



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



RAYANE APARECIDA VIEIRA DE SOUZA

**ANÁLISE *IN-SILICO* DE DOIS ANTÍGENOS ESTRUTURAIS E DO ANTICORPO
4B8 PARA O DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE *ORTHOFILAVIVIRUS ZIKAENSE***

**OURO PRETO
2026**

Rayane Aparecida Vieira de Souza

**ANÁLISE *IN-SILICO* DE DOIS ANTÍGENOS ESTRUTURAIS E DO ANTICORPO
4B8 PARA O DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE *ORTHOFILAVIVIRUS ZIKAENSE***

Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito necessário para a obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Breno de Mello Silva
Coorientadora: Ana Clara Gomes de Souza

**OURO PRETO
2026**

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

S729a Souza, Rayane Aparecida Vieira de.

Análise in-silico de dois antígenos estruturais e do anticorpo 4B8 para o diagnóstico diferencial de Orthoflavivirus Zikaense. [manuscrito] / Rayