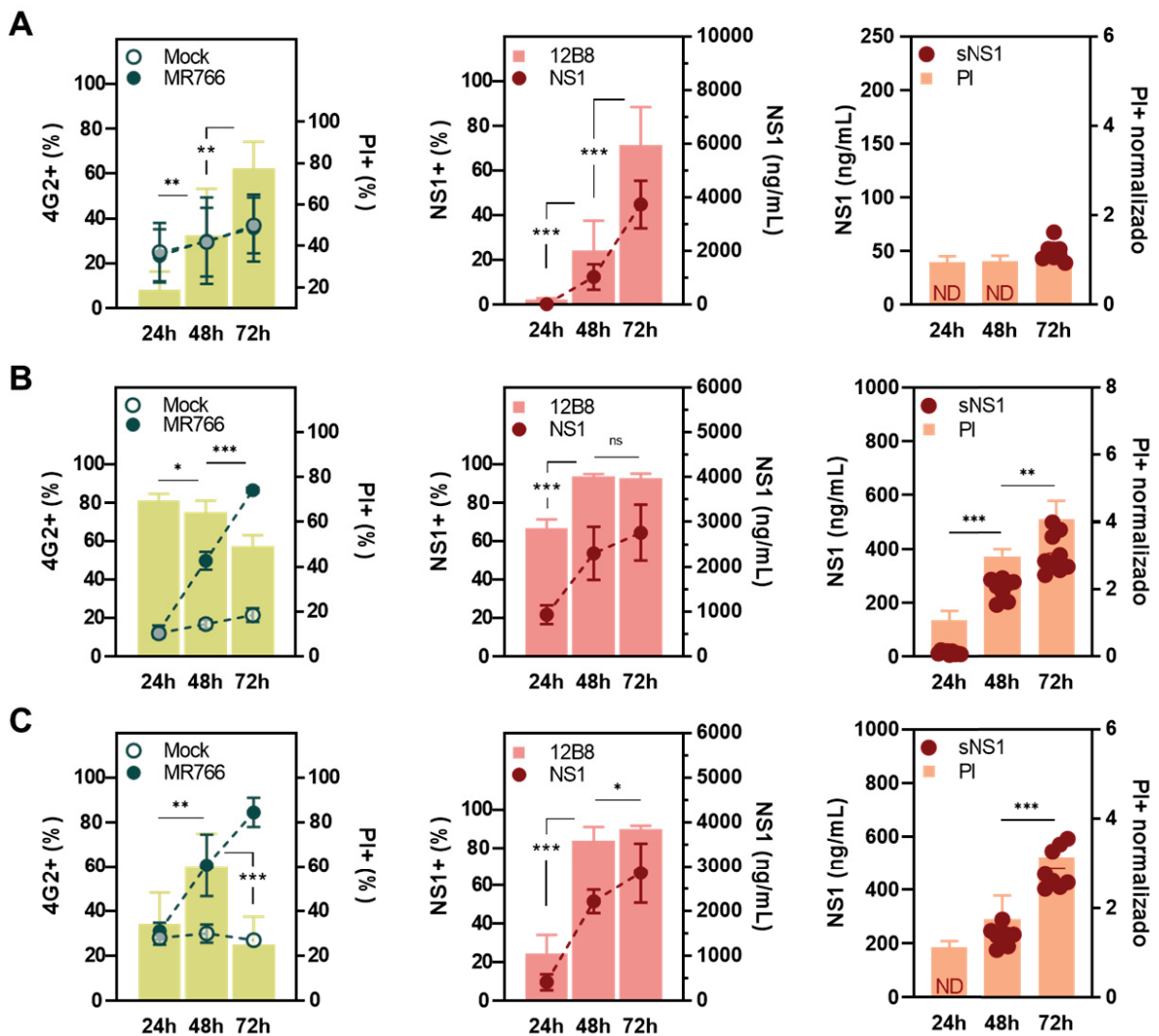


Figura 53 – Dinâmica de expressão de NS1 durante a infecção por ZIKV MR766. Células C6/36 (**A**), A549 (**B**), JEG-3 (**C**) foram infectadas com MOI de 1, 0,1 e 0,01, respectivamente. As amostras foram marcadas com mAb 4G2 para determinar a frequência de infecção (barras) e com iodo de Propídeo (PI) para quantificar dano celular (linhas tracejadas, painel esquerdo). Células NS1+ foram detectadas por marcação com mAb 12B8/2E3 (barras) e a concentração de NS1 total foi determinada por ELISA (linhas tracejadas, painel central). NS1 solúvel (sNS1) foi quantificada por ELISA e apresentada com os resultados de dano celular normalizados com relação ao *Mock* (barras, painel direito). Valores abaixo do limite de detecção foram considerados negativos (ND). Resultados de

citometria e ELISA foram adquiridos a partir de infecções realizadas paralelamente. Análise estatística de células 4G2 e 12B8 positivas (painel esquerdo e central) e NS1 solúvel (painel direito) foi realizada com teste não pareado t de Welch. Ns se $p > 0,05$; * se $p \leq 0,05$; ** se $p \leq 0,01$; *** se $p \leq 0,001$. Dados apresentados como média e desvio padrão de três experimentos independentes.

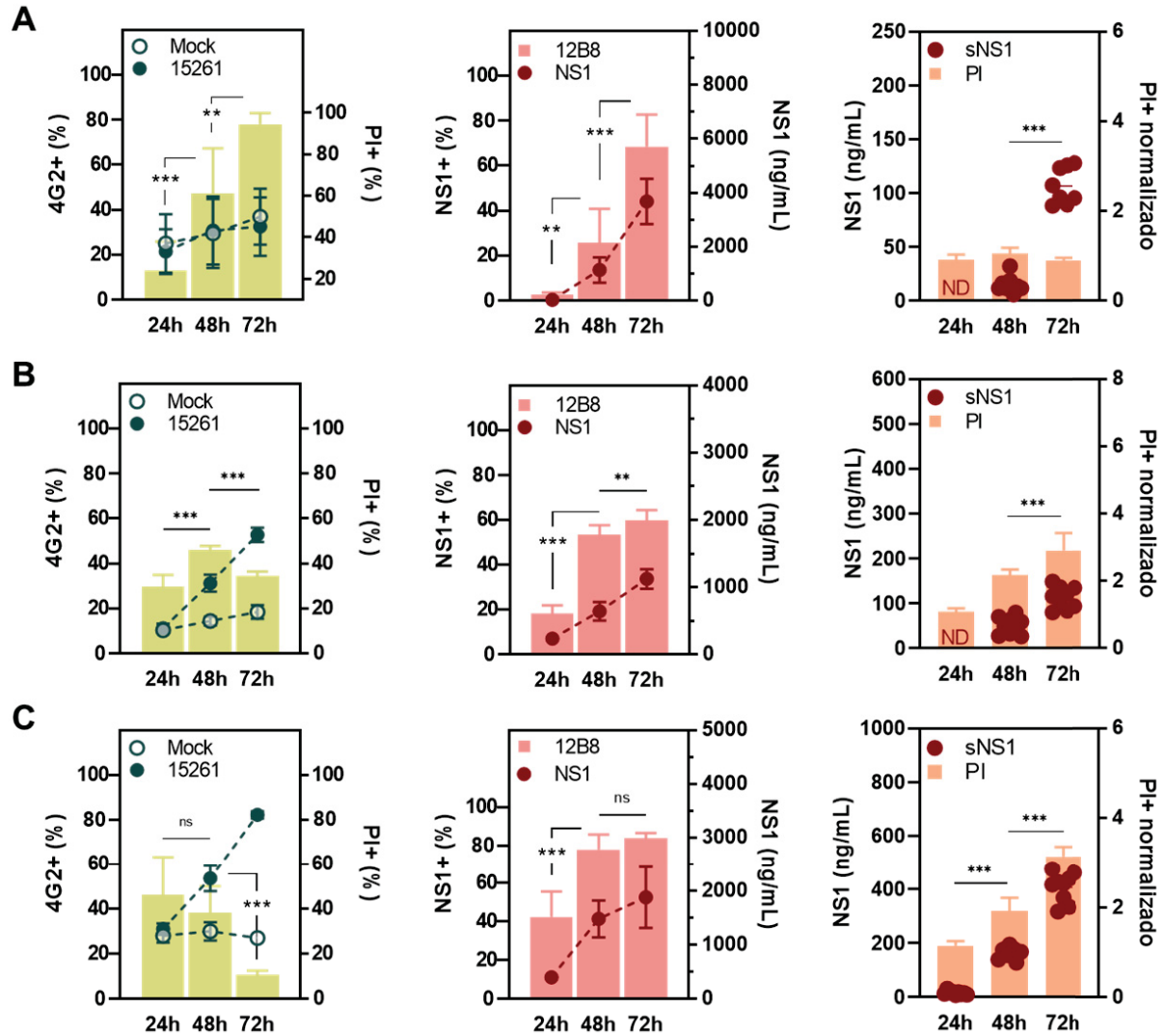


Figura 54 – Dinâmica de expressão de NS1 durante a infecção por ZIKV ZV BR 2015/15261. Células C6/36 (**A**), A549 (**B**), JEG-3 (**C**) foram infectadas com MOI de 1, 0,1 e 0,01, respectivamente. As amostras foram marcadas com mAb 4G2 para determinar a frequência de infecção (barras) e com iodeto de Propídeo (PI) para quantificar dano celular (linhas tracejadas, painel esquerdo). Células NS1+ foram detectadas por marcação com mAb 12B8/2E3 (barras) e a concentração de NS1 total foi determinada por ELISA (linhas tracejadas, painel central). NS1 solúvel (sNS1) foi quantificada por ELISA e apresentada com os resultados de dano celular normalizados com relação ao Mock (barras, painel direito). Valores abaixo do limite de detecção foram considerados negativos (ND). Resultados de citometria e ELISA foram adquiridos a partir de infecções realizadas paralelamente. Análise estatística de células 4G2 e 12B8 positivas (painel esquerdo e central) e NS1 solúvel (painel direito) foi realizada com teste não pareado t de Welch. Ns se $p > 0,05$; ** se $p \leq 0,01$; *** se $p \leq 0,001$. Dados apresentados como média e desvio padrão de três experimentos independentes.

5 DISCUSSÃO

Vírus da família Flaviviridae, como DENV, YFV e ZIKV representam importantes agravos de saúde globalmente. Embora o número de casos de infecção por ZIKV tenham apresentado uma queda considerável após 2016, a transmissão ainda é documentada em alguns países, sendo que a região das Américas tem o maior número de casos reportados anualmente (WHO, 2022). Ainda que a interação entre o ZIKV e o hospedeiro humano tenha sido tema de diversos estudos, ainda existem importantes lacunas no entendimento da sua biologia.

Sabe-se que as proteínas não-estruturais de orthoflavivirus desempenham um papel importante no estabelecimento da infecção viral. A NS1 é uma glicoproteína conservada que pode ser encontrada em monômeros e dímeros em sua forma intracelular, ou ainda ser ativamente secretada na forma de uma partícula lipoproteica hexamérica (CROOKS; LEE; EASTERBROOK; TIMOFEEV et al., 1994; FLAMAND; MEGRET; MATHIEU; LEPAULT et al., 1999; GUTSCHE; COULIBALY; VOSS; SALMON et al., 2011; POST; CARVALHO; GALLER, 1991; WINKLER; RANDOLPH; CLEAVES; RYAN et al., 1988). Embora esteja estabelecido que NS1 intracelular tem um papel essencial na síntese da fita negativa do RNA viral (LINDENBACH; RICE, 1997; LINDENBACH; RICE, 1999; MACKENZIE; JONES; YOUNG, 1996; MUYLAERT; GALLER; RICE, 1997), a proteína secretada contribui para a patogenicidade e evasão do sistema imune. A NS1 extracelular pode se ligar a proteínas do sistema complemento e antagonizar suas funções (AVIRUTNAN; FUCHS; HAUHART; SOMNUKE et al., 2010; AVIRUTNAN; HAUHART; SOMNUKE; BLOM et al., 2011; CHUNG; LISZEWSKI; NYBAKKEN; DAVIS et al., 2006; CONDE; DA SILVA; ALLONSO; COELHO et al., 2016; THIEMMECA; TAMDET; PUNYADEE; PROMMOOL et al., 2016). Além disto, a disrupção da resposta imune tem sido relatada pela interação deste antígeno com vias de sinalização ligadas aos receptores do tipo *Toll* (TLR) e receptores do tipo RIG-I (RLR) (CROOK; MILLER-KITTRELL; MORRISON; SCHOLLE, 2014; WILSON; DE SESSIONS; LEON; SCHOLLE, 2008; WU; LIU; ZHOU; XIE et al., 2017; ZHANG; YE; LIU; DENG et al., 2017).

A presença de NS1 no soro como um marcador de infecção foi descrito pela primeira vez para DENV (ALCON; TALARMIN; DEBRUYNE; FALCONAR et al., 2002; YOUNG; HILDITCH; BLETCHLY; HALLORAN, 2000), mas foi posteriormente proposto para WNV e para o JEV (KUMAR; PARIDA; RAO, 2011; MACDONALD;

TONRY; HALL; WILLIAMS et al., 2005). Embora ELISAs baseados na captura deste antígeno tenham sido desenvolvidos para estes orthoflavivirus, seu uso diagnóstico ainda é subutilizado, exceto no caso de DENV. Além disto, há uma escassez de conhecimento acerca da produção de NS1 durante a infecção por ZIKV para explorar o uso desta proteína como um marcador diagnóstico.

Com a finalidade de estudar a síntese e padrões de secreção da proteína NS1 e avaliar seu potencial como um marcador para o diagnóstico, um ELISA de captura quantitativo específico para ZIKV foi desenvolvido. Para isto, um anticorpo monoclonal que não apresentou reatividade cruzada contra um painel de orthoflavivirus filogeneticamente relacionados foi selecionado, produzido e modificado para uso na captura e detecção de NS1, favorecendo assim a ligação a oligômeros.

Embora existam ELISAs desenvolvidos para detecção de infecções ocasionadas por orthoflavivirus baseados na proteína NS1, estes são majoritariamente voltados para detecção de anticorpos IgG ou IgM e não diretamente da proteína NS1. Estudos prévios para o desenvolvimento de testes visando a captura de NS1 envolvem majoritariamente o uso de soros policlonais de animais imunizados, além do uso de um anticorpo conjugado a HRP para se ligar ao anticorpo usado na detecção. O teste desenvolvido neste projeto faz uso de mAbs anti-NS1 purificados e conjugados, o que representa um avanço em comparação com grande parte dos testes descritos na literatura, pela maior pureza dos insumos obtidos e pela diminuição do tempo para obtenção do resultado, já que elimina a necessidade de uma etapa extra de incubação com anticorpo anti-IgG-HRP.

Diferentes etapas de padronização do teste com o objetivo de melhorar a eficiência da reação foram realizadas, sendo que uma etapa que se mostrou crítica para a sensibilidade do ensaio foi a produção do anticorpo conjugado com a enzima HRP. Ainda que o protocolo original para a conjugação de anticorpos preconize uma etapa de purificação para obter maior pureza do mAb-HRP, quando este passo foi realizado por troca iônica, a amostra final apresentou menor atividade quando comparada à amostra não purificada, sugerindo que o processo de purificação pode estar afetando a atividade enzimática da HRP.

É descrito na literatura que, embora a faixa de estabilidade desta enzima esteja na faixa de pH 5 a 9, a atividade ótima fica em torno de pH 6 a 6,5 (OSTOJIC; HERENDA; GALIJASEVIC; GALIC et al., 2017; SAUD AL-BAGMI; SHAHNAWAZ KHAN; ALHASAN ISMAEL; AL-SENAIDY et al., 2019; SCHOMBURG; SALZMANN;

STEPHAN, 1994). O pH do estabilizante *Guardian* utilizado para armazenamento do mAb-HRP está dentro desta faixa, no entanto, é possível que haja melhora no sinal com a troca de tampão no qual o mAb se encontra ao final da reação de conjugação. Apesar disto, com as adaptações realizadas no protocolo, o lote de 12B8/2E3-HRP obtido apresentou maior atividade com relação a lotes anteriores, o que foi suficiente para melhorar o limite de detecção do ensaio.

Após uma série de etapas de otimização, o teste desenvolvido apresentou sensibilidade similar a outros kits comerciais e *in house* para outros orthoflavivirus (BOSCH; DE PUIG; HILEY; CARRÉ-CAMPS et al., 2017; CHUNG; DIAMOND, 2008; KUMAR; PARIDA; RAO, 2011; MACDONALD; TONRY; HALL; WILLIAMS et al., 2005; RICCIARDI-JORGE; BORDIGNON; KOISHI; ZANLUCA et al., 2017; SAXENA; KUMAR; PARIDA; SIVAKUMAR et al., 2013; YOUNG; HILDITCH; BLETCHLY; HALLORAN, 2000), com um limite de detecção de 19,5 ng/mL. Além disto, a obtenção de rNS1 de DENV e YFV permitiu a confirmação da especificidade da reação mesmo quando uma concentração alta de proteínas relacionadas é usada no teste.

Embora o ensaio padronizado tenha se mostrado bastante promissor usando a proteína rNS1 de ZIKV, quando analisadas amostras humanas, foi possível observar uma queda na eficiência da reação, comprovada com testes usando amostras de doadores saudáveis propositalmente contaminadas com o antígeno. A diluição dos soros reduz consideravelmente a interferência da reação, mas também leva a uma diminuição na quantidade de antígeno disponível, o que poderia ser um problema caso a concentração de NS1 sérica seja muito baixa.

Diversas substâncias capazes de alterar a concentração mensurável do analito ou afetar a capacidade de ligação dos anticorpos, ocasionando interferência em ensaios imunológicos, foram descritas na literatura. Este efeito pode ocorrer de forma independente ou dependente do analito, sendo que, no primeiro caso, fatores como hemólise, lipemia, efeito de anticoagulantes e armazenamento da amostra atuam de forma independente à concentração do analito na amostra (TATE; WARD, 2004). Interferências dependentes do analito estão relacionadas à interação entre constituintes da amostra com os anticorpos do ensaio, como por exemplo, compostos com diferenças químicas, mas com semelhanças estruturais que podem levar a reação cruzada, anticorpos heterófilos (autoanticorpos), anticorpos humanos anti-animal, anticorpos anti-analito, fator reumatoide, entre outros (TATE; WARD, 2004). Considerando os resultados apresentados, a influência de anticorpos heterófilos, anti-

animal e fator reumatóide é improvável, uma vez que os componentes que estão causando interferência na reação são sensíveis à variação de temperatura.

Sabe-se que cátions presentes no soro, como Mg^{2+} ou Ca^{2+} , podem se ligar a proteínas causando mudança conformacional do antígeno e, conseqüentemente, diminuindo a concentração do analito capaz de ser detectado (TATE; WARD, 2004). A forma de coleta da amostra de sangue (heparina, EDTA, fluoreto de sódio/oxalato de potássio ou tubos sem anticoagulante) também podem afetar a reação. Ademais, outras proteínas que afetam a ligação de anticorpos como complemento, lisozima e paraproteína podem ocasionar interferência. O complemento e a lisozima podem inibir a reação pela ligação à porção Fc e bloqueio dos sítios de ligação específicos para o analito nas imunoglobulinas por impedimento estérico, ou ainda pela formação de uma ponte entre a molécula de IgG na fase sólida e o anticorpo de detecção, no caso da lisozima (SELBY, 1999). Considerando que a interação da proteína NS1 com fatores do complemento é amplamente descrita, é possível que esta interferência seja decorrente disto.

O fato de que o aquecimento do soro humano levou a uma redução da interferência da detecção de NS1 nas amostras reforça a existência de componentes sensíveis a temperatura que estão interferindo na reação. Sabe-se que o procedimento para inativação de soro, amplamente usado em laboratório, está ligado principalmente à inativação de complemento.

Foi sugerido previamente que a dissociação ácida ou por calor de NS1 em monômeros pode melhorar a sensibilidade de kits comerciais de ELISA para detecção em amostras de pacientes com DENV (BUONORA; DOS SANTOS; DAUMAS; PASSOS et al., 2017; LIMA; NOGUEIRA; FILIPPIS; NUNES et al., 2014). Roldán *et al.* (2021) propuseram o pré-tratamento do soro humano com DTT e SDS associado a aquecimento a 60°C por 15 minutos como tratamento alternativo para melhora do sinal no formato de ELISA competitivo. Estas condições seriam suficientes para dissociação da proteína sem a formação de coágulos. É importante ressaltar que, para teste destas abordagens, seria necessário o uso de diferentes monoclonais nas etapas de captura e detecção para que o ELISA de captura seja funcional. Além disto, no caso do tratamento desnaturante proposto por Roldán *et al.* (2021), é essencial que estes anticorpos reconheçam epítomos lineares. Sendo assim, há possibilidade de testar esta abordagem, utilizando a combinação 1F12/2E11 para captura e 12B82E3 para detecção.

De forma geral, a análise da literatura evidencia uma grande variação nas concentrações de NS1 presentes nos soros de pacientes infectados por orthoflavivirus. Young *et al.* (2000) detectaram em pacientes com infecção secundária por DENV-2 de 0,07 a 15 µg/mL de NS1 circulante. Alcon *et al.* (2002) detectaram a proteína até nove dias após o surgimento dos sintomas, com níveis séricos entre 0,01 e 50 µg/mL durante infecção com DENV-1. No caso de YFV, a concentração deste antígeno varia de 0,1 a 4,5 µg/mL (RICCIARDI-JORGE; BORDIGNON; KOISHI; ZANLUCA *et al.*, 2017).

A concentração sérica de NS1 durante a infecção por ZIKV foi relatada pela primeira vez por BOSCH *et al.* (2017) que, através de um ELISA de captura *in house* estimaram que a concentração média deste antígeno é de aproximadamente 30 ng/mL a partir de um número de amostras reduzido. Dados recentes com amostras provenientes da Colômbia e República Dominicana, sugerem que a quantidade de proteína circulante pode chegar a 2,2 µg/mL, embora a maior parte das amostras se encontre na faixa abaixo de 100 ng/mL (BEDDINGFIELD; HARTNETT; WILSON; KULAKOSKY *et al.*, 2021).

No caso específico de ZIKV, estes dados sugerem a importância de um teste com alta sensibilidade para detecção deste antígeno durante uma infecção natural, principalmente se considerarmos a necessidade de diluir a amostra para análise. Zhang *et al.* (2018) descreveram um teste no formato de ELISA de captura baseado na detecção de NS1 com sensibilidade de 0,12 µg/mL. Além disto, um teste de ELISA competitivo foi desenvolvido por Roldán e colaboradores (2021), apresentando um limite de detecção de 0,34 µg/mL. Vale ressaltar que ambos os estudos não foram validados com amostras obtidas de pacientes naturalmente infectados. Recentemente, Beddingfield *et al.* (2021) descreveram um ELISA sanduíche com o uso de anticorpos policlonais com uma faixa dinâmica de 0,5 a 0,03 µg/mL. Considerando o limite de detecção do teste desenvolvido pelo nosso grupo, podemos afirmar que ele se encontra na mesma ordem de magnitude dos trabalhos mencionados.

Embora as condições do ensaio ainda possam ser melhoradas através de mais testes, as ferramentas desenvolvidas neste estudo apresentam potencial para o diagnóstico diferencial, podendo eventualmente ser utilizadas em outros ensaios diagnósticos, como imunofluorescência, imuno-histoquímica e teste

imunocromatográfico *point of care*, o que pode ser particularmente vantajoso em áreas com cocirculação de orthoflavivirus.

Com relação à cinética de crescimento das cepas ZIKV MR766 e ZV BR 2015/15261, fica evidente que a densidade celular é um fator que afeta diretamente a curva de crescimento viral. Devido a limitações pertinentes à técnica, a qualidade da leitura do resultado por IFI está intrinsecamente ligada à densidade e homogeneidade da monocamada. Levando em consideração a proliferação celular, a quantidade de células a serem semeadas deve ser calculada de forma que mesmo no último *timepoint*, o *software* ainda seja capaz de discernir as células para gerar dados confiáveis. Isto é particularmente importante quando é feita análise de linhagens celulares que não apresentam inibição de crescimento por contato, como é o caso de JEG3. Por outro lado, para análise por citometria, é possível semear as células em uma densidade inicial mais alta sem prejudicar a leitura do resultado, já que elas serão destacadas e lidas em suspensão. Com esta abordagem também há menor perda de células durante as lavagens, o que pode acontecer facilmente durante a marcação por IFI caso as células estejam sob estresse e/ou em processo de morte celular.

Gerar uma monocamada homogênea para as células JEG-3 é bastante desafiador visto que elas apresentam crescimento em clusters. Quando semeadas em baixa densidade, como feito em placas para IFI, o tapete celular fica heterogêneo até que as células comecem a replicar e, consequentemente o vírus fica restrito a essas ilhas. Portanto, é possível que a diferença vista nos resultados obtidos por IFI e citometria para JEG-3 seja explicada em parte por este motivo. Além disto, a falta de inibição por contato associada aos clusters celulares observados podem ter prejudicado a contagem realizada pelo *software*.

A característica mais distintiva observada durante as infecções in vitro com ZIKV, foi a persistência de NS1 associada à célula em células A549 e JEG-3 enquanto a frequência de células infectadas diminuía ao longo do tempo. Levando em consideração que esta queda está associada ao aumento no número de células PI positivas, é plausível sugerir que a acumulação deste antígeno associado à célula pode ser atribuída a (1) a ligação de sNS1 à membrana celular e (2) à captura e internalização da proteína liberada através da lise celular.

Trabalhos prévios demonstraram que a NS1 de DENV pode se ligar à membrana plasmática de células não infectadas e ser endocitada através de diferentes mecanismos. Embora o receptor que promove a captura de sNS1 ainda

seja desconhecido, a proteína pode ser detectada por até 48 horas dentro de endossomos tardios de hepatócitos não infectados (ALCON-LEPODER; DROUET; ROUX; FRENKIEL et al., 2005). Além disto, o pré-tratamento com sNS1 também levou a um aumento na atividade endocítica e na infecção por DENV (ALCON-LEPODER; DROUET; ROUX; FRENKIEL et al., 2005).

A ligação deste antígeno a células epiteliais e fibroblastos está principalmente ligada ao glicosaminoglicano (GAG) heparam sulfato (HS) e condroitina sulfato E, embora é provável que um mecanismo GAG-independente também exista (AVIRUTNAN; ZHANG; PUNYADEE; MANUYAKORN et al., 2007). Foi sugerido que a expressão tecido específica de isoformas de GAG possa desempenhar um papel na restrição da ligação de NS1 a tecidos associados com o tropismo e patogênese característicos de cada orthoflavivirus. Considerando que as células humanas usadas neste estudo apresentam características epiteliais, é possível que a adesão mediada por GAG possa desempenhar um papel neste sistema. Adicionalmente, as células JEG-3 infectadas com o isolado clínico ZV BR 2015/15261 (linhagem asiática) apresentaram maior porcentagem de células NS1 positivas em comparação com células A549, embora o aumento na morte celular tenha sido semelhante. Uma vez que a presença de NS1 em placenta humana foi descrita previamente (RABELO; DE SOUZA CAMPOS FERNANDES; DE SOUZA; LOUVAIN DE SOUZA et al., 2017), é possível que este fenótipo esteja ligado a tropismo, já que se trata de uma linhagem de origem placentária.

Embora pesquisas relevantes acerca da biologia do ZIKV tenham sido realizadas com cepas adaptadas a laboratório, é importante enfatizar a necessidade de se trabalhar com cepas de circulação recente, principalmente se considerarmos que a acumulação de mutações pode ter contribuído para a emergência de novas manifestações clínicas (PIERSON; DIAMOND, 2018; YOKOYAMA; STARMER, 2017).

Finalmente, este é o primeiro relato quantitativo que discrimina a dinâmica da proteína NS1 solúvel e associada à célula durante a infecção pelo ZIKV MR766 e pelo isolado clínico ZV BR 2015/15261. Experimentos adicionais são necessários para determinar se este fenótipo de acumulação de NS1 e persistência em células enquanto o vírus é eliminado é exclusivo de ZIKV ou também pode ser observada para outros orthoflavivirus. Mais estudos abordando a adesão desta proteína na superfície celular, assim como a captura de sNS1 precisam ser realizados para

explorar suas implicações na resposta imune e aprofundar o conhecimento relativo ao envolvimento desta proteína na patogênese e proliferação viral.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Coletivamente, os resultados apresentados neste trabalho mostram a produção dos insumos necessários para o desenvolvimento de um teste no formato ELISA de captura para NS1 de ZIKV. O desenvolvimento de um anticorpo específico e que não apresenta reação cruzada para orthoflavivirus relacionados foi essencial para a padronização do ensaio. Embora ainda seja necessário realizar a validação com um painel de amostras humanas, a aplicação do teste providenciou maior conhecimento da dinâmica de expressão e secreção da proteína NS1 de ZIKV, evidenciando um acúmulo deste antígeno mesmo com diminuição significativa do número de células infectadas.

6.1 PERSPECTIVAS

Havia previsão do uso de um painel de soros de pacientes em fase aguda para validação do ELISA enviado por nosso colaborador Rafael França (Fiocruz – IAM), contudo, devido a problemas no transporte, as amostras chegaram em não conformidade (temperatura ambiente e tubos abertos). Por este motivo, o ELISA de captura otimizado não pode ser testado na análise de soros de infecções naturais. Alternativamente, há possibilidade de realizar o teste com outras amostras biológicas, como a urina de pacientes.

Levando em consideração os resultados apresentados, seria relevante realizar a marcação dupla com 4G2 e 12B8/2E3 para determinar qual a porcentagem de células não infectadas e NS1 positivas. Para isto será preciso conjugar um dos anticorpos para realizar a marcação simultânea das amostras. Além disto, seria interessante avaliar a cinética de expressão de NS1 durante a infecção por outros orthoflavivirus, para investigar se o fenótipo observado é exclusivo de ZIKV.

REFERÊNCIAS

- ADAMS WALDORF, K. M.; STENCEL-BAERENWALD, J. E.; KAPUR, R. P.; STUDHOLME, C. *et al.* Fetal brain lesions after subcutaneous inoculation of Zika virus in a pregnant nonhuman primate. **Nature Medicine**, 22, n. 11, p. 1256-1259, 2016-11-01 2016.
- AKEY, D. L.; BROWN, W. C.; DUTTA, S.; KONWERSKI, J. *et al.* Flavivirus NS1 structures reveal surfaces for associations with membranes and the immune system. **Science**, 343, n. 6173, p. 881-885, Feb 21 2014.
- ALCON, S.; TALARMIN, A.; DEBRUYNE, M.; FALCONAR, A. *et al.* Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Specific to Dengue Virus Type 1 Nonstructural Protein NS1 Reveals Circulation of the Antigen in the Blood during the Acute Phase of Disease in Patients Experiencing Primary or Secondary Infections. **Journal of Clinical Microbiology**, 40, n. 2, p. 376-381, 2002-02-01 2002.
- ALCON-LEPODER, S.; DROUET, M.-T. R. S.; ROUX, P.; FRENKIEL, M.-P. *et al.* The Secreted Form of Dengue Virus Nonstructural Protein NS1 Is Endocytosed by Hepatocytes and Accumulates in Late Endosomes: Implications for Viral Infectivity. **Journal of Virology**, 79, n. 17, p. 11403-11411, 2005-09-01 2005.
- ALENCAR, J.; FERREIRA DE MELLO, C.; BRISOLA MARCONDES, C.; ÉRICO GUIMARÃES, A. *et al.* Natural Infection and Vertical Transmission of Zika Virus in Sylvatic Mosquitoes *Aedes albopictus* and *Haemagogus leucocelaenus* from Rio de Janeiro, Brazil. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, 6, n. 2, p. 99, 2021-06-11 2021.
- ALVAREZ, D. E.; DE LELLA EZCURRA, A. L.; FUCITO, S.; GAMARNIK, A. V. Role of RNA structures present at the 3'UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication. **Virology**, 339, n. 2, p. 200-212, 2005/09/01/ 2005.
- AUBRY, F.; JACOBS, S.; DARMUZEY, M.; LEQUIME, S. *et al.* Recent African strains of Zika virus display higher transmissibility and fetal pathogenicity than Asian strains. **Nature Communications**, 12, n. 1, 2021-02-10 2021.
- AVIRUTNAN, P.; FUCHS, A.; HAUHART, R. E.; SOMNUKE, P. *et al.* Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1. **J Exp Med**, 207, n. 4, p. 793-806, Apr 12 2010.
- AVIRUTNAN, P.; HAUHART, R. E.; SOMNUKE, P.; BLOM, A. M. *et al.* Binding of flavivirus nonstructural protein NS1 to C4b binding protein modulates complement activation. **J Immunol**, 187, n. 1, p. 424-433, Jul 01 2011.
- AVIRUTNAN, P.; ZHANG, L.; PUNYADEE, N.; MANUYAKORN, A. *et al.* Secreted NS1 of Dengue Virus Attaches to the Surface of Cells via Interactions with Heparan Sulfate and Chondroitin Sulfate E. **PLoS Pathogens**, 3, n. 11, p. e183, 2007-11-30 2007.

BARBACHANO-GUERRERO, A.; ENDY, T. P.; KING, C. A. Dengue virus non-structural protein 1 activates the p38 MAPK pathway to decrease barrier integrity in primary human endothelial cells. **J Gen Virol**, 101, n. 5, p. 484-496, May 2020.

BARJAS-CASTRO, M. L.; ANGERAMI, R. N.; CUNHA, M. S.; SUZUKI, A. *et al.* Probable transfusion-transmitted Zika virus in Brazil. **Transfusion**, 56, n. 7, p. 1684-1688, Jul 2016.

BARZON, L.; PACENTI, M.; FRANCHIN, E.; LAVEZZO, E. *et al.* Infection dynamics in a traveller with persistent shedding of Zika virus RNA in semen for six months after returning from Haiti to Italy, January 2016. **Eurosurveillance**, 21, n. 32, 2016-08-11 2016.

BAUD, D.; GUBLER, D. J.; SCHAUB, B.; LANTERI, M. C. *et al.* An update on Zika virus infection. **The Lancet**, 390, n. 10107, p. 2099-2109, 2017-11-01 2017.

BEATTY, P. R.; PUERTA-GUARDO, H.; KILLINGBECK, S. S.; GLASNER, D. R. *et al.* Dengue virus NS1 triggers endothelial permeability and vascular leak that is prevented by NS1 vaccination. **Sci Transl Med**, 7, n. 304, p. 304ra141, Sep 09 2015.

BEDDINGFIELD, B. J.; HARTNETT, J. N.; WILSON, R. B.; KULAKOSKY, P. C. *et al.* Zika Virus Non-Structural Protein 1 Antigen-Capture Immunoassay. **Viruses**, 13, n. 9, p. 1771, 2021-09-05 2021.

BHATT, S.; GETHING, P. W.; BRADY, O. J.; MESSINA, J. P. *et al.* The global distribution and burden of dengue. **Nature**, 496, n. 7446, p. 504-507, 2013-04-01 2013.

BOSCH, I.; DE PUIG, H.; HILEY, M.; CARRÉ-CAMPS, M. *et al.* Rapid antigen tests for dengue virus serotypes and Zika virus in patient serum. **Science Translational Medicine**, 9, n. 409, p. eaan1589, 2017-09-27 2017.

BRANDT, W. E.; CARDIFF, R. D.; RUSSELL, P. K. Dengue virions and antigens in brain and serum of infected mice. **J Virol**, 6, n. 4, p. 500-506, Oct 1970.

BRASIL. **Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 52 de 2022**. Ministério da Saúde. 2023.

BRASIL, M. D. S. **Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 52 de 2022**. 2023.

BRASIL, P.; PEREIRA, J. P.; MOREIRA, M. E.; RIBEIRO NOGUEIRA, R. M. *et al.* Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. **New England Journal of Medicine**, 375, n. 24, p. 2321-2334, 2016-12-15 2016.

BUONORA, S. N.; DOS SANTOS, F. B.; DAUMAS, R. P.; PASSOS, S. R. L. *et al.* Increased sensitivity of NS1 ELISA by heat dissociation in acute dengue 4 cases. **BMC Infectious Diseases**, 17, n. 1, 2017-12-01 2017.

BYK, L. A.; IGLESIAS, N. G.; DE MAIO, F. A.; GEBHARD, L. G. *et al.* Dengue Virus Genome Uncoating Requires Ubiquitination. **mBio**, 7, n. 3, p. 10.1128/mbio.00804-00816, 2016.

CALVET, G.; AGUIAR, R. S.; MELO, A. S. O.; SAMPAIO, S. A. *et al.* Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **The Lancet Infectious Diseases**, 16, n. 6, p. 653-660, 2016-06-01 2016.

CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, 21, n. 10, p. 1885-1886, 2015-10-01 2015.

CAUCHEMEZ, S.; BESNARD, M.; BOMPARD, P.; DUB, T. *et al.* Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013–15: a retrospective study. **The Lancet**, 387, n. 10033, p. 2125-2132, 2016-05-01 2016.

CHAMBERS, T. J.; HAHN, C. S.; GALLER, R.; RICE, C. M. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annu Rev Microbiol**, 44, p. 649-688, 1990.

CHAN, J. F.-W.; YIP, C. C.-Y.; TSANG, J. O.-L.; TEE, K.-M. *et al.* Differential cell line susceptibility to the emerging Zika virus: implications for disease pathogenesis, non-vector-borne human transmission and animal reservoirs. **Emerging Microbes & Infections**, 5, n. 1, p. 1-12, 2016-01-01 2016.

CHANG, A. Y.; LYNCH, R.; MARTINS, K.; ENCINALES, L. *et al.* Long-term clinical outcomes of Zika-associated Guillain-Barré syndrome. **Emerging Microbes & Infections**, 7, n. 1, p. 1-4, 2018-12-01 2018.

CHAO, L. H.; KLEIN, D. E.; SCHMIDT, A. G.; PEÑA, J. M. *et al.* Sequential conformational rearrangements in flavivirus membrane fusion. **eLife**, 3, p. e04389, 2014/12/05 2014.

CHUNG, K. M.; DIAMOND, M. S. Defining the levels of secreted non-structural protein NS1 after West Nile virus infection in cell culture and mice. **Journal of Medical Virology**, 80, n. 3, p. 547-556, 2008-03-01 2008.

CHUNG, K. M.; LISZEWSKI, M. K.; NYBAKKEN, G.; DAVIS, A. E. *et al.* West Nile virus nonstructural protein NS1 inhibits complement activation by binding the regulatory protein factor H. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 103, n. 50, p. 19111-19116, 2006-12-12 2006.

CLETON, N.; KOOPMANS, M.; REIMERINK, J.; GODEKE, G.-J. *et al.* Come fly with me: Review of clinically important arboviruses for global travelers. **Journal of Clinical Virology**, 55, n. 3, p. 191-203, 2012/11/01/ 2012.

COFFEY, L. L.; FORRESTER, N.; TSETSARKIN, K.; VASILAKIS, N. *et al.* Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: implications for the emergence of disease. **Future Microbiology**, 8, n. 2, p. 155-176, 2013-02-01 2013.

CONDE, J. N.; DA SILVA, E. M.; ALLONSO, D.; COELHO, D. R. *et al.* Inhibition of the Membrane Attack Complex by Dengue Virus NS1 through Interaction with Vitronectin and Terminal Complement Proteins. **Journal of Virology**, 90, n. 21, p. 9570-9581, 2016-11-01 2016.

CRILL, W. D.; ROEHRIG, J. T. Monoclonal Antibodies That Bind to Domain III of Dengue Virus E Glycoprotein Are the Most Efficient Blockers of Virus Adsorption to Vero Cells. **Journal of Virology**, 75, n. 16, p. 7769-7773, 2001-08-15 2001.

CROOK, K. R.; MILLER-KITTRELL, M.; MORRISON, C. R.; SCHOLLE, F. Modulation of innate immune signaling by the secreted form of the West Nile virus NS1 glycoprotein. **Virology**, 458-459, p. 172-182, Jun 2014.

CROOKS, A. J.; LEE, J. M.; EASTERBROOK, L. M.; TIMOFEEV, A. V. *et al.* The NS1 protein of tick-borne encephalitis virus forms multimeric species upon secretion from the host cell. **Journal of General Virology**, 75, n. 12, p. 3453-3460, 1994-12-01 1994.

CROWTHER, J. R. Titration of Reagents. *In*: CROWTHER, J. R. (Ed.). **The ELISA Guidebook**. Totowa, NJ: Humana Press, 2009. p. 79-109.

DAVIDSON, A.; SLAVINSKI, S.; KOMOTO, K.; RAKEMAN, J. *et al.* **Suspected Female-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus — New York City, 2016**. p. 716–717. 2016.

DE ALMEIDA, P. R.; EHLERS, L. P.; DEMOLINER, M.; EISEN, A. K. A. *et al.* Detection of a novel African-lineage-like Zika virus naturally infecting free-living neotropical primates in Southern Brazil. Cold Spring Harbor Laboratory 2019.

DE ARAÚJO, T. V. B.; RODRIGUES, L. C.; DE ALENCAR XIMENES, R. A.; DE BARROS MIRANDA-FILHO, D. *et al.* Association between Zika virus infection and microcephaly in Brazil, January to May, 2016: preliminary report of a case-control study. **The Lancet Infectious Diseases**, 16, n. 12, p. 1356-1363, 2016-12-01 2016.

DELATORRE, E.; FERNÁNDEZ, J.; BELLO, G. Investigating the Role of Easter Island in Migration of Zika Virus from South Pacific to Americas. **Emerging Infectious Diseases**, 24, n. 11, p. 2119-2121, 2018-11-01 2018.

DERRAIK, J. G.; SLANEY, D. Notes on Zika virus--an emerging pathogen now present in the South Pacific. **Aust N Z J Public Health**, 39, n. 1, p. 5-7, Feb 2015.

DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 46, n. 5, p. 509-520, 1952.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A. P. B. V. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Revista de Saúde Pública**, 51, n. 0, 2017-01-01 2017.

DOS SANTOS, C. N.; POST, P. R.; CARVALHO, R.; FERREIRA, I. I. *et al.* Complete nucleotide sequence of yellow fever virus vaccine strains 17DD and 17D-213. **Virus Res**, 35, n. 1, p. 35-41, Jan 1995.

DUDLEY, D. M.; ALIOTA, M. T.; MOHR, E. L.; WEILER, A. M. *et al.* A rhesus macaque model of Asian-lineage Zika virus infection. **Nature Communications**, 7, n. 1, p. 12204, 2016-06-28 2016.

DUFFY, M. R.; CHEN, T.-H.; HANCOCK, W. T.; POWERS, A. M. *et al.* Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, 360, n. 24, p. 2536-2543, 2009-06-11 2009.

DUPONT-ROUZEYROL, M.; BIRON, A.; O'CONNOR, O.; HUGUON, E. *et al.* Infectious Zika viral particles in breastmilk. **The Lancet**, 387, n. 10023, p. 1051, 2016-03-01 2016.

EDELING, M. A.; DIAMOND, M. S.; FREMONT, D. H. Structural basis of Flavivirus NS1 assembly and antibody recognition. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 111, n. 11, p. 4285-4290, Mar 18 2014.

FARIA, N. R.; QUICK, J.; CLARO, I. M.; THÉZÉ, J. *et al.* Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas. **Nature**, 546, n. 7658, p. 406-410, 2017-06-15 2017.

FISHBURN, A. T.; PHAM, O. H.; KENASTON, M. W.; BEESABATHUNI, N. S. *et al.* Let's Get Physical: Flavivirus-Host Protein-Protein Interactions in Replication and Pathogenesis. **Front Microbiol**, 13, p. 847588, 2022.

FLAMAND, M.; MEGRET, F. O.; MATHIEU, M.; LEPAULT, J. *et al.* Dengue Virus Type 1 Nonstructural Glycoprotein NS1 Is Secreted from Mammalian Cells as a Soluble Hexamer in a Glycosylation-Dependent Fashion. **Journal of Virology**, 73, n. 7, p. 6104-6110, 1999-07-01 1999.

FOY, B. D.; KOBYLINSKI, K. C.; FOY, J. L. C.; BLITVICH, B. J. *et al.* Probable Non-Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. **Emerging Infectious Disease journal**, 17, n. 5, p. 880, 2011.

GAO, G. F. From "A"IV to "Z"IKV: Attacks from Emerging and Re-emerging Pathogens. **Cell**, 172, n. 6, p. 1157-1159, 2018-03-01 2018.

GEBHARD, L. G.; FILOMATORI, C. V.; GAMARNIK, A. V. Functional RNA elements in the dengue virus genome. **Viruses**, 3, n. 9, p. 1739-1756, Sep 2011.

GIARD, D. J.; AARONSON, S. A.; TODARO, G. J.; ARNSTEIN, P. *et al.* In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. **J Natl Cancer Inst**, 51, n. 5, p. 1417-1423, Nov 1973.

GIRARD, M.; NELSON, C. B.; PICOT, V.; GUBLER, D. J. Arboviruses: A global public health threat. **Vaccine**, 38, n. 24, p. 3989-3994, May 19 2020.

GRUBAUGH, N. D.; LADNER, J. T.; KRAEMER, M. U. G.; DUDAS, G. *et al.* Genomic epidemiology reveals multiple introductions of Zika virus into the United States. **Nature**, 546, n. 7658, p. 401-405, 2017-06-15 2017.

GUBLER, D. J. Human arbovirus infections worldwide. **Ann N Y Acad Sci**, 951, p. 13-24, Dec 2001.

GUBLER, D. J. The continuing spread of West Nile virus in the western hemisphere. **Clin Infect Dis**, 45, n. 8, p. 1039-1046, Oct 15 2007.

GUBLER, D. J. The Global Threat of Emergent/Re-emergent Vector-Borne Diseases. *In: Vector Biology, Ecology and Control*: Springer Netherlands, 2010. p. 39-62.

GUTIÉRREZ-BUGALLO, G.; PIEDRA, L. A.; RODRIGUEZ, M.; BISSET, J. A. *et al.* Vector-borne transmission and evolution of Zika virus. **Nature Ecology & Evolution**, 3, n. 4, p. 561-569, 2019-03-18 2019.

GUTSCHE, I.; COULIBALY, F.; VOSS, J. E.; SALMON, J. *et al.* Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 108, n. 19, p. 8003-8008, 2011-05-10 2011.

HADDOW, A. D.; SCHUH, A. J.; YASUDA, C. Y.; KASPER, M. R. *et al.* Genetic Characterization of Zika Virus Strains: Geographic Expansion of the Asian Lineage. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 6, n. 2, p. e1477, 2012-02-28 2012.

HADINEGORO, S. R.; ARREDONDO-GARCÍA, J. L.; CAPEDING, M. R.; DESEDA, C. *et al.* Efficacy and Long-Term Safety of a Dengue Vaccine in Regions of Endemic Disease. **New England Journal of Medicine**, 373, n. 13, p. 1195-1206, 2015-09-24 2015.

HAMEL, R.; LIÉGEOIS, F.; WICHIT, S.; POMPON, J. *et al.* Zika virus: epidemiology, clinical features and host-virus interactions. **Microbes and Infection**, 18, n. 7-8, p. 441-449, 2016-07-01 2016.

HERRERA, B. B.; CHANG, C. A.; HAMEL, D. J.; MBOUP, S. *et al.* Continued Transmission of Zika Virus in Humans in West Africa, 1992-2016. **J Infect Dis**, 215, n. 10, p. 1546-1550, May 15 2017.

HO, Z. J. M.; HAPUARACHCHI, H. C.; BARKHAM, T.; CHOW, A. *et al.* Outbreak of Zika virus infection in Singapore: an epidemiological, entomological, virological, and clinical analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, 17, n. 8, p. 813-821, 2017-08-01 2017.

HU, Y.; SUN, L. Systematic Analysis of Structure Similarity between Zika Virus and Other Flaviviruses. **ACS Infect Dis**, 5, n. 7, p. 1070-1080, Jul 12 2019.

HUNG, S. J.; HUANG, S. W. Contributions of Genetic Evolution to Zika Virus Emergence. **Front Microbiol**, 12, p. 655065, 2021.

IOOS, S.; MALLET, H. P.; LEPARC GOFFART, I.; GAUTHIER, V. *et al.* Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. **Med Mal Infect**, 44, n. 7, p. 302-307, Jul 2014.

JACOBS, M. G.; ROBINSON, P. J.; BLETCHLY, C.; MACKENZIE, J. M. *et al.* Dengue virus nonstructural protein 1 is expressed in a glycosyl-phosphatidylinositol-linked form that is capable of signal transduction. **FASEB J**, 14, n. 11, p. 1603-1610, Aug 2000.

