

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ANA LUISA CAUVILA DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE UM TESTE DE DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO PARA
Orthoflavivirus zikaense UTILIZANDO EPÍTOPOS IMUNOGÊNICOS
SELECIONADOS POR IMUNOINFORMÁTICA**

ALFENAS/MG

2025

ANA LUISA CAUVILA DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE UM TESTE DE DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO PARA
Orthoflavivirus zikaense UTILIZANDO EPÍTOPOS IMUNOGÊNICOS
SELECIONADOS POR IMUNOINFORMÁTICA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em Ciências
Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas.
Área de concentração: Interação patógeno-
hospedeiro,
Orientador: Luiz Felipe Leomil Coelho

ALFENAS/MG

2025

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

dos Santos, Ana Luisa Cauvila.

Desenvolvimento de um teste de diagnóstico sorológico para
Orthoflavivirus zikaense utilizando epítomos imunogênicos selecionados por
imunoinformática / Ana Luisa Cauvila dos Santos. - Alfenas, MG, 2025.

82 f. : il. -

Orientador(a): Luiz Felipe Leomil Coelho.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal
de Alfenas, Alfenas, MG, 2025.

Bibliografia.

1. Orthoflavivirus zikaense. 2. Diagnóstico. 3. Peptídeos. 4. Proteína
quimérica. I. Coelho, Luiz Felipe Leomil, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

ANA LUISA CAUVILA DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE UM TESTE DE DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO PARA
Orthoflavivirus zikaense UTILIZANDO EPÍTOPOS IMUNOGÊNICOS
SELECIONADOS POR IMUNOINFORMÁTICA**

O Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Interação Patógeno Hospedeiro.

Aprovada em: 27 de agosto de 2025.

Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho
Presidente da Banca Examinadora
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG

Profa. Dra. Raissa Prado Rocha
Instituição: University of Surrey

Profa. Dra. Livia de Figueiredo Diniz Castro
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Felipe Leomil Coelho, Professor do Magistério Superior**, em 27/08/2025, às 21:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifalmg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orga_o_acesso_externo=0, informando o código verificador **1602737** e o código CRC **EC653DD1**.

Dedico esse trabalho a uma mulher que sempre
foi e sempre será meu maior exemplo de força e
coragem: minha mãe.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de começar agradecendo a Deus pela bênção de ter uma família que me motiva, me apoia e me conforta nos momentos difíceis. A Deus também sou grata por me guiar pelo caminho do bem e me fortalecer nos momentos em que duvido de mim mesma.

À minha mãe, meu maior amor e meu exemplo de força, coragem e esforço. Obrigada por todo apoio, dedicação e cuidado, especialmente nos momentos mais difíceis dessa nossa longa jornada juntas. Obrigada por, de certa forma, abrir mão dos seus próprios sonhos para que, um dia, eu pudesse conquistar os meus. Nada do que eu faça será suficiente para retribuir tudo o que representa para mim.

Ao meu irmão, que chegou em minha vida para me mostrar um amor que eu nem imaginava poder sentir, obrigada por ser meu porto seguro e por estar sempre presente com o coração mais carinhoso que já conheci.

À minha vó, obrigada por me amar incondicionalmente, me apoiar em todas as escolhas. Ao meu namorado, João Vitor, por todo amor, apoio e paz que me transmite diariamente, sua presença faz meus dias melhores.

Amo vocês com todo o meu coração!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho, muito obrigada pela confiança que sempre depositou em mim, pelo incentivo diário e pela paciência. Obrigada por me mostrar que eu sou capaz.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Vacinas da UNIFAL-MG, por tornarem os dias mais leves e por serem presentes não só nos longos dias de trabalho. Nossos momentos de descontração e amizade fez e faz toda a diferença nessa longa jornada longe de casa.

À Universidade Federal de Alfenas, aos técnicos e funcionários do Laboratório de Vacinas e do Departamento de Microbiologia e Imunologia, meu reconhecimento e gratidão pelo suporte.

Às agências de fomento CAPES e FAPEMIG pelo apoio através da ReMinD – Rede Mineira de Diagnóstico de doenças infecciosas (RED00196- 23).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho e para o encerramento de um ciclo tão significativo, deixo aqui o meu mais sincero agradecimento.

LISTA DE SIGLAS

ADE	Antibody-Dependent Enhancement
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCs	Antigen-Presenting Cells (Células apresentadoras de antígenos)
BCR	B Cell Receptor (Receptor de célula B)
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CHIKV	<i>Alphavirus chikungunya</i>
DC's	Dendritic Cells (Células dendríticas)
DENV	<i>Orthoflavivirus denguei</i>
ER	Endoplasmic Reticulum (Retículo endoplasmático)
GBS	Guillain-Barré Syndrome (Síndrome de Guillain-Barré)
JEV	Japanese Encephalitis Virus (Vírus da encefalite japonesa)
MHC	Major Histocompatibility Complex
mAbs	Monoclonal Antibodies (Anticorpos monoclonais)
NC	Nucleocapsídeo
NK	Natural Killer (Células assassinas naturais)
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	Open Reading Frame (Quadro de leitura aberto)
PHEIC	Public Health Emergency of International Concern
PRNT	Plaque Reduction Neutralization Test
PRR	Pattern Recognition Receptors
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
Rvac	Vacinologia reversa
SCZ	Síndrome congênita do Zika

ssRNA	Single-Stranded RNA (RNA fita simples)
SVP	Subviral Particle (Partícula subviral)
TCR	T Cell Receptor (Receptor de célula T)
TGN	Trans-Golgi Network (Rede trans-Golgi)
WNV	<i>Orthoflavivirus nelense</i> (Vírus do Nilo Ocidental)
YFV	<i>Orthoflavivirus flavi</i> (Vírus da febre amarela)
ZIKV	<i>Orthoflavivirus zikaense</i> (Vírus Zika)

RESUMO

O *Orthoflavivirus zikaense* (ZIKV) é um arbovírus emergente pertencente ao gênero *Orthoflavivirus*. Este se espalhou em regiões equatoriais, indo da África à Ásia e foi associado a epidemias em ilhas na região do oceano pacífico e em vários países das Américas, onde causou grandes preocupações devido à associação a inúmero de casos de síndrome de Guillain-Barré e malformações congênitas. A infecção é majoritariamente assintomática e quando presentes, as manifestações clínicas se assemelham a outras arboviroses cocirculantes que compartilham também semelhanças estruturais, especialmente com o vírus *Orthoflavivirus deguei* (DENV). Essas similaridades estruturais impõem desafios significativos no desenvolvimento de testes de diagnósticos. Nesse contexto, a imunoinformática surge como uma abordagem promissora para a determinação teórica de regiões imunogênicas exclusivas e altamente conservadas do ZIKV de forma a superar o desafio da reatividade cruzada. Foi avaliada a capacidade de cinco peptídeos derivados de proteínas estruturais de ZIKV identificados por imunoinformática em serem reconhecidos por um painel de soros de pacientes previamente infectados por ZIKV. O poder discriminatório dos peptídeos foi de 79,24%, 75%, 91,83%, 87% e 86,38% para os peptídeos 1, 2, 3, 4 e 5 respectivamente. Os resultados demonstram que o soro de pacientes com infecção natural pelo vírus apresenta reatividade (IgG total) contra esses peptídeos indicando-os como bons candidatos para aplicações em diagnósticos sorológicos. A análise de sororeatividade de indivíduos do sul de Minas utilizando Pep03 para detecção de IgG anti-ZIKV demonstrou uma reatividade de 12,46% na região. Pensando em melhorar a acurácia dessas regiões no diagnóstico de ZIKV, modelamos por métodos de computação duas proteínas quiméricas multi-epítomos. As construções obtiveram qualidade estrutural excelentes e se apresentaram estáveis para expressão em modelo procarioto. Além disso, análises *in-silico* de predição de resposta imunológica sugerem que os epítomos mantêm suas características imunogênicas e as proteínas simulam uma infecção por ZIKV. Testes futuros avaliarão a eficácia das proteínas em testes de diagnósticos sorológicos para ZIKV.

Palavras Chave: *Orthoflavivirus zikaense*, diagnóstico, peptídeos, proteína quimérica.

ABSTRACT

The Orthoflavivirus zikaense (ZIKV) is an emerging arbovirus belonging to the genus *Orthoflavivirus*. It has spread across equatorial regions, from Africa to Asia, and has been associated with outbreaks in islands of the Pacific Ocean region as well as in several countries in the Americas, where it raised major concerns due to its association with numerous cases of Guillain-Barré syndrome and congenital malformations. Infection is mostly asymptomatic, and when present, clinical manifestations resemble those of other co-circulating arboviruses that also share structural similarities, particularly with *Orthoflavivirus deguei* (DENV). These structural similarities pose significant challenges to the development of diagnostic tests. In this context, immunoinformatics emerges as a promising approach for the theoretical identification of exclusive and highly conserved immunogenic regions of ZIKV in order to overcome the challenge of cross-reactivity. The ability of five peptides derived from ZIKV structural proteins, identified through immunoinformatics, to be recognized by a panel of sera from patients previously infected with ZIKV was evaluated. The discriminatory power of the peptides was 79.24%, 75%, 91.83%, 87%, and 86.38% for peptides 1, 2, 3, 4, and 5, respectively. The results demonstrate that sera from patients with natural ZIKV infection present reactivity (total IgG) against these peptides, indicating them as good candidates for serological diagnostic applications. The seroreactivity analysis of individuals from southern Minas Gerais using Pep03 for anti-ZIKV IgG detection showed a reactivity of 12.46% in the region. In order to improve the accuracy of these regions in ZIKV diagnostics, we modeled two chimeric multi-epitope proteins through computational methods. The constructs showed excellent structural quality and proved to be stable for expression in a prokaryotic system. Moreover, in-silico analyses of immune response prediction suggest that the epitopes maintain their immunogenic characteristics and that the proteins mimic a ZIKV infection. Future studies will assess the efficacy of these proteins in serological diagnostic tests for ZIKV.

Keywords: Orthoflavivirus zikaense, diagnosis, peptides, chimeric protein.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1	<i>Orthoflavivirus zikaense</i> : HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA.....	14
2.2	<i>Orthoflavivirus zikaense</i> : BIOLOGIA E PATOGENIA.....	16
2.2.1	Genoma e estrutura do ZIKV.....	17
2.2.2	Manifestações clínicas de ZIKV.....	20
2.3	RESPOSTA IMUNE AO ZIKV.....	21
2.4	DIAGNÓSTICO.....	23
2.5	IMUNOINFORMÁTICA.....	28
2.6	PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS DE CÉLULAS T E B.....	29
3	JUSTIFICATIVA.....	33
4	OBJETIVO.....	33
4.1	OBJETIVO GERAL.....	34
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
5	METODOLOGIA.....	35
5.1	OBTENÇÃO DOS SOROS.....	35
5.2	OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS.....	35
5.3	ENSAIO DE IMUNOADSORÇÃO ENZIMÁTICA (ELISA) COM AMOSTRAS DE SORO DE CAMUNDONGO.....	36
5.4	ENSAIO DE IMUNOADSORÇÃO ENZIMÁTICA (ELISA) COM AMOSTRAS DE SORO HUMANO.....	37
5.5	ANÁLISE DE RESULTADOS DO TESTE ELISA.....	37
5.6	AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE CRUZADA DE PEP 3 COM AMOSTRAS DE SORO PCR POSITIVAS PARA CHIKV E DENV.....	38
5.7	SOROPREVALÊNCIA DE ZIKV EM VARGINA, ALFENAS E POÇOS DE CALDAS (MINAS GERAIS)	38
5.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
5.9	PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS LINEARES DE CÉLULAS B.....	39
5.10	CONSTRUÇÃO DE PROTEÍNA QUIMÉRICA MULTI-EPÍTOPO.....	40
5.11	SIMULAÇÃO IN-SÍLICO DA RESPOSTA IMUNE DA PROTEÍNA EM UM HOSPEDEIRO VERTEBRADO.....	40
6	RESULTADOS.....	42

6.1	REATIVIDADE DOS PEPTÍDEOS FRENTE A SOROS DE CAMUNDONGOS PREVIAMENTE INFECTADOS COM ZIKV.....	42
6.2	REATIVIDADE DOS PEPTÍDEOS FRENTE AO PAINEL DE SOROS HUMANOS.....	42
6.3	REATIVIDADE CRUZADA DE PEP 03 COM AMOSTRAS DE SORO PCR POSITIVAS PARA CHIKV E DENV.....	45
6.4	SOROPOSITIVIDADE DE AMOSTRAS DO SUL DE MINAS GERAIS (MINAS GERAIS)	46
6.5	PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS LINEARES DE CÉLULAS B.....	48
6.6	CONSTRUÇÃO DA PROTEÍNA QUIMÉRICA MULTI-EPÍTOPO.....	48
6.7	PREDIÇÃO IN-SÍLICO DE UMA RESPOSTA IMUNOLÓGICA FRENTE A IMUNIZAÇÃO COM PROTEÍNAS QUIMÉRICAS.....	53
7	DISCUSSÃO.....	56
8	CONCLUSÃO.....	63
	REFERÊNCIAS.....	64
	ANEXO.....	77

1 INTRODUÇÃO

O *Orthoflavivirus zikaense*, mais conhecido como Zika vírus (ZIKV) é um vírus transmitido por artrópodes (arbovírus) pertencente ao gênero *Orthoflavivirus* e à família *Flavirividae* (Gould; Solomon, 2008). O ZIKV é considerado um vírus emergente de regiões equatoriais com prevalência em países da África, Ásia e Américas sendo associado a várias epidemias na ilha Yap, Polinésia Francesa e países da América do Sul (Campos; Bandeira; Sardi, 2015; Duffy et al., 2009; Ios et al., 2014). O aparecimento do ZIKV nas Américas trouxe grandes preocupações, uma vez que a infecção causada pelo vírus passou a ser associada a complicações graves como a síndrome congênita do zika bem como Síndrome de Guillain Barré em adultos, por isso, o desenvolvimento de medidas profiláticas frente ao vírus se tornou prioridade (Ios et al., 2014; Peiter et al., 2020).

Apesar de serem associados a casos mais graves, as infecções causadas por ZIKV em humanos apresentam-se de modo assintomático na maioria dos casos, o que dificulta a avaliação epidemiológica local (Faria *et al.*, 2016). Cerca de 20% das infecções em humanos se mostram sintomáticas, nesses casos, ela se apresenta com sintomas leves variando entre dor de cabeça, febre, dores leves nas articulações, manchas vermelhas na pele, coceira e vermelhidão nos olhos (CDC, 2024). Esses sintomas mais frequentes são semelhantes ao de outras arboviroses que circulam concomitantemente com o ZIKV, como as infecções causadas por *Orthoflavivirus denguei* (DENV) e *Alphavirus chikungunya* (CHIKV) que além de apresentarem sintomas clínicos semelhantes possuem o mesmo vetor de transmissão, mosquitos do gênero *Aedes* (Kerckhof *et al.*, 2020a).

Essas características tornam necessário o diagnóstico através da confirmação por exames laboratoriais, o que tem sido uma grande dificuldade devido a semelhança estrutural e reatividade sorológica cruzada especialmente entre ZIKV e DENV (Goncalves *et al.*, 2018). O principal método de diagnóstico utilizado e recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) é a reação em cadeia da polimerase de Transcriptase Reversa (RT-PCR), mas essa técnica possui uso limitado devido à janela de detecção de RNA viral em fluidos corporais, além de ser uma técnica dispendiosa que exige demanda de profissionais altamente qualificados (Bingham, 2016). Por outro lado, existem testes sorológicos disponíveis no mercado que buscam a detecção da proteína NS1 circulante, uma lipoproteína não estrutural secretada em grandes quantidades pelo vírus na fase inicial de infecção, no entanto, apesar de ser imunogênica essa proteína é altamente conservada nos flavivírus e quando aplicadas no

diagnóstico apresentam reatividade cruzada e como consequência, limitam o diagnóstico preciso (Gutsche *et al.*, 2011).

Uma abordagem promissora na tentativa de superar a dificuldade de um diagnóstico correto, é o uso de ferramentas computacionais que têm contribuído ativamente para o conhecimento de novas tecnologias genômicas e facilitam a identificação de regiões potencialmente antigênicas em patógenos (Chiang *et al.*, 2015; Contreras *et al.*, 2018). A predição de regiões imunogênicas utilizando a imunoinformática é chamada de vacinologia reversa (Rvac), e pode ser utilizada para encontrar importantes sequencias peptídicas com aplicação no desenvolvimento de diagnóstico mais sensíveis e específicos (Backert; Kohlbacher, 2015; Pereira *et al.*, 2024).

Nosso grupo utilizou Rvac para encontrar regiões imunogênicas exclusivas e altamente conservadas entre diversas cepas circulantes de ZIKV. Nessas regiões, são encontrados epítomos, peptídeos presentes em proteínas estruturais e não estruturais do vírus, e podem superar os efeitos e a influência da reatividade cruzada entre flavivírus. Por isso, podem ser utilizados para o desenvolvimento de novas tecnologias de diagnóstico para a infecção causada por ZIKV (Salvador *et al.*, 2019).

Considerando a lacuna existente nos métodos de diagnóstico disponíveis para arboviroses e a necessidade de um ensaio específico e sensível para ZIKV, o presente trabalho buscou avaliar a reatividade de 5 determinantes antigênicos de proteínas estruturais de ZIKV preditos por bioinformática em testes sorológicos e avalia-los em associação por meio da construção de uma proteína quimérica multi-epítomo. Uma vez consideradas antigênicas, essas regiões foram estabelecidas como potenciais candidatos ao desenvolvimento de um teste de diagnóstico sorológico diferencial para ZIKV.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Orthoflavivirus zikaense*: HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA.

O ZIKV foi isolado pela primeira vez em 1947 na floresta de Zika em Entebbe, Uganda, a partir de amostra de soro de macaco *Rhesus* durante estudos de mapeamento para a febre amarela, posteriormente, em 1948, o ZIKV foi isolado de mosquitos pela primeira vez (Dick; Kitchen; Haddock, 1952). Quatro anos mais tarde, também na África, leste da Nigéria, a infecção causada pelo vírus foi identificada em três pacientes humanos, sendo um por meio do isolamento do vírus e dois por meio da observação de aumento dos níveis de anticorpos séricos (MacNamara, 1954).

Desde então, infecções em humanos foram documentadas por meio de testes sorológicos em outros países Africanos e em países da Ásia (Diallo *et al.*, 2014; Marchette; Garcia; Rudnick, 1969; Song *et al.*, 2017). De acordo com Faria e colaboradores (2016) é provável que o ZIKV foi endêmico por décadas em partes da África subsaariana e da Ásia, com soroprevalência podendo chegar em mais de 50% nesses países.

Historicamente, epidemias de ZIKV foram vistas fora da África pela primeira vez, em 2007 na Ilha Yap, nos Estados Federados da Micronésia, onde foi reconhecido como um vírus emergente (Duffy *et al.*, 2009), seguido por uma epidemia ainda maior em 2013, na Polinésia Francesa, com uma estimativa de 30.000 casos de infecções sintomáticas (Cao-Lormeau *et al.*, 2014). Surtos menores após essas epidemias foram vistos em algumas regiões do pacífico em 2014 na Nova Caledônia (Simon *et al.*, 2018), Ilhas Cook e na Ilha da Páscoa (Tognarelli *et al.*, 2016) e em 2015 em Vanuatu, Ilhas Salomão, Samão e Fiji (Brusin *et al.*, 2015). O Brasil, foi o primeiro país das Américas a relatar um surto de ZIKV, em março de 2015, com primeiro caso notificado na Bahia, Nordeste (Campos; Bandeira; Sardi, 2015) e, posteriormente, a presença do vírus foi relatada em países da América Central e do Sul e no Caribe (Hennessey, 2016).

A princípio, acreditava-se que o vírus tivesse sido introduzido no Brasil durante a Copa do Mundo de 2014 (12 de junho a 13 de julho de 2014) (Zanluca *et al.*, 2015) ou em um evento de canoagem realizado no Rio de Janeiro entre 12 e 17 de agosto do mesmo ano (Musso, 2015). Apesar das suposições da chegada do vírus ser atrelada a grandes eventos, um estudo com abordagem de análises filogenéticas sugere uma única introdução do vírus nas Américas, em meados de 2013, mais de 12 meses antes da primeira detecção de ZIKV no Brasil, data que coincide com os surtos relatados nas ilhas do pacífico, bem como com o

aumento do número de viajantes de áreas endêmicas para o Brasil. Além disso, esse mesmo estudo constatou que as amostras das Américas coletadas e analisadas estão relacionadas entre si e compartilham um ancestral comum com a linhagem circulante da Polinésia Francesa em 2013 (Faria *et al.*, 2016).

Independente do meio pelo qual se deu a entrada do vírus no Brasil, em janeiro de 2016 já haviam cerca de milhares de casos de infecções confirmadas, com maioria dos casos relatados no Nordeste do país, essas ocorrências apontam um pico endêmico entre meados de julho de 2015 e 2016 (Faria *et al.*, 2016). Atrelado a esse aumento do número de casos de infecção, foi observado uma correlação causal entre a infecção por ZIKV durante a gravidez e o aparecimento de casos de microcefalia e anomalias congênitas (SCZ) (Araújo *et al.*, 2018; Mlakar *et al.*, 2016; Schuler-Faccini, 2016). Por isso, em fevereiro de 2016 a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a microcefalia e mal formações congênitas relacionadas ao ZIKV uma Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (PHEIC) (WHO, 2016).

Após o pico de infecções confirmadas em meados de 2016, a OMS declarou o fim da PHEIC em novembro do mesmo ano (Brasil, 2016). No entanto, entre os anos de 2015 e 2020 foram notificados ao Ministério da Saúde 19.622 casos suspeitos de SCZ, dos quais 3.577 foram confirmados. Do total de casos suspeitos notificados, 1.007 foram notificados no ano de 2020 (BRASIL, 2024a). Portanto, a possibilidade de um novo surto com consequências graves em recém-nascidos não pode ser descartada.

Embora o número de casos de doença causados por ZIKV tenham diminuído globalmente a partir de 2017, com menos de 30.000 casos relatados em 2018 em comparação com os mais de 500.000 casos relatados no pico da pandemia em 2016 (Musso; Ko; Baud, 2019), o ZIKV continua apresentando uma grande ameaça global, uma vez que a transmissão do vírus persiste em níveis mais baixos em vários países. De acordo com os dados mais recentes disponíveis, 89 países e territórios distribuídas em cinco das seis regiões da OMS documentaram transmissão autóctone de ZIKV, sendo a região do Mediterrâneo Oriental a única região sem transmissão documentada (WHO, 2022). Além disso, a transmissão de ZIKV em humanos pode ocorrer de modo silencioso, uma vez que a maioria das infecções são assintomáticas (Musso; Gubler, 2016).

Estudos de vigilância descobriram um surto não relatado em Cuba durante 2017, um ano após o pico de transmissão nos países vizinhos (Grubaugh *et al.*, 2019), o que por sua vez, sugere que o ZIKV pode estar se espalhando de modo silencioso nas Américas. Além disso, parte das regiões tropicais e subtropicais do globo apresentam condições ambientais

adequadas para a circulação do vírus, aumentando ainda mais a população susceptível (Messina *et al.*, 2016). Nesse contexto, deve-se ainda, levar em consideração que o vírus pode sofrer mutações genéticas, que alteram fenótipos virais, conhecidos como determinantes antigênicos, responsáveis por uma resposta imunológica protetiva. Essas mudanças podem aumentar a eficácia de transmissão artrópode-humano do vírus e gravidade da doença, mesmo em ambientes cuja população já acumula imunidade de infecções anteriores (Regla-Nava *et al.*, 2022).

De acordo com dados mais recentes disponibilizados pelo Ministério da Saúde, em 2025 há no Brasil cerca de 2.340 casos prováveis de infecção causada por ZIKV com maior número de casos na região do Nordeste brasileiro, seguido por Centro-Oeste e Norte (Brasil, 2025). Em relação a SCZ, dados referentes ao boletim epidemiológico de 2023 publicado em 2024, destacam que no ano de 2023 1.035 casos suspeitos foram notificados, a maioria em recém-nascidos. Destes, 6 foram confirmados para SCZ e 684 permaneciam em investigação até o momento da publicação (Brasil, 2024b).

2.2 *Orthoflavivirus zikaense*: BIOLOGIA E PATOGENIA

O *Orthoflavivirus zikaense*, mais conhecido como Zika vírus (ZIKV) é um arbovírus do gênero *Orthoflavivirus*, pertencente à família *Flavirividae* (Musso; Gubler, 2016). O termo arbovírus (*arthropod-borne vírus*) define os vírus que são transmitidos entre hospedeiros vertebrados por meio da picada de artrópodes hematófagos, no caso do ZIKV essa transmissão ocorre através da picada de mosquitos fêmeas infectadas do gênero *Aedes aegypti* ou *Aedes albopictus* (Downs, 1989; Rückert *et al.*, 2017).

Apesar de ser um arbovírus, foi observada a capacidade de propagação do vírus entre humanos, um componente não encontrado na maioria dos outros *Orthoflavivirus* (Miner; Diamond, 2017). Vários estudos relataram suspeita de transmissão viral por vias sexuais além de relatos da presença do vírus no sêmen de homens infectados (Barzon *et al.*, 2016; Mansuy *et al.*, 2016; Musso *et al.*, 2015). Em outros casos de transmissão entre humanos, o vírus pode ter sido adquirido através do contato com fluidos corporais infectados (Barjas-Castro *et al.*, 2016; Swaminathan *et al.*, 2016).

O gênero *Orthoflavivirus*, cujo ZIKV pertence, contém mais de 70 vírus, incluindo *Orthoflavivirus denguei* (DENV), *Orthoflavivirus flavi* (YFV), *Orthoflavivirus nelense* (WNV), *Orthoflavivirus japonicum* (JEV), entre outros (Postler *et al.*, 2023). Dentro da

própria espécie, estes vírus podem ser subdivididos em complexos antigênicos de acordo com critérios sorológicos ou clados com base na filogenia molecular (Kuno *et al.*, 1998).

Haddow e colaboradores (2012) descreveram duas linhagens principais do ZIKV, uma africana e uma asiática, com a segunda sendo introduzida na Ilha Yap a partir do sudeste asiático e posteriormente na Polinésia Francesa. Nas Américas, as sequências de ZIKV disponíveis apresentam mais de 99% de identidade com as cepas da Polinésia Francesa, conforme já citado anteriormente (Faria *et al.*, 2016), sugerindo por meio de dados epidemiológicos e de sequências que as cepas endêmicas de ZIKV das Américas surgiram por meio de mutações genéticas da linhagem asiática, eventos que provavelmente ocorreram primeiro na Ilha Yap e posteriormente na Polinésia Francesa (Musso; Gubler, 2016; Tognarelli *et al.*, 2016).

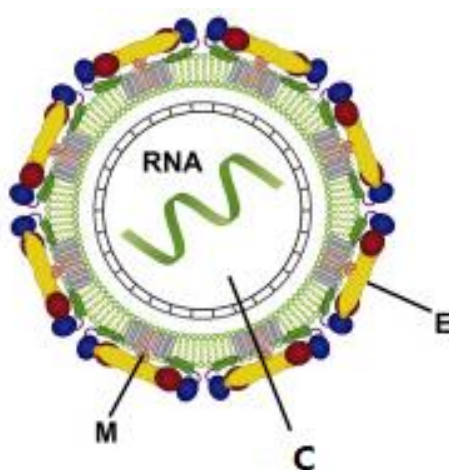
2.2.1 Genoma e estrutura do ZIKV

O ZIKV, bem como outros *Orthoflavivirus*, é um vírus com aproximadamente 50 nm de diâmetro e composto de um único genoma de RNA de fita simples (ssRNA) de sentido positivo (+), com aproximadamente 10,8 kb de comprimento. Seu genoma tem um quadro de leitura aberto (ORF) que codifica uma grande poliproteína posteriormente clivada em três proteínas estruturais que compõem a partícula viral – capsídeo (~ 120 aminoácidos), membrana (expresso em um primeiro momento como prM) (~ 165 aminoácidos) e envelope (~ 495 aminoácidos) – e outras sete proteínas não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 importantes para a replicação e montagem viral, além de serem responsáveis por modulações imunológicas no hospedeiro (Fields Virology, 6th Edition., 2013). A porção 5' inicial do genoma codifica as três proteínas virais estruturais, enquanto as proteínas não estruturais são codificadas pela porção restante, além disso a porção codificadora do genoma viral é flanqueada por regiões 5' e 3' não traduzidas (UTRs) (Göertz *et al.*, 2018).

A arquitetura do ZIKV é, em geral, semelhante à de outros *Orthoflavivirus* conforme já revelado em trabalhos de resolução de estrutura por meio de microscopia crioeletrônica de vírus purificados, comparações com vírus da dengue demonstram que características estruturais essenciais para os vírus são conservadas, incluindo orientações de domínios e arranjo de proteínas estruturais (Sirohi *et al.*, 2016). De modo geral, o ZIKV é um vírus envelopado por uma bicamada lipídica derivada do hospedeiro e circundado por cerca de 180 cópias de duas glicoproteínas que dão ao vírus uma morfologia esférica. O arranjo de suas

proteínas de superfície (M e E) conferem à partícula viral uma simetria icosaédrica, elas são organizadas em 60 unidades repetidas com cada unidade contendo três proteínas do envelope individuais (Kostyuchenko *et al.*, 2016). A proteína C é a proteína envolvida no empacotamento do genoma viral e formação do nucleopsídeo (NC) (Mukhopadhyay; Kuhn; Rossmann, 2005).

Figura 1 – Partícula viral de *Orthoflavivirus zikaense*.



FONTE: Adaptada de Agrelli *et al.* (2019).

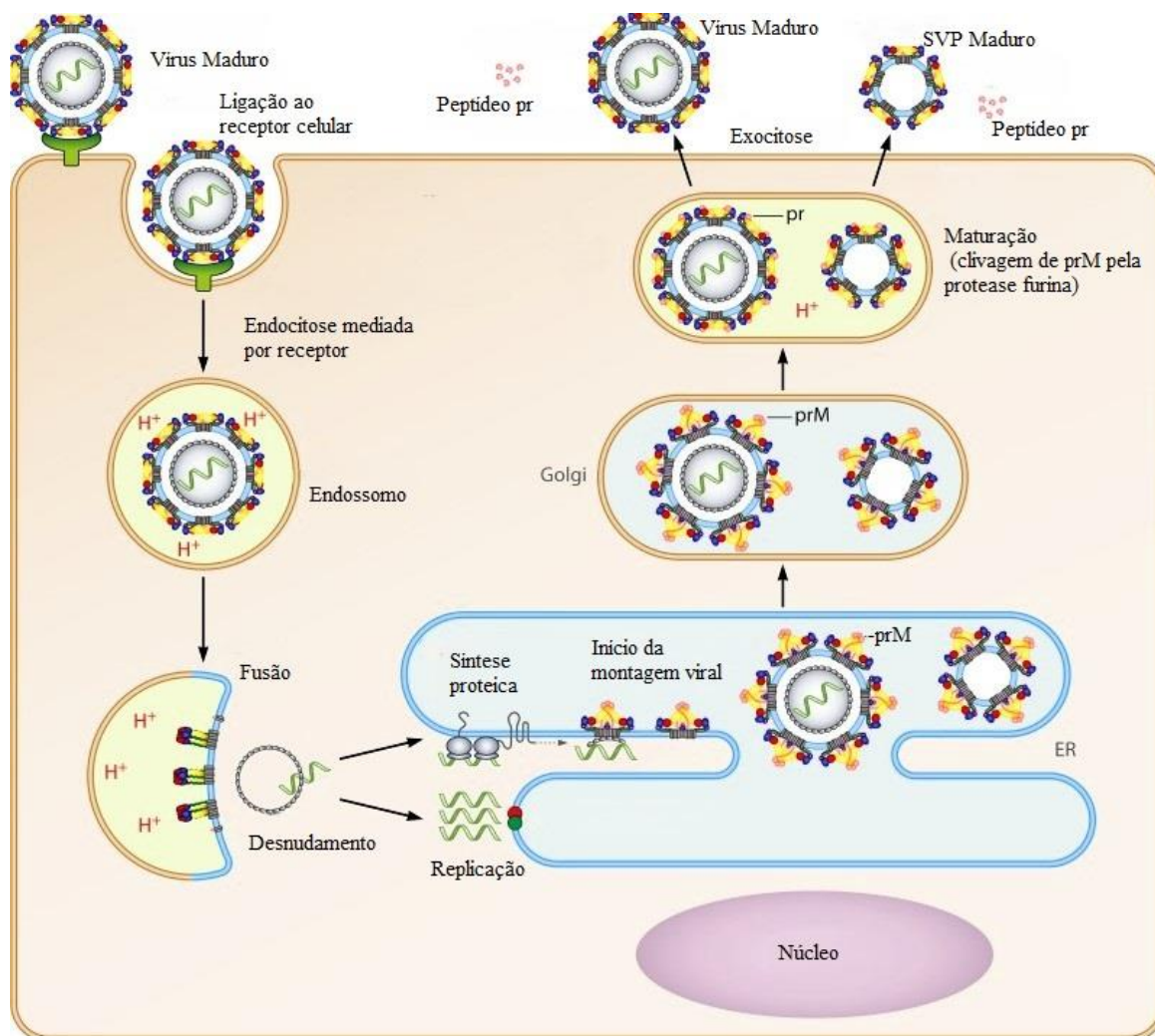
LEGENDA: *Orthoflavivirus zikaense*: partícula madura apresentando suas proteínas estruturais E (envelope), M (membrana) e C (capsídeo).

O ciclo de replicação do ZIKV (Figura 1) se assemelha fortemente aos ciclos de outros *Orthoflavivirus*, onde picos da superfície da partícula viral se ligam a um ou mais receptores celulares marcando o início da infecção do vírus na célula (Sharma *et al.*, 2020). A proteína E desempenha um papel importante na ligação do vírus na célula e na fusão com a membrana do hospedeiro, sua identidade de aminoácidos com outros vírus do mesmo gênero gira em torno de 40% (Mukhopadhyay; Kuhn; Rossmann, 2005). Uma vez endocitado pela célula, a acidez do endossomo favorece mudanças conformacionais nas glicoproteínas virais levando a fusão das proteínas E virais com a membrana endossomal e liberação do capsídeo contendo o RNA viral (Fields Virology, 6th Edition, 2013; Heinz; Stiasny, 2017).

Já no citoplasma celular, o RNA genômico de fita positiva atua como um RNA mensageiro e é imediatamente traduzido em uma grande poliproteína processado co e pós-traducionalmente em proteínas estruturais e não estruturais. A montagem do vírus ocorre no retículo endoplasmático (ER) em um processo de brotamento com a formação de partículas imaturas e não infecciosas com heterodímeros de prM-E. Após a formação dessas partículas, as mesmas são transportadas para a via exocítica da célula até atingirem a rede trans-Golgi

(TGN) onde o pH ácido desencadeiam mudanças conformacionais e clivagem de prM em pr e M por uma furina, uma protease celular. Enquanto permanece no ambiente ácido de TGN o fragmento clivado permanece próximo à partícula e só irá se dissociar no momento em que a partícula viral agora madura atinge um pH neutro no ambiente extracelular (Agrelli *et al.*, 2019; Mukhopadhyay; Kuhn; Rossmann, 2005; Yu *et al.*, 2009, 2008).

Figura 2 – Ciclo de replicação de *Orthoflavivirus zikaense*.



FONTE: Adaptada de Heinz; Stiasny (2017).

LEGENDA: Ciclo de replicação de *Orthoflavivirus zikaense*: Através da ligação com um receptor celular, o vírus entra na célula e em condições ácidas libera o RNA genômico viral que por sua vez atua como um RNA mensageiro que codifica uma poliproteína que quando processada, leva a montagem do vírus na membrana do retículo endoplasmático (ER). Após a formação de uma partícula viral imatura, a mesma é transportada por uma via exocítica, onde novamente em condições ácidas, a partícula viral se torna madura e é exocitada da célula.

Durante a maturação do vírus, partículas subvirais (SVP) são formadas como um subproduto da montagem do vírus. Essas partículas carregam apenas uma bicamada lipídica e as proteínas de prM e E, mas não apresentam um capsídeo, por isso não são consideradas partículas infecciosas (Heinz; Stiasny, 2017).

2.2.2 Manifestações clínicas de ZIKV

Aproximadamente 80% das infecções causadas pelo ZIKV são assintomáticas, nos poucos casos com presença de sintomas, a infecção se assemelha com doença causada pelo vírus influenza com febre leve e pode, muitas vezes, ser confundida com sintomas de outras infecções causadas por arbovírus como manchas na pele, febre, artralgias – dores nas articulações, conjuntivite, dores musculares, cefaleia e dor retro-orbital (Duffy *et al.*, 2009; Haby *et al.*, 2018). A condição infecciosa aguda de ZIKV tem um período de incubação de 3 a 14 dias, com sintomas tipicamente leves que duram cerca de uma semana de maneira semelhante em crianças e adultos de ambos os sexos e em mulheres grávidas. As complicações, embora pouco frequentes, quando presentes podem ser graves e fatais (Musso; Gubler, 2016; Musso; Ko; Baud, 2019).

Uma pequena quantidade de casos graves foram documentados na Polinésia Francesa com o primeiro relato de caso da síndrome de Guillain-Barré (GBS) associada ao ZIKV, uma doença neurológica grave, observando posteriormente um aumento notável de GBS na região (Oehler *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2017). Dos casos confirmados de GBS durante a epidemia na Polinésia Francesa, 41 de 42 apresentavam anticorpos IgM e IgG para ZIKV, além de um teste de neutralização por redução de placa (PRNT) compatível com uma infecção recente de ZIKV, com quase todos os casos observados em adultos e alguns poucos em crianças (Barbi *et al.*, 2018; Cao-Lormeau *et al.*, 2016; Duijster *et al.*, 2016; Oehler *et al.*, 2014).

A patogênese de GBS associada ao ZIKV inclui hipóteses de reação cruzada entre partículas virais e receptores do tecido neural do hospedeiro (Morris *et al.*, 2018). Além de GBS, outras síndromes como mielite, encefalite, meningoencefalite, encefalomielite disseminada aguda, polineuropatia sensitiva e neuropatia óptica já foram descritas (Reid; Rimmer; Thakur, 2018). A capacidade de vários membros da família *Flavirividae* causarem danos neurológicos devido às habilidades de neuroinvasão e neurovirulência já haviam sido documentados anteriormente (Sips; Wilschut; Smit, 2012).

Em outubro de 2015, no Brasil, relatos crescentes e incomuns de casos de microcefalia foram notificados e em janeiro de 2016 já haviam cerca de 3.893 casos suspeitos, cerca de 42% das gestantes infectadas com o vírus no Brasil foram analisadas por ultrassonografia e exibiram algum tipo de anormalidade no crescimento fetal intrauterino (Araújo *et al.*, 2018; Miner; Diamond, 2017). O termo síndrome congênita do Zika (SCZ) foi assim denominado para descrever um conjunto de sintomas e sinais clínicos em crianças recém-nascidas cujas mães tiveram uma infecção pelo ZIKV durante a gravidez (Desai *et al.*, 2017).

A característica clínica mais relatada de SCZ é a microcefalia, um quadro grave e irreversível de dano neurológico, no entanto, além de microcefalia, crianças com SCZ podem apresentar outras características como retardo no crescimento intrauterino, redução do volume cerebral, malformações cerebrais (calcificação subcortical, ventriculomegalia e defeitos de migração cortical) e desproporção craniofacial, além de acúmulo de pele na região occipital (Brasil *et al.*, 2016a; Brasil *et al.*, 2016b; Desai *et al.*, 2017; Martins; Medronho; Cunha, 2021). O desenvolvimento de microcefalia pós-natal em crianças expostas ao ZIKV intrauterino também já foi relatado, com efeitos negativos no crescimento e desenvolvimento infantil (Cardoso *et al.*, 2019; Linden, 2016; Prata-Barbosa *et al.*, 2019). A ausência de sinais clínicos e anormalidades em exames radiológicos que indiquem SCZ, não exclui o risco de alguns problemas a jusante com convulsão, perda auditiva, deficiência visual e atraso no desenvolvimento de maneira tardia (Musso; Ko; Baud, 2019).

2.3 RESPOSTA IMUNE AO ZIKV

Uma resposta imunológica contra vírus, em geral é caracterizada pela ação de macrófagos, células dendríticas (DC's) e células “natural killers” (NK). Seguida posteriormente pela ativação de linfócitos que medeiam a resposta imune adaptativa, que tem como finalidade, além da eliminação do patógeno, a produção de células de memória e anticorpos neutralizantes (Abbas *at al.*, 2018). O sistema interferon é o mecanismo primário de defesa imunológica inata do hospedeiro contra o ZIKV e pode ser ativado em quase todas as células nucleadas poucas horas após a infecção. A ativação dessa resposta mediada por receptores de reconhecimento padrão (PRR) cooperam com a indução da expressão de várias citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias que irão dentre outras funções ativar uma resposta imune adaptativa (Ngono; Shresta, 2018).

A ativação da resposta imune adaptativa gera a produção de anticorpos específicos contra o vírus que podem ser detectados no sangue de dois a três dias após o início dos sintomas (Kerkhof *et al.*, 2020a; Ngono; Shresta, 2018). Os plasmócitos, um grupo de células B secretoras de anticorpos, estão presentes no sangue periférico do hospedeiro logo após sua exposição ao patógeno. Estudos demonstram que essas células são responsáveis por excretarem imunoglobulina específica de ZIKV do tipo IgM, IgG e IgA (Lai *et al.*, 2018). Diversos estudos que buscaram caracterizar os subtipos de células B circulantes de paciente já infectados por ZIKV, ajudaram a definir alguns alvos de epítomos de proteínas com anticorpos monoclonais (mAbs) fortemente neutralizantes e protetores (Richner; Diamond, 2018;

Robbiani *et al.*, 2017; Rogers *et al.*, 2017; Sapparapu *et al.*, 2016; Stettler *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016).

Anticorpos com especificidade contra epítomos da proteína E abrangendo os diferentes domínios (I, II e III) do dímero proteico e alguns locais no interior do primeiro e/ou segundo domínio se mostraram neutralizantes (Dai *et al.*, 2016; Swanstrom *et al.*, 2016; Sapparapu *et al.*, 2016; Robbiani *et al.*, 2017). Por outro lado, alguns anticorpos direcionados para a mesma proteína, no entanto para locais com conservação na sequência de aminoácidos foram considerados anticorpos com reação altamente cruzada, além de serem pouco neutralizantes. A junção dessas duas características podem levar ao aparecimento de um fenômeno conhecido como aumento da infecção dependente de anticorpos (ADE) (Stettler *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2016).

Devido à conservação e semelhança estrutural entre os *Orthoflavivírus*, alguns anticorpos direcionados ao ZIKV possuem a capacidade de se ligar a outro vírus intimamente relacionado, mais frequentemente DENV, mas são incapazes de neutralizá-lo. O complexo vírus-anticorpo subneutralizante formado se liga a receptores do tipo Fc presente em células do hospedeiro facilitando a entrada do vírus na célula e conseqüentemente a replicação viral, essas cargas virais aumentadas decorrentes de ADE contribuem e impulsionam o aumento da produção de mediadores pró-inflamatórios contribuindo para o aumento da gravidade da doença (Ngono; Shresta, 2018; Richner; Diamond, 2018). A reatividade cruzada de anticorpos, além de contribuir com uma possível piora no quadro clínico de pacientes com uma imunidade prévia a outros *Orthoflavivírus*, tem também impacto negativo em ensaios sorológicos. Em regiões endêmicas com a circulação dessas espécies virais, esse fenômeno dificulta a distinção entre as infecções, gerando falsos positivos e/ou negativos, limitando a acurácia diagnóstica e vigilância epidemiológica (Rathore; St. John, 2020).

A proteína E, por ser o antígeno mais abundante e acessível na superfície viral carrega os epítomos mais dominantes da resposta humoral, sendo o principal alvo de anticorpos neutralizantes (Andrade; Harris, 2018). Apesar de já terem sido descritos anticorpos contra outras regiões da proteína E, aqueles voltados contra o domínio III estão entre os mais neutralizantes (Ngono; Shresta, 2018; Richner; Diamond, 2018; Stettler *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2016). Outras proteínas como a proteína M e as não estruturais também são capazes de induzir a produção de anticorpos que impedem a entrada do vírus na célula por meio da inibição da interação entre partículas virais e receptores celulares ou impedem a mudança conformacional durante a fusão de membranas (Pierson *et al.*, 2007; Stiasny *et al.*, 2007).

Embora uma imunidade mediada por células B com produção de anticorpos neutralizantes seja de extrema importância, outras células efetoras pertencentes a imunidade adaptativa também contribuem para a proteção contra a infecção causada pelo ZIKV (Richner; Diamond, 2018). Células T CD4 e T CD8 antivirais foram detectadas após a infecção pelo ZIKV com epítomos imunodominantes contra outros genes estruturais (E, prM e C), sugerindo que a resposta de células T efetoras contribuem para uma resposta imunológica adaptativa e geração de uma imunidade protetora (Grifoni *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2017; Messina *et al.*, 2016; Muthumani *et al.*, 2016). É importante ressaltar que a reatividade cruzada com imunidade preexistente de células T de DENV modulam a respostas de algumas células T de ZIKV, no entanto respostas de células T específicas de ZIKV tem como alvo principal proteínas estruturais (E, prM e C) enquanto os epítomos de DENV são encontrados principalmente em proteínas não estruturais (Grifoni *et al.*, 2017), essas características são importantes para o design de produtos que busquem diferenciar respostas anti ZIKV e anti DENV.

2.4 DIAGNÓSTICO

Embora a maioria dos casos de infecções causada por ZIKV sejam assintomáticas e autolimitadas, o correto diagnóstico da infecção se faz necessário devido ao risco potencial de anormalidades congênitas (Song *et al.*, 2017). Ainda que testes em pacientes sintomáticos sejam úteis para o alerta e avaliação de circulação viral local, a identificação de indivíduos assintomáticos é importante uma vez que em grupos de alto risco, ou seja, mulheres grávidas, o estado de viremia é prolongado (Nithiyantham; Badawi, 2019). Além disso, o maior número de indivíduos testados auxilia em uma análise epidemiológica mais robusta.

Segundo orientações do centro de controle e prevenção de doenças infecciosas (CDC) o teste para um diagnóstico da infecção por ZIKV só é recomendado se o paciente apresenta sintomas com suspeita de exposição a uma área endêmica ou em caso de mulheres grávidas com qualquer chance de exposição ao vírus, seja por contato sexual ou viagens (CDC, 2025). Já para o ministério da saúde, o diagnóstico de ZIKV é clínico e feito por um médico com resultados confirmados por exames laboratoriais de sorologia ou biologia molecular oferecido pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e recém nascidos com suspeita de comprometimento neurológico devem ser submetidos a exames de imagem como ultrassom, tomografias e/o ressonância magnética (**Zika Vírus**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/z/zika-virus>>).

Apesar de o diagnóstico clínico ser recomendado pelo ministério da saúde, como descrito anteriormente, na maioria dos casos as manifestações clínicas são ausentes. Além disso, quando presentes eles se assemelham a outras arboviroses que co-circulam em regiões endêmicas e que apresentam o mesmo vetor de transmissão dificultando este tipo de avaliação (Soni *et al.*, 2023). Embora difícil, algumas sutis diferenças clínicas podem ser observadas entre as três principais arboviroses co-circulantes conforme demonstrado no Quadro 1.

Quadro 1 – Comparação de sintomas entre as arboviroses: ZIKV, DENV e CHIKV.

Sintomas	DENV	CHIKV	ZIKV
Febre	Alta (39 – 40 °C) de início súbito e sempre presente	Alta (39 – 40 °C) de início súbito ou pode não estar presente	Baixa (38 °C) e nem sempre presente
Dor de Cabeça	Intensa	Moderada	Leve
Dor nas articulações	Pode estar presente de modo moderado	Sempre presente de modo intenso e com inchaço local	Pode estar presente de modo leve
Manchas vermelhas pelo corpo	Pode estar presente com ou sem coceira	Pode estar presente com ou sem coceira	Quase sempre presente com coceira intensa
Conjuntivite	Ausente	Pouco provável	Muito provável
Dor atrás dos olhos	Moderada	Leve	Moderada
Possíveis complicações	Hemorragia e falência múltipla de órgãos	Dores crônicas que podem durar anos com agravos neurológicos raros.	Microcefalia em bebês de gestantes infectadas e Síndrome de Guillain-Barré em adultos. Risco de parto prematuro e aborto espontâneo

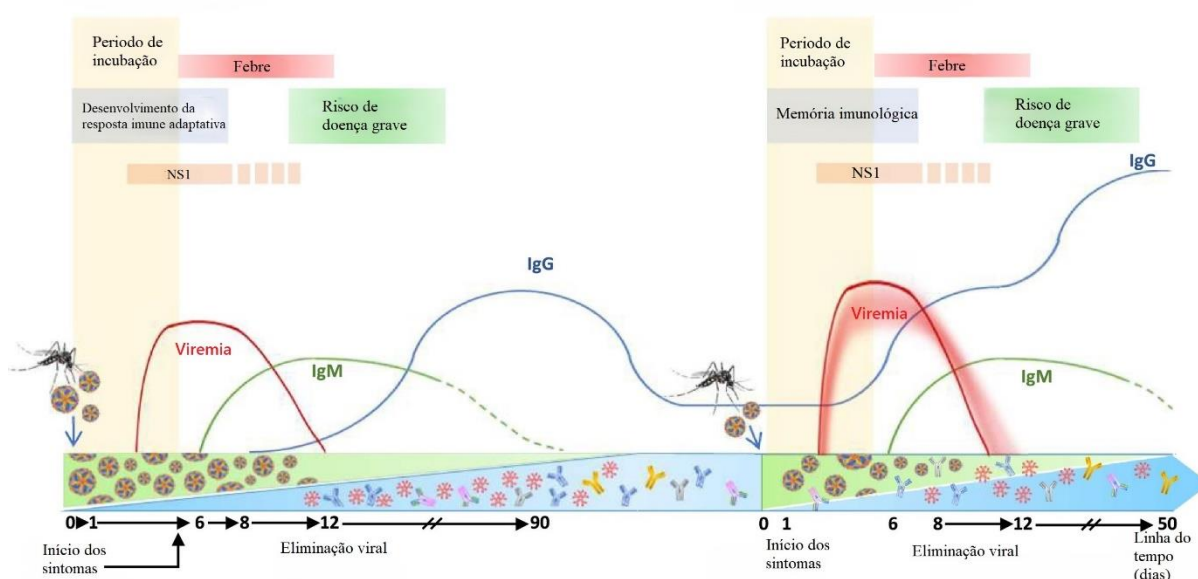
FONTE: Soni *et al.* (2023).