JOHANSEN, H.; VAN DER STRATEN, A.; SWEET, R.; OTTO, E. *et al.* Regulated expression at high copy number allows production of a growth-inhibitory oncogene product in Drosophila Schneider cells. **Genes & Development**, 3, n. 6, p. 882-889, 1989-06-01 1989.

KARAKUS, R.; BUYRUKCU, B. A.; AYBAY, C. A new efficient method for eliminating the interference effect of human serum and increasing the sensitivity and recovery rate of enzyme immunoassay. **J Immunoassay Immunochem**, 26, n. 2, p. 109-124, 2005.

KASPRZYKOWSKI, J. I.; FUKUTANI, K. F.; FABIO, H.; FUKUTANI, E. R. *et al.* A recursive sub-typing screening surveillance system detects the appearance of the ZIKV African lineage in Brazil: Is there a risk of a new epidemic? **International Journal of Infectious Diseases**, 96, p. 579-581, 2020-07-01 2020.

KING, T. P. Separation of proteins by ammonium sulfate gradient solubilization. **Biochemistry**, 11, n. 3, p. 367-371, Feb 01 1972.

KOHLER, P. O.; BRIDSON, W. E. Isolation of hormone-producing clonal lines of human choriocarcinoma. **J Clin Endocrinol Metab**, 32, n. 5, p. 683-687, May 1971.

KOISHI, A. C.; SUZUKAWA, A. A.; ZANLUCA, C.; CAMACHO, D. E. *et al.* Development and evaluation of a novel high-throughput image-based fluorescent neutralization test for detection of Zika virus infection. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 12, n. 3, p. e0006342, 2018-03-15 2018.

KUCZERA, D.; BAVIA, L.; MOSIMANN, A. L. P.; KOISHI, A. C. *et al.* Isolation of dengue virus serotype 4 genotype II from a patient with high viral load and a mixed Th1/Th17 inflammatory cytokine profile in South Brazil. **Virology Journal**, 13, n. 1, 2016-12-01 2016.

KUMAR, J. S.; PARIDA, M.; RAO, P. V. Monoclonal antibody-based antigen capture immunoassay for detection of circulating non-structural protein NS1: implications for early diagnosis of Japanese encephalitis virus infection. **J Med Virol**, 83, n. 6, p. 1063-1070, Jun 2011.

KUNO, G. Persistence of arboviruses and antiviral antibodies in vertebrate hosts: its occurrence and impacts. **Rev Med Virol**, 11, n. 3, p. 165-190, 2001.

LAMBRECHTS, L.; FERGUSON, N. M.; HARRIS, E.; HOLMES, E. C. *et al.* Assessing the epidemiological effect of wolbachia for dengue control. **Lancet Infect Dis**, 15, n. 7, p. 862-866, Jul 2015.

LANCIOTTI, R. S.; KOSOY, O. L.; LAVEN, J. J.; VELEZ, J. O. *et al.* Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, 14, n. 8, p. 1232-1239, 2008-08-01 2008.

LANCIOTTI, R. S.; LAMBERT, A. J.; HOLODNIY, M.; SAAVEDRA, S. *et al.* Phylogeny of Zika Virus in Western Hemisphere, 2015. **Emerging Infectious Diseases**, 22, n. 5, p. 933-935, 2016-05-01 2016.

LEHR, R. V.; ELEFANTE, L. C.; KIKLY, K. K.; O'BRIEN, S. P. *et al.* A modified metal-ion affinity chromatography procedure for the purification of histidine-tagged recombinant proteins expressed in *Drosophila* S2 cells. **Protein Expr Purif**, 19, n. 3, p. 362-368, Aug 2000.

LESSLER, J.; CHAISSON, L. H.; KUCIRKA, L. M.; BI, Q. *et al.* Assessing the global threat from Zika virus. **Science**, 353, n. 6300, p. aaf8160, 2016/08/12 2016.

LI, H.; SAUCEDO-CUEVAS, L.; REGLA-NAVA, A.; JOSE; CHAI, G. *et al.* Zika Virus Infects Neural Progenitors in the Adult Mouse Brain and Alters Proliferation. **Cell Stem Cell**, 19, n. 5, p. 593-598, 2016-11-01 2016.

LIMA, M. A. R.; NOGUEIRA, R. M.; FILIPPIS, A. M.; NUNES, P. C. *et al.* A simple heat dissociation method increases significantly the ELISA detection sensitivity of the nonstructural-1 glycoprotein in patients infected with DENV type-4. **J Virol Methods**, 204, p. 105-108, Aug 2014.

LIMA-CAMARA, T. N. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, 50, n. 0, 2016-01-01 2016.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. trans-Complementation of yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication. **Journal of Virology**, 71, n. 12, p. 9608-9617, 1997-12-01 1997.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Genetic Interaction of Flavivirus Nonstructural Proteins NS1 and NS4A as a Determinant of Replicase Function. **Journal of Virology**, 73, n. 6, p. 4611-4621, 1999-06-01 1999.

LINDENBACH, B. D.; THIEL, H.-J.; RICE, C. M. Flaviviridae: the viruses and their replication. *In*: HOWLEY, P. M.; KNIPE, D. M., *et al.* (Ed.). **Fields Virology**. Seventh edition. ed. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2021.

LIU, J.; LIU, Y.; NIE, K.; DU, S. *et al.* Flavivirus NS1 protein in infected host sera enhances viral acquisition by mosquitoes. **Nature Microbiology**, 1, n. 9, p. 16087, 2016-06-20 2016.

LIU, Y.; LIU, J.; DU, S.; SHAN, C. *et al.* Evolutionary enhancement of Zika virus infectivity in *Aedes aegypti* mosquitoes. **Nature**, 545, n. 7655, p. 482-486, 2017-05-01 2017.

LOURENÇO, J.; DE LOURDES MONTEIRO, M.; VALDEZ, T.; MONTEIRO RODRIGUES, J. *et al.* Epidemiology of the Zika Virus Outbreak in the Cabo Verde Islands, West Africa. **PLoS Curr**, 10, Mar 15 2018.

LYNCH, R. M.; MANTUS, G.; ENCINALES, L.; PACHECO, N. *et al.* Augmented Zika and Dengue Neutralizing Antibodies Are Associated With Guillain-Barré Syndrome. **J Infect Dis**, 219, n. 1, p. 26-30, Jan 01 2019.

MACDONALD, J.; TONRY, J.; HALL, R. A.; WILLIAMS, B. *et al.* NS1 Protein Secretion during the Acute Phase of West Nile Virus Infection. **Journal of Virology**, 79, n. 22, p. 13924-13933, 2005-11-15 2005.

MACKENZIE, J. M.; JONES, M. K.; YOUNG, P. R. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. **Virology**, 220, n. 1, p. 232-240, Jun 01 1996.

MANDL, C. W.; GUIRAKHOO, F.; HOLZMANN, H.; HEINZ, F. X. *et al.* Antigenic structure of the flavivirus envelope protein E at the molecular level, using tick-borne encephalitis virus as a model. **J Virol**, 63, n. 2, p. 564-571, Feb 1989.

MAYER, S. V.; TESH, R. B.; VASILAKIS, N. The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. **Acta Trop**, 166, p. 155-163, Feb 2017.

MAZZAROTTO, G. A.; RABONI, S. M.; STELLA, V.; CARSTENSEN, S. *et al.* Production and characterization of monoclonal antibodies against the recombinant nucleoprotein of *Araucaria hantavirus*. **J Virol Methods**, 162, n. 1-2, p. 96-100, Dec 2009.

MEDITS, I.; VANEY, M.-C.; ROUVINSKI, A.; REY, M. *et al.* Extensive flavivirus E trimer breathing accompanies stem zippering of the post-fusion hairpin. **EMBO reports**, 21, n. 8, p. e50069, 2020/08/05 2020.

METSKY, H. C.; MATRANGA, C. B.; WOHL, S.; SCHAFFNER, S. F. *et al.* Zika virus evolution and spread in the Americas. **Nature**, 546, n. 7658, p. 411-415, 2017-06-15 2017.

MINER, J. J.; SENE, A.; RICHNER, J. M.; SMITH, A. M. *et al.* Zika Virus Infection in Mice Causes Panuveitis with Shedding of Virus in Tears. **Cell Reports**, 16, n. 12, p. 3208-3218, 2016-09-01 2016.

MODHIRAN, N.; WATTERSON, D.; MULLER, D. A.; PANETTA, A. K. *et al.* Dengue virus NS1 protein activates cells via Toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity. **Sci Transl Med**, 7, n. 304, p. 304ra142, Sep 09 2015.

MODIS, Y.; OGATA, S.; CLEMENTS, D.; HARRISON, S. C. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 100, n. 12, p. 6986-6991, 2003-06-10 2003.

MOTTA, I. J. F.; SPENCER, B. R.; CORDEIRO DA SILVA, S. G.; ARRUDA, M. B. *et al.* Evidence for Transmission of Zika Virus by Platelet Transfusion. **New England Journal of Medicine**, 375, n. 11, p. 1101-1103, 2016-09-15 2016.

MUSSO, D.; ROCHE, C.; ROBIN, E.; NHAN, T. *et al.* Potential Sexual Transmission of Zika Virus. **Emerging Infectious Diseases**, 21, n. 2, p. 359-361, 2015-02-01 2015.

MUSSO, D.; ROUAULT, E.; TEISSIER, A.; LANTERI, M. C. *et al.* Molecular detection of Zika virus in blood and RNA load determination during the French Polynesian outbreak. **Journal of Medical Virology**, 89, n. 9, p. 1505-1510, 2017-09-01 2017.

MUYLAERT, I. R.; GALLER, R.; RICE, C. M. Genetic analysis of the yellow fever virus NS1 protein: identification of a temperature-sensitive mutation which blocks RNA accumulation. **Journal of Virology**, 71, n. 1, p. 291-298, 1997-01-01 1997.

NOISAKRAN, S.; DECHTAWEWAT, T.; AVIRUTNAN, P.; KINOSHITA, T. *et al.* Association of dengue virus NS1 protein with lipid rafts. **J Gen Virol**, 89, n. Pt 10, p. 2492-2500, Oct 2008.

NORONHA, L. D.; ZANLUCA, C.; AZEVEDO, M. L. V.; LUZ, K. G. *et al.* Zika virus damages the human placental barrier and presents marked fetal neurotropism. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 111, n. 5, p. 287-293, 2016-04-29 2016.

NUNES DUARTE DOS SANTOS, C.; FRENKIEL, M.-P.; COURAGEOT, M.-P.; FERNANDO S. ROCHA, C. *et al.* Determinants in the Envelope E Protein and Viral RNA Helicase NS3 That Influence the Induction of Apoptosis in Response to Infection with Dengue Type 1 Virus. **Virology**, 274, n. 2, p. 292-308, 2000/09/01/ 2000.

OEHLER, E.; WATRIN, L.; LARRE, P.; LEPARC-GOFFART, I. *et al.* Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome – case report, French Polynesia, December 2013. **Eurosurveillance**, 19, n. 9, p. 20720, 2014-03-06 2014.

OLIVEIRA MELO, A. S.; MALINGER, G.; XIMENES, R.; SZEJNFELD, P. O. *et al.* Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? **Ultrasound in Obstetrics & Gynecology**, 47, n. 1, p. 6-7, 2016-01-01 2016.

OSTOJIC, J.; HERENDA, S.; GALIJASEVIC, S.; GALIC, B. *et al.* Inhibition of Horseradish Peroxidase Activity by Boroxine Derivative, Dipotassium-trioxohydroxytetrafluorotriborate K₂[B₃O₃F₄OH]. **Journal of Chemistry**, 2017, p. 8134350, 2017/03/08 2017.

PACHECO, O.; BELTRÁN, M.; NELSON, C. A.; VALENCIA, D. *et al.* Zika Virus Disease in Colombia — Preliminary Report. **New England Journal of Medicine**, 383, n. 6, p. e44, 2020-08-06 2020.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, P. **Epidemiological update for Dengue, Chikungunya and Zika in 2022.** <https://www3.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/indicadores-dengue-en/annual-arbovirus-bulletin-2022.html>. 2023.

PAYNE, S. Chapter 15 - Family Flaviviridae. *In*: PAYNE, S. (Ed.). **Viruses**: Academic Press, 2017. p. 129-139.

PERRIN, P. Techniques for the preparation of rabies conjugates. *In*: MESLIN, F. X.; KAPLAN, M. M., *et al* (Ed.). **Laboratory techniques in rabies**. 4th ed. Geneva: World Health Organization, 1996. p. 433–444.

PESSÔA, R.; PATRIOTA, J. V.; LOURDES DE SOUZA, M.; FELIX, A. C. *et al.* Investigation Into an Outbreak of Dengue-like Illness in Pernambuco, Brazil, Revealed a Cocirculation of Zika, Chikungunya, and Dengue Virus Type 1. **Medicine (Baltimore)**, 95, n. 12, p. e3201, Mar 2016.

PIERSON, T. C.; DIAMOND, M. S. The emergence of Zika virus and its new clinical syndromes. **Nature**, 560, n. 7720, p. 573-581, 2018-08-01 2018.

PIERSON, T. C.; DIAMOND, M. S. The continued threat of emerging flaviviruses. **Nature Microbiology**, 5, n. 6, p. 796-812, 2020/06/01 2020.

POST, P. R.; CARVALHO, R.; GALLER, R. Glycosylation and secretion of yellow fever virus nonstructural protein NS1. **Virus Res**, 18, n. 2-3, p. 291-302, Mar 1991.

POSTLER, T. S.; BEER, M.; BLITVICH, B. J.; BUKH, J. *et al.* Renaming of the genus Flavivirus to Orthoflavivirus and extension of binomial species names within the family Flaviviridae. **Archives of Virology**, 168, n. 9, 2023-09-01 2023.

RABELO, K.; DE SOUZA CAMPOS FERNANDES, R. C.; DE SOUZA, L. J.; LOUVAIN DE SOUZA, T. *et al.* Placental Histopathology and Clinical Presentation of Severe Congenital Zika Syndrome in a Human Immunodeficiency Virus-Exposed Uninfected Infant. **Front Immunol**, 8, p. 1704, 2017.

RAMANATHAN, H. N.; ZHANG, S.; DOUAM, F.; MAR, K. B. *et al.* A Sensitive Yellow Fever Virus Entry Reporter Identifies Valosin-Containing Protein (VCP/p97) as an Essential Host Factor for Flavivirus Uncoating. **mBio**, 11, n. 2, p. 10.1128/mbio.00467-00420, 2020.

RASTOGI, M.; SHARMA, N.; SINGH, S. K. Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein. **Virol J**, 13, p. 131, Jul 29 2016.

RICCIARDI-JORGE, T.; BORDIGNON, J.; KOISHI, A.; ZANLUCA, C. *et al.* Development of a quantitative NS1-capture enzyme-linked immunosorbent assay for

early detection of yellow fever virus infection. **Sci Rep**, 7, n. 1, p. 16229, Nov 24 2017.

ROLDÁN, J. S.; CASSOLA, A.; CASTILLO, D. S. Development of a novel NS1 competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the early detection of Zika virus infection. **PLOS ONE**, 16, n. 8, p. e0256220, 2021-08-17 2021.

RUPLEY, J. A.; GRATTON, E.; CARERI, G. Water and globular proteins. **Trends in Biochemical Sciences**, 8, n. 1, p. 18-22, 1983-01-01 1983.

RUST, R. S. Human arboviral encephalitis. **Semin Pediatr Neurol**, 19, n. 3, p. 130-151, Sep 2012.

SAFRONETZ, D.; SLOAN, A.; STEIN, D. R.; MENDOZA, E. *et al.* Evaluation of 5 Commercially Available Zika Virus Immunoassays. **Emerg Infect Dis**, 23, n. 9, p. 1577-1580, Sep 2017.

SARMIENTO-OSPINA, A.; VÁSQUEZ-SERNA, H.; JIMENEZ-CANIZALES, C. E.; VILLAMIL-GÓMEZ, W. E. *et al.* Zika virus associated deaths in Colombia. **Lancet Infect Dis**, 16, n. 5, p. 523-524, May 2016.