Para indivíduos com suspeita de ZIKV um diagnóstico definitivo depende de testes sorológicos e/ou teste de detecção direta do vírus. Os principais métodos diretos utilizados para detecção do vírus são ensaios baseados em técnicas de Transcriptase Reversa – Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR), cultivo e isolamento do vírus em cultura de células ou detecção da proteína NS1 circulante, que devem ser realizados em pacientes em estado virêmico no momento do teste (Singh *et al.*, 2018). Embora os métodos diretos apresentem elevada sensibilidade e especificidade, eles devem ser aplicados apenas durante a fase aguda da infecção, situação frequentemente ignorada devido a frequente falta de sintomatologia ou casos em que o paciente busca assistência médica quando existem sintomas persistentes indo além do estágio febril onde a detecção do vírus no sangue já não é confiável (Kerkhof *et al.*, 2020).

Outra problemática em relação a detecção por RT-qPCR é o seu uso limitado quanto a janela de detecção do RNA viral em diferentes fluidos corporais, onde divergências de detecção em amostras de urina, saliva e soro coletados na mesma data de pacientes infectados pelo vírus foram verificadas (Bingham, 2016). Ademais, os testes de detecção direta RT-qPCR e isolamento viral normalmente possui custos elevados e exigem profissionais altamente qualificados e em regiões endêmicas esses recursos podem ser limitados (Kerkhof *et al.*, 2020).

Uma infecção por ZIKV tem um curso clínico característico (Figura 2) na grande maioria das vezes e conforme descrito anteriormente, após o início da viremia o sistema imunológico responde com anticorpos específico contra o vírus. O início da infecção passa por um período de incubação assintomático e após alguns dias inicia-se uma fase virêmica com duração de 5-7 dias onde é possível observar sintomas agudos da infecção, é nesse momento que os métodos de detecção direta devem ser empregados, no entanto essa janela é curta. Normalmente, após o início dos sintomas o sistema imunológico começa a produção de anticorpos do tipo IgM e dias depois a presença de anticorpos do tipo IgG já podem ser observados. Anticorpos do tipo IgM podem durar por meses enquanto os anticorpos do tipo IgG podem persistir por mais tempo (Goncalves *et al.*, 2018; Kerkhof *et al.*, 2020).

Figura 3 – Representação esquemática da evolução de uma infecção causada por ZIKV



FONTE: Adaptada de Kerkhof *et al.* (2020).

LEGENDA: Representação esquemática da evolução de uma infecção causada por ZIKV: Durante a infecção o aumento da viremia precede o início dos sintomas clínicos e dura alguns dias após o início dos sintomas. Nesse momento de fase aguda o vírus secreta em grandes quantidades a proteína não estrutural NS1 e por esse motivo a detecção direta de antígenos virais é possível. Durante o curso da infecção anticorpos IgM e IgG começam a ser produzidos e podem ser utilizados para detectar a exposição do indivíduo ao patógeno. Em uma reinfecção, o indivíduo já possui células B de memória que em contato com o vírus, secretarão anticorpos IgG mais rápido e em maiores quantidades.

Sabendo do curso clínico habitual da infecção de ZIKV, e que anticorpos permanecem no sangue por períodos mais longos, sua detecção fornece uma janela mais ampla de oportunidades para o diagnóstico, embora a interpretação da presença de IgM e IgG deva ser feita com cautela levando em consideração o contexto epidemiológico (Peeling *et al.*, 2010). Durante o curso da infecção anticorpos do tipo IgM podem ser detectados a partir do 6 dia de infecção, período em que normalmente se iniciam os sintomas e após um pico de produção sua presença começa a diminuir (Cleton *et al.*, 2012). O tempo de persistência de IgM normalmente gira em torno de 2 meses, mas já foram relatados casos excepcionais com duração de 6 meses para DENV (Prince; Matud, 2011) e 19 meses para ZIKV (Griffin *et al.*, 2019).

Anticorpos do tipo IgG são normalmente detectados de maneira mais tardia durante o curso de uma infecção primária, mas seu tempo de duração no hospedeiro dura anos ou a vida toda (Cleton *et al.*, 2012), embora alguns estudos já tenham demonstrado o decaimento do título desses anticorpos anti-ZIKV ao longo dos anos (Langerak *et al.*, 2021; Lustig *et al.*, 2017; Moreira-Soto *et al.*, 2020; Pasquier *et al.*, 2018). Por outro lado, a resposta de IgG

durante uma infecção secundária pode ser observada nos primeiros dias de infecção, superando IgM, que nesse caso, segue o curso de produção habitual durante a infecção (Ohst *et al.*, 2018). Embora o diagnóstico sorológico para ZIKV seja promissor e muito empregado, o seu principal desafio é a grande reatividade cruzada das respostas de anticorpos com outras infecções de *Orthoflavivirus* como a DENV, como já descrito anteriormente ambos os vírus compartilham semelhanças estruturais que dificultam a aplicação desse tipo de teste.

Os ensaios mais utilizados no diagnóstico sorológico são os ensaios do tipo ELISA, ensaio de imunofluorescência (detectam anticorpos direcionados a antígenos virais) e testes de neutralização por redução de placa (PRNT) (analisa a fração de anticorpos neutralizantes presentes no soro do paciente), destes, o último é considerado o padrão ouro para o diagnóstico sorológico (Kerkhof *et al.*, 2020). Embora recomendado, o PRNT é um ensaio muito trabalhoso, demorado e requer um laboratório com nível de segurança compatível ao patógeno, uma vez que utiliza-se o vírus vivo (Shan *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2018). Considerando a dificuldade de implementação da técnica PRNT em laboratório e a reatividade cruzada entre flavivírus se faz necessária a busca por técnicas e antígenos alternativos para o aperfeiçoamento de ensaios sorológicos.

Dos testes sorológicos comerciais disponíveis para ZIKV, o da empresa Euroimmun e InBios são os mais citados. Os produtos da Euroimmun utilizam como antígeno a proteína NS1 para detecção de anticorpos IgM, IgG e IgA e tem sido extensamente avaliado em diversos estudos (Granger *et al.*, 2017; Kadkhoda; Gretchen; Racano, 2017; L'Huillier *et al.*, 2017). Embora o fabricante relate alta especificidade e sensibilidade dos testes, com valores próximos a 97%, estudos avaliando a eficiência do kit demonstram sensibilidade e especificidade inferior a padrões esperados (L'Huillier *et al.*, 2017).

Além da proteína NS1, existem alguns ensaios de detecção de anticorpos baseados na proteína do envelope (E) do ZIKV, uma glicoproteína que apresenta 3 domínios distintos sendo eles o domínio I (EDI), II (EDII) e III (EDIII) (Denis *et al.*, 2019). A porção EDIII é uma região com menor homologia comparada a outras arboviroses de importância médica, principalmente a DENV e por isso é um destaque com potencial aplicação em diagnóstico, embora algumas estratégias já tenham apresentado reatividade cruzada em ensaios ELISA frente a soros de indivíduos infectados por DENV em fase convalescente inicial (Premkumar *et al.*, 2018). O produto da InBios busca avaliar a presença de anticorpos IgM contra o ZIKV usando a proteína E como antígeno exibindo resultados de alta sensibilidade (>90% de acordo com o fabricante) e sendo o primeiro a receber autorização para ser comercializado nos Estados Unidos (EUA) (Granger *et al.*, 2017; Safronetz *et al.*, 2017).

A ANVISA no Brasil aprovou alguns testes comerciais para o diagnóstico de ZIKV sendo a maioria deles sorológicos (Silva *et al.*, 2020). Embora apresentem dados de especificidade e sensibilidade elevados, sua validação não leva em consideração amostras de diferentes países e regiões, o que pode ser um fator crítico para suas aplicações e confiabilidade devido as diferentes linhagens de ZIKV circulantes. Por esses motivos é necessária a seleção de regiões com menor homologia entre sequencias estruturais e/ou não estruturais de *Orthoflavivirus*. Uma alternativa promissora é o desenho *in silico* de antígenos específicos direcionados ao ZIKV para estabelecimento de ensaios de diagnósticos e vacinas.

2.5 IMUNOINFORMÁTICA

Várias abordagens vacinais têm sido utilizadas atualmente para o desenvolvimento de uma vacina eficaz para o ZIKV. Nos primórdios da tecnologia de vacinas componentes antigênicos dos patógenos eram isolados e, posteriormente, avaliados quanto a sua capacidade de induzir uma resposta imune (Garg; Mehmetoglu-Gurbuz; Joshi, 2018). Embora essa abordagem tenha sido muito utilizada até agora, o avanço da tecnologia de sequenciamento de genoma possibilitou a aplicação de métodos computacionais para identificação de regiões potencialmente relevantes, sendo a maioria, aplicadas a construção de vacinas através da predição de epítomos baseados na sequência genômica de determinado patógeno (Backert; Kohlbacher, 2015).

A identificação de regiões potencialmente antigênicas a partir de análises computacionais é chamada de vacinologia reversa (Rvac). A Rvac tem sido extensamente estudada como uma alternativa promissora para a determinação de epítomos antigênicos potenciais com baixo custo e tempo reduzido para análise laboratorial quando comparado aos métodos de pesquisas tradicionais (Bruno *et al.*, 2015; Liljeroos *et al.*, 2015). Um dos grandes alvos da Rvac é a predição de epítomos reconhecidos por células T, estes são tipicamente fragmentos de peptídeos que se tornaram candidatos vacinais desejáveis devido a sua produção e obtenção relativamente fáceis, estabilidade química e ausência de potencial infeccioso, além de serem pontos chaves no desenvolvimentos de uma resposta imune adaptativa (Patronov; Doytchinova, 2013).

É sabido que a conservação das sequências de aminoácidos está relacionada a alta similaridade entre diferentes espécies de *Orthoflavivirus* e que essa similaridade impacta o correto diagnóstico de casos de infecções por esse tipo viral. Para superar os efeitos da reatividade cruzada entre esse patógenos e seu impacto no desenvolvimento de vacinas e

diagnósticos de alta performance, nosso grupo utilizou a imunoinformática e Rvac para encontrar regiões imunogênicas exclusiva e altamente conservadas entre cepas de ZIKV, seguindo uma metodologia baseada em análises *in-silico*.

Em um primeiro momento, peptídeos derivados da poliproteína do ZIKV foram previstos com base na capacidade de interação com 4 ou mais alelos de HLA-I e HLA-II. Posteriormente os peptídeos foram comparados com genomas de 7 vírus pertencentes a família *Flavirividae* e todos os genomas de cepas circulantes de ZIKV depositadas no GenBank para avaliação de especificidade e conservação respectivamente. Os epítomos selecionados foram avaliados quanto ao potencial teórico de toxicidade e antigenicidade e posteriormente avaliados quanto a acessibilidade ao solvente. O estudo resultou em uma lista final de 14 epítomos candidatos, que são potenciais candidatos para serem aplicados em testes de diagnósticos para ZIKV (Salvador *et al.*, 2019).

2.6 PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS DE CÉLULAS T E B

Uma resposta imunológica robusta acontece por meio da atuação conjunta da imunidade inata e adaptativa. Enquanto a imunidade inata atua com mecanismos de respostas inespecíficos contra um determinado patógeno, a imunidade adaptativa é capaz de responder e desenvolver memória contra regiões específicas deste patógeno (Justiz Vaillant; Sabir; Jan, 2025). As principais células efetoras da imunidade adaptativa, são os linfócitos B e T que medeiam a resposta imunológica, humoral e celular respectivamente, por meio do reconhecimento de pequenos componentes moleculares nos antígenos chamadas de epítomos (Sanchez-Trincado; Gomez-Perosanz; Reche, 2017).

A capacidade de reconhecimento de uma gama de componentes moleculares pelos linfócitos é determinada por meio de eventos de recombinações genéticas que ocorrem apenas nesses tipos celulares, levando a geração de milhares de variantes nos receptores de reconhecimento de antígenos (Sanchez-Trincado; Gomez-Perosanz; Reche, 2017).

Linfócitos T reconhecem antígenos por meio de seus receptores (TCR). Esses antígenos são processados e apresentados por meio de células apresentadores de antígenos (APCs) que por sua vez, exibem pequenas porções das proteínas do antígeno ligadas às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I ou II presentes em suas membranas celulares que são reconhecidos pelos subtipos celulares TCD8+ e TCD4+ respectivamente (Annunziato; Romagnani, 2009).

Já os linfócitos B reconhecem antígenos expostos ao solvente por meio de receptores de células B (BCR). Esses receptores consistem em imunoglobulinas ligadas à membrana. Após a ativação dessas células, elas se diferem e passam a secretar formas solúveis das imunoglobulinas que passam a ser conhecidas como anticorpos (Grasseau *et al.*, 2020). Um epítopo de célula B é, portanto, reconhecido por essas células e podem estar presentes em qualquer região do antígeno exposta ao solvente e não precisam ser processados e apresentados por outros tipos celulares.

Durante a geração da resposta imunológica, os dois tipos de epítopos (epítopos de célula B e T) têm funções complementares e essenciais. Enquanto o reconhecimento de epítopos de células B é importante para a produção de anticorpos, a ativação de células T é excepcionalmente importante para ativar uma resposta celular abrangente e mais eficiente, além de ser fundamental para a maturação das células B e geração de anticorpos com alta afinidade e memória duradoura (Justiz Vaillant; Sabir; Jan, 2025). Diante disso, a identificação de epítopos é de grande interesse para o monitoramento imunológico e desenvolvimento de ensaios de diagnósticos.

A identificação tradicional de determinantes antigênicos por meio de experimentos em bancada é cara e demorada, por isso, o desenvolvimento de técnicas computacionais para identificação e previsão de epítopos tem sido extensamente empregada (Fadaka *et al.*, 2021; Kar *et al.*, 2020; Ullah; Sarkar; Islam, 2020). A predição de epítopos de células T, busca a identificação de peptídeos curtos dentro de um antígeno capazes de serem processados por APCs, se ligarem à moléculas do MHC e posteriormente, serem reconhecidos pelos TCRs (Jensen, 2007; Lafuente; Reche, 2009).

Moléculas de MHC I e II possuem estruturas semelhantes com uma fenda de ligação para peptídeos composto por α -hélices sobrepostas por folhas β antiparalelas (Sanchez-Trincado; Gomez-Perosanz; Reche, 2017). Pequenas diferenças no sulco de ligação de MHC I e II condicionam as previsões de ligação dos peptídeos. A molécula de MHC I possui um sulco de ligação mais estreito e, por isso, permite a ligação apenas de peptídeos curtos (9 – 11 aminoácidos) com as extremidades N- e C- terminal presas a resíduos conservados da molécula (Blees *et al.*, 2017). Já as moléculas de MHC II possuem um sulco de ligação aberto, permitindo que as extremidades N- e C- terminal dos peptídeos se estendam além do sulco de ligação. Portanto, peptídeos capazes de se ligarem a MHC II possuem comprimentos variados (9 – 22 aminoácidos), no entanto, apenas um núcleo de 9 resíduos de aminoácidos permanece no sulco de ligação (Racle *et al.*, 2023; Sanchez-Trincado; Gomez-Perosanz; Reche, 2017).

Com o avanço do entendimento das moléculas de MHC, foram desenvolvidos diversos métodos de predição de ligação peptídeo-MHC, baseados em dados conhecidos ou estruturas moleculares. Métodos baseados em estruturas dependem da modelagem 3D dos peptídeos-MHC e posterior avaliação da interação entre eles por meio de dinâmica molecular. Apesar de não necessitarem de dados experimentais, são pouco usados devido a complexibilidade e desempenho inferior de predição (Desai; Kulkarni-Kale, 2014; Lafuente; Reche, 2009). Já os métodos baseados em dados para predição de epítomos de células T, utilizam sequências de peptídeos conhecidos por se ligarem ao MHC. Essas sequências estão disponíveis em banco de dados como IEDB (Dhanda *et al.*, 2019), EPIMHC (Molero-Abraham; Lafuente; Reche, 2014), Antigen (Singh; Mishra, 2016), entre outros. Uma vez que a ligação peptídeo-MHC é, atualmente, bem caracterizada esse tipo de predição apresentam uma elevada confiabilidade.

Para epítomos de células B, a predição busca qualquer região do antígeno que pode ser reconhecida por BCR. No entanto, epítomos de células B podem apresentar características distintas, sendo epítomos lineares com resíduos de aminoácidos sequenciais ou epítomos conformacionais com aminoácidos próximos espacialmente, mas distantes na sequência primária (Sanchez-Trincado; Gomez-Perosanz; Reche, 2017). Cerca de 90% dos epítomos de células B são conformacionais com uma minoria sendo considerados lineares (Van Regenmortel, 2009).

Apesar de estarem presentes em menores quantidades, os epítomos lineares de células B são previstos a partir da sequência primária do antígeno em estudo. Os principais métodos computacionais utilizados na predição desse tipo de epítomo envolvem análises baseadas em características físico-químicas, flexibilidade, acessibilidade à superfície, frequência de aminoácidos em epítomos de células B determinados experimentalmente, entre outros (Jespersen *et al.*, 2017; Karplus; Schulz, 1985; Lins; Thomas; Brasseur, 2003; Saha; Raghava, 2006).

Embora a maioria dos epítomos de células B sejam conformacionais, os modelos preditivos disponíveis para esse tipo de epítomo apresentam desempenho limitado (Ponomarenko; Bourne, 2007; Sun *et al.*, 2009; Sweredoski; Baldi, 2008). Em teoria, a predominância desses epítomos sugerem que o desenvolvimento de ferramentas para suas predições deveria ser priorizado. Entretanto, essas abordagens apresentam grandes desafios uma vez que, a predição de epítomos conformacionais requerem o conhecimento da estrutura tridimensional do antígeno estudado, esse tipo de informação nem sempre está disponível em banco de dados públicos, especialmente para antígenos de organismos emergentes e/ou negligenciados. Além disso, identificar epítomos que dependem da proximidade espacial de

aminoácidos em um contexto proteico torna a tarefa ainda mais difícil (Sanchez-Trincado; Gomez-Perosanz; Reche, 2017).

Em um contexto de imunogenicidade vacinal e desenvolvimento de ensaios imunodiagnósticos ambos os epítomos, de células B e T são importantes. No entanto, a predição de epítomos de células T é mais confiável do ponto de vista computacional devido ao melhor entendimento de mecanismos de apresentação via MHC e maior acessibilidade a dados experimentais tendo, portanto, os modelos computacionais melhores desenvolvidos (Dhanda *et al.*, 2019; Singh; Mishra, 2016). Enquanto para predições de epítomos de células B, os dados experimentais disponíveis para o treinamento de máquinas são mais escassos tendo, portanto, a confiabilidade de predição inferior (Sanchez-Trincado; Gomez-Perosanz; Reche, 2017).

3 JUSTIFICATIVA

A velocidade com que o ZIKV se espalhou nas Américas e, sua capacidade de neuroinvasão e neurovirulência com casos associados a síndromes neurológicas graves como malformações congênitas e síndrome de Guillain-Barré trouxeram grandes prejuízos sociais e econômicos para o Brasil. O correto diagnóstico das infecções causadas por ZIKV continuam sendo um desafio significativo devido à alta similaridade sintomatológica com outras arboviroses e alto grau de semelhança estrutural com outros *Orthoflavivírus*, especialmente a DENV.

A reatividade cruzada de anticorpos gerados após a infecção pelo vírus impacta diretamente os testes sorológicos, levando a resultados pouco precisos, que prejudicam além do manejo clínico, as avaliações epidemiológicas que impactam diretamente a saúde pública. Os métodos laboratoriais indicados atualmente para o diagnóstico como o RT-PCR, apresentam dificuldades de aplicação devido ao alto custo e acessibilidade limitada dada a estrutura necessária para sua realização. Diante disso, é inegável que existe a necessidade de uma abordagem diagnóstica alternativa com um bom poder de acurácia e baixo custo, levando em consideração, a possibilidade de uma reemergência de ZIKV.

Nesse contexto a imunoinformática tem se mostrado como uma ferramenta útil para identificação de regiões promissora com características de imunogenicidade e conservação desejadas. Este trabalho busca avaliar peptídeos antigênicos identificados *in silico* como potenciais candidatos para aplicação em testes de diagnósticos sorológicos para ZIKV, favorecendo o correto manejo clínico e epidemiológico diante dessas infecções.

4 OBJETIVO

4.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliar a reatividade de cinco peptídeos identificados por imunoinformática presentes nas proteínas estruturais do ZIKV e desenvolver modelos de proteínas quiméricas multi-epítopo para aplicação em testes de diagnósticos

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar cinco peptídeos identificados nas proteínas estruturais de ZIKV frente a um painel com amostras de 20 soros de pacientes com infecção prévia ao vírus.
- Avaliar a sororeatividade de ZIKV no sul de Minas Gerais.
- Desenvolver modelos de proteínas quiméricas multi-epítopo com os peptídeos testados.
- Simular a resposta imunológica provável por meio da interação entre a proteína com o hospedeiro.

5 METODOLOGIA

5.1 OBTENÇÃO DOS SOROS

As amostras de soro humano positivas para ZIKV (ZIKV +) utilizadas nesse trabalho foram cedidas pelo Centro de Tecnologia em Vacinas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e foram confirmadas quanto por meio de ensaios de soroneutralização por redução de placa (PRNT), PCR e/ou testes rápidos.

As amostras ZIKV negativas (ZIKV -) foram coletados de pacientes residentes de áreas rurais de Alfenas – Minas Gerais em anos anteriores a 2012, sendo considerados, portanto, soros negativos para ZIKV, uma vez que não há relatos da circulação do vírus no Brasil antes de 2013. A falta de reatividade dessas amostras foi testada por teste ELISA *in-house*, utilizando como antígeno o domínio III da proteína do envelope do zika e como controle negativo plasma humano masculino da marca (Sigma) (Anexo 1).

As amostras de soro ZIKV positivas de camundongos foram obtidas em experimentos anteriores realizados por nosso grupo com aprovação do comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Alfenas (Nº de protocolo: 009/2020). Nesse caso, os camundongos foram infectados pela via intraperitoneal (i.p.) com 10^3 unidades formadoras de placas (pfu) de Zika vírus (ZIKV- BRPE243/2015). Após 7 dias, os animais foram eutanasiados com dose letal de anestésico (150 µL de cetamina a 100 mg/mL e 50 µL de xilazina a 20 mg/mL por animal), o sangue coletado por punção cardíaca e os soros foram separados por centrifugação a 3600 rpm durante 10 minutos.

As amostras de soro PCR positivas para DENV e CHIK foram cedidas pelo Prof. Danilo Bretas de Oliveira da Universidade Federal dos Valos do Jetinhonha e Mucuri. Os procedimentos experimentais realizados nesse trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alfenas (Nº de parecer: 6.802.332).

5.2 OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS SINTÉTICOS

Os peptídeos utilizados no presente trabalho foram sintetizados usando as sequências de aminoácidos identificadas por bioinformática de acordo com Salvador e colaboradores (2019). Eles foram sintetizados pela empresa GenScript e posteriormente foram solubilizados de acordo com seu perfil de hidrofobicidade que varia de acordo com a sequência de aminoácidos, após solubilização as soluções foram preservadas em freezer -20°C.

Quadro 2 - Peptídeos sintéticos baseados em proteínas estruturais ZIKV.

Sequência	Tamanho	ID	Proteína
MMLELDPPF	9 aa	Pep 01	Envelope
LNTKNGSISLMCLAL	15 aa	Pep 02	Envelope
PSLGLINRWGSVGKK	15 aa	Pep 03	Capsídeo
RRGADTSVGIVGLLL	15 aa	Pep 04	Capsídeo
IQIMDLGHMCDATMS	15 aa	Pep 05	Pré-membrana

FONTE: o autor.

Para a análise de polaridade e posterior solubilização dos peptídeos foi atribuído um valor de -1 a cada resíduo ácido de aminoácido (Asp [D], Glu [E] e C-terminal -COOH), valor +1 a resíduos básicos (Arg [R], Lys [K] e o N-terminal -NH₂). O restante dos aminoácidos foram considerados hidrofóbicos sem carga (Phe [F], Ile [I], Leu [L], Met [M], Val [V], Trp [W], e Tyr [Y]) e não carregados (Gly [G], Ala [A], Ser [S], Thr [T], Cys [C], Asn [N], Gln [Q] e Pro [P]), de acordo com o site https://www.lifetein.com/handling_and_storage_of_synthetic_peptides.html. O peptídeo 01 (carga -2) foi solubilizado em solução de água destilada contendo 25% de fosfato de sódio (0,1M), os peptídeos 2 (carga +1), 3 (carga +3) e 4 (carga +1) foram solubilizados em água destilada e o peptídeo 5 (carga -1) foi solubilizado em água destilada contendo 50% de tampão fosfato-salino (PBS).