SAUD AL-BAGMI, M.; SHAHNAWAZ KHAN, M.; ALHASAN ISMAEL, M.; AL-SENAIDY, A. M. *et al.* An efficient methodology for the purification of date palm peroxidase: Stability comparison with horseradish peroxidase (HRP). **Saudi J Biol Sci**, 26, n. 2, p. 301-307, Feb 2019.

SAXENA, D.; KUMAR, J. S.; PARIDA, M.; SIVAKUMAR, R. R. *et al.* Development and evaluation of NS1 specific monoclonal antibody based antigen capture ELISA and its implications in clinical diagnosis of West Nile virus infection. **J Clin Virol**, 58, n. 3, p. 528-534, Nov 2013.

SCATURRO, P.; CORTESE, M.; CHATEL-CHAIX, L.; FISCHL, W. *et al.* Dengue Virus Non-structural Protein 1 Modulates Infectious Particle Production via Interaction with the Structural Proteins. **PLOS Pathogens**, 11, n. 11, p. e1005277, 2015-11-12 2015.

SCHNEIDER, I. Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. **J Embryol Exp Morphol**, 27, n. 2, p. 353-365, Apr 1972.

SCHOMBURG, D.; SALZMANN, M.; STEPHAN, D. Peroxidase. *In*: SCHOMBURG, D.; SALZMANN, M., *et al.* (Ed.). **Enzyme Handbook 7: Class 1.5–1.12: Oxidoreductases**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1994. p. 747-753.

SELBY, C. Interference in immunoassay. **Ann Clin Biochem**, 36 (Pt 6), p. 704-721, Nov 1999.

SHAO, Q.; HERRLINGER, S.; ZHU, Y.-N.; YANG, M. *et al.* The African Zika virus MR-766 is more virulent and causes more severe brain damage than current Asian lineage and Dengue virus. **Development**, 144, n. 22, p. 4114-4124, 2017-01-01 2017.

SHI, M.; LIN, X. D.; VASILAKIS, N.; TIAN, J. H. *et al.* Divergent Viruses Discovered in Arthropods and Vertebrates Revise the Evolutionary History of the Flaviviridae and Related Viruses. **J Virol**, 90, n. 2, p. 659-669, Jan 15 2016.

SIMONIN, Y.; LOUSTALOT, F.; DESMETZ, C.; FOULONGNE, V. *et al.* Zika Virus Strains Potentially Display Different Infectious Profiles in Human Neural Cells. **EBioMedicine**, 12, p. 161-169, 2016-10-01 2016.

SIMPSON, D. I. H. Zika virus infection in man. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 58, n. 4, p. 335-338, 1964/07/01/ 1964.

SRIDHAR, S.; LUEDTKE, A.; LANGEVIN, E.; ZHU, M. *et al.* Effect of Dengue Serostatus on Dengue Vaccine Safety and Efficacy. **New England Journal of Medicine**, 379, n. 4, p. 327-340, 2018-07-26 2018.

STROTTMANN, D. M.; ZANLUCA, C.; MOSIMANN, A. L. P.; KOISHI, A. C. *et al.* Genetic and biological characterisation of Zika virus isolates from different Brazilian regions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 114, 2019-01-01 2019.

SUN, J.; WU, D.; ZHONG, H.; GUAN, D. *et al.* Presence of Zika Virus in Conjunctival Fluid. **JAMA Ophthalmology**, 134, n. 11, p. 1330, 2016-11-01 2016.

SWAMINATHAN, S.; SCHLABERG, R.; LEWIS, J.; HANSON, K. E. *et al.* Fatal Zika Virus Infection with Secondary Nonsexual Transmission. **New England Journal of Medicine**, 375, n. 19, p. 1907-1909, 2016-11-10 2016.

TANG, H.; HAMMACK, C.; OGDEN, C., SARAH; WEN, Z. *et al.* Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. **Cell Stem Cell**, 18, n. 5, p. 587-590, 2016-05-01 2016.

TATE, J.; WARD, G. Interferences in immunoassay. **Clin Biochem Rev**, 25, n. 2, p. 105-120, May 2004.

THIEMMECA, S.; TAMDET, C.; PUNYADEE, N.; PROMMOOL, T. *et al.* Secreted NS1 Protects Dengue Virus from Mannose-Binding Lectin-Mediated Neutralization. **J Immunol**, 197, n. 10, p. 4053-4065, Nov 15 2016.

TOGNARELLI, J.; ULLOA, S.; VILLAGRA, E.; LAGOS, J. *et al.* A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. **Archives of Virology**, 161, n. 3, p. 665-668, 2016-03-01 2016.

TRIPATHI, S.; BALASUBRAMANIAM, V. R. M. T.; BROWN, J. A.; MENA, I. *et al.* A novel Zika virus mouse model reveals strain specific differences in virus pathogenesis and host inflammatory immune responses. **PLOS Pathogens**, 13, n. 3, p. e1006258, 2017-03-09 2017.

WALKER, P. J.; SIDDELL, S. G.; LEFKOWITZ, E. J.; MUSHEGIAN, A. R. *et al.* Recent changes to virus taxonomy ratified by the International Committee on

Taxonomy of Viruses (2022). **Archives of Virology**, 167, n. 11, p. 2429-2440, 2022-11-01 2022.

WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. **Antiviral Research**, 85, n. 2, p. 328-345, 2010-02-01 2010.

WESTAWAY, E. G.; MACKENZIE, J. M.; KENNEY, M. T.; JONES, M. K. *et al.* Ultrastructure of Kunjin virus-infected cells: colocalization of NS1 and NS3 with double-stranded RNA, and of NS2B with NS3, in virus-induced membrane structures. **Journal of Virology**, 71, n. 9, p. 6650-6661, 1997-09-01 1997.

WHO, W. H. O. **Zika epidemiology update**. 2022.

WILDER-SMITH, A.; LEONG, W. Y. Importation of yellow fever into China: assessing travel patterns. **J Travel Med**, 24, n. 4, Jul 01 2017.

WILSON, J. R.; DE SESSIONS, P. F.; LEON, M. A.; SCHOLLE, F. West Nile Virus Nonstructural Protein 1 Inhibits TLR3 Signal Transduction. **Journal of Virology**, 82, n. 17, p. 8262-8271, 2008-09-01 2008.

WINGFIELD, P. Protein precipitation using ammonium sulfate. **Curr Protoc Protein Sci**, Appendix 3, p. Appendix 3F, May 2001.

WINKLER, G.; RANDOLPH, V. B.; CLEAVES, G. R.; RYAN, T. E. *et al.* Evidence that the mature form of the flavivirus nonstructural protein NS1 is a dimer. **Virology**, 162, n. 1, p. 187-196, Jan 1988.

WISDOM, G. B. Conjugation of antibodies to horseradish peroxidase. *In*: BURNS, R. (Ed.). **Immunochemical Protocols**. 3 ed. Humana Totowa, NJ, 2005. p. 127–130. (Methods in Molecular Biology).

WU, Y.; LIU, Q.; ZHOU, J.; XIE, W. *et al.* Zika virus evades interferon-mediated antiviral response through the co-operation of multiple nonstructural proteins in vitro. **Cell Discovery**, 3, n. 1, p. 17006, 2017-03-21 2017.

XIA, H.; LUO, H.; SHAN, C.; MURUATO, A. E. *et al.* An evolutionary NS1 mutation enhances Zika virus evasion of host interferon induction. **Nature Communications**, 9, n. 1, 2018-01-29 2018.

YOKOYAMA, S.; STARMER, W. T. Possible Roles of New Mutations Shared by Asian and American Zika Viruses. **Mol Biol Evol**, 34, n. 3, p. 525-534, Mar 01 2017.

YOUNG, P. R. Arboviruses: A Family on the Move. **Adv Exp Med Biol**, 1062, p. 1-10, 2018.

YOUNG, P. R.; HILDITCH, P. A.; BLETCHLY, C.; HALLORAN, W. An Antigen Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Reveals High Levels of the Dengue Virus Protein NS1 in the Sera of Infected Patients. **Journal of Clinical Microbiology**, 38, n. 3, p. 1053-1057, 2000-03-01 2000.

YUAN, L.; HUANG, X. Y.; LIU, Z. Y.; ZHANG, F. *et al.* A single mutation in the prM protein of Zika virus contributes to fetal microcephaly. **Science**, 358, n. 6365, p. 933-936, Nov 17 2017.

ZAMBRANO, H.; WAGGONER, J.; LEÓN, K.; PINSKY, B. *et al.* High incidence of Zika virus infection detected in plasma and cervical cytology specimens from pregnant women in Guayaquil, Ecuador. **American Journal of Reproductive Immunology**, 77, n. 2, p. e12630, 2017-02-01 2017.

ZANLUCA, C.; DOS SANTOS, C. N. D. Zika virus – an overview. **Microbes and Infection**, 18, n. 5, p. 295-301, 2016-05-01 2016.

ZANLUCA, C.; MELO, V. C. A. D.; MOSIMANN, A. L. P.; SANTOS, G. I. V. D. *et al.* First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 110, n. 4, p. 569-572, 2015-06-09 2015.

ZHANG, H.-L.; YE, H.-Q.; LIU, S.-Q.; DENG, C.-L. *et al.* West Nile Virus NS1 Antagonizes Interferon Beta Production by Targeting RIG-I and MDA5. **Journal of Virology**, 91, n. 18, p. e02396-02316, 2017-09-15 2017.

ZHANG, L.; DU, X.; CHEN, C.; CHEN, Z. *et al.* Development and Characterization of Double-Antibody Sandwich ELISA for Detection of Zika Virus Infection. **Viruses**, 10, n. 11, p. 634, 2018-11-15 2018.

ZHANG, S.; HE, Y.; WU, Z.; WANG, M. *et al.* Secretory pathways and multiple functions of nonstructural protein 1 in flavivirus infection. **Front Immunol**, 14, p. 1205002, 2023.

ZHU, Z.; CHAN, J. F.-W.; TEE, K.-M.; CHOI, G. K.-Y. *et al.* Comparative genomic analysis of pre-epidemic and epidemic Zika virus strains for virological factors potentially associated with the rapidly expanding epidemic. **Emerging Microbes & Infections**, 5, n. 1, p. 1-12, 2016-01-01 2016.

ANEXO I – ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO (*Scientific Reports*)

1 **Development of a quantitative NS1 antigen enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for**
2 **Zika virus detection using a novel virus-specific mAb**

3

4 Stefanny Viloché Morales¹, Gabriela Mattoso Coelho¹, Taíssa Ricciardi-Jorge², Gisiane Gruber
5 Dori¹, Camila Zanluca¹ & Claudia Nunes Duarte dos Santos^{1*}.

6

7 ¹Laboratório de Virologia Molecular, Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ, Curitiba, Paraná, Brazil.

8 ²Viral gene expression group, The Pirbright Institute, Pirbright, Surrey, United Kingdom.

9 *Correspondence and requests for material should be addressed to C.N.D.S. (e-mail:

10 claudia.dossantos@fiocruz.br)

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48 Abstract

49 Viruses from the *Flaviviridae* family, such as Dengue virus (DENV), Yellow fever virus (YFV), and
 50 Zika virus (ZIKV) are notorious global public health problems. ZIKV emergence in Polynesia and
 51 the Americas from 2013 to 2016 raised concerns as new distinguishing features set it apart
 52 from previous outbreaks, including its association with neurological complications and
 53 heightened disease severity. Virus detection is impaired as cross-reactivity to other closely
 54 related orthoflaviviruses is common among commercially available diagnostic kits. While non-
 55 structural protein 1 (NS1) has been used as an early marker of DENV and West Nile virus (WNV)
 56 infection, little is known about NS1 expression during ZIKV infection. In the present work, we
 57 developed a NS1 capture ELISA using a novel ZIKV-specific monoclonal antibody to study NS1
 58 expression dynamics *in vitro* in mosquito and human cell lines. While detectable in culture
 59 supernatants, higher concentrations of NS1 were predominantly cell-associated. To our
 60 knowledge, this is the first report of NS1 detection in human cells despite viral clearance over
 61 time. Tests with human samples need to be conducted to validate the applicability of NS1
 62 detection for diagnosis, but overall, the tools developed in this work are promising for specific
 63 detection of acute ZIKV infection.

64

65 Introduction

66 Arboviruses are transmitted by hematophagous vectors, particularly mosquitoes, in which a
 67 part of their replicative cycle occurs. These viruses are maintained in nature predominantly
 68 through a sylvatic transmission cycle between arthropod vectors and non-human vertebrate
 69 reservoirs that act as amplifying hosts [1, 2]. Since human infection is mostly incidental and
 70 produces low viremia, they act as dead-end hosts by stopping virus dissemination to a new
 71 vector. Nonetheless, spillover events can lead to the establishment of urban cycles where a few
 72 arboviruses, such as Yellow Fever (YFV), Dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV), and Zika (ZIKV),
 73 have expanded their reach, including humans as amplifying hosts [1, 2].

74 Although Zika virus was first isolated in 1947 from non-human primates in Zika forest in
 75 Uganda, its circulation was mostly silent, with only sporadic cases of human infection being
 76 reported in sub-Saharan Africa and Southeast Asia before the first major outbreak in Yap Island,
 77 Micronesia, in 2007. Human infection was considered a mild, self-limiting flu-like febrile illness
 78 with a classic clinical pattern (fever, rash, arthralgia, and conjunctivitis) that would only be
 79 developed in a fraction of infected people [3, 4]. However, the outbreaks in French Polynesia,
 80 Easter Island, New Caledonia, and the Cook Islands in 2013–2014 [5–7], followed by the
 81 outbreak in Brazil and the Americas in 2015–2016 [8–11], shed light on new clinical
 82 presentations that set them apart from previous outbreaks. For the first time, neurological
 83 complications in fetuses and adults were causally linked to Zika virus infection [4, 12, 13]. ZIKV-
 84 induced congenital diseases ranging from cerebral calcifications to microcephaly, intrauterine
 85 growth restriction, fetal death, and stillbirth were reported [14–16]. On the other hand,
 86 infection has also been associated with Guillain-Barré Syndrome (GBS), possibly as a
 87 consequence of anti-ZIKV neutralizing antibody activity, causing nerve damage and leading to
 88 an inflammatory demyelinating polyneuropathy [17, 18]. While the number of ZIKV cases
 89 declined considerably after 2016, transmission is still documented in some countries, with the
 90 Americas being the region with highest number of reported cases annually. According to the
 91 most recent WHO report, eighty nine nations and territories have reported evidence of
 92 autochthonous mosquito-borne ZIKV transmission as of December 2021. Despite the high

93 morbidity due to severe sequelae resulting from infection, critical gaps remain in our
94 understanding of Zika virus biology.

95 ZIKV is an enveloped positive-stranded RNA virus in the *Flaviviridae* family. The 11-kb RNA
96 genome encodes a polyprotein that is subsequently processed by viral and host proteases to
97 generate structural (capsid, pre/membrane, and envelope) and seven non-structural proteins
98 (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, and NS5) [19]. Studies with closely related flaviviruses
99 showed that the non-structural protein 1 (NS1) is essential for the establishment of infection,
100 having an important role in viral replication as well as in pathogenicity and immune system
101 evasion [20-22]. This 46–55 kDa glycoprotein presents itself as a membrane-associated
102 homodimer as well as a secreted hexameric lipoprotein particle [23] that can be detected in
103 infected individuals and correlate with disease severity. The antigen presence in sera has been
104 used as a marker for acute infections by DENV and WNV [24-26], making it an interesting target
105 for early diagnosis of ZIKV infections. Despite this, little is known about NS1 production during
106 ZIKV infection. In this study, we developed a specific quantitative NS1 antigen capture ELISA to
107 investigate the dynamics of expression and secretion of this antigen in human and mosquito
108 cell lines and address its applicability as a diagnostic marker of acute infection.

109

110 Results

111 Production of ZIKV-specific monoclonal antibody and recombinant NS1 protein

112 Monoclonal antibodies (mAb) were generated from the fusion of splenocytes harvested from
113 ZIKV-immunized Balb/c mice and P3X63Ag8.653 cells. Stable hybridomas were screened for
114 reactivity against ZIKV by immunofluorescence assay (IFA), as well as to NS1 by Western Blot
115 (WB). Out of all positive mAbs, 12B8 was selected for its high fluorescence intensity and
116 specificity. This mAb presented no cross-reactivity against a panel of closely related flaviviruses
117 (DENV serotypes 1–4, YFV, WNV, and Saint Louis encephalitis virus (SLEV)) and was able to bind
118 to both the African (see Figure 3) and Asian lineages of ZIKV (Figure 1 a). The sensitivity of 12B8
119 was similar to that of pan-flavivirus mAb 4G2, used as a positive control of infection. Further
120 characterization revealed that the 12B8 antibody was an IgG2b/k isotype. Recombinant NS1
121 (rNS1) expressed in Schneider 2 (S2) insect cells was successfully detected by IFA (Figure 1 b)
122 and WB analysis (Figure 1 c), establishing that the 12B8 mAb binds to a linear epitope.