5.3 ENSAIO DE IMUNOADSORÇÃO ENZIMÁTICA (ELISA) COM AMOSTRAS DE SORO DE CAMUNDONGO.

A avaliação da reatividade dos peptídeos de ZIKV e sua característica imunogênica foram feitas utilizando os soros ZIKV+ e ZIKV- em ensaio imunoenzimático. Microplacas de 96 poços Nunc MaxiSorp® (eBIOSCIENCE, EUA) foram sensibilizadas por 18h a 4°C com 100 µL/ poço da solução de peptídeos previamente diluídos em tampão de sensibilização carbonato/bicarbonato (0,1 M pH 9,6) contendo 200 ng de peptídeo por poço, a quantidade de peptídeo utilizada para sensibilização da placa foi otimizada para estabelecimento do protocolo. No dia seguinte a placa foi lavada quatro vezes com a solução de lavagem (PBS contendo 0,05% de Tween-20 – PBS-T). Após a lavagem, a etapa de bloqueio foi realizada (incubação de 2h a 37°C) com 200 µL/ poço de PBS-T contendo 4% leite em pó desnatado (Molico) e 1% de proteína BSA. Após novo ciclo de lavagem (quatro vezes), 100 µL dos soros diluídos individualmente (diluição 1:50 em PBS-T) foram adicionados aos poços e incubados por 1h a 37°C. Após incubação e lavagem com PBS-T (quatro vezes), foram adicionados aos poços 100 µL/poço de anticorpo anti-IgG murino conjugados a Peroxidase (sigma) diluídos em fator de diluição 1:5000 em PBS-T. Após incubação de 1h a 37°C e nova

lavagem (quatro vezes) a revelação da reação foi realizada com a adição de 100 µL/poço de solução reveladora contendo Tetrametilbenzidina – TMB (Sigma-Aldrich, EUA) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) diluídos em tampão citrato/fosfato (0,1M de Ácido Cítrico; 0,1 M de Fosfato de Sódio; pH 4,5) por 15 minutos, em temperatura ambiente sob abrigo da luz. Decorrido os 15 minutos, a reação foi interrompida utilizando uma solução ácida, *Stop Solution*, de ácido sulfúrico 2M (dinâmica) com 30 µL/poço. A leitura da absorbância resultante foi realizada a 450 nm (Abs_{450nm}) em leitor de microplaca (Leitor de Elisa AnthosZenyth 200rt).

5.4 ENSAIO DE IMUNOADSORÇÃO ENZIMÁTICA (ELISA) COM AMOSTRAS DE SORO HUMANO.

A avaliação da reatividade dos peptídeos de ZIKV frente aos soros obtidos pacientes previamente infectados seguiu majoritariamente o protocolo descrito anteriormente. No entanto a solução de bloqueio foi feita utilizando 200 µL/ poço de solução de PBS contendo 5% de proteína BSA. Já os soros foram diluídos individualmente em PBS-T na proporção 1:100 e, se tratando de humano foi utilizado um anticorpo anti-IgG humano conjugado com peroxidase diluído na concentração de 1:5000 (Sigma).

5.5 ANÁLISE DE RESULTADOS DO TESTE ELISA.

O índice de reatividade (RI) foi calculado através da razão entre a densidade ótica obtida para o grupo ZIKV+ e o ponto de corte (*cut-off*). O *cut-off* por sua vez, foi calculado através da média da densidade ótica obtida no controle negativo (Soro humano masculino - Sigma) somada a duas vezes o valor do desvio padrão obtido para este grupo, valores acima do ponto de corte são considerados reativos.

O RI é interpretado de modo a avaliar a reatividade da amostra sendo considerado reagente aqueles que apresentem resultado maior que 1,1, indeterminado os variam entre 0,8 e 1,1 e não reagente aqueles que estão abaixo de 0,8 (Pereira *et al.*, 2024).

A eficiência do ELISA realizado foi avaliado através da análise de sensibilidade e especificidade do teste. A sensibilidade é a capacidade de identificação correta de indivíduos previamente infectados, por outro lado, a especificidade é capacidade de identificação correta de indivíduos não infectados. A sensibilidade (a) e especificidade (b) é calculada como (Mehra *et al.*, 2014):

$$(a) \frac{\text{Verdadeiros positivos}}{(\text{Verdadeiros positivos} + \text{falsos negativos})} \times 100$$

$$(b) \frac{\textit{Verdadeiros negativos}}{(\textit{Verdadeiros negativos} + \textit{falsos positivos})} \times 100$$

5.6 AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE CRUZADA DE PEP 3 COM AMOSTRAS DE SORO PCR POSITIVAS PARA CHIKV E DENV

A presença de anticorpos anti-DENV e anti-CHIKV das amostras foram confirmadas utilizando kits de testes rápido da empresa Eco Diagnósticas. Para DENV foi utilizado o kit Dengue DUO ECO Teste (MS:80954880038) e para CHIKV o kit ChikV IgG/IgM ECO Teste (MS: 8095488023). Foi realizado também uma caracterização dessas amostras para anticorpos IgG anti-ZIKV utilizando um kit de diagnóstico EUROIMMUN (Anexo III).

A avaliação da reatividade dos peptídeos de ZIKV frente aos soros positivos para DENV e CHIKV seguiu majoritariamente o protocolo descrito na secção 5.4. Ponto de corte e índice de reatividade foram calculados e as amostras que permaneceram acima de 1,1 foram consideradas positivas.

5.7 SOROREATIVIDADE DE ZIKV EM AMOSTRAS DE SORO COLETADAS NO SUL DE MINAS GERAIS

329 amostras de soros coletadas das cidades de Vargina, Alfenas e Poços de Caldas – Minas Gerais em 2020, foram submetidas ao ensaio ELISA descrito na secção 5.4 utilizando como antígeno o Pep 03 para avaliação da circulação de ZIKV nessas regiões. Ponto de corte e índice de reatividade foram calculados conforme descrito anteriormente e as amostras que permaneceram acima de 1,1 foram consideradas positivas.

As amostras consideradas positivas para Pep03 foram analisadas quanto a presença de anticorpos IgG utilizando um kit de teste de diagnóstico da empresa EUROIMMUN (cód: EI 2668-9601 G) baseada também no método ELISA. O protocolo seguiu com base nas especificações do fabricante.

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.

As análises estatísticas dos resultados foram realizadas utilizando o software GraphPadPrism® 7.0. As análises foram feitas utilizando a análise de teste de Tukey e curva ROC. O nível mínimo de significância aceito foi de 5% ($p < 0,05$).

5.9 PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS LINEARES DE CÉLULAS B

A predição de epítomos lineares de células B foi realizada a partir das proteínas do envelope, capsídeo e prM de ZIKV, com base nas sequências de aminoácidos disponíveis no

GenBank (NCBI Reference Sequence: YP_009430300.1; YP_009430296.1 e QWX21791.1 respectivamente). Com o objetivo de aumentar a confiança da predição, foram utilizados três metodologias computacionais distintas: BepiPred 2.0 (Jespersen *et al.*, 2017), Emini Surface Accessibility Prediction (Emini *et al.*, 1985), ambos disponíveis na plataforma Immune Epitope Database (IEDB) e o modelo disponível no servidor ABCpred (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/abcpred/index.html>) (Saha; Raghava, 2006, 2007).

O algoritmo BepiPred 2.0 baseia-se em técnicas de aprendizado de máquina, mais especificamente Random Forest, treinadas a partir de dados experimentais de epítomos depositados no IEDB. O modelo combina características da sequência aminoacídica, como hidrofobicidade, flexibilidade e acessibilidade, para prever regiões antigênicas contínuas potencialmente reconhecidas por anticorpos. Os resíduos com Score superior à 0,5 e comprimento mínimo de 8 aminoácidos foram considerados como prováveis epítomos lineares.

A predição de acessibilidade superficial de Emini é baseada em um modelo estatístico que avalia a probabilidade de cada resíduo estar exposto na superfície da proteína (essencial para o reconhecimento por anticorpos). Regiões com Score acima de 1.0 foram consideradas acessíveis e, portanto, mais propensas a atuarem como epítomos. O ABCpred, por sua vez, é um preditor de epítomos lineares baseado em redes neurais treinado com peptídeos de diferentes comprimentos validados experimentalmente. O comprimento de aminoácidos utilizado foi de 16 aminoácidos e um limiar de corte de 0.51, de acordo com parâmetros sugeridos pelo servidor.

Os resultados obtidos pelos três métodos foram comparados com as sequências peptídicas previstas por Salvador e colaboradores (2019) e validade neste trabalho.

5.10 CONSTRUÇÃO DE PROTEÍNA QUIMÉRICA MULTI-EPÍTOPO

Os cinco epítomos avaliados quanto à reatividade foram utilizados na construção da proteína quimérica neste trabalho. Duas proteínas diferentes foram projetadas com a sequência de cada epítopo conectada por ligantes flexíveis (GSGSGS-quimera flexível) e ligantes rígidos (AEAAAKEAAKA-quimera rígida). Propriedades de alergenicidade e a antigenicidade das proteínas construídas foram avaliadas nos servidores AllerCatPro2.0 (<https://allercatpro.bii.a-star.edu.sg/>) e Vaxijen 2.0 (<https://ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>), respectivamente. Peso molecular, meia-vida e índice de instabilidade foram calculados utilizando o software ProtParam no servidor ExPASy. As previsões das estruturas proteicas tridimensionais das quimeras rígidas e

flexíveis foram submetidas ao software AlphaFold (versão 2.3.1) (<https://github.com/sokrypton/ColabFold>) e a qualidade das estruturas foram submetidas ao software MolProbity (<http://molprobity.manchester.ac.uk/>) por meio da classificação de Ramachandran. As sequências de nucleotídeos foram sintetizadas comercialmente e inseridas no plasmídeo pET28a+ (Genone-Biotech, Rio de Janeiro, Brasil) com a adição da sequência codificante para seis resíduos de histidina na extremidade COO- de cada proteína.

5.11 SIMULAÇÃO IN-SÍLICO DA RESPOSTA IMUNE DA PROTEÍNA EM UM HOSPEDEIRO VERTEBRADO

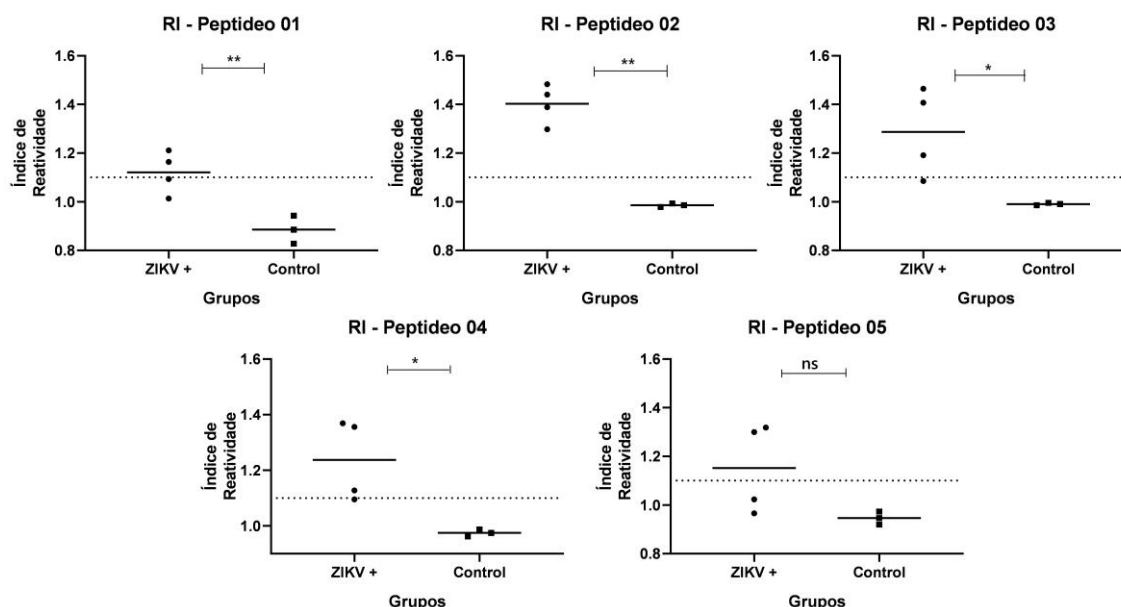
As proteínas quiméricas foram submetidas ao servidor C-ImmSim (<https://kraken.iac.rm.cnr.it/C-IMMSIM/>) para predição do perfil de resposta imune celular e humoral, os parâmetros utilizados foram os seguintes: injeção única, random seed = 12345, injeção sem LPS, volume de simulação 10 e simulação em 300 etapas com seleção de interação com antígeno leucocitário humano (HLA) do hospedeiro. Para predição de interação com HLA humano as sequências FASTA das proteínas desenhadas foram submetidas ao servidor IEDB (<https://www.iedb.org>) que utiliza aprendizado de máquinas para prever as ligações peptídicas com HLA-I e HLA-II. O método de predição NetMHCpan foi utilizado para ligações peptídicas de HLA-I e HLA-II (Nilsson *et al.*, 2023; Reynisson *et al.*, 2020). Os alelos representativos utilizados na simulação da resposta imunológica para interação com HLA-I da proteína flexível foram HLA-A*1101, HLA-A*0101, HLA-B*5701, HLA-B*5801 e para HLA-II foram HLA-DRB1*1101 e HLA-DRB1*0802 de acordo com as interações previstas no IEDB. Já para a quimera rígida os alelos de interação representativos utilizados foram HLA-A*1101, HLA-A*6801, HLA-B*5701, HLA-B*5801 para HLA-I e HLA-DRB1*0901 e HLA-DRB1*0402 para HLA-II.

6 RESULTADOS

6.1 REATIVIDADE DOS PEPTÍDEOS FRENTE A SOROS DE CAMUNDONGOS PREVIAMENTE INFECTADOS COM ZIKV

A avaliação de um painel de soros de camundongos previamente infectados por ZIKV frente aos peptídeos sintéticos em teste ELISA utilizando anticorpos anti-IgG murino, demonstrou que esses camundongos apresentaram a presença de anticorpos IgG para todos os peptídeos com exceção do peptídeo 5.

Figura 4 – Reatividade dos peptídeos com amostras de soro de camundongos previamente infectados com ZIKV.



FONTE: o autor.

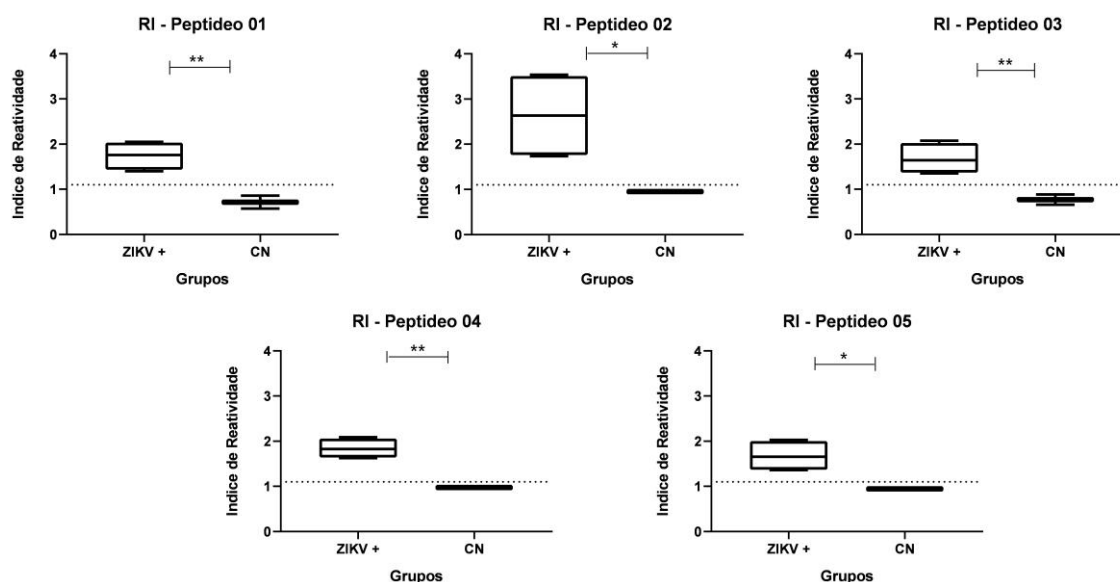
LEGENDA: Reatividade dos peptídeos com amostras de soros de camundongos previamente infectados com ZIKV: As amostras positivas (n = 4), amostras negativas (n = 3). Valores considerados significativos estão em $P < 0,05$. A linha pontilhada indica que valores acima são considerados reativos (RI > 1,1). Os peptídeos 1 e 2 obtiveram um p-value < 0,01. Os peptídeos 3 e 4 demonstraram um valor de significância de $p < 0,05$ e o peptídeo 5 não apresentou diferença significativa (teste Tukey $p < 0,05$).

6.2 REATIVIDADE DOS PEPTÍDEOS FRENTE AO PAINEL DE SOROS HUMANOS

Uma avaliação prévia da reatividade dos peptídeos perante a anticorpos IgG humano e padronização da concentração de peptídeos para sensibilização da placa foi feita utilizando dois pools de soros ZIKV positivo homogeneizando em quantidades iguais a 4 amostras por pool de soros ZIKV+. Para todos os peptídeos, os pools de soros ZIKV+ se mostraram reativos (índice de reatividade > 1,1), com diferença significativa de $P < 0,01$ para os peptídeos 01, 03 e 04 e $P < 0,05$ para os peptídeos 02 e 05 em relação ao grupo controle em

que foi utilizado plasma masculino humano comercial (Sigma) com a utilização de 200 ng de peptídeo por poço.

Figura 5 – Reatividade dos peptídeos utilizando um pool de amostras ZIKV+.

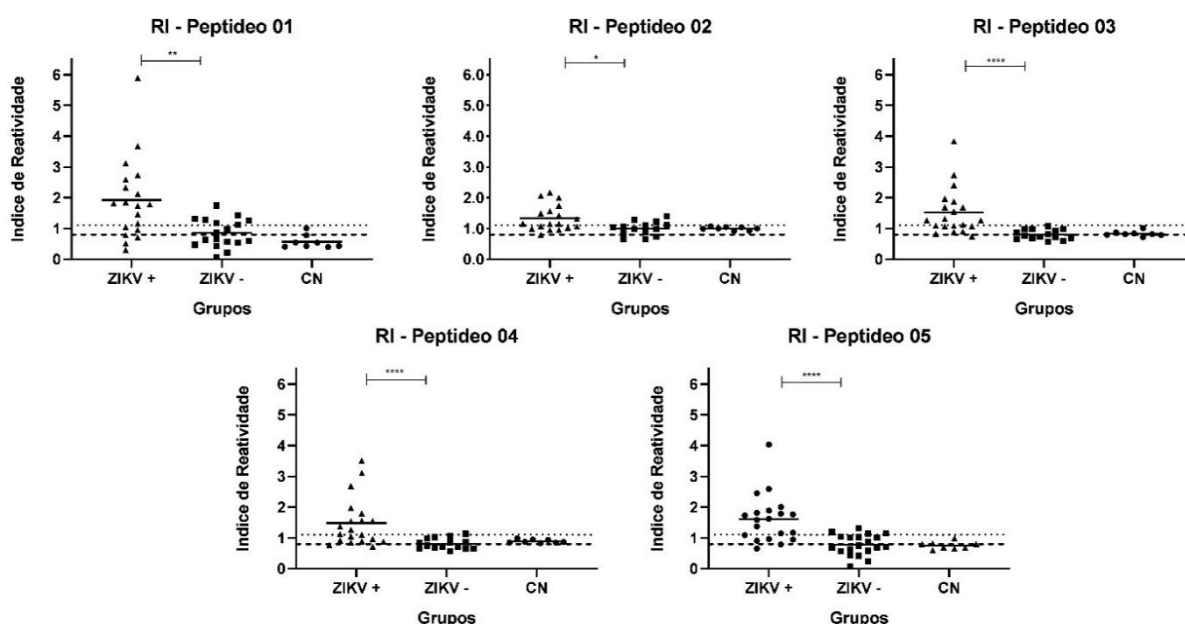


FONTE: o autor.

LEGENDA: Reatividade dos peptídeos sintéticos 01, 02, 03, 04 e 05 perante ao pool de soros ZIKV+. As linhas pontilhadas representam o valor de corte de reatividade, sendo $>1,1$ reativos ao teste realizado (teste Tukey $p < 0,05$).

Obtendo uma reatividade promissora frente ao pool de amostras ZIKV+, partimos para os testes utilizando um painel amostral maior de soro humano positivo para ZIKV ($n=20$) para determinar a capacidade de reconhecimento de anticorpos IgG presente nas amostras de soro com os peptídeos usando o mesmo teste de ELISA indireto. De um total de 20 soros conhecidamente positivos para ZIKV+ foi detectado reatividade ($RI > 1,1$) de 13 amostras para Pep 01 (65%), 12 para Pep 02 (66%) (o painel de soros utilizados no peptídeos 2 foi de $n = 18$), 12 para Pep 03 (60%), 12 para Pep 04 (60%) e 14 para Pep 05 (70%). As demais amostras não incluídas permaneceram sem reatividade ($RI < 0,8$) ou com reatividade indeterminada ($0,8 < RI < 1,1$). Nesse mesmo teste foi empregado um painel de soros negativos para ZIKV ($n = 20$) para os peptídeos 1 e 5; e ($n = 15$) para os peptídeos 2, 3 e 4). Nossos dados indicaram 7 amostras de soro reativas para Pep 01 (35%), 5 para Pep 02 (33,3%), 0 para Pep 03, 1 para Pep 04 (6,6%) e 4 para Pep 05 (26%). Dados de densidade óptica incluídos no Anexo IV.

Figura 6 – Reatividade dos peptídeos frente a um painel de soro ZIKV+ e ZIKV-.



FONTE: o autor.

LEGENDA: Reatividade dos peptídeos frente a um painel de soros ZIKV + e ZIKV-. A significância apresentada pelo peptídeo foi de $P < 0,002$. A linha pontilhada indica que valores acima são considerados reativos ($RI > 1,1$), a linha tracejada indica a não reatividade daqueles que estão abaixo ($RI < 0,8$). O peptídeo 2 obteve um p -value $< 0,02$. Os demais peptídeos obtiveram uma diferença significativa maior, com $P < 0,0001$ (teste Tukey $p < 0,05$).

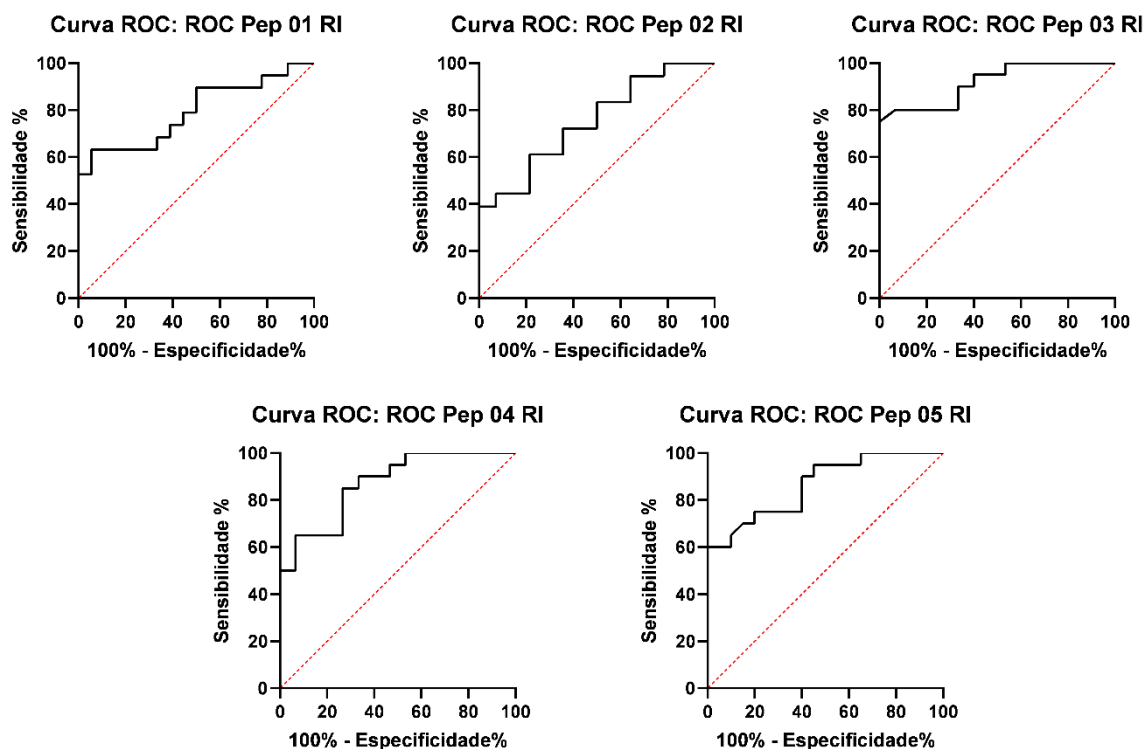
A relação entre sensibilidade (verdadeiros positivos) e especificidade (falsos positivos) é observado através da padronização do procedimento experimental pela curva ROC, que indica a capacidade de discriminação do teste e é analisada a partir da área formada sob a curva (AUC). De acordo com os valores de AUC descrito por Hosmer e colaboradores (2013) os peptídeos 1 e 2 demonstraram, um poder discriminativo aceitável com AUC de 79,24% e 75% respectivamente, os peptídeos 4 com 87% e 5 com 86,38% tiveram uma discriminação muito boa, notavelmente o peptídeo 3 apresentou uma discriminação excelente com uma área sob a curva de 91,83%.