123

124 ZIKV NS1 antigen capture ELISA

125 The test developed consisted of antigen capture and detection by 12B8 mAb associated with a
126 standard curve of purified ZIKV rNS1 to determine protein concentration in samples. rNS1 was
127 serially diluted from 40 µg/mL to 19.5 ng/mL to determine the assay sensitivity. The mean
128 value of optical density at 450 nm for the blank was subtracted from the samples prior to
129 fitting a nonlinear regression model. The limit of detection (LOD) of the test is 19.5 ng/mL, with
130 a concentration-dependent response up to 10 µg/mL (Figure 2). Therefore, this was the chosen
131 range of the standard curve for interpolation of unknown values. Specificity of the test was
132 assessed with high concentrations (10 µg/mL) of purified recombinant YFV and DENV-3 NS1 as
133 well as with supernatant of infection (Figure S2). No cross-reactivity was observed.

134

135 NS1 expression and secretion in human and mosquito cell lines

136 To study NS1 production and secretion over time, C6/36, A549, and JEG-3 cells were infected
 137 with the ZIKV strain MR766 (Figure 3), as well as the clinical isolate from the 2015 epidemic, ZV
 138 BR 2015/15261 (Figure 4). NS1 synthesis was assessed at 24-, 48-, and 72-hours post-infection
 139 by staining infected cells with 12B8 mAb. Additionally, culture supernatant and cell lysates
 140 were analyzed with the developed ZIKV NS1-capture ELISA to determine total and soluble
 141 antigen concentration.

142 C6/36 cells produced the highest concentration of total NS1 among all tested cell lines. Despite
 143 this, secreted NS1 levels were low, falling outside the limit of detection of the test at the earlier
 144 timepoints (Figure 3 a and Figure 4 a, right panel). ZIKV ZV BR 2015/15261 infected cultures
 145 displayed an overall higher percentage of 4G2 positive cells when compared to MR766
 146 infection (Figure 3 a and Figure 4 a, left panel); nonetheless, comparable levels of cell-
 147 associated NS1 and total NS1 were detected (Figure 3 a and Figure 4 a, middle panel), which
 148 could be attributed to viral load differences. Although the frequency of NS1-positive cells
 149 increased over time following a similar pattern to viral infection with both MR766 and ZV BR
 150 2015/15261, a different trend was observed in human cell lines.

151 Peak infection in A549 and JEG-3 cells was detected up to 48 h in MR766 and ZV BR
 152 2015/15261 infected cultures. At 72 h post-infection, the percentage of 4G2 positive cells
 153 declined, while NS1 positive cells maintained constant levels from 48 to 72 h (Figure 3 b-c and
 154 Figure 4 b-c, left and middle panel). This contrasting phenotype is particularly heightened in
 155 JEG-3 cells, where the frequency of NS1+ cells is 4 and 8-fold higher than that of 4G2+ cells
 156 during MR766 and ZV BR 2015/15261 infections, respectively (Figure 3 c and Figure 4 c, left and
 157 middle panel).

158 Total and soluble NS1 quantified by ELISA increased over time in both cell types. Considering
 159 the cytopathic effect of ZIKV infection in mammalian cells, leakage of intracellular components
 160 of damaged cells could contribute to the amount of soluble NS1 detected by ELISA. Since no
 161 increase in cell death was observed during infection in C6/36 cells (Figure 3 a and Figure 4 a,
 162 right panel), it is likely that NS1 present in the supernatant originated from active secretion. On
 163 the other hand, the contribution of cell-associated antigen to total soluble NS1 cannot be ruled
 164 out, as significant cell death is observed in A549 and JEG3 cells infected with both ZIKV strains
 165 (Figure 3 b-c and Figure 4 b-c, right panel). Higher cell viability could support viral replication
 166 for a longer period and a higher viral load, thus allowing NS1 accumulation, which might be the
 167 case during C6/36 infection.

168

169 Discussion

170 Flaviviruses non-structural proteins have been found to play an important role for
 171 establishment of virus infection. NS1 is a conserved glycoprotein that can be found as
 172 intracellular monomers and dimers or be actively secreted as a hexameric lipoprotein particle
 173 [23, 27-32]. While it has been established that intracellular NS1 plays an essential role in
 174 negative-strand viral RNA synthesis [33-37], secreted NS1 contributes to pathogenicity and
 175 immune system evasion. Extracellular NS1 can bind to proteins of the complement system and
 176 antagonize their functions [38-41]. Disruption of innate immune response has also been
 177 previously reported by NS1 interaction with toll-like receptors (TLR) as well as with RIG-I-like
 178 receptors (RLR) pathways [20, 42-44].

NS1 presence in sera as an early marker of infection was first described for DENV [24, 25] but was later proposed for WNV and JEV [26, 45, 46], thus making an interesting target for virus specific diagnosis. Although NS1-capture ELISAs have been developed for these orthoflaviviruses, their use for diagnosis is still underutilized for viruses other than DENV. Furthermore, there is insufficient knowledge about NS1 production during ZIKV infection to effectively address the use of this protein for early virus detection.

To explore NS1 synthesis, secretion patterns, and its potential as a marker for ZIKV diagnosis, we developed a NS1-based capture ELISA for antigen quantification in mosquito and human cells cultures. The selected specific monoclonal antibody is used for capture and detection of NS1, thus favoring the binding of oligomers. Our test displayed similar sensitivity as other commercial and in house tests for other flaviviruses [24, 26, 45, 47-49], with a limit of detection of 19.5 ng/mL.

Overall, we showed that NS1 appears to be predominantly associated with cells, a pattern that was also observed for YFV [50], with notably higher levels compared to ZIKV infection. A singular study has previously assessed extracellular NS1 in ZIKV-infected Vero cells. NS1 levels were reported to be around 800 ng/mL [49], which is significantly lower than what is observed in similar studies with WNV and YFV, where the antigen can range up to 7–9 µg/mL [45, 50]. In this work, low NS1 secretion during ZIKV infection was confirmed using relevant human cell lines (A549 and JEG-3), where sNS1 was present within the 400–500 ng/mL range at later timepoints.

While for decades NS1 secretion was thought to be absent in insect cells, recent reports using more sensitive methods have detected its presence in C6/36 and Aag2 culture supernatants of DENV and YFV infected cells [50, 51]. During ZIKV infection, extracellular NS1 detection was limited to later timepoints in insect cells. Despite the high percentage of infected cells at 72 h, sNS1 levels were still lower than the amount detected for human cells.

NS1 presence in sera of flavivirus-infected patients is highly variable; antigen concentration can fluctuate from 0.01 to 50 µg/mL during DENV infection [25], while for YFV, it can range from 0.1 to 4.5 µg/mL [50]. Concentration of ZIKV NS1 in human is estimated to be 30 ng/mL. Considering the low viremia observed during ZIKV infection [52] as well as the low levels of NS1 in sera and in vitro infection, the use of this antigen as a marker for diagnosis still needs to be explored with bigger cohorts.

Although the assay settings could still be improved through tests with human samples, the tools developed in this study show potential for differential diagnostic. Aside from the developed NS1 capture ELISA, the specific monoclonal antibody generated in this study could be applied to development of a point-of-care rapid test, which could be particularly advantageous in areas with flavivirus cocirculation.

The most distinguishing feature observed during *in vitro* ZIKV infections, was cell associated-NS1 persistence in A549 and JEG-3 while viral infection decreased over time. The drop in frequency of infected cells is associated to an increase in number of damaged cells. It is then plausible to suggest that antigen accumulation on the cell membrane could be attributed to (1) the binding of sNS1 as well as the uptake of antigen released through cell lysis (2).

Previous studies have demonstrated that both secreted DENV and ZIKV NS1 can bind to the plasma membrane of uninfected cells and be endocytosed through different mechanisms [53, 54]. DENV sNS1 can be detected up to 48h within late endosomes of uninfected hepatocytes

and pretreatment with this protein was also shown to increase general endocytic activity as well as DENV infection [54]. Although a recent study has presented evidence of the participation of SRB1 receptor in NS1 internalization in C6/36 and Huh7 cells [53], NS1 binding to cells of epithelial and fibroblast origin was primarily linked to the glycosaminoglycans (GAG) heparin sulfate (HS) and chondroitin sulfate E [55]. It has been suggested that tissue-specific expression of GAG isoforms could play a role in restricting binding of NS1 to tissues associated with each flavivirus particular pathogenesis.

Considering that the human cell lines used in this study are both of epithelial origin, it is possible that GAG-mediated sNS1 adhesion could play a role in this system. Additionally, JEG-3 cells infected with the clinical isolate ZV BR 2015/15261 (Asian lineage) displayed a higher percentage of NS1-positive cells compared to A549, although presenting a similar fold increase in cell death. Considering that NS1 presence in human placenta has been previously reported [56], it is possible that this phenotype could be linked to tropism, as JEG-3 is a placenta-derived cell line.

Even though relevant research has been developed on ZIKV biology, many studies resort exclusively to the use of laboratory adapted strains, which could bias the observations of viral phenotypes, as it is believed that the accumulation of mutations might have contributed to the emergence of new clinical entities [57, 58], emphasizing the importance of working with currently circulating strains.

In conclusion, this is the first quantitative report that discriminates soluble, and cell associated NS1 expression dynamics during infection with ZIKV MR766 and clinical isolate ZV BR 2015/15261. Additional experiments would be necessary to determine if the phenotype of NS1 accumulation and persistence in cells during viral clearance is exclusive to ZIKV or can also be observed for other flaviviruses. Further investigation on cell surface attachment and uptake of sNS1 needs to be conducted to explore its implication in immune response and help decipher the contribution of this multifaceted protein to pathogenesis and viral proliferation.

Material and Methods

Cell culture and Viruses

A549 (ATCC) and JEG-3 (ATCC) cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium/nutrient mixture F-12 Ham (DMEM F-12; Gibco) supplemented with 7% fetal bovine serum (FBS; Gibco), 100U/mL of penicillin and 100µg/mL of streptomycin. *Aedes albopictus* C6/36 (ATCC) cells were maintained at 28°C in Leibovitz's L-15 medium (Gibco) supplemented with 5% FBS, 0.26% tryptose broth (Gibco) and 25µg/mL of gentamicin (Gibco) in the absence of CO₂. *Drosophila melanogaster* S2 cells (Thermo Fischer Scientific) were maintained at 28°C in Schneider's *Drosophila* Medium (Gibco) supplemented with 7% FBS and 100U/mL of penicillin and 100µg/mL of streptomycin in the absence of CO₂. All cell lines were routinely tested for mycoplasma contamination. Cell stocks were maintained at 37°C, 5% CO₂, unless stated otherwise.

Zika virus (ZIKV) viral stocks of strain MR766 and clinical isolate ZV BR 2015/15261 (isolated in 2015 from a subject in Brazil [59]) used in this study were grown and titrated in C6/36 cells. Additionally, Dengue virus 1 (DENV-1) MR, DENV-2 EN, DENV-3 290, DENV-4 LRV-13/422, Yellow Fever virus (YFV) M17/09 and 17DD, West Nile virus (WNV) E/7229/06, and Saint Louis

Encephalitis Virus (SLEV) 78V6507 stocks were used. All experiments handling virus were carried out under a BSL-2 or BSL-3 containment in accordance with current biosafety guidelines.

Monoclonal antibody production

All animal experimental procedures were conducted using protocols approved by the Fiocruz Ethical Committee on Animal Research under protocol LW-2/17, in accordance with the National Council on Animal Experimentation (CONCEA) regulations. All animal studies complied with the ARRIVE guidelines.

Young adult (4-6 weeks) Balb/c mice were kept under 12h light/dark cycles with *ad libitum* feeding at the Carlos Chagas Institute Animal Facility. Mice were immunized with five doses (1 to 4, intraperitoneal; 5, intravenous) of 1×10^6 PFU/animal of purified ZIKV ZV BR 2015/15261 particles with a two-week interval between each dose. Splenocytes were harvested 3 days after the last dose and fused with P3X63Ag8.653 myeloma cells as previously reported [60]. Specificity of mAbs was tested by indirect immunofluorescence assay (IFA) against other orthoflaviviruses. After screening, hybridoma 12B8-2E3 was selected and cultured in 300cm² flasks. mAb were precipitated from culture supernatant with a saturated ammonium sulfate solution prior to affinity purification with HiTrap Protein G HP column (GE Healthcare). Purified mAb was conjugated with horseradish peroxidase (HRP) as previously described [61] with minor modifications. Size exclusion chromatography of conjugated mAb was skipped and the final sample was dialyzed in PBS. Guardian Peroxidase Conjugate Stabilizer/Diluent (Thermo Fisher Scientific) was added 1:1 (v/v) to 12B8-2E3-HRP for long-term storage at 4°C.

Recombinant NS1 production

A consensus sequence coding for NS1 derived from a full genome ZIKV sequences alignment was optimized for expression in S2 cells and cloned into pMT/BiP/V5-His A (*Drosophila* Expression System; Invitrogen). Cells were co-transfected with the construct and selection vector pCoBlast (Invitrogen) to generate a stable culture after several rounds of blasticidin (25µg/mL) selection. Clones were screened for V5-tag both by IFA and western blot (WB) after CuSO₄ induction. For recombinant NS1 (rNS1) production, 1×10^8 cells were seeded in 300cm² flasks and induced with 1.2mM CuSO₄. After 5 days, supernatant was harvested and rNS1 was purified by affinity to Ni-NTA Agarose (Qiagen). Final protein concentration was measured both by a colorimetric assay (Bio-rad Protein Assay, Bio-rad) and SDS-PAGE gel band quantification in ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

Kinetics of NS1 expression

C6/36, A549 and JEG3 cells were seeded at a density of 2×10^5 cells per well into 24-well tissue culture plates. The next day cells were infected with a 200µL inoculum of ZIKV MR766 or ZV BR 2015/15261 at different multiplicity of infection (MOI). After 1h, inocula was replaced with fresh media and cells were maintained at 28°C (C6/36) or 37°C/5% CO₂ (A549 and JEG-3) for 24, 48 and 72h. NS1 was quantified from the supernatant and cell lysates of infected cultures with the NS1 antigen capture ELISA. Cells were lysed with 200µL of cell lysis buffer (50mM Tris

308 pH 7.8, 150mM NaCl, 1% NP-40 and cOmplete Protease Inhibitor cocktail 1x; Roche) and
 309 centrifuged to remove cell debris. The supernatant from this step was diluted to 600 μ L with
 310 media prior to analysis by ELISA.

311

312 Viability and intracellular staining

313 At each timepoint, cells were harvested and washed with PBS. After resuspending each sample
 314 in 300 μ L of PBS, a third of it was transferred to a 96 well U-bottom plate and stained with
 315 Propidium Iodide 1 μ g/mL (BD Biosciences) for 15 minutes protected from light. Samples were
 316 analyzed immediately in CytoFLEX LX (Beckman Coulter).

317 The remainder of each sample was fixed with 2% paraformaldehyde (PFA) for 1h at room
 318 temperature (RT), protected from light. Cells were washed with PBS and incubated in 200 μ L of
 319 Perm/Wash solution (P/W; BD Biosciences) for 30 min at 4°C, centrifuged and incubated with
 320 100 μ L of the pan-flavivirus mAb 4G2 (1:200 v/v in P/W) or anti-ZIKV NS1 mAb 12B8-2E3 (1:400
 321 v/v in P/W) for 1h at 37°C. Following two P/W washes, cells were incubated with Alexa Fluor
 322 488-conjugated goat anti-mouse IgG (1:400 v/v in P/W; Invitrogen) for 40 min at 37°C. Lastly,
 323 cells were washed twice with P/W and an additional time with PBS before being transferred to
 324 96 well U-bottom plates for analysis in CytoFLEX LX. Raw data was analyzed on FlowJo v10.9
 325 (BD Life Sciences) and graphed using GraphPadPrism 8 (Boston, Massachusetts USA). Statistical
 326 analyses were performed with GraphPad Prism using Welch's unpaired t-test assuming a
 327 confidence interval of 95%.

328

329 NS1 antigen capture ELISA

330 96 well ELISA plate modules (Nalge Nunc International) were coated with 250ng of purified
 331 12B8-2E3 mAb per well, diluted in 0.05M carbonate buffer (pH 9.6) overnight at 4°C. Blocking
 332 buffer (PBS containing 0.05% Tween 20 and 10% FBS) was added to the plate for 1 hour at 37°C
 333 to minimize non-specific binding. Samples or standard curve (100 μ L each) were added and
 334 incubated for 2 hours at 37°C, followed by 10 μ g/mL of 12B8-2E3-HRP diluted in blocking buffer.
 335 After 1h at 37°C, 50 μ L of the chromogenic substrate TMB (KPL) was added to each well. The
 336 reaction developed for 20 min at RT and was interrupted with the same volume of 2M H₂SO₄.
 337 Unbound proteins were removed after each step by rinsing 5 times with washing buffer (PBS
 338 containing 0.05% Tween 20). Net value of optical density at 450 nm was calculated by
 339 subtracting the value obtained for the negative control. NS1 concentration was determined
 340 through interpolation from a rNS1 standard curve built from serial dilutions ranging from
 341 10 μ g/mL – 19.5ng/mL on Prism 8. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism
 342 using Welch's unpaired t-test assuming a confidence interval of 95%.

343

344 Data availability

345 All data generated and analyzed during this study are included in this published article and its
 346 Supplementary Information files.

347

348 References

349

- 350 1. D. J. Gubler, Human arbovirus infections worldwide. *Ann N Y Acad Sci* 951, 13-24
351 (2001).
- 352 2. N. Cleton, M. Koopmans, J. Reimerink, G.-J. Godeke, C. Reusken, Come fly with me:
353 Review of clinically important arboviruses for global travelers. *Journal of Clinical*
354 *Virology* 55, 191-203 (2012).
- 355 3. R. Hamel *et al.*, Zika virus: epidemiology, clinical features and host-virus interactions.
356 *Microbes and Infection* 18, 441-449 (2016).
- 357 4. C. Zanluca, C. N. D. Dos Santos, Zika virus – an overview. *Microbes and Infection* 18,
358 295-301 (2016).
- 359 5. S. Iosifidis *et al.*, Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Med Mal Infect* 44,
360 302-307 (2014).
- 361 6. J. G. Derraik, D. Slaney, Notes on Zika virus—an emerging pathogen now present in the
362 South Pacific. *Aust N Z J Public Health* 39, 5-7 (2015).
- 363 7. J. Tognarelli *et al.*, A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific,
364 2014. *Archives of Virology* 161, 665-668 (2016).
- 365 8. C. Zanluca *et al.*, First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil.
366 *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 110, 569-572 (2015).
- 367 9. N. R. Faria *et al.*, Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the
368 Americas. *Nature* 546, 406-410 (2017).
- 369 10. N. D. Grubaugh *et al.*, Genomic epidemiology reveals multiple introductions of Zika
370 virus into the United States. *Nature* 546, 401-405 (2017).
- 371 11. H. C. Metsky *et al.*, Zika virus evolution and spread in the Americas. *Nature* 546, 411-
372 415 (2017).
- 373 12. G. Calvet *et al.*, Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses
374 with microcephaly in Brazil: a case study. *The Lancet Infectious Diseases* 16, 653-660
375 (2016).
- 376 13. A. S. Oliveira Melo *et al.*, Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality
377 and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* 47, 6-7
378 (2016).
- 379 14. P. Brasil *et al.*, Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *New England*
380 *Journal of Medicine* 375, 2321-2334 (2016).
- 381 15. T. V. B. De Araújo *et al.*, Association between Zika virus infection and microcephaly in
382 Brazil, January to May, 2016: preliminary report of a case-control study. *The Lancet*
383 *Infectious Diseases* 16, 1356-1363 (2016).
- 384 16. G. V. A. França *et al.*, Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first
385 1501 livebirths with complete investigation. *The Lancet* 388, 891-897 (2016).
- 386 17. E. Oehler *et al.*, Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome – case
387 report, French Polynesia, December 2013. *Eurosurveillance* 19, 20720 (2014).
- 388 18. R. M. Lynch *et al.*, Augmented Zika and Dengue Neutralizing Antibodies Are Associated
389 With Guillain-Barré Syndrome. *J Infect Dis* 219, 26-30 (2019).
- 390 19. T. J. Chambers, C. S. Hahn, R. Galler, C. M. Rice, Flavivirus genome organization,
391 expression, and replication. *Annu Rev Microbiol* 44, 649-688 (1990).
- 392 20. J. R. Wilson, P. F. De Sessions, M. A. Leon, F. Scholte, West Nile Virus Nonstructural
393 Protein 1 Inhibits TLR3 Signal Transduction. *Journal of Virology* 82, 8262-8271 (2008).
- 394 21. S. Chen, Z. Wu, M. Wang, A. Cheng, Innate Immune Evasion Mediated by Flaviviridae
395 Non-Structural Proteins. *Viruses* 9, 291 (2017).
- 396 22. H. Puerta-Guardo *et al.*, Flavivirus NS1 Triggers Tissue-Specific Vascular Endothelial
397 Dysfunction Reflecting Disease Tropism. *Cell Reports* 26, 1598-1613.e1598 (2019).

- 398 23. I. Gutsche *et al.*, Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-
399 shaped high-density lipoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108,
400 8003-8008 (2011).
- 401 24. P. R. Young, P. A. Hilditch, C. Bletchly, W. Halloran, An Antigen Capture Enzyme-Linked
402 Immunosorbent Assay Reveals High Levels of the Dengue Virus Protein NS1 in the Sera
403 of Infected Patients. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 1053-1057 (2000).
- 404 25. S. Alcon *et al.*, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Specific to Dengue Virus Type 1
405 Nonstructural Protein NS1 Reveals Circulation of the Antigen in the Blood during the
406 Acute Phase of Disease in Patients Experiencing Primary or Secondary Infections.
407 *Journal of Clinical Microbiology* 40, 376-381 (2002).
- 408 26. J. Macdonald *et al.*, NS1 Protein Secretion during the Acute Phase of West Nile Virus
409 Infection. *Journal of Virology* 79, 13924-13933 (2005).
- 410 27. G. Winkler, V. B. Randolph, G. R. Cleaves, T. E. Ryan, V. Stollar, Evidence that the mature
411 form of the flavivirus nonstructural protein NS1 is a dimer. *Virology* 162, 187-196
412 (1988).
- 413 28. G. Winkler, S. E. Maxwell, C. Ruemmler, V. Stollar, Newly synthesized dengue-2 virus
414 nonstructural protein NS1 is a soluble protein but becomes partially hydrophobic and
415 membrane-associated after dimerization. *Virology* 171, 302-305 (1989).
- 416 29. P. R. Post, R. Carvalho, R. Galler, Glycosylation and secretion of yellow fever virus
417 nonstructural protein NS1. *Virus Res* 18, 291-302 (1991).
- 418 30. A. J. Crooks, J. M. Lee, L. M. Easterbrook, A. V. Timofeev, J. R. Stephenson, The NS1
419 protein of tick-borne encephalitis virus forms multimeric species upon secretion from
420 the host cell. *Journal of General Virology* 75, 3453-3460 (1994).
- 421 31. M. Flamand *et al.*, Dengue Virus Type 1 Nonstructural Glycoprotein NS1 Is Secreted
422 from Mammalian Cells as a Soluble Hexamer in a Glycosylation-Dependent Fashion.
423 *Journal of Virology* 73, 6104-6110 (1999).
- 424 32. D. L. Akey *et al.*, Flavivirus NS1 structures reveal surfaces for associations with
425 membranes and the immune system. *Science* 343, 881-885 (2014).
- 426 33. J. M. Mackenzie, M. K. Jones, P. R. Young, Immunolocalization of the dengue virus
427 nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. *Virology* 220,
428 232-240 (1996).
- 429 34. B. D. Lindenbach, C. M. Rice, trans-Complementation of yellow fever virus NS1 reveals
430 a role in early RNA replication. *Journal of Virology* 71, 9608-9617 (1997).
- 431 35. I. R. Muyaert, R. Galler, C. M. Rice, Genetic analysis of the yellow fever virus NS1
432 protein: identification of a temperature-sensitive mutation which blocks RNA
433 accumulation. *Journal of Virology* 71, 291-298 (1997).
- 434 36. E. G. Westaway, J. M. Mackenzie, M. T. Kenney, M. K. Jones, A. A. Khromykh,
435 Ultrastructure of Kunjin virus-infected cells: colocalization of NS1 and NS3 with double-
436 stranded RNA, and of NS2B with NS3, in virus-induced membrane structures. *Journal of*
437 *Virology* 71, 6650-6661 (1997).
- 438 37. B. D. Lindenbach, C. M. Rice, Genetic Interaction of Flavivirus Nonstructural Proteins
439 NS1 and NS4A as a Determinant of Replicase Function. *Journal of Virology* 73, 4611-
440 4621 (1999).
- 441 38. K. M. Chung *et al.*, West Nile virus nonstructural protein NS1 inhibits complement
442 activation by binding the regulatory protein factor H. *Proceedings of the National*
443 *Academy of Sciences* 103, 19111-19116 (2006).
- 444 39. P. Avirutnan *et al.*, Binding of flavivirus nonstructural protein NS1 to C4b binding
445 protein modulates complement activation. *J Immunol* 187, 424-433 (2011).
- 446 40. J. N. Conde *et al.*, Inhibition of the Membrane Attack Complex by Dengue Virus NS1
447 through Interaction with Vitronectin and Terminal Complement Proteins. *Journal of*
448 *Virology* 90, 9570-9581 (2016).

- 449 41. S. Thiemmea *et al.*, Secreted NS1 Protects Dengue Virus from Mannose-Binding
450 Lectin-Mediated Neutralization. *J Immunol* 197, 4053-4065 (2016).
- 451 42. K. R. Crook, M. Miller-Kittrell, C. R. Morrison, F. Scholle, Modulation of innate immune
452 signaling by the secreted form of the West Nile virus NS1 glycoprotein. *Virology* 458-
453 459, 172-182 (2014).
- 454 43. Y. Wu *et al.*, Zika virus evades interferon-mediated antiviral response through the co-
455 operation of multiple nonstructural proteins in vitro. *Cell Discovery* 3, 17006 (2017).
- 456 44. H.-L. Zhang *et al.*, West Nile Virus NS1 Antagonizes Interferon Beta Production by
457 Targeting RIG-I and MDA5. *Journal of Virology* 91, e02396-02316 (2017).
- 458 45. K. M. Chung, M. S. Diamond, Defining the levels of secreted non-structural protein NS1
459 after West Nile virus infection in cell culture and mice. *Journal of Medical Virology* 80,
460 547-556 (2008).
- 461 46. J. S. Kumar, M. Parida, P. V. Rao, Monoclonal antibody-based antigen capture
462 immunoassay for detection of circulating non-structural protein NS1: implications for
463 early diagnosis of Japanese encephalitis virus infection. *J Med Virol* 83, 1063-1070
464 (2011).
- 465 47. S. R. Fry *et al.*, The Diagnostic Sensitivity of Dengue Rapid Test Assays Is Significantly
466 Enhanced by Using a Combined Antigen and Antibody Testing Approach. *PLoS*
467 *Neglected Tropical Diseases* 5, e1199 (2011).
- 468 48. D. Saxena, J. S. Kumar, M. Parida, R. R. Sivakumar, I. K. Patro, Development and
469 evaluation of NS1 specific monoclonal antibody based antigen capture ELISA and its
470 implications in clinical diagnosis of West Nile virus infection. *J Clin Virol* 58, 528-534
471 (2013).
- 472 49. I. Bosch *et al.*, Rapid antigen tests for dengue virus serotypes and Zika virus in patient
473 serum. *Science Translational Medicine* 9, eaan1589 (2017).
- 474 50. T. Ricciardi-Jorge *et al.*, Development of a quantitative NS1-capture enzyme-linked
475 immunosorbent assay for early detection of yellow fever virus infection. *Sci Rep* 7,
476 16229 (2017).
- 477 51. A. C. Alcalá *et al.*, The dengue virus non-structural protein 1 (NS1) is secreted efficiently
478 from infected mosquito cells. *Virology* 488, 278-287 (2016).
- 479 52. J. J. Waggoner *et al.*, Viremia and Clinical Presentation in Nicaraguan Patients Infected
480 With Zika Virus, Chikungunya Virus, and Dengue Virus. *Clin Infect Dis* 63, 1584-1590
481 (2016).
- 482 53. A. C. Alcalá *et al.*, Dengue Virus NS1 Uses Scavenger Receptor B1 as a Cell Receptor in
483 Cultured Cells. *J Virol* 96, e0166421 (2022).
- 484 54. S. Alcon-Lepoder *et al.*, The Secreted Form of Dengue Virus Nonstructural Protein NS1
485 Is Endocytosed by Hepatocytes and Accumulates in Late Endosomes: Implications for
486 Viral Infectivity. *Journal of Virology* 79, 11403-11411 (2005).
- 487 55. P. Avirutnan *et al.*, Secreted NS1 of Dengue Virus Attaches to the Surface of Cells via
488 Interactions with Heparan Sulfate and Chondroitin Sulfate E. *PLoS Pathogens* 3, e183
489 (2007).
- 490 56. K. Rabelo *et al.*, Placental Histopathology and Clinical Presentation of Severe
491 Congenital Zika Syndrome in a Human Immunodeficiency Virus-Exposed Uninfected
492 Infant. *Front Immunol* 8, 1704 (2017).
- 493 57. S. Yokoyama, W. T. Starmer, Possible Roles of New Mutations Shared by Asian and
494 American Zika Viruses. *Mol Biol Evol* 34, 525-534 (2017).
- 495 58. T. C. Pierson, M. S. Diamond, The emergence of Zika virus and its new clinical
496 syndromes. *Nature* 560, 573-581 (2018).
- 497 59. D. M. Strottmann *et al.*, Genetic and biological characterisation of Zika virus isolates
498 from different Brazilian regions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 114, (2019).

60. G. A. Mazzarotto *et al.*, Production and characterization of monoclonal antibodies against the recombinant nucleoprotein of *Araucaria hantavirus*. *J Virol Methods* **162**, 96-100 (2009).
61. G. B. Wisdom, Conjugation of antibodies to horseradish peroxidase. *Methods Mol Biol* **295**, 127-130 (2005).

Acknowledgements

We thank the animal facility staff for technical support with animal experiments. We thank the Program for Technological Development in Tools for Health – PDTIS-FIOCRUZ – for the use of microscopy and flow cytometry facilities at Instituto Carlos Chagas/Fiocruz-PR. We thank Allan Henrique Depieri Cataneo for his support with flow cytometry sample acquisition. The research reported in this manuscript was supported by Banco Nacional de Desenvolvimento (BNDES) by grant number VPPIS-002-FEX-17-2-1; CAPES Zika-Fast-Track 481/2016 (88887.116626/2016-01); and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) by grant number 439968/2016-0. CNDs was granted a CNPq fellowship.

Author contributions

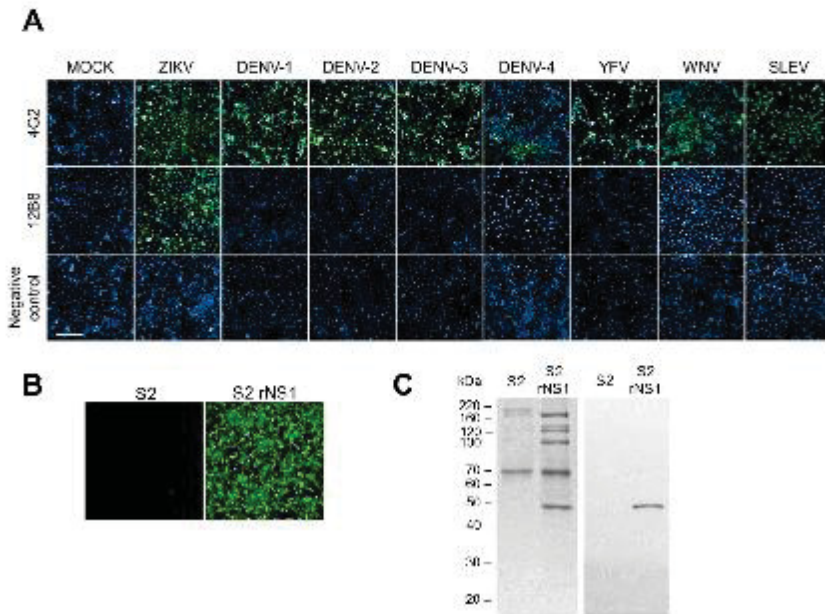
C.N.D.S and C.Z., conceptualized the study and funding acquisition. Experiment design, investigation, formal analysis, and original draft was executed by S.V.M. T.R.J. participated in hybridoma production and NS1 cloning. G.M.C. and G.G.D performed hybridoma screening and characterization. C.Z, C.N.D.S, G.M.C, and S.V.M. reviewed and edited the manuscript. All authors have read and agreed to the final version of the manuscript.