Quadro 3 – Poder discriminatório testes ELISA's com painel de soros humanos.

Peptídeo	Especificidade	Sensibilidade	Área sob a Curva	Discriminação
1	65%	70%	79,24%	Aceitável
2	50%	77,7%	75%	Aceitável
3	93,9%	80%	91,83%	Excelente
4	80%	65%	87%	Muito Bom
5	60%	75%	86,38%	Muito Bom

FONTE: o autor.

Figura 7 – Poder discriminativo do teste representado por meio da curva ROC.



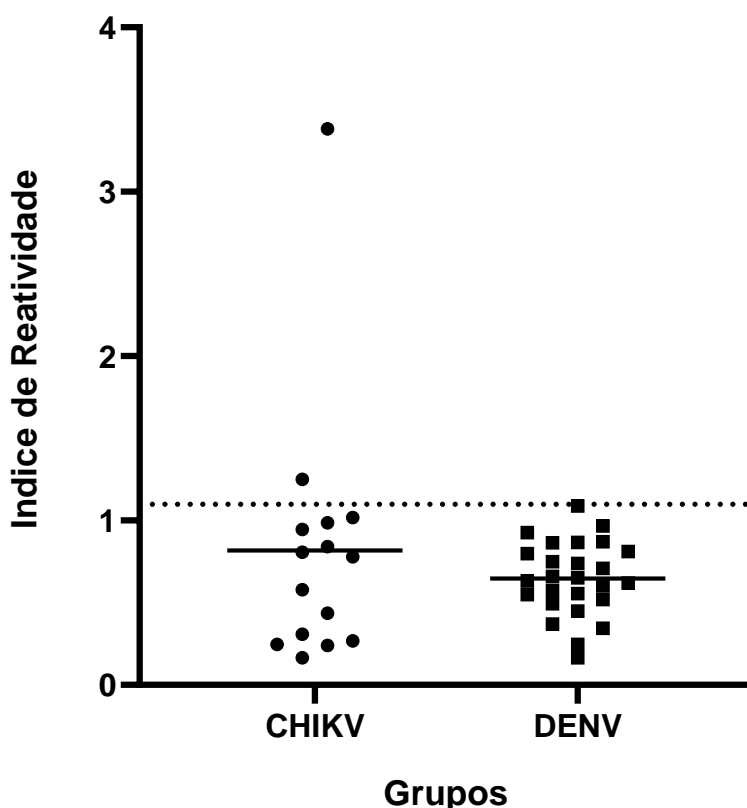
FONTE: o autor.

LEGENDA: Poder discriminativo do teste representado por meio da curva ROC: Quanto maior o poder discriminativo entre soros positivos e negativos mais a curva se aproxima do canto superior esquerdo, ou seja, mais a área sob a curva se aproxima de 100%. Fonte: o autor.

6.3 REATIVIDADE CRUZADA DE PEP 03 COM AMOSTRAS DE SORO PCR POSITIVAS PARA CHIKV E DENV

Tendo o peptídeo 3 demonstrado maior poder de acurácia em nossos testes (área sob a curva de 91,83%), ele foi avaliado quanto a sua reação cruzada com amostras de soros de pacientes positivas para outras arboviruses de importância clínica como DENV e CHIKV. Foram utilizadas 26 amostras PCR positivo para DENV e 15 amostras PCR positivas para CHIKV. Dentre essas, 13,33% (2/15) das amostras de CHIKV foram consideradas positivas para Pep 03. Já para DENV, nenhuma das amostras (0/26) foram consideradas positivas para Pep 03.

Figura 8 – Reatividade cruzada de Pep 03 com amostras clínicas PCR positivas para CHIKV e DENV.



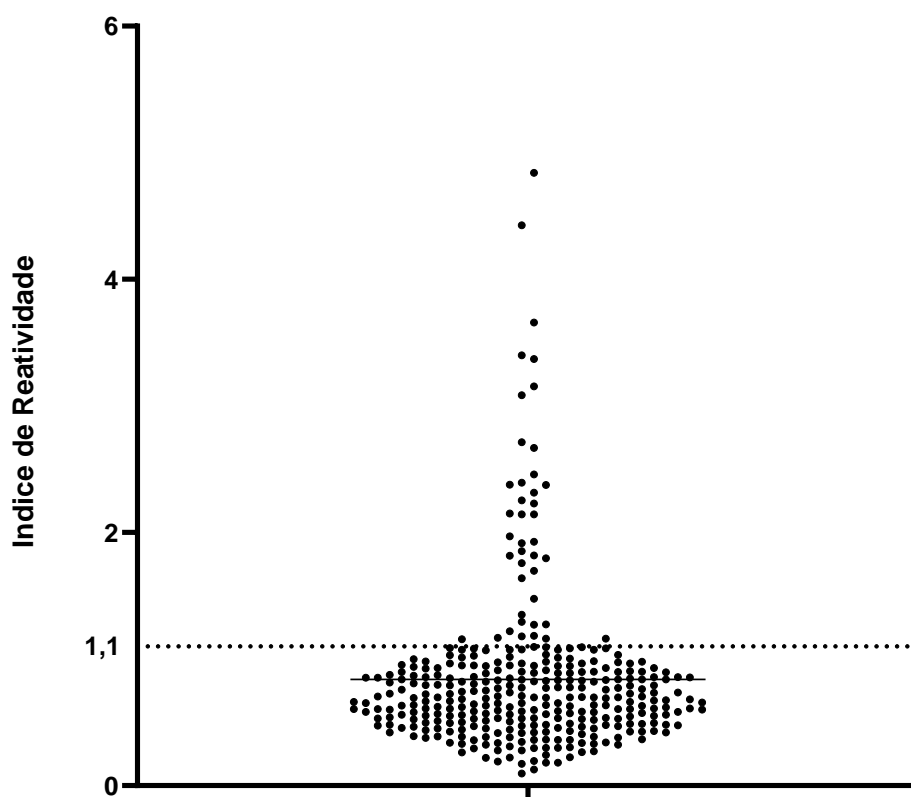
FONTE: o autor.

LEGENDA: Reatividade cruzada de Pep 03 com amostras PCR positivas para CHIKV e DENV. 13,33% e nenhuma das amostras PCR positivas para CHIKV e DENV respectivamente foram consideradas positivas para Pep 03.

6.4 SOROREATIVIDADE DE AMOSTRAS DO SUL DE MINAS GERAIS (MINAS GERAIS)

Uma análise de sororeatividade para Pep03 foi feita utilizando 329 amostras de soro de indivíduos coletadas em 2020 no sul de Minas Gerais. Os soros, foram submetidos ao teste ELISA com Pep 3 para detecção de anticorpos IgG. O índice de reatividade foi calculado conforme descrito anteriormente e aqueles que permaneceram acima de 1,1 foram considerados positivos. Cerca de 12,46% (41/329) das amostras foram consideradas positivas para Pep3. É importante considerar que cerca de 5 amostras (13,33%) podem estar em um contexto de reatividade cruzada para CHIKV conforme avaliadas anteriormente.

Figura 9 – Análise de soropositividade em cidades do sul de Minas Gerais.



FONTE: o autor.

LEGENDA: Reatividade de 329 amostras de soro em um teste ELISA utilizando Pep 03. 12,46% de todas as amostras foram consideradas positivas para ZIKV.

O kit de diagnóstico ELISA indireto comercial EUROIMMUM para detecção de anticorpos IgG anti ZIKV foi utilizado, conforme especificações do fabricante, para avaliação da positividade das amostras reativas para Pep 03 (dados disponíveis no Anexo V). Apenas duas amostras da análise (2/41) foram consideradas também positivas no kit EUROIMMUN. Os soros PCR positivos para DENV e CHIKV também foram incluídos no ensaio para caracterização das amostras e duas amostras de DENV e uma de CHIKV foram consideradas positivas (Anexo III).

6.5 PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS LINEARES DE CÉLULAS B

Considerando a detecção de anticorpos contra os peptídeos utilizados nesse estudo consideramos a possibilidade de esses serem também epítopos previstos para células B. Tendo em vista a baixa eficácia de predição de epítopos para células B, utilizamos três métodos de predição diferente e comparamos com as sequencias peptídicas utilizadas nesse trabalho. Ao

final das análises, 65 epítomos foram preditos para a proteína E, 15 para proteína C e 13 para proteína prM (Tabela 2).

Tabela 1 – Quantidade de epítomos preditos por 3 diferentes métodos disponíveis.

	Bepi Predi	ABC Predi	Emini Suface	Total
Envelope	7	52	6	65
Capsídeo	2	13	0	15
pré- Membrana	1	11	1	13

FONTE: o autor.

De todos os epítomos de células B previstos, apenas 2 apresentaram certo grau de homologia com os peptídeos de células T estudados neste trabalho, sendo eles MMLELDPPFGDSYIVI (método de predição: ABC Predi) e AIKPSLGLINRWGSVKGKKEAME (método de predição: Bepi Predi). Esse epítomos possuem semelhança com Pep 01 (envelope – MMLELDPPF) e Pep 03 (capsídeo - PSLGLINRWGSVGGK) respectivamente.

6.6 CONSTRUÇÃO DA PROTEÍNA QUIMÉRICA MULTI-EPÍTOPO

Para a construção da proteína quimérica, os epítomos foram dispostos seguindo a ordem de seu ID (Quadro 2), sendo o primeiro peptídeo 1 do envelope e seguindo até o peptídeo 5 de pré-membrana. A construção se deu com a união desses epítomos da seguinte maneira:

Quimera 1- Epítomos em sequência, sem a união por ligantes.

Quimera 2- Epítomos em cópia única conectados por ligantes flexíveis.

Quimera 3- Epítomos com duas cópias conectados por ligantes flexíveis.

Quimera 4- Epítomos em cópia única conectados por ligantes rígidos.

Quimera 5- Epítomos com duas cópias conectados por ligantes rígidos.

Em posse das sequências em formato FASTA das proteínas, as propriedades físico-químicas foram analisadas utilizando a ferramenta ProtParam no servidor ExPASy. Propriedades físico-químicas de proteínas são críticas para a sustentabilidade, eficiência e estabilidade em um sistema de expressão em organismos biológicos (Garg *et al.*, 2016). As predições básicas como peso molecular, meia vida e estabilidade da proteína (consideradas estáveis aquelas que apresentarem valores < 40) foram analisadas considerando como sistema biológico *Escherichia coli* (E. coli), além disso foi considerada o perfil de solubilidade da

proteína utilizando a ferramenta SoluProt, onde resultados $> 0,5$ indicam alta solubilidade proteica (Hebditch *et al.*, 2017) e os resultados estão demonstrados na Tabela 2.

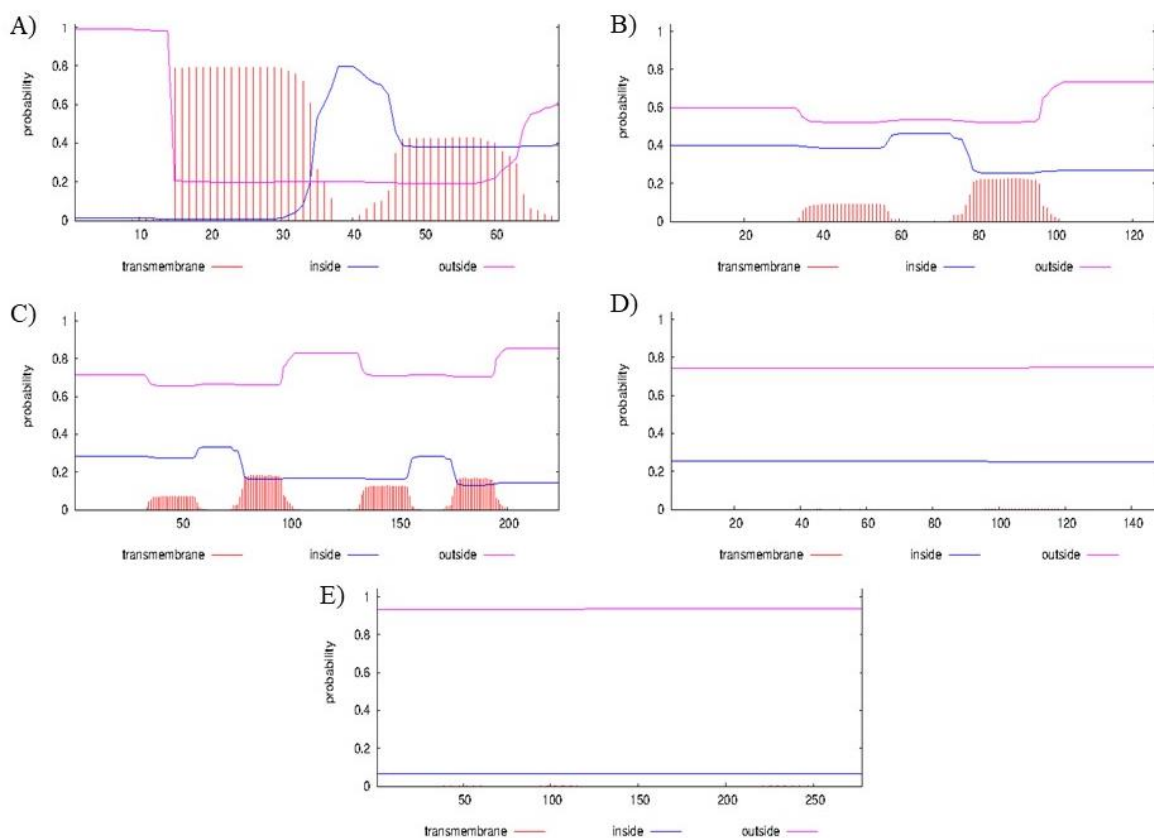
Tabela 2 – Análise físico das construções de proteínas quiméricas.

Proteínas	Quantidade de aminoácidos	Peso Molecular (kDa)	Tempo de meia vida (E. coli)	Índice de instabilidade	Solubilidade
Químera 1	69aa	7,4	> 10 horas	35,72	0,556
Químera 2	127aa	12,3	> 10 horas	20,15	0,584
Químera 3	226aa	21,7	> 10 horas	21,84	0,513
Químera 4	151aa	14,9	> 10 horas	16,16	0,597
Químera 5	280aa	27,6	> 10 horas	17,43	0,546

FONTE: o autor.

Devido às características hidrofóbicas de alguns peptídeos, existe a possibilidade de as proteínas apresentarem uma tendência de interação com a membrana dificultando a recuperação delas quando expressas no sistema procaríoto. Para avaliar essa tendência de interação, utilizamos o servidor DeepTMHMM (Hallgren *et al.*, 2022).

Figura 10 – Análise da tendência de interação das proteínas quiméricas com a membrana.



FONTE: o autor.

LEGENDA: Análise da tendência de interação das proteínas quiméricas com a membrana determinada pelo software DeepTMHMM: Os gráficos representam a probabilidade (eixo y) de diferentes resíduos ou aminoácidos (eixo x) de uma proteína estar presente: dentro da célula (inside), fora da célula (outside) ou de estar na membrana (transmembrane). De acordo com o gráfico apenas a proteína descrita em A apresenta características indesejáveis de ser localizada em membrana. A) Quimera 1, B) Quimera 2, C) Quimera 3, D) Quimera 4 e E) Quimera 5.

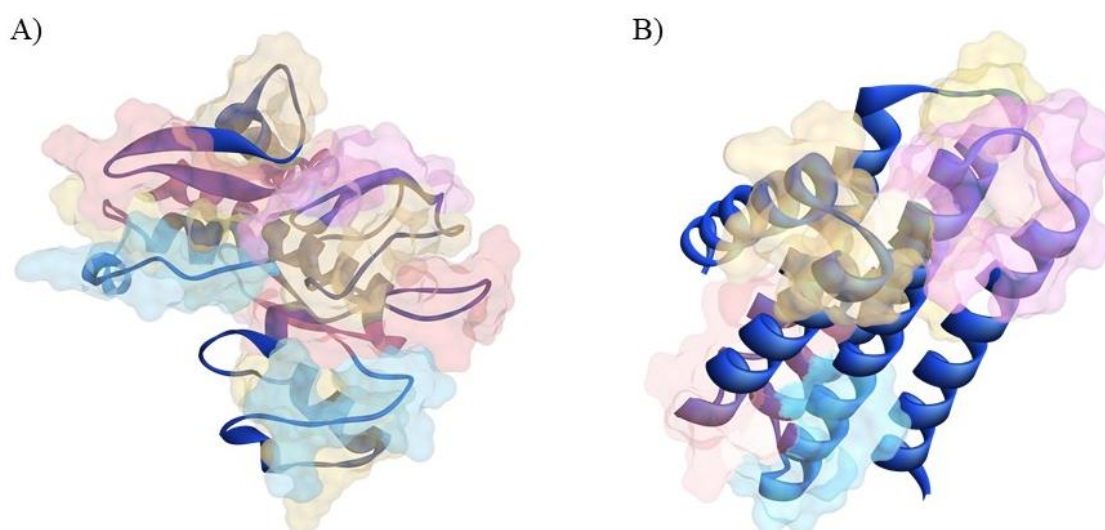
De modo geral, todas as possíveis construções de proteínas foram preditas como estáveis e solúveis, no entanto, com base nas análises descritas, a Quimera 4 (rígida com uma cópia dos epítomos) e Quimera 3 (flexível com 2 cópias dos epítomos) apresentaram melhores apontamentos. A Quimera 1 (sem ligante) foi excluída devido a maior probabilidade de ser transmembranar, a Quimera 5 (ligantes rígidos com duas cópias dos epítomos) possui uma complexidade maior em comparação com as demais opções, dificultando a síntese de seu DNA, portanto também foi excluída das análises a jusante. Por fim, a Quimera 2 (flexível com uma cópia dos epítomos) tem maior propensão à membrana do que a Quimera 3, sendo esse o motivo de escolha da última.

As análises de antigenicidade (Threshold 0,5) utilizando o servidor Vaxijen, amplamente utilizado na previsão de antígenos imunológico (Doytchinova; Flower, 2007) e alergenicidade utilizando o servidor AllerCatPro (Nguyen *et al.*, 2022) seguiram apenas com

as duas proteínas selecionadas. A quimera flexível foi considerada antigênica com uma pontuação de 0,9273 e não alergênica enquanto a quimera rígida também foi considerada não alergênica e provavelmente antigênica com uma pontuação de 0,7322.

As estruturas 3D das proteínas foram desenvolvidas utilizando o software AlphaFold (Figura 8) e a qualidade da estrutura tridimensional foi avaliada por meio da classificação de Ramachandram no servidor MolProbity (Figura 9) (Chen *et al.*, 2010). A classificação de Ramachandram analisa os ângulos formados entre os aminoácidos e utiliza percentis para avaliar a qualidade estrutural da proteína com base em bancos de dados de estruturas proteicas já conhecidas. Os dados gerados são analisados em função dos valores de MolProbity Score que combina diferentes fatores de validação estrutural, dentre eles: proximidade atômica, ângulo de ligação entre cadeias laterais (phi e psi) e suas rotações, dentre outras. Valores de percentis iguais a 100 indicam uma excelente qualidade estrutural, percentis de 90-99 representam ainda uma excelente qualidade estrutural, mas com alguns pequenos ajustes de colisões atômicas, percentil de 50-90 representam uma qualidade estrutural boa, porém com algumas áreas de melhoria, percentil de 10-50 representam estruturas com qualidade média e percentil abaixo de 10 representa estruturas de baixa qualidade (Chen *et al.*, 2010).

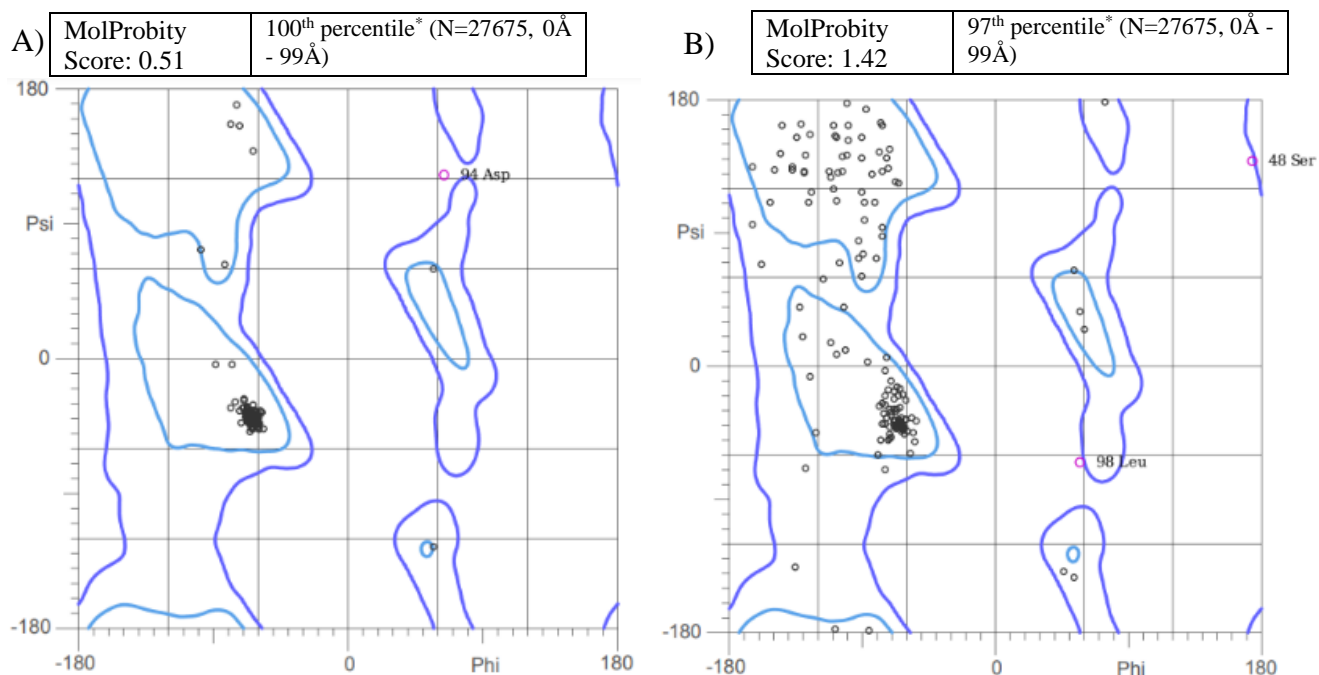
Figura 11 – Estrutura tridimensional de proteínas quiméricas com melhores apontamentos.



FONTE: o autor.

LEGENDA: Estrutura tridimensional de proteínas quiméricas com melhores apontamentos, epítomos estão destacados. A) Quimera Flexível. B) Quimera Rígida.

Figura 12 – Classificação Ramachandram das estruturas tridimensionais previstas.



FONTE: o autor.

LEGENDA: Classificação Ramachandram das estruturas tridimensionais previstas: A avaliação da qualidade estrutural das proteínas indica que ambas as proteínas apresentam alta qualidade estrutural. Resíduos de aminoácidos em conformações favorecidas se encontram nas regiões azul claro e as regiões permitidas estão representadas pela área em azul escuro. Resíduos fora dessas regiões indicam problemas conformacionais. A) Quimera rígida: 98% (147/150) resíduos estão em regiões favoráveis (conformações estáveis e prováveis) e 99,3% (149/150) estão em regiões permitidas (aceitáveis para a estrutura proteica). B) Quimera flexível: 92,4% (205/224) dos resíduos se encontram em regiões favoráveis e 99,1% (222/224) se encontram em regiões permitidas.