Additional Information

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

536 **Figures**

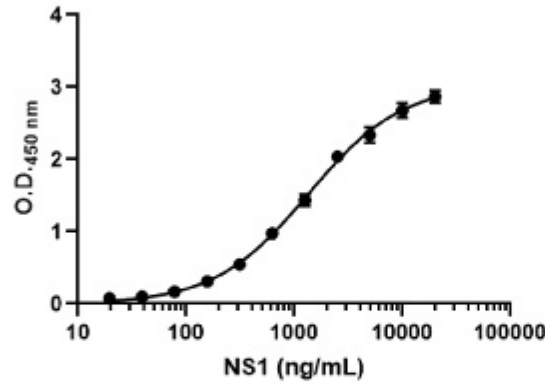
537



538

539 **Figure 1. Characterization of 12B8 mAb.** (a) IFA of C6/36 cells infected with ZIKV ZV BR
 540 2015/15261, DENV serotypes 1–4, YFV, WNV, and SLEV. Uninfected cells (Mock) were also
 541 included as controls. In addition to mAb 12B8, cells were also stained with 4G2 and anti-GFP
 542 for positive and negative controls of infection, respectively. Reactivity was visualized with an
 543 Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse IgG antibody and counterstained with DAPI. Images
 544 were obtained with Operetta CLS high-content imaging system at 20x magnification. Scale bar
 545 indicates 100 μ m. (b) IFA of rNS1-expressing cells stained with 12B8 and Alexa Fluor 488
 546 conjugated anti-mouse IgG antibody. Wild-type S2 cells were included as a negative control.
 547 Images were obtained with a Leica AF6000 modular system with 20x magnification. Scale bar
 548 indicates 100 μ m (c) Supernatant of NS1 expressing cells was purified and resolved on 10%
 549 SDS-PAGE and stained with Coomassie blue (left panel) or analyzed by western blot (right
 550 panel). The membrane was stained with 12B8 mAb and alkaline phosphatase-conjugated anti-
 551 mouse IgG. Supernatant of wild-type S2 cells were included as a negative control.

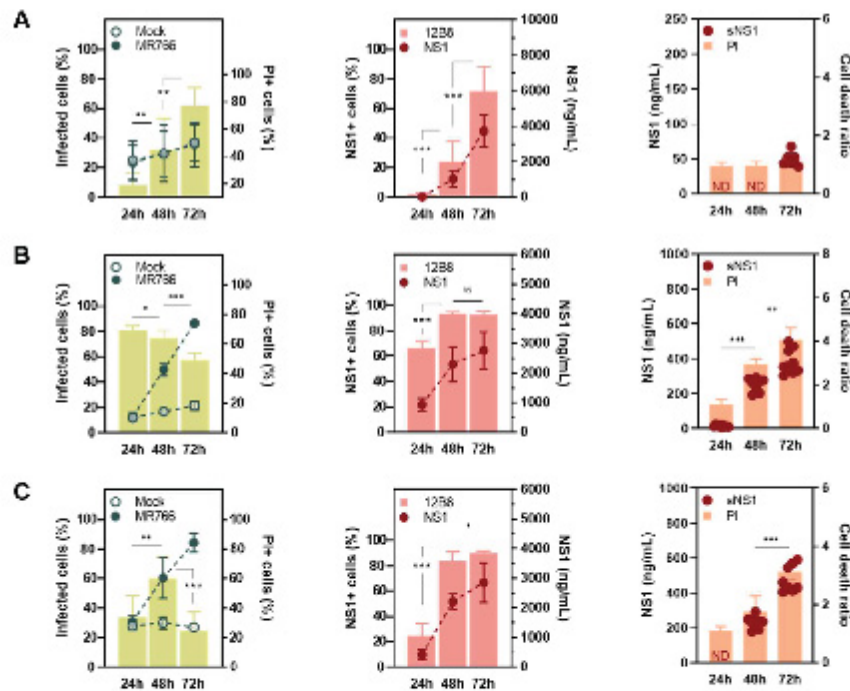
552



553

554 Figure 2. ZIKV NS1 antigen capture ELISA. Standard curve was built by serial dilutions of rNS1.

555 Data is representative of three independent experiments and presented as mean (SD).

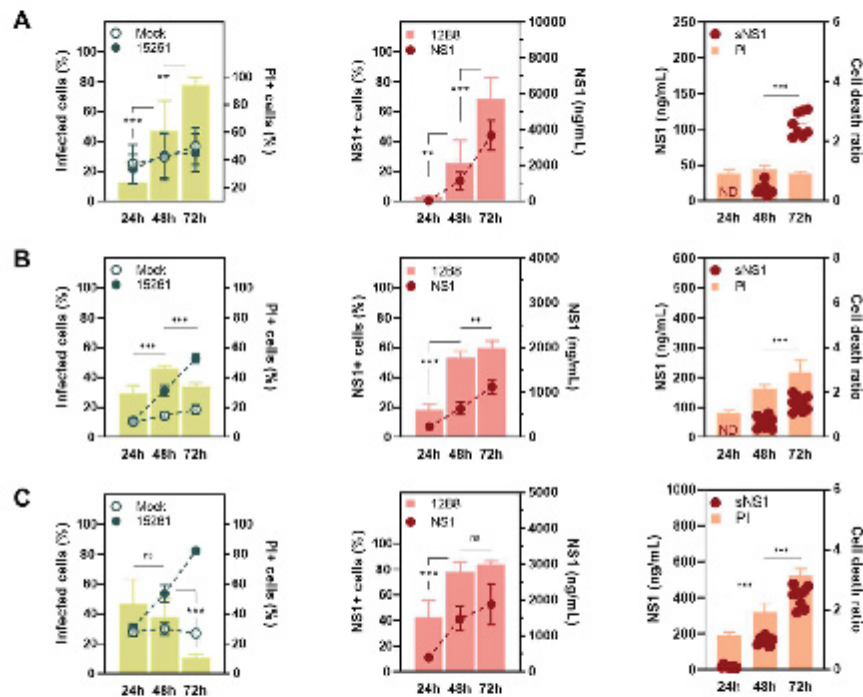


556

557 Figure 3. NS1 expression dynamics during ZIKV MR766 infection. (a) C6/36, (b) A549, and (c)
 558 JEG-3 cells were infected with a multiplicity of infection (MOI) of 1, 0.1, and 0.01, respectively.
 559 The percentage of infected and damaged cells are presented in the left panels. Green bars
 560 represent frequency of infection as determined by 4G2 staining (left axis), and lines cell viability
 561 by propidium iodide (PI) staining (mock versus infected; right axis). NS1 expression was

assessed by 12B8 staining and quantitative ELISA (middle panels). The percentage of NS1 positive cells are presented as pink bars (left axis) and lines concentration of total NS1 (right axis). Soluble NS1 (sNS1) was quantified by ELISA and presented with cell death data normalized over mock (right panel). Concentration of sNS1 is presented as a scatter plot (left axis), and orange bars as cell viability (right axis). Values under LOD were considered negative (ND). Flow cytometry and ELISA data were obtained from infections carried out simultaneously. Statistical analysis of 4G2 and 12B8 positive cells (left and middle panel) and soluble NS1 (right panel) was performed with unpaired Welch's t-test. Ns if $p > 0.05$; *if $p \leq 0.05$; **if $p \leq 0.01$; ***if $p \leq 0.001$. Data is presented as the mean (SD) of three independent experiments.

571



572

573 Figure 4. NS1 expression dynamics during ZIKV ZV BR 2015/15261 infection. (a) C6/36, (b)
574 A549, and (c) JEG-3 cells were infected with a multiplicity of infection (MOI) of 1. The
575 percentage of infected and damaged cells are presented in the left panels. Green bars
576 represent frequency of infection as determined by 4G2 staining (left axis), and lines cell viability
577 by propidium iodide (PI) staining (mock versus infected; right axis). NS1 expression was
578 assessed by 12B8 staining and quantitative ELISA (middle panels). The percentage of NS1
579 positive cells are presented as pink bars (left axis) and lines concentration of total NS1 (right
580 axis). Soluble NS1 (sNS1) was quantified by ELISA and presented with cell death data
581 normalized over mock (right panel). Concentration of sNS1 is presented as a scatter plot (left
582 axis), and orange bars as cell viability (right axis). Values under LOD were considered negative
583 (ND). Flow cytometry and ELISA data were obtained from infections carried out simultaneously.

584 Statistical analysis of 4G2 and 12B8 positive cells (left and middle panel) and soluble NS1 (right
585 panel) was performed with unpaired Welch's t-test. Ns if $p > 0.05$; **if $p \leq 0.01$; ***if $p \leq 0.001$.
586 Data is presented as the mean (SD) of three independent experiments.

Development of a quantitative NS1 antigen enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for Zika virus detection using a novel virus-specific mAb

Stefanny Viloché Morales¹, Gabriela Mattoso Coelho¹, Taíssa Ricciardi-Jorge², Gisiane Gruber Dori¹, Camila Zanluca¹ & Claudia Nunes Duarte dos Santos^{1*}.

¹Laboratório de Virologia Molecular, Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ, Curitiba, Paraná, Brazil.

²Viral gene expression group, The Pirbright Institute, Pirbright, Surrey, United Kingdom.

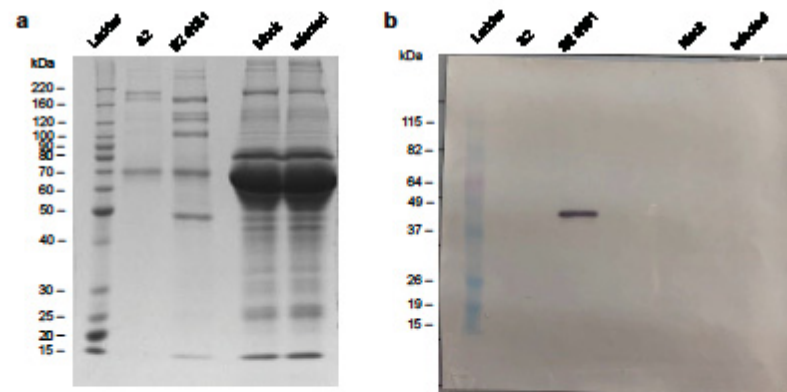


Fig. S1- Original image of SDS-PAGE and western-blot depicted in Figure 1. (a) SDS-PAGE analysis to characterize rNS1. Samples from purification of control wild-type S2 cells (S2) and S2 NS1 expressing cells were resolved in SDS-PAGE 10%. Supernatant of mock and ZIKV infected Vero cells were also tested. (b) Western blot analysis to confirm monoclonal antibody reactivity to NS1. Membrane was stained with 12B8 following with an AP conjugated secondary antibody (Promega). Reactivity was confirmed by reaction with BCIP/NBT substrate.

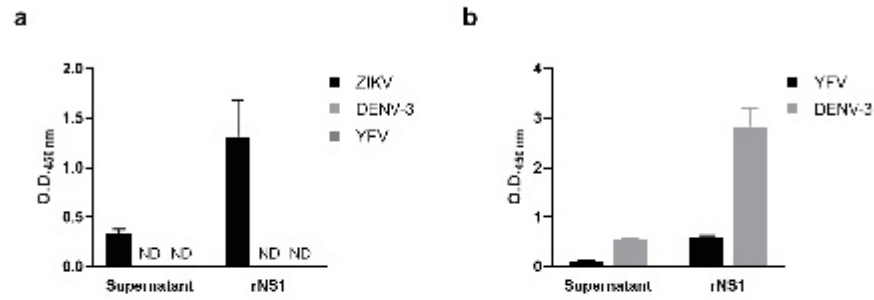


Fig. S2- The NS1-based capture ELISA does not display cross-reactivity against other orthoflaviviruses. (a) Supernatant of C6/36 cells infected with ZIKV ZV BR 2015/15261, C6/36 cells infected with DENV-3, and Vero E6 cells infected with YFV 17DD were analyzed by NS1 capture ELISA. Purified recombinant NS1 protein of ZIKV (5 μ g/mL), DENV-3 (10 μ g/mL) and YFV (10 μ g/mL) were used as controls. (b) The same samples were assessed by indirect ELISA, with their corresponding recombinant proteins as positive controls (10 μ g/mL each).

ANEXO 2 – CERTIFICADO DE COMITÊ DE ÉTICA (CEUA)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



Comissão de Ética
no Uso de Animais

LICENÇA

LW-2/17

Certificamos que o protocolo (P-24/18-4), intitulado "Projeto Guarda-Chuva: produção de anticorpos policlonais e monoclonais contra víruses emergentes para fins de diagnóstico e de estudos de interação vírus-hospedeiro", sob a responsabilidade de GIOVANNY AUGUSTO CAMACHO ANTEVERE MAZZAROTTO, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 14/12/2020 e inclui o uso total de :

Mus musculus

- 48 Machos de BALB/c, Idade: 45 Dia(s), Peso: 30,0000 Grama(s).
- 48 Fêmeas de BALB/c, Idade: 45 Dia(s), Peso: 30,0000 Grama(s).

Mus musculus

- 48 Machos de Swiss Webster, Idade: 45 Dia(s), Peso: 35,0000 Grama(s).
- 48 Fêmeas de Swiss Webster, Idade: 45 Dia(s), Peso: 35,0000 Grama(s).

Rio de Janeiro, 14 de dezembro de

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA

Octavio A. F. Presgrave
Coordenador
CEUA/FIOCRUZ
SIAPE 06628550
14/12/2016

Comissão de Ética no Uso de Animais
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4033 - Prédio da Expansão - sala 200 - Marquinhos - Rio de Janeiro / RJ
Telefone: (21) 3882.6121 e-mail: ceua@fiocruz.br

ANEXO 3 – CERTIFICADO DE COMITÊ DE ÉTICA



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
FIOCRUZ/IOC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Desenvolvimento de ensaios imunoenzimáticos (EIE) e testes rápidos (Point-of-care tests) para diagnóstico e monitoramento de viroses emergentes e re-emergentes. Estudos da interação vírus Zika e hospedeiro humano: marcadores moleculares e genéticos, resposta imune, carga viral e marcadores de prognóstico e embriogênese.

Pesquisador: Claudia Nunes Duarte dos Santos

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 42481115.7.0000.5248

Instituição Proponente: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Patrocinador Principal: Fundação Araucária
Fundação Oswaldo Cruz
FUND COORD DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.024.282

Apresentação do Projeto:

A pesquisadora envia carta ao CEP IOC/Fiocruz explicando a razão da emenda ao protocolo. Segue abaixo o documento enviado pela pesquisadora.

Seguindo instruções contidas no site da plataforma Brasil venho esclarecer o pedido de adendo ao projeto já aprovado no CEP.

O objeto é a inclusão de amostras humanas recebidas para o diagnóstico de febre amarela nos estudos no âmbito do Laboratório de Referência em Viroses Emergentes (LRV) do Instituto Carlos Chagas Fiocruz/PR que é parte da rede de diagnóstico e vigilância do Ministério da Saúde/SVS/CGLAB. Com as recentes epizootias e surtos de febre amarela que vem ocorrendo no país há 2 anos e, mais recentemente no sul do Brasil (área de abrangência do LRV) temos recebido um número significativo de amostras para diagnóstico molecular, por imunohistoquímica (pós morte) e isolamento viral. Vários dos casos se relacionam a efeitos adversos da vacina (EAV). Embora a vacina contra febre amarela que vem sendo utilizada globalmente seja segura, no caso de surtos e epidemias há a preconização de vacinação em massa, o que aumenta a ocorrência de

Endereço: Av. Brasil 4036, sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br