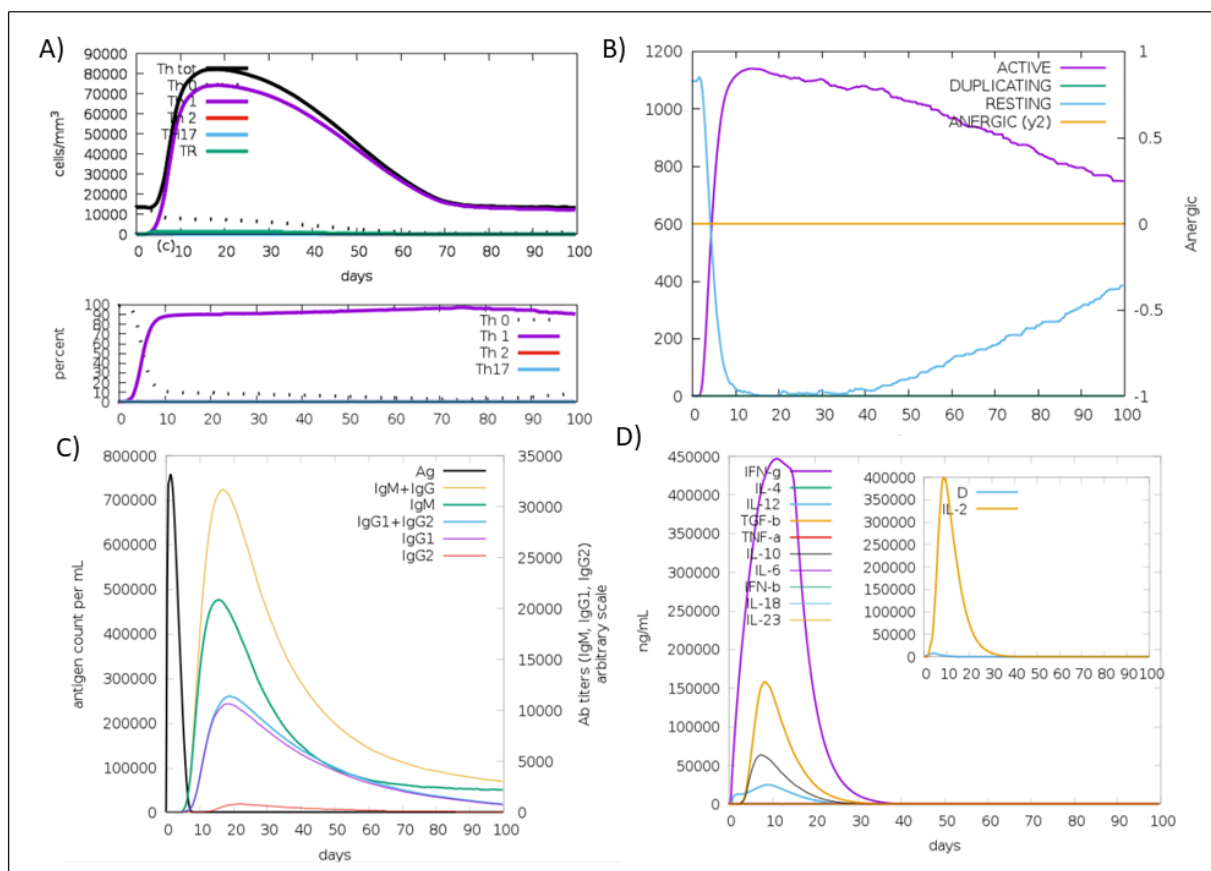
De acordo com a classificação obtida, a proteína quimérica rígida obteve um Score (métrica geral de qualidade) de 0.51 colocando-a no 100° percentil, indicando uma qualidade estrutural excelente com quase todos os resíduos de aminoácidos em conformações favorecidas e permitidas. A quimera flexível obteve um Score maior do que a quimera rígida com um valor de 1.42 indicando uma qualidade estrutural ligeiramente inferior, no entanto encontra-se ainda dentro de uma excelente faixa de qualidade dentro de 97° percentil. De modo geral, esses dados sugerem que a proteína quimérica rígida desenhada preserva melhor sua geometria estrutural e as interações atômicas, embora ambas apresentem qualidade estrutural.

6.7 PREDIÇÃO IN-SÍLICO DE UMA RESPOSTA IMUNOLÓGICA FRENTE A IMUNIZAÇÃO COM PROTEÍNAS QUIMÉRICAS

O software disponível no servidor C-ImmSim para predição de uma resposta imune utiliza técnica de aprendizado de máquinas baseada em gânglios linfáticos, timo e medula óssea para prever a resposta imunológica frente a interação de peptídeos e HLA humano e,

por isso, é um bom aliado em estudos de modelo *in silico* para validação de construção (Rapin *et al.*, 2010). As proteínas foram submetidas isoladamente como uma imunização em dose única de modo a avaliar se os peptídeos mantiveram suas características imunogênicas após o desenho das quimeras. A figura 10 e 11 mostram os resultados obtidos para quimera rígida e quimera flexível respectivamente.

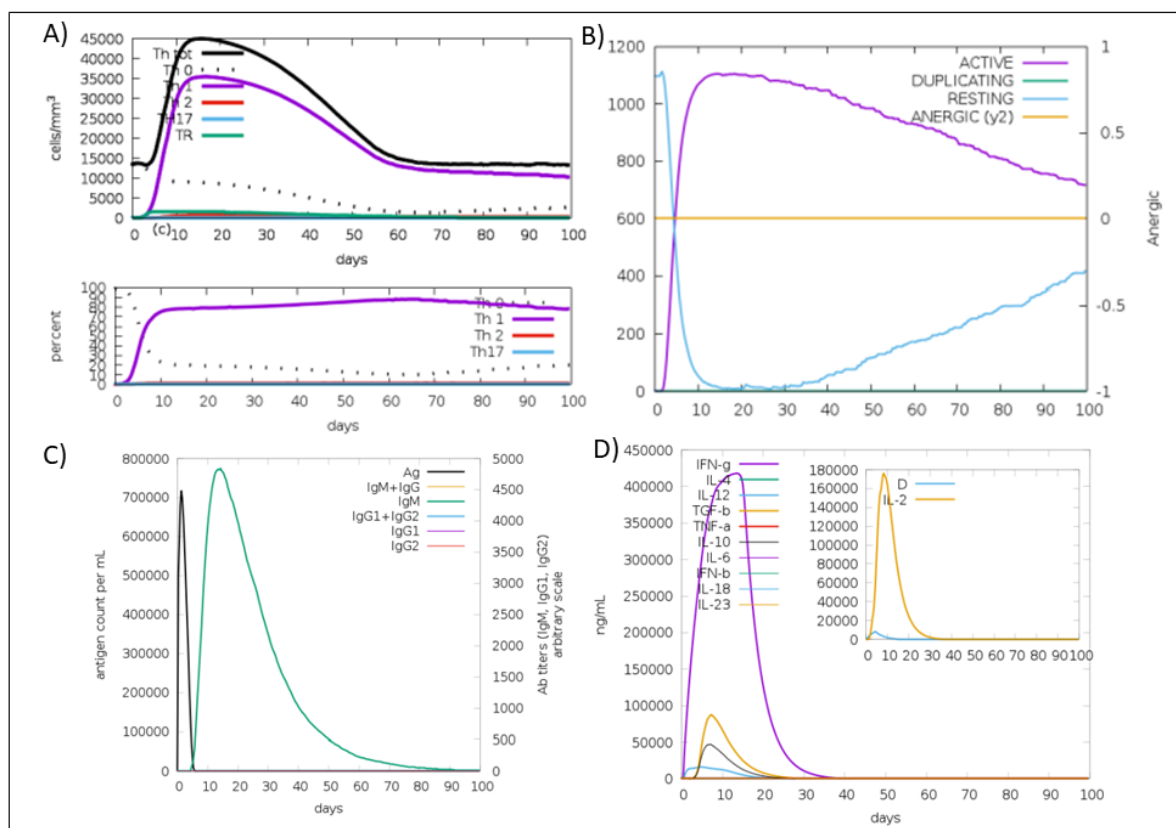
Figura 13 – Perfil de resposta imunológica para interação da proteína quimérica rígida com o hospedeiro.



FONTE: o autor.

LEGENDA: Perfil de resposta imunológica para interação da proteína quimérica rígida com o hospedeiro. A) Dinâmica de respostas com subtipo celular de células T auxiliares (Th) com predominância de células do tipo Th1. B) Ativação de células T citotóxicas. C) Dinâmica da concentração de antígenos e anticorpos. D) Curso do perfil de indução de citocinas pró e anti-inflamatórias.

Figura 14 – Perfil de resposta imunológica para interação da proteína quimérica flexível com o hospedeiro.



FONTE: o autor.

LEGENDA: Perfil de resposta imunológica para interação da proteína quimérica rígida com o hospedeiro. A) Dinâmica de respostas com subtipo celular de células T auxiliares (Th) com predominância de células do tipo Th1. B) Ativação de células T citotóxicas. C) Dinâmica da concentração de antígenos e anticorpos. D) Curso do perfil de indução de citocinas pró e anti-inflamatórias.

Os modelos preditivos mostraram que proteínas induziram um aumento significativo de resposta celular do tipo T Helper (Th) (observada em A) com quimera rígida exibindo um título quase duas vezes maior de célula Th totais. Em contraste o título de células T citotóxicas (B) foi semelhante para ambas, mas significativamente inferior quando comparada às células Th. A quantidade de antígeno no hospedeiro decresce (C) a medida que o título de células T aumenta, indicando o controle da infecção mediada por uma resposta imunológica. Além disso nos primeiros dias de sensibilização ao antígeno, há um aumento expressivo de anticorpos do tipo IgM para ambas as proteínas condizente com o curso habitual de uma infecção, no entanto, apenas a quimera rígida foi capaz de induzir o desenvolvimento de anticorpos do tipo IgG. O aumento de citocinas pró-inflamatórias indicado nas figuras (D) com um pico de IFN- γ é fundamental para a ativação de células efetoras durante uma resposta antiviral, o título ligeiramente superior observado na quimera rígida é condizente com o nível

de resposta celular, bem como o aumento expressivo da citocina IL-2 responsável pela expansão clonal.

7 DISCUSSÃO

A infecção causada por ZIKV e a semelhança clínica que apresenta com outras infecções virais, incluindo arboviroses, dificulta seu correto diagnóstico, manejo clínico e avaliação epidemiológica, tornando-se uma significativa ameaça à saúde pública. Em regiões subtropicais e tropicais onde casos de ZIKV ocorrem concomitantemente às outras arboviroses, cujo vetor comum *Aedes aegypti* é prevalente, o diagnóstico clínico é difícil e depende de confirmação laboratorial (Heinz; Stiasny, 2017). Atualmente, no Brasil, ocorre a co-circulação de DENV, ZIKV e CHIKV com uma grave epidemia de dengue que até agora registrou um número elevado de mortes. De acordo com o Ministério da Saúde, o número de casos prováveis de ZIKV é baixo, no entanto com o recente surto de dengue o sistema de saúde pode estar sobrecarregado e, portanto, nem todas as amostras estejam sendo testadas para as outras arboviroses o que implica em prováveis subnotificações de ZIKV (Brasil, 2025).

Vários estudos vêm analisando as performances de kits comerciais disponíveis, no entanto resultados controversos sugerem que novos ensaios precisam ser feitos para inserção de um teste com uma boa acurácia que alcance diferentes regiões onde o vírus circula (Granger *et al.*, 2017; Kadkhoda; Gretchen; Racano, 2017; L’Huillier *et al.*, 2017; Premkumar *et al.*, 2018; Safronetz *et al.*, 2017). Um estudo publicado pelo CDC (Safronetz *et al.*, 2017), buscou avaliar a relação de sensibilidade e especificidade de 5 testes disponíveis comercialmente, que possuem valores > 90% de acordo com os fabricantes (Euroimmun – IgM e IgG, InBios, Abcam e Novatec) com confirmação de resultado por PRNT. A maioria dos imunoenaios apresentou baixa sensibilidade que por sua vez levará a resultados falso-negativos, os ensaios IgM Euroimmun demonstraram uma sensibilidade de 37% com valor aumentado para 82% quando combinados ensaio de IgM e IgG. L’Huillier e colaboradores (2017) encontraram resultados semelhantes com 83% de sensibilidade em comparação com PRNT quando combinados os ensaios IgM e IgG, embora esse valor tenha caído drasticamente (39,5%) em comparação a um MAC-ELISA. Esses resultados controversos e com discriminação diferente do que sugerem os fabricantes indicam que novos testes precisam ser feitos para inserção de um teste com uma boa acurácia que alcance diferentes regiões onde o vírus circula.

Além da dificuldade de diagnóstico clínico, a semelhança estrutural com outros *Orthoflavivirus* e sua reatividade cruzada afeta a confiabilidade de diagnósticos laboratoriais que é influenciada também pela diversidade filogenética do ZIKV que afetam o nível de

viremia no hospedeiro e a ativação da resposta imunológica, contribuindo para a dificuldade de detecção do vírus (Mancini *et al.*, 2023).

Para superar os desafios de variabilidade genética e reatividade cruzada, a vacinologia reversa tem contribuído com a detecção de determinantes antigênicos por meio da imunoinformática. Todos os peptídeos sintéticos utilizados no presente trabalho foram desenhados e identificados com base nos dados descritos por Salvador e colaboradores (2019). Usando 9 etapas de abordagens computacionais, o estudo buscou identificar potenciais epítomos imunogênicos de células T, presentes em proteínas estruturais e não estruturais de ZIKV. Ao final do trabalho, foram identificados 14 epítomos que carregam as características desejáveis de possuir baixa similaridade com outros *Orthoflavivírus*, alta taxa de conservação entre as diversas cepas de ZIKV e alta taxa de cobertura populacional com base nos alelos de HLA que esses epítomos podem interagir sendo, portanto, bons candidatos ao desenvolvimento de teste de diagnósticos para ZIKV.

Dos 14 epítomos imunorreativos identificados no trabalho, 5 deles, pertencentes a proteínas estruturais do vírus (Pep01, Pep02, Pep03, Pep04 e Pep05) foram avaliados no presente trabalho. A escolha desses 5 peptídeos levou em consideração suas localizações e exposições nas proteínas virais, uma vez que a facilidade de reconhecimento de anticorpos e receptores celulares é importante na geração de uma resposta imunológica e, conseqüentemente, na aplicabilidade de um diagnóstico sorológico (Heinz; Stiasny, 2017).

Os 5 peptídeos foram avaliados frente à capacidade de reconhecimento de anticorpos IgG induzidos por uma infecção prévia à ZIKV devido a maior janela de detecção. Anticorpos IgM direcionados ao ZIKV geralmente se desenvolvem alguns dias após o início dos sintomas e permanecem detectáveis por cerca 12 semanas, embora ainda faltem dados sobre sua duração no organismo (Griffin *et al.*, 2019).

Todos os peptídeos apresentaram reatividade significativa de anticorpos de tipo IgG (Figura 6) em amostras de soros humanas ZIKV + clinicamente relevantes, provenientes de pacientes sintomáticos e confirmadas por ensaios sorológicos e moleculares, as informações referentes aos dados disponíveis das amostras estão disponíveis no anexo II. Além disso, também foi observada uma reatividade significativa de anticorpos do tipo IgG murino para todos os peptídeos, com exceção do peptídeo 5 (Figura 4). Camundongos e humanos apresentam complexos de histocompatibilidade (MHC) diferentes, e a ligação de peptídeos a essas regiões altamente polimórficas são responsáveis por ativar uma resposta imune adaptativa ao serem apresentados aos linfócitos T. A identificação de anticorpos anti-peptídeos em camundongos e humanos, espécies com complexos MHC diferentes, indicam

um promissor efeito imunogênico desses peptídeos em diferentes populações (Allcock; Martin; Price, 2000). Fortalecendo os resultados *in silico* obtidos pelo nosso grupo (Salvador *et al.*, 2019), em que essas sequências de aminoácidos foram consideradas altamente imunogênicas.

A padronização do procedimento experimental determinado por meio da curva ROC (Figura 7), indica um elevado poder discriminatório entre sensibilidade e especificidade no teste ELISA. Os peptídeos 4, 5 e especialmente para o peptídeo 3, foram considerados promissores para o desenvolvimento de um teste de diagnóstico para ZIKV, embora Pep01 e Pep02 tenham demonstrado um poder discriminatório aceitável. É importante ressaltar que os peptídeos de melhores reatividades são epítomos das proteínas do capsídeo e da proteína pré-membrana e a grande maioria dos estudos atuais de vacinas contra ZIKV se concentram na proteína E, uma vez que esta proteína é, na maioria das vezes, alvo desses anticorpos neutralizantes (Bollman *et al.*, 2023; Shan; Xie; Shi, 2018). Nossos resultados evidenciam a produção de anticorpos direcionados a outras proteínas estruturais do vírus e estudos subsequentes devem ser conduzidos para demonstrar a capacidade protetiva de uma resposta imune humoral ou celular direcionada contra esses epítomos.

Considerando o desempenho excelente do Pep 03 na detecção de anticorpos IgG, buscamos avaliar sua especificidade utilizando amostras de pacientes com infecção por arboviroses cocirculantes confirmada por meio de diagnóstico molecular, devido ao potencial de reatividade cruzadas de anticorpos induzidos por essas infecções em áreas endêmicas (Priyamvada *et al.*, 2016). Foram avaliadas 41 amostras sorológicas totais PCR positivas para DENV ou CHIKV, onde duas apresentaram reatividade para Pep 03, resultando em uma especificidade de 95,12%. Ambas as amostras positivas são amostras PCR positivas para CHIKV. A presença desses anticorpos nessas amostras pode configurar um contexto de reatividade cruzada, embora isso não exclua a possibilidade de uma infecção anterior a ZIKV.

Desde o grande surto de ZIKV em 2015 e 2016, houve uma redução significativa do número de casos suspeitos e confirmados de ZIKV, especialmente em regiões com cocirculação de arboviroses. É possível inferir, que nesse contexto e devido a característica predominante de casos assintomáticos, o número de casos de infecção causada por ZIKV possam estar subnotificados. Portanto, após avaliação e observação das características de especificidade e sensibilidade favoráveis, o Pep03 foi utilizado para estudos de soropositividade, em cidades do sul de Minas Gerais.

Para a análise de sororeatividade, foram usados um número amostral de 329 soros de indivíduos das cidades de Alfenas, Varginha e Poços de Caldas, coletados em 2020. Nosso

ensaio resultou em 41 amostras reativas para Pep03, apresentado uma soropositividade de ZIKV de 12,46% em nossas amostras. Uma vez que Pep03 foi avaliado com amostras positivas para DENV e CHIKV, cerca de 13,33% dessas amostras (5-6) podem estar positivas em um contexto de reatividade cruzada. Essas mesmas amostras foram incluídas no kit comercial EUROIMMUN Anti-ZIKV IgG ELISA e do total das 41 amostras, apenas 2 foram consideradas positivas nesse teste.

A grande diferença entre os resultados obtidos entre os ELISAs Pep03 e EUROIMMUN pode ser atribuída a vários fatores como o as proteínas desses antígenos e cinética de anticorpos nos indivíduos. Embora seja presumido que a infecção causada por ZIKV promova uma imunidade duradoura, estudos avaliando a duração de anticorpos contra o vírus sugerem que essa resposta ainda não está clara (Langerak *et al.*, 2021; Lustig *et al.*, 2017; Moreira-Soto *et al.*, 2020; Pasquier *et al.*, 2018). Foi observado um declínio rápido de anticorpos IgG anti-NS1 em indivíduos infectados por ZIKV em Salvador-BA durante o surto de 2016. Nesse trabalho, foi demonstrado que a soropositividade no ano do estudo foi 59% e diminuiu para 38,6% em 1,5-2 anos depois, além disso, a reatividade do kit anti-NS1 para indivíduos que permaneceram IgG positivos para ZIKV teve uma redução significativa indo de uma proporção de 4,4 para 1,6 nesse intervalo de tempo (Moreira-Soto *et al.*, 2020). Lustig e colaboradores (2017) também demonstraram reatividade de IgG anti-NS1 significativamente menor em viajantes infectados por ZIKV 61 dias após o início dos sintomas.

Estudos avaliando a diminuição dos títulos de anticorpos em infecções causadas por ZIKV, normalmente avaliam anticorpos anti NS1 com confirmação de positividade por soroneutralização. Pacientes de Suriname com infecções sintomáticas confirmadas durante o surto de 2016, foram avaliados 3 anos depois quanto a soroprevalência de anticorpos anti-NS1 direcionados ao vírus. Os resultados demonstraram que 63,3% permaneceram positivos em teste ELISA anti-NS1 e 59,2% em comparação com o ensaio de neutralização. Entretanto, o resultado de ambos os testes não foram totalmente correlacionados com 58,1% dos participantes positivos no teste ELISA, apresentando resultados positivos no ensaio de neutralização (Langerak *et al.*, 2021). Fica evidente, a dificuldade de uma caracterização sorológica de amostras positivas para ZIKV e a necessidade de uma avaliação combinada com mais de um método de detecção.

As amostras consideradas positivas para Pep03 nesse trabalho serão, futuramente, avaliadas em ensaios de soroneutralização, embora já existam dados na literatura que a diminuição de anticorpos detectáveis por kits anti-NS1 é seguida por uma diminuição dos títulos de anticorpos neutralizantes (Henderson *et al.*, 2020; Langerak *et al.*, 2021).

Evidências da diminuição da soroprevalência e anticorpos neutralizantes em indivíduos após o surto na Polinésia Francesa e Fiji, foram documentadas por Henderson e colaboradores (2020), onde foi levantada a hipótese de que uma infecção anterior a DENV pode influenciar negativamente a duração da resposta imune anti-ZIKV, cenário comum da região proveniente de nossas amostras.

É importante citar ainda, que o trabalho publicado por Henderson (2020) foi o único encontrado em nossa revisão que fez uma extensa análise de soroprevalência utilizando ensaios sorológicos baseados em proteínas estruturais, nesse caso, o domínio III da proteína do envelope. Nosso trabalho é, portanto, um dos primeiros a trazer *insights* sobre soropositividade avaliando anticorpos contra uma determinada região da proteína do capsídeo de ZIKV. Infelizmente, um dos grandes e mais significativos desafios no desenvolvimento de testes de diagnósticos sorológicos para ZIKV é a falta de acesso a biobancos com amostras clínicas bem caracterizadas para validação (Goncalves *et al.*, 2018). Portanto, análises mais abrangentes necessitarão de um maior número de amostras clinicamente relevantes e caracterizadas.

A produção de anticorpos decorrentes de uma infecção é coordenada por um perfil de respostas de linfócitos B. Os 5 peptídeos avaliados foram preditos com base em análise de linfócitos T e ainda assim exibiram reatividade significativa com anticorpos anti-ZIKV. Pensando nisso, de forma a confirmar uma possível predição desses epítomos como como epítomos de células B, foi realizada a predição utilizando algoritmos específicos para predição de células B. Apenas dois dos cinco peptídeos de células T avaliados nesse trabalho foram preditos com epítomos de células B pelos métodos utilizados. Os dois epítomos preditos para células T e B se referem ao Pep01 e Pep03, dos quais (em especial o segundo) tiveram bom poder de discriminação sugerindo regiões antigênicas e imunogênicas capazes de induzir respostas humorais e celulares. Essa discordância entre resultados *in-vitro* e *in-silico* pode ser atribuída às limitações dos algoritmos de predição para células B. Além disso, se um peptídeo de célula T está localizado em uma região exposta e acessível na proteína (característica de proteínas estruturais virais), ele pode coincidir com a área de reconhecimento de BCR.

Atualmente, extensos trabalhos publicados buscam a construção de subunidades proteicas utilizando ferramentas de imunoinformática (Antonelli *et al.*, 2022; Ganji *et al.*, 2024; Mittal *et al.*, 2020; Napoleão-Pêgo *et al.*, 2021; Prasasty *et al.*, 2019). MITTAL e colaboradores (2020) utilizaram epítomos estruturais das proteínas do envelope, capsídeo e membrana, além de adicionar também um epítomo não estrutural de ZIKV ao desenho de uma

proteína quimérica multi-epítopo. Por meio de modelagem molecular e análise computacional *in silico*, eles obtiveram uma vacina de subunidade com alta estabilidade e segurança. Nossos resultados *in vitro* utilizando peptídeos identificados por imunoinformática, reforçam o potencial dessas plataformas e, por esse motivo, desenvolvemos duas proteínas quiméricas multi-epítopos com epítopos de imunogenicidade validadas.

As duas quimeras construídas tiveram suas modelagens tridimensionais desenvolvidas de modo satisfatório com qualidade estrutural excelente. Além disso, elas foram desenvolvidas com o intuito de expressão em sistemas procariotos devido à facilidade de produção, menor custo e propensão de serem obtidas em maior quantidade. Trabalhos desenvolvendo e validando testes de diagnósticos para ZIKV com proteínas quiméricas expressas em sistemas procariotos demonstram altos níveis de sensibilidade e especificidade (Pereira *et al.*, 2024). Embora, antígenos produzidos em sistemas procariotos possam apresentar características favoráveis, a falta de modificações pós-traducionais em bactérias podem gerar proteínas com perfis antigênicos menos pronunciados (Rosano; Ceccarelli, 2014).

Pensando nisso, a simulação de uma resposta imunológica do hospedeiro frente às proteínas foi feita utilizando o software C-IMMSIM, um sistema muito utilizado para predições de respostas imunológicas (Rapin *et al.*, 2010), com validações em modelos *in silico* (Stolfi *et al.*, 2022) e *in vivo* (Ragone *et al.*, 2021). Para ambas as proteínas, observamos uma previsão de ativação da resposta imunológica com aumento expressivo de anticorpos do tipo IgM nos primeiros dias de sensibilização ao antígeno, condizente com os dados de infecção ao ZIKV disponíveis na literatura (Kerkhof *et al.*, 2020), embora para a quimera rígida o título de anticorpos seja ligeiramente maior, além de observarmos a presença de anticorpos do tipo IgG.

Nos primeiros dias de sensibilização ao antígeno, foi predito a produção de grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias e concomitante aumento de linfócitos T, com subtipo CD4⁺ mais acentuado que CD8⁺. Essa resposta já era esperada, uma vez que dos 5 epítopos utilizados na construção da proteína, apenas o Pep 01, foi predito como ligante ao HLA-I e, portanto, reconhecido por linfócitos do tipo CD8⁺. Adicionalmente, um estudo avaliando a resposta imunológica de mulheres com infecção aguda por ZIKV monitoraram a presença de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e detectaram células do tipo CD4⁺ específicas de ZIKV visando amplamente os epítopos de todo o genoma do vírus enquanto o tipo CD8⁺ tiveram um foco mais voltado para proteínas não estruturais (Tonnerre *et al.*, 2020).

Nossos resultados sugerem que as proteínas quiméricas desenvolvidas conservam os perfis de imunogenicidade previstos e validados para os peptídeos individuais. Portanto, se tornam materiais biotecnológicos promissores para aplicação no desenvolvimento de um teste de diagnóstico específico e sensível pra ZIKV.

8 CONCLUSÃO

Neste trabalho destacamos a relevância e impacto de estudos *in silico* na identificação de regiões potencialmente relevantes no contexto de doenças infecciosas. Exploramos o potencial imunogênico de cinco peptídeos identificados por imunoinformática e identificamos a presença de anticorpos do tipo IgG frente a esses epítomos diante de uma infecção natural por ZIKV. Nossos resultados indicam que os peptídeos são regiões promissoras demonstrando alta reatividade em amostras de soros ZIKV+ com destaque ao peptídeo 03 com discriminação excepcional. A alta reatividade de anticorpos IgG, indica que os peptídeos estruturais de ZIKV são imunogênicos e, portanto, promissores para o desenvolvimento de testes de diagnósticos sorológicos diferenciais para ZIKV.

Desenvolvemos duas proteínas quiméricas multi-epítomos com estruturas tridimensionais desenvolvidas de modo satisfatório, além de preservar as características imunogênicas dos peptídeos individuais, sendo, portanto, produtos promissores para melhora da acurácia em testes de diagnósticos.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. **Imunologia celular e molecular**. 9. ed. Rio de Janeiro: GEN Guanabara Koogan, 2019. 565 p. ISBN 9788535290745.
- AGRELLI, Almerinda et al. **ZIKA virus entry mechanisms in human cells**. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 69, p. 22–29, 2019.
- ALLCOCK, Richard J. N.; MARTIN, Annalise M.; PRICE, Patricia. **The mouse as a model for the effects of MHC genes on human disease**. *Immunology Today*, v. 21, n. 7, p. 328–332, 2000.
- ANDRADE, Daniela V.; HARRIS, Eva. **Recent advances in understanding the adaptive immune response to Zika virus and the effect of previous flavivirus exposure**. *Virus Research*, v. 254, p. 27–33, 2018.
- ANNUNZIATO, Francesco; ROMAGNANI, Sergio. **Heterogeneity of human effector CD4+ T cells**. *Arthritis Research & Therapy*, v. 11, n. 6, p. 257, 2009.
- ANTONELLI, Ana Clara Barbosa et al. **In silico construction of a multiepitope Zika virus vaccine using immunoinformatics tools**. *Scientific Reports*, v. 12, n. 1, p. 53, 2022.
- ARAÚJO, Thalia Velho Barreto de et al. **Association between microcephaly, Zika virus infection, and other risk factors in Brazil: final report of a case-control study**. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 18, n. 3, p. 328–336, 2018.
- BACKERT, Linus; KOHLBACHER, Oliver. **Immunoinformatics and epitope prediction in the age of genomic medicine**. *Genome Medicine*, v. 7, n. 1, p. 119, 2015.
- BARBI, Ludovica et al. **Prevalence of Guillain-Barré syndrome among Zika virus infected cases: a systematic review and meta-analysis**. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 22, n. 2, p. 137–141, 2018.
- BARJAS-CASTRO, Maria L. et al. **Probable transfusion-transmitted Zika virus in Brazil**. *Transfusion*, v. 56, n. 7, p. 1684–1688, 2016.
- BARZON, Luisa 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*, v. 21, n. 32, 2016. Disponível em: <<https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.32.30316>>. Acesso em: 15 jan. 2025.
- BINGHAM, Andrea M. **Comparison of Test Results for Zika Virus RNA in Urine, Serum, and Saliva Specimens from Persons with Travel-Associated Zika Virus Disease — Florida, 2016**. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 65, 2016. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/wr/mm6518e2.htm>>. Acesso em: 17 jan. 2025.
- BLEES, Andreas et al. **Structure of the human MHC-I peptide-loading complex**. *Nature*, v. 551, n. 7681, p. 525–528, 2017.

BOLLMAN, Brooke et al. **An optimized messenger RNA vaccine candidate protects non-human primates from Zika virus infection.** *npj Vaccines*, v. 8, n. 1, p. 58, 2023.

BRASIL, Patrícia et al. **Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro.** *New England Journal of Medicine*, v. 375, n. 24, p. 2321–2334, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde; Ministério das Relações Exteriores. **Declaração pela OMS do fim da “Emergência de Saúde Pública de Preocupação Internacional” associada ao vírus Zika – nota conjunta entre o Ministério da Saúde e o Ministério das Relações Exteriores.** Publicada em 19 nov. 2016. Disponível em: <https://www.gov.br/mre/pt-br/canais_atendimento/imprensa/notas-a-imprensa/declaracao-pela-oms-do-fim-da-emergencia-de-saude-publica-de-preocupacao-internacional-associada-ao-virus-zika-nota-conjunta-entre-o-ministerio-da-saude-e-o-ministerio-das-relacoes-exteriores>. Acesso em: 22 jan. 2025.

BRUNO, Luca et al. **Lessons from Reverse Vaccinology for viral vaccine design.** *Current Opinion in Virology*, v. 11, p. 89–97, 2015.

BRUSIN, Sergio et al. **ECDC internal response team.** 2015.

CAMPOS, Gubio S.; BANDEIRA, Antonio C.; SARDI, Silvia I. **Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil.** *Emerging Infectious Diseases*, v. 21, n. 10, p. 1885–1886, 2015.

CAO-LORMEAU, Van-Mai et al. **Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study.** *The Lancet*, v. 387, n. 10027, p. 1531–1539, 2016.

CAO-LORMEAU, Van-Mai et al. **Zika Virus, French Polynesia, South Pacific, 2013.** *Emerging Infectious Diseases*, v. 20, n. 6, 2014. Disponível em: <https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/20/6/14-0138_article>. Acesso em: 21 jan. 2025.

CARDOSO, Taíssa Ferreira et al. **Congenital Zika infection: neurology can occur without microcephaly.** *Archives of Disease in Childhood*, v. 104, n. 2, p. 199–200, 2019.

CDC. **Testing for Zika.** 2025. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/zika/testing/index.html>>. Acesso em: 31 jan. 2025.

CDC. **Zika Symptoms and Complications.** 2024. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/zika/signs-symptoms/index.html>>. Acesso em: 17 jan. 2025.

CHEN, Vincent B. et al. **MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography.** *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, v. 66, n. Pt 1, p. 12–21, 2010.

CHIANG, Ming-Hsien et al. **Identification of novel vaccine candidates against *Acinetobacter baumannii* using reverse vaccinology.** *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, v. 11, n. 4, p. 1065–1073, 2015.

CLETON, Natalie et al. **Come fly with me: Review of clinically important arboviruses for global travelers.** *Journal of Clinical Virology*, v. 55, n. 3, p. 191–203, 2012.

CONTRERAS, Marinela et al. **A reverse vaccinology approach to the identification and characterization of *Ctenocephalides felis* candidate protective antigens for the control of cat flea infestations.** *Parasites & Vectors*, v. 11, n. 1, p. 43, 2018.

DENIS, Jessica et al. **High specificity and sensitivity of Zika EDIII-based ELISA diagnosis highlighted by a large human reference panel.** *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 13, n. 9, p. e0007747, 2019.

DESAI, Sruti K. et al. **Zika Virus (ZIKV): a review of proposed mechanisms of transmission and associated congenital abnormalities.** *American Journal of Stem Cells*, v. 6, n. 2, p. 13–22, 2017.

DESAI, Dattatraya V.; KULKARNI-KALE, Urmila. **T-Cell Epitope Prediction Methods: An Overview.** In: DE, Rajat K.; TOMAR, Namrata (org.). *Immunoinformatics*. New York, NY: Springer, 2014. p. 333–364. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1115-8_19>. Acesso em: 15 abr. 2025.

DHANDA, Sandeep Kumar et al. **IEDB-AR: immune epitope database—analysis resource in 2019.** *Nucleic Acids Research*, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/nar/gkz452>>. Acesso em: 15 abr. 2025.

DIALLO, Diawo et al. **Zika Virus Emergence in Mosquitoes in Southeastern Senegal, 2011.** *PLOS ONE*, v. 9, n. 10, p. e109442, 2014.

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*, v. 46, n. 5, p. 509–520, 1952.

DOWNS, Wilbur G. **Arboviruses.** In: EVANS, Alfred S. (org.). *Viral Infections of Humans: Epidemiology and Control*. Boston, MA: Springer US, 1989. p. 105–132. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0705-1_5>. Acesso em: 21 jan. 2025.

DOYTCHINOVA, Irini A.; FLOWER, Darren R. **VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines.** *BMC Bioinformatics*, v. 8, n. 1, p. 4, 2007.

DUFFY, Mark R. et al. **Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia.** *New England Journal of Medicine*, v. 360, n. 24, p. 2536–2543, 2009.

DUIJSTER, Janneke W. et al. **Zika virus infection in 18 travellers returning from Surinam and the Dominican Republic, The Netherlands, November 2015–March 2016.** *Infection*, v. 44, n. 6, p. 797–802, 2016.

EMINI, E. A. et al. **Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide.** *Journal of Virology*, v. 55, n. 3, p. 836–839, 1985.

FADAKA, Adewale Oluwaseun et al. **Immunoinformatics design of a novel epitope-based vaccine candidate against dengue virus.** *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 19707, 2021.

FARIA, Nuno Rodrigues et al. **Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings.** *Science*, v. 352, n. 6283, p. 345–349, 2016.

FIELDS VIROLOGY. **Fields Virology**. 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013.

GANJI, Mahmoud et al. **Rational design of B-cell and T-cell multi epitope-based vaccine against Zika virus, an in silico study**. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, v. 42, n. 7, p. 3426–3440, 2024.

GARG, Vijay Kumar et al. **MFPPI – Multi FASTA ProtParam Interface**. *Bioinformatics*, v. 12, n. 2, p. 74–77, 2016.

GARG, Himanshu; MEHMETOGLU-GURBUZ, Tugba; JOSHI, Anjali. **Recent Advances in Zika Virus Vaccines**. *Viruses*, v. 10, n. 11, p. 631, 2018.

GONÇALVES, Adriana et al. **Innovative and New Approaches to Laboratory Diagnosis of Zika and Dengue: A Meeting Report**. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 217, n. 7, p. 1060–1068, 2018.

GOULD, Ea; SOLOMON, T. **Pathogenic flaviviruses**. *The Lancet*, v. 371, n. 9611, p. 500–509, 2008.

GRANGER, Dane et al. **Serologic Testing for Zika Virus: Comparison of Three Zika Virus IgM-Screening Enzyme-Linked Immunosorbent Assays and Initial Laboratory Experiences**. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 55, n. 7, p. 2127–2136, 2017.

GRASSEAU, Alexis et al. **Innate B Cells: the Archetype of Protective Immune Cells**. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, v. 58, n. 1, p. 92–106, 2020.

GRIFFIN, Isabel et al. **Zika Virus IgM Detection and Neutralizing Antibody Profiles 12–19 Months after Illness Onset**. *Emerging Infectious Diseases*, v. 25, n. 2, 2019.
Disponível em: <https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/25/2/18-1286_article>. Acesso em: 31 jan. 2025.

GRIFONI, Alba et al. **Prior Dengue Virus Exposure Shapes T Cell Immunity to Zika Virus in Humans**. *Journal of Virology*, v. 91, n. 24, p. e01469-17, 2017.

GRUBAUGH, Nathan D. et al. **Travel Surveillance and Genomics Uncover a Hidden Zika Outbreak during the Waning Epidemic**. *Cell*, v. 178, n. 5, p. 1057–1071.e11, 2019.

GUTSCHE, Irina et al. **Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 108, n. 19, p. 8003–8008, 2011.

GÖERTZ, Giel P. et al. **Functional RNA during Zika virus infection**. *Virus Research*, v. 254, p. 41–53, 2018.

HABY, Michelle M et al. **Prevalence of asymptomatic Zika virus infection: a systematic review**. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 96, n. 6, p. 402-413D, 2018.

HADDOW, Andrew D. et al. **Genetic Characterization of Zika Virus Strains: Geographic Expansion of the Asian Lineage**. PLOS Neglected Tropical Diseases, v. 6, n. 2, p. e1477, 2012.

HALLGREN, Jeppe et al. **DeepTMHMM predicts alpha and beta transmembrane proteins using deep neural networks**. bioRxiv, 2022. Disponível em: <<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.04.08.487609v1>>. Acesso em: 3 fev. 2025.

HEBDITCH, Max et al. **Protein-Sol: a web tool for predicting protein solubility from sequence**. Bioinformatics, v. 33, n. 19, p. 3098–3100, 2017.

HEINZ, Franz X.; STIASNY, Karin. **The Antigenic Structure of Zika Virus and Its Relation to Other Flaviviruses: Implications for Infection and Immunoprophylaxis**. Microbiology and Molecular Biology Reviews (MMBR), v. 81, n. 1, p. e00055-16, 2017.

HENDERSON, Alasdair D et al. **Zika seroprevalence declines and neutralizing antibodies wane in adults following outbreaks in French Polynesia and Fiji**. eLife, v. 9, p. e48460, 2020.

HENNESSEY, Morgan. **Zika Virus Spreads to New Areas — Region of the Americas, May 2015–January 2016**. MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report, v. 65, 2016. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/wr/mm6503e1.htm>>. Acesso em: 21 jan. 2025.

HOSMER, David W.; LEMESHOW, Stanley; STURDIVANT, Rodney X. **Applied Logistic Regression**. 3. ed. Hoboken, NJ: Wiley, 2013. (Wiley Series in Probability and Statistics). Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118548387>>. Acesso em: 15 jan. 2025.

HUANG, Huarong et al. **CD8+ T Cell Immune Response in Immunocompetent Mice during Zika Virus Infection**. Journal of Virology, v. 91, n. 22, p. e00900-17, 2017.

IOOS, S. et al. **Current Zika virus epidemiology and recent epidemics**. Médecine et Maladies Infectieuses, v. 44, n. 7, p. 302–307, 2014.

JENSEN, Peter E. **Recent advances in antigen processing and presentation**. Nature Immunology, v. 8, n. 10, p. 1041–1048, 2007.

JESPERSEN, Martin Closter et al. **BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes**. Nucleic Acids Research, v. 45, n. W1, p. W24–W29, 2017.

JUSTIZ VAILLANT, Angel A.; SABIR, Sarah; JAN, Arif. **Physiology, Immune Response**. In: STATPEARLS. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2025. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539801/>>. Acesso em: 15 abr. 2025.

KADKHODA, Kamran; GRETCHEN, Ainsley; RACANO, Adrianna. **Evaluation of a commercially available Zika virus IgM ELISA: specificity in focus**. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, v. 88, n. 3, p. 233–235, 2017.

- KAR, Tamalika et al. **A candidate multi-epitope vaccine against SARS-CoV-2.** *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 10895, 2020.
- KARPLUS, P. A.; SCHULZ, G. E. **Prediction of chain flexibility in proteins.** *Naturwissenschaften*, v. 72, n. 4, p. 212–213, 1985.
- KERKHOF, Karen et al. **Reliable Serological Diagnostic Tests for Arboviruses: Feasible or Utopia?.** *Trends in Microbiology*, v. 28, n. 4, p. 276–292, 2020.
- KOSTYUCHENKO, Victor A. et al. **Structure of the thermally stable Zika virus.** *Nature*, v. 533, n. 7603, p. 425–428, 2016.
- KUNO, Goro et al. **Phylogeny of the Genus Flavivirus.** *Journal of Virology*, v. 72, n. 1, p. 73–83, 1998.
- LAFUENTE, Esther M.; RECHE, Pedro A. **Prediction of MHC-peptide binding: a systematic and comprehensive overview.** *Current Pharmaceutical Design*, v. 15, n. 28, p. 3209–3220, 2009.
- LAI, Lilin et al. **Innate, T-, and B-Cell Responses in Acute Human Zika Patients.** *Clinical Infectious Diseases*, v. 66, n. 1, p. 1–10, 2018.
- LANGERAK, Thomas et al. **Zika Virus Antibody Titers Three Years after Confirmed Infection.** *Viruses*, v. 13, n. 7, p. 1345, 2021.
- LILJEROOS, Lassi et al. **Structural and Computational Biology in the Design of Immunogenic Vaccine Antigens.** *Journal of Immunology Research*, v. 2015, p. 1–17, 2015.
- LINDEN, Vanessa van der. **Description of 13 Infants Born During October 2015–January 2016 With Congenital Zika Virus Infection Without Microcephaly at Birth — Brazil.** *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 65, 2016. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/wr/mm6547e2.htm>>. Acesso em: 28 jan. 2025.
- LINS, Laurence; THOMAS, Annick; BRASSEUR, Robert. **Analysis of accessible surface of residues in proteins.** *Protein Science*, v. 12, n. 7, p. 1406–1417, 2003.
- LUSTIG, Yaniv et al. **Sensitivity and Kinetics of an NS1-Based Zika Virus Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in Zika Virus-Infected Travelers.** *Journal of Clinical Microbiology*, v. 55, n. 6, p. 1894–1901, 2017.
- L’HUILIER, Arnaud G. et al. **Evaluation of Euroimmun Anti-Zika Virus IgM and IgG Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Zika Virus Serologic Testing.** *Journal of Clinical Microbiology*, v. 55, n. 8, p. 2462–2471, 2017.
- MACNAMARA, F.N. **Zika virus: A report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria.** *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 48, n. 2, p. 139–145, 1954.
- MANCINI, Maria Vittoria et al. **Evaluation of an Engineered Zika Virus-Like Particle Vaccine Candidate in a Mosquito-Mouse Transmission Model.** *mSphere*, v. 8, n. 2, p. e00564-22, 2023.

- MANSUY, Jean Michel et al. **Zika virus: high infectious viral load in semen, a new sexually transmitted pathogen?**. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 16, n. 4, p. 405, 2016.
- MARCHETTE, N. J.; GARCIA, R.; RUDNICK, A. **Isolation of Zika Virus from Aedes aegypti Mosquitoes in Malaysia**. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 18, n. 3, p. 411–415, 1969. Disponível em: <<https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/18/3/article-p411.xml>>. Acesso em: 21 jan. 2025.
- MARTINS, Marlos Melo; MEDRONHO, Roberto De Andrade; CUNHA, Antônio José Ledo Alves Da. **Zika virus in Brazil and worldwide: a narrative review**. *Paediatrics and International Child Health*, v. 41, n. 1, p. 28–35, 2021.
- MEHRA, Bhanu et al. **Rapid Tests versus ELISA for Screening of HIV Infection: Our Experience from a Voluntary Counselling and Testing Facility of a Tertiary Care Centre in North India**. *ISRN AIDS*, v. 2014, p. 1–5, 2014.
- MESSINA, Jane P et al. **Mapping global environmental suitability for Zika virus**. *eLife*, v. 5, p. e15272, 2016.
- MINER, Jonathan J.; DIAMOND, Michael S. **Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism**. *Cell Host & Microbe*, v. 21, n. 2, p. 134–142, 2017.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico — Volume 55, nº 05: Situação epidemiológica da síndrome congênita associada à infecção pelo vírus Zika: Brasil, 2015 a 2023**. [s.l.]: Ministério da Saúde, 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2024/boletim-epidemiologico-volume-55-no-05>. Acesso em: 7 maio 2025.
- MITTAL, Ayushi et al. **Exploring the Zika Genome to Design a Potential Multiepitope Vaccine Using an Immunoinformatics Approach**. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, v. 26, n. 4, p. 2231–2240, 2020.
- MLAKAR, Jernej et al. **Zika Virus Associated with Microcephaly**. *New England Journal of Medicine*, 2016. Disponível em: <<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1600651>>. Acesso em: 22 jan. 2025.
- MOLERO-ABRAHAM, Magdalena; LAFUENTE, Esther M.; RECHE, Pedro. **Customized Predictions of Peptide–MHC Binding and T-Cell Epitopes Using EPIMHC**. In: DE, Rajat K.; TOMAR, Namrata (org.). *Immunoinformatics*. New York, NY: Springer, 2014. p. 319–332. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1115-8_18>. Acesso em: 15 abr. 2025.
- MOREIRA-SOTO, Andres et al. **Rapid decline of Zika virus NS1 antigen-specific antibody responses, northeastern Brazil**. *Virus Genes*, v. 56, n. 5, p. 632–637, 2020.
- MORRIS, Gerwyn et al. **Zika Virus as an Emerging Neuropathogen: Mechanisms of Neurovirulence and Neuro-Immune Interactions**. *Molecular Neurobiology*, v. 55, n. 5, p. 4160–4184, 2018.

MUKHOPADHYAY, Suchetana; KUHN, Richard J.; ROSSMANN, Michael G. **A structural perspective of the flavivirus life cycle**. *Nature Reviews Microbiology*, v. 3, n. 1, p. 13–22, 2005.

MUSSO, Didier et al. **Potential Sexual Transmission of Zika Virus**. *Emerging Infectious Diseases*, v. 21, n. 2, p. 359–361, 2015.

MUSSO, Didier. **Zika Virus Transmission from French Polynesia to Brazil**. *Emerging Infectious Diseases*, v. 21, n. 10, p. 1887–1889, 2015.

MUSSO, Didier; GUBLER, Duane J. **Zika Virus**. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 29, n. 3, p. 487–524, 2016.

MUSSO, Didier; KO, Albert I.; BAUD, David. **Zika Virus Infection — After the Pandemic**. *New England Journal of Medicine*, v. 381, n. 15, p. 1444–1457, 2019.

MUTHUMANI, Karuppiah et al. **In vivo protection against ZIKV infection and pathogenesis through passive antibody transfer and active immunisation with a prME_{env} DNA vaccine**. *npj Vaccines*, v. 1, n. 1, p. 1–11, 2016.

NAPOLEÃO-PÊGO, Paloma et al. **Performance assessment of a multi-epitope chimeric antigen for the serological diagnosis of acute Mayaro fever**. *Scientific Reports*, v. 11, p. 15374, 2021.

NGONO, Annie Elong; SHRESTA, Sujan. **Immune Response to Dengue and Zika**. *Annual Review of Immunology*, v. 36, p. 279–308, 2018.

NGUYEN, Minh N et al. **AllerCatPro 2.0: a web server for predicting protein allergenicity potential**. *Nucleic Acids Research*, v. 50, n. W1, p. W36–W43, 2022.

NILSSON, Jonas B. et al. **Accurate prediction of HLA class II antigen presentation across all loci using tailored data acquisition and refined machine learning**. *Science Advances*, v. 9, n. 47, p. ead6367, 2023.

NITHIYANANTHAM, Saiee F.; BADAWI, Alaa. **Maternal infection with Zika virus and prevalence of congenital disorders in infants: systematic review and meta-analysis**. *Canadian Journal of Public Health*, v. 110, n. 5, p. 638–648, 2019.

OEHLER, E et al. **Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome – case report, French Polynesia, December 2013**. *Eurosurveillance*, v. 19, n. 9, 2014. Disponível em: <<https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES2014.19.9.20720>>. Acesso em: 15 jan. 2025.

OHST, Claudia et al. **Reliable Serological Testing for the Diagnosis of Emerging Infectious Diseases**. In: HILGENFELD, Rolf; VASUDEVAN, Subhash G. (org.). *Dengue and Zika: Control and Antiviral Treatment Strategies*. Singapore: Springer, 2018. p. 19–43. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-981-10-8727-1_3>. Acesso em: 31 jan. 2025.

PASQUIER, Christophe et al. **Kinetics of anti-ZIKV antibodies after Zika infection using two commercial enzyme-linked immunoassays**. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 90, n. 1, p. 26–30, 2018.

- PATRONOV, Atanas; DOYTCHINOVA, Irini. **T-cell epitope vaccine design by immunoinformatics**. *Open Biology*, v. 3, n. 1, p. 120139, 2013.
- PEELING, Rosanna W. et al. **Evaluation of diagnostic tests: dengue**. *Nature Reviews Microbiology*, v. 8, n. 12, p. S30–S37, 2010.
- PEITER, Paulo Cesar et al. **Zika epidemic and microcephaly in Brazil: Challenges for access to health care and promotion in three epidemic areas**. *PLOS ONE*, v. 15, n. 7, p. e0235010, 2020.
- PEREIRA, Samille Henriques et al. **Design, development, and validation of multi-epitope proteins for serological diagnosis of Zika virus infections and discrimination from dengue virus seropositivity**. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 18, n. 4, p. e0012100, 2024.
- PIERSON, Theodore C. et al. **The Stoichiometry of Antibody-Mediated Neutralization and Enhancement of West Nile Virus Infection**. *Cell Host & Microbe*, v. 1, n. 2, p. 135–145, 2007.
- PONOMARENKO, Julia V.; BOURNE, Philip E. **Antibody-protein interactions: benchmark datasets and prediction tools evaluation**. *BMC Structural Biology*, v. 7, n. 1, p. 64, 2007.
- POSTLER, Thomas S. et al. **Renaming of the genus *Flavivirus* to *Orthoflavivirus* and extension of binomial species names within the family *Flaviviridae***. *Archives of Virology*, v. 168, n. 9, p. 1–7, 2023.
- PRASASTY, Vivitri Dewi et al. **Peptide-Based Subunit Vaccine Design of T- and B-Cells Multi-Epitopes against Zika Virus Using Immunoinformatics Approaches**. *Microorganisms*, v. 7, n. 8, p. 226, 2019.
- PRATA-BARBOSA, Arnaldo et al. **Effects of Zika infection on growth**. *Jornal de Pediatria*, v. 95, p. 30–41, 2019.
- PREMKUMAR, Lakshmanane et al. **Development of Envelope Protein Antigens To Serologically Differentiate Zika Virus Infection from Dengue Virus Infection**. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 56, n. 3, p. e01504-17, 2018.
- PRINCE, Harry E.; MATUD, Jose L. **Estimation of Dengue Virus IgM Persistence Using Regression Analysis**. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 18, n. 12, p. 2183–2185, 2011.
- PRIYAMVADA, Lalita et al. **Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 113, n. 28, p. 7852–7857, 2016.
- RACLE, Julien et al. **Machine learning predictions of MHC-II specificities reveal alternative binding mode of class II epitopes**. *Immunity*, v. 56, n. 6, p. 1359-1375.e13, 2023.
- RAGONE, Concetta et al. **Identification and validation of viral antigens sharing sequence and structural homology with tumor-associated antigens (TAAs)**. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, v. 9, n. 5, p. e002694, 2021.

RAPIN, Nicolas et al. **Computational Immunology Meets Bioinformatics: The Use of Prediction Tools for Molecular Binding in the Simulation of the Immune System.** PLOS ONE, v. 5, n. 4, p. e9862, 2010.

RATHORE, Abhay P. S.; ST. JOHN, Ashley L. **Cross-Reactive Immunity Among Flaviviruses.** Frontiers in Immunology, v. 11, 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2020.00334/full>>. Acesso em: 11 jul. 2025.

REGLA-NAVA, Jose Angel et al. **A Zika virus mutation enhances transmission potential and confers escape from protective dengue virus immunity.** Cell Reports, v. 39, n. 2, p. 110655, 2022.

REID, Savina; RIMMER, Kathryn; THAKUR, Kiran. **Zika Virus and Neurologic Disease.** Neurologic Clinics, v. 36, n. 4, p. 767–787, 2018.

REYNISSON, Birkir et al. **NetMHCpan-4.1 and NetMHCIIpan-4.0: improved predictions of MHC antigen presentation by concurrent motif deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data.** Nucleic Acids Research, v. 48, W1, p. W449–W454, 2020.

RICHNER, Justin M.; DIAMOND, Michael S. **Zika Virus Vaccines: Immune Response, Current Status, and Future Challenges.** Current Opinion in Immunology, v. 53, p. 130–136, 2018.

ROBBIANI, Davide F. et al. **Recurrent Potent Human Neutralizing Antibodies to Zika Virus in Brazil and Mexico.** Cell, v. 169, n. 4, p. 597-609.e11, 2017.

ROGERS, Thomas F. et al. **Zika virus activates de novo and cross-reactive memory B cell responses in dengue-experienced donors.** Science Immunology, v. 2, n. 14, p. eaan6809, 2017.

ROSANO, Germán L.; CECCARELLI, Eduardo A. **Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges.** Frontiers in Microbiology, v. 5, 2014. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2014.00172/full>>. Acesso em: 5 fev. 2025.

RÜCKERT, Claudia et al. **Impact of simultaneous exposure to arboviruses on infection and transmission by Aedes aegypti mosquitoes.** Nature Communications, v. 8, n. 1, p. 15412, 2017.

SAFRONETZ, David et al. **Evaluation of 5 Commercially Available Zika Virus Immunoassays.** Emerging Infectious Diseases, v. 23, n. 9, 2017. Disponível em: <https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/23/9/16-2043_article>. Acesso em: 3 fev. 2025.

SAHA, Sudipto; RAGHAVA, Gajendra P.S. **Prediction Methods for B-cell Epitopes.** In: FLOWER, Darren R. (org.). Immunoinformatics: Predicting Immunogenicity In Silico. Totowa, NJ: Humana Press, 2007. p. 387–394. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-118-9_29>. Acesso em: 16 abr. 2025.

- SAHA, Sudipto; RAGHAVA, G. P. S. **Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network.** *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, v. 65, n. 1, p. 40–48, 2006.
- SALVADOR, E.A. et al. **Identification of relevant regions on structural and nonstructural proteins of Zika virus for vaccine and diagnostic test development: an in silico approach.** *New Microbes and New Infections*, v. 29, p. 100506, 2019.
- SANCHEZ-TRINCADO, Jose L.; GOMEZ-PEROSANZ, Marta; RECHE, Pedro A. **Fundamentals and Methods for T- and B-Cell Epitope Prediction.** *Journal of Immunology Research*, v. 2017, n. 1, p. 2680160, 2017.
- SAPPARAPU, Gopal et al. **Neutralizing human antibodies prevent Zika virus replication and fetal disease in mice.** *Nature*, v. 540, n. 7633, p. 443–447, 2016.
- SCHULER-FACCINI, Lavinia. **Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly — Brazil, 2015.** *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 65, 2016. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/wr/mm6503e2.htm>>. Acesso em: 22 jan. 2025.
- SHAN, Chao et al. **Evaluation of a Novel Reporter Virus Neutralization Test for Serological Diagnosis of Zika and Dengue Virus Infection.** *Journal of Clinical Microbiology*, v. 55, n. 10, p. 3028–3036, 2017.
- SHAN, Chao; XIE, Xuping; SHI, Pei-Yong. **Zika Virus Vaccine: Progress and Challenges.** *Cell Host & Microbe*, v. 24, n. 1, p. 12–17, 2018.
- SHARMA, Vikrant et al. **Zika virus: an emerging challenge to public health worldwide.** *Canadian Journal of Microbiology*, v. 66, n. 2, p. 87–98, 2020.
- SILVA, Isaura Beatriz Borges et al. **Zika virus serological diagnosis: commercial tests and monoclonal antibodies as tools.** *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 26, p. e20200019, 2020.
- SIMON, Olivier et al. **Zika virus outbreak in New Caledonia and Guillain-Barré syndrome: a case-control study.** *Journal of NeuroVirology*, v. 24, n. 3, p. 362–368, 2018.
- SINGH, Raj K. et al. **Advances in Diagnosis, Surveillance, and Monitoring of Zika Virus: An Update.** *Frontiers in Microbiology*, v. 8, p. 2677, 2018.
- SINGH, Satarudra Prakash; MISHRA, Bhartendu Nath. **Major histocompatibility complex linked databases and prediction tools for designing vaccines.** *Human Immunology*, v. 77, n. 3, p. 295–306, 2016.
- SIPS, Gregorius J.; WILSCHUT, Jan; SMIT, Jolanda M. **Neuroinvasive flavivirus infections.** *Reviews in Medical Virology*, v. 22, n. 2, p. 69–87, 2012.
- SIROHI, Devika et al. **The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus.** *Science*, v. 352, n. 6284, p. 467–470, 2016.
- SONG, Byung-Hak et al. **Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation.** *Journal of Neuroimmunology*, v. 308, p. 50–64, 2017.

- SONI, Suha et al. **Dengue, Chikungunya, and Zika: The Causes and Threats of Emerging and Re-emerging Arboviral Diseases**. Cureus, 2023. Disponível em: <<https://www.cureus.com/articles/165267-dengue-chikungunya-and-zika-the-causes-and-threats-of-emerging-and-re-emerging-arboviral-diseases>>. Acesso em: 31 jan. 2025.
- STETTLER, Karin et al. **Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection**. Science, v. 353, n. 6301, p. 823–826, 2016.
- STIASNY, Karin et al. **Characterization of a Structural Intermediate of Flavivirus Membrane Fusion**. PLOS Pathogens, v. 3, n. 2, p. e20, 2007.
- SUN, Jing et al. **SEPPA: a computational server for spatial epitope prediction of protein antigens**. Nucleic Acids Research, v. 37, n. suppl_2, p. W612–W616, 2009.
- SWAMINATHAN, Sankar et al. **Fatal Zika Virus Infection with Secondary Nonsexual Transmission**. New England Journal of Medicine, v. 375, n. 19, p. 1907–1909, 2016.
- SWEREDOSKI, Michael J.; BALDI, Pierre. **PEPITO: improved discontinuous B-cell epitope prediction using multiple distance thresholds and half sphere exposure**. Bioinformatics, v. 24, n. 12, p. 1459–1460, 2008.
- TOGNARELLI, J. et al. **A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014**. Archives of Virology, v. 161, n. 3, p. 665–668, 2016.
- TONNERRE, Pierre et al. **Evolution of the innate and adaptive immune response in women with acute Zika virus infection**. Nature Microbiology, v. 5, n. 1, p. 76–83, 2020.
- ULLAH, Md. Asad; SARKAR, Bishajit; ISLAM, Syed Sajidul. **Exploiting the reverse vaccinology approach to design novel subunit vaccines against Ebola virus**. Immunobiology, v. 225, n. 3, p. 151949, 2020.
- VAN REGENMORTEL, Marc H.V. **What Is a B-Cell Epitope?**. In: SCHUTKOWSKI, Mike; REINEKE, Ulrich (org.). Epitope Mapping Protocols: Second Edition. Totowa, NJ: Humana Press, 2009. p. 3–20. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-1-59745-450-6_1>. Acesso em: 15 abr. 2025.
- WANG, Qihui et al. **Molecular determinants of human neutralizing antibodies isolated from a patient infected with Zika virus**. Science Translational Medicine, v. 8, n. 369, p. 369ra179, 2016.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO statement on the first meeting of the International Health Regulations (2005) (IHR 2005) Emergency Committee on Zika virus and observed increase in neurological disorders and neonatal malformations**. [s.l.]: WHO, 2016. Disponível em: <[https://www.who.int/news/item/01-02-2016-who-statement-on-the-first-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-\(ihr-2005\)-emergency-committee-on-zika-virus-and-observed-increase-in-neurological-disorders-and-neonatal-malform...](https://www.who.int/news/item/01-02-2016-who-statement-on-the-first-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-(ihr-2005)-emergency-committee-on-zika-virus-and-observed-increase-in-neurological-disorders-and-neonatal-malform...)>. Acesso em: 22 jan. 2025.
- YU, I.-M. et al. **Association of the pr Peptides with Dengue Virus at Acidic pH Blocks Membrane Fusion**. Journal of Virology, v. 83, n. 23, p. 12101–12107, 2009.
- YU, I-Mei et al. **Structure of the Immature Dengue Virus at Low pH Primes Proteolytic Maturation**. Science, v. 319, n. 5871, p. 1834–1837, 2008.

ZANLUCA, Camila et al. **First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil.** *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 110, n. 4, p. 569–572, 2015.

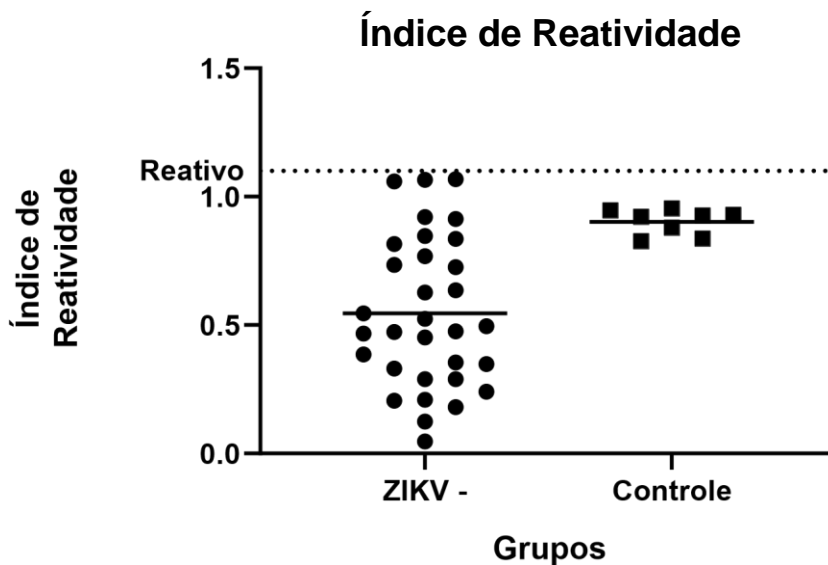
ZHAO, Haiyan et al. **Structural Basis of Zika Virus-Specific Antibody Protection.** *Cell*, v. 166, n. 4, p. 1016–1027, 2016.

ZIKA VÍRUS. **Zika vírus.** [S.l.]: Ministério da Saúde, [s.d.]. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/z/zika-virus/zika-virus>>. Acesso em: 31 jan. 2025.

ANEXO

Anexo I.

Anexo I – Reatividade das amostras de soro coletadas em anos anteriores a 2012 em teste ELISA *in-house* com domínio III da proteína do envelope de ZIKV.



Anexo 1: Reatividade de um painel de soros ZIKV negativos (ZIKV-) coletados em anos anteriores à 2012 testados quanto a não reatividade utilizando como antígeno de fase sólida o domínio III da proteína do envelope do zika. Na figura, é possível concluir que os soros considerados negativos utilizados neste trabalho, não apresentaram reatividade ao antígeno alvo de anticorpos. Controle = Plasma humano masculino (Sigma). Fonte: o autor (a).

Anexo II.

Anexo II – Índice de reatividade de amostras positivas para ZIKV, previamente caracterizadas por PCR e/ou sorologia.

ID amostra	RT-qPCR ZIKV	ZIKV IgM/IgG	Índice de Reatividade				
			Pep 01	Pep 02	Pep 03	Pep 04	Pep 05
409	Positivo	-	1,7384	1,3064	1,2677	1,1186	1,7289
368	-	IgG/IgM	3,1164	1,9982	2,7369	2,6869	2,5919
388	-	IgG/IgM	1,8573	1,0667	1,1231	1,3734	1,0870
252	-	IgG	-	-	1,0992	0,7733	0,6497
297	-	IgG	2,7305	1,5689	1,9664	1,8025	1,7850
311	-	IgG/IgM	1,4628	1,1479	1,6881	1,5488	1,7652
600	-	IgG	0,3053	0,7978	0,8329	0,8528	0,9434
578	-	IgG	0,9493	1,0206	1,2605	0,9650	0,9649
346	-	IgG	0,5142	1,7403	0,7445	0,8898	0,7900
527	-	IgG	5,8984	2,1639	3,8382	3,5147	4,0390
99	Positivo	IgG	3,6733	2,0612	2,4084	3,1128	2,4450
30	Positivo	IgG/IgM	0,7057	0,9953	1,0921	1,1077	1,1448
29	Positivo	-	2,1213	0,9446	0,9021	0,8822	1,5853
28	Positivo	IgG	1,1698	0,9440	1,0730	0,9149	1,1695
27	Positivo	-	2,3331	1,1622	1,5543	1,5368	1,6200
25	Positivo	-	1,0451	1,0804	0,8842	0,7177	1,3758
26	Positivo	-	0,7840	-	1,0825	1,0554	0,9154
19	Positivo	IgG	1,7790	1,4896	1,3107	1,2667	1,8097
20	Positivo	-	2,5913	1,4240	1,6881	1,9746	2,0045
21	Positivo	IgG/IgM	1,8167	1,1531	1,8757	1,5651	1,8873

Anexo 2: Amostras provenientes de pacientes com infecção prévia natural por ZIKV confirmadas por PCR e/ou sorologia com valores de reatividade para Pep01 à Pep05. Fonte: o autor (a).

Anexo III.

Anexo III – Diagnóstico sorológico de amostras PCR positivo para CHIKV e DENV utilizando teste rápido comercial Eco Diagnóstica e EUROIMMUN anti-ZIKV.

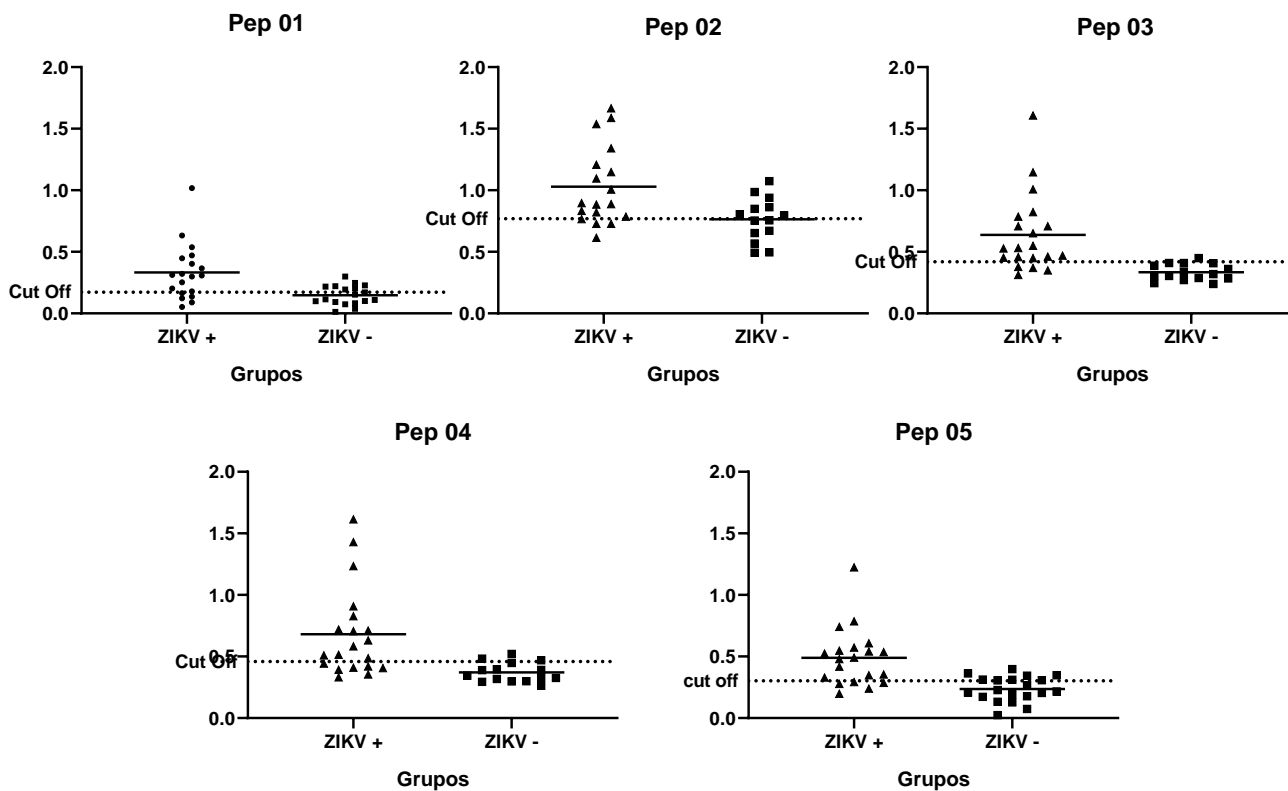
	ID da Amostra	IgM	IgG	EUROIMMUN	
				IR	UR/ml
CHIKV	26737	Positivo	Negativo	0,2048	-5,5076
	291223	Positivo	Negativo	0,81068	19,1077
	26788	Positivo	Positivo	0,2313	-4,4307
	30871	Positivo	Negativo	0,1972	-5,8153
	31001	Negativo	Negativo	-	-
	26791	Negativo	Negativo	-	-
	26794	Negativo	Negativo	-	-
	31005	Positivo	Negativo	0,2003	-5,6923
	26843	Negativo	Negativo	-	-
	31145	Positivo	Negativo	0,3381	-0,0923
	26844	Positivo	Negativo	0,2018	-5,6307
	31254	Negativo	Negativo		
	31257	Negativo	Negativo	0,4653	5,0769
	26846	Positivo	Negativo	-	-
	27357	Negativo	Negativo	0,9724	25,6923
	33359	Negativo	Negativo	-	-
	DENV	28640	Negativo	Positivo	1,9507
28647		Negativo	Positivo	0,7436	16,38462
28674		Negativo	Negativo	-	-
28718		Negativo	Negativo	-	-
28724		Positivo	Positivo	0,2923	-1,9538
28727		Positivo	Positivo	0,18326	-6,38462
28737		Negativo	Positivo	0,25293	-3,55385
28739		Positivo	Positivo	0,33018	-0,4153
28750		Positivo	Positivo	0,17872	-6,5692
28753		Positivo	Positivo	0,19955	-5,7230
35602		Positivo	Positivo	0,17834	-6,5846
35613		Negativo	Negativo	-	-
35625		Negativo	Negativo	-	-
35715		Positivo	Positivo	0,5062	6,7384
35917		Negativo	Positivo	0,21015	-5,2923
35734		Negativo	Negativo	-	-
35735		Positivo	Positivo	0,21015	-5,2923
35742	Positivo	Positivo	0,1764	-6,6615	
35761	Positivo	Positivo	0,2983	-1,7076	
35764	Positivo	Positivo	0,1779	-6,6	
35776	Positivo	Positivo	0,1760	-6,6769	

35789	Positivo	Positivo	1,02499	27,8154
35837	Negativo	Negativo	-	-
35841	Positivo	Positivo	0,1616	-7,2615
35848	Positivo	Positivo	0,2919	-1,9692
35852	Positivo	Positivo	0,2018	-5,6307
35870	Positivo	Positivo	0,3525	0,4923
35940	Positivo	Positivo	0,2196	-4,9076

Anexo 3: Presença de anticorpos IgM e IgG de amostras de soro de pacientes com resultado PCR positivo para arboviroses CHIKV e DENV. Os resultados obtidos por meio dos testes rápidos, indicam que 50% das amostras de CHIKV apresentam o início de uma resposta imunológica com detecção de anticorpos IgM e 1 amostra (6,25%) possui anticorpos IgG. Já os resultados de DENV sugerem uma maior circulação viral com reincidência da infecção com 71,43% das amostras com detecção de anticorpos IgG e 64,29% de detecção de anticorpos IgM. Fonte: o autor (a).

Anexo IV.

Anexo IV – Densidade ótica das amostras de soro ZIKV+ frente aos peptídeos.



Anexo 4: Densidade ótica apresentada por um painel de soros ZIKV + e ZIKV- perante aos peptídeos analisados. Fonte: o autor (a).

Anexo V.

Anexo V – Dados de densidade ótica e índice de reatividade de soros positivos para Pep 03 e kit de diagnóstico EUROIMMUM.

ID AMOSTRA	ELISA Pep 03		EUROIMMUN	
	DO	IR	IR	UR/ml
UAL 1	1,7721	3,6596	0,6312	11,81538
UAL 2	1,0372	2,1419	0,272624	-2,75385
UAL 3	0,6269	1,2946	0,337372	-0,12308
UAL 6	0,6157	1,2715	0,204089	-5,53846
UAL 9	0,6166	1,2733	0,307838	-1,32308
UAL 12	0,5618	1,1601	0,538811	8,061538
UAL 21	0,5736	1,1844	0,500189	6,492308
UAL 25	1,0916	2,2543	1,631579	52,46154
UAL 29	1,0794	2,2290	0,499811	6,476923
UAL 41	0,5618	1,1602	0,195381	-5,89231
UAL 49	0,9276	1,9156	0,314275	-1,06154
UAL 59	0,9329	1,9264	0,438849	4
UVA 3	0,7939	1,6395	0,184778	-6,32308
UVA 16	1,2917	2,6674	0,785309	18,07692
UVA 52	1,6462	3,3995	0,295721	-1,81538
UVA 54	2,3443	4,8411	0,803484	18,81538
UVA 55	1,1902	2,4579	0,2961	-1,8
UVA 58	0,8518	1,7590	0,568724	9,276923
UVA 59	1,1503	2,3755	0,746308	16,49231
UVA 71	2,1433	4,4260	0,679667	13,78462
VA 19	1,3139	2,7132	0,287012	-2,16923
VA 22	1,1515	2,3780	2,940174	105,6308
VA 25	0,6536	1,3496	0,232488	-4,38462
VA 30	0,8222	1,6978	0,357819	0,707692
VA 32	1,1591	2,3935	0,316547	-0,96923
VA 37	1,4936	3,0844	0,523665	7,446154
VA 38	0,8967	1,8518	0,650511	12,6
VA 50	1,0927	1,7970	0,487315	5,969231
VA 57	0,7104	1,1683	0,261643	-3,2
PO 1	0,7164	1,1781	0,176448	-6,66154
PO 13	0,7034	1,1568	0,252177	-3,58462
PO 14	1,3079	2,1509	0,431276	3,692308
PO 19	1,4068	2,3134	0,586899	10,01538
PO 22	0,7413	1,2190	0,368042	1,123077
PO 27	2,0501	3,3713	0,660735	13,01538
AL 15	0,8980	1,4767	0,444529	4,230769

AL 20	1,1054	1,8178	0,366149	1,046154
AL 23	1,9183	3,1547	0,419159	3,2
AL 24	1,1045	1,8164	0,750473	16,66154
AL 27	1,1975	1,9693	0,58652	10
AL 33	1,3029	2,1426	0,259371	-3,29231
DENV 28640	0,9402	1,5461	1,95078	65,4308
DENV 35789	1,7441	2,8682	1,02499	27,8154
CHIKV 31257	2,0573	3,38326	0,46535	5,07692
CHIKV 26846	0,7603	1,25033	0,19992	-5,70769
CHIKV 27357	1,0389	1,70849	0,97274	25,6923

Anexo V: Dados referentes a densidade ótica (DO) e índice de reatividade (IR) das amostras consideradas positivas para PEP 03. As amostras positivas foram avaliadas utilizando um kit de diagnóstico EUROIMMUM para detecção de IgG anti ZIKV, os resultados são demonstrados em forma semiquantitativa por meio do índice de reatividade e de maneira quantitativa por meio da concentração de anticorpos (UR/ml). Para este trabalho os resultados quantitativos foram considerados e valores acima de 22 UR/ml são considerados positivos. Fonte: o autor (a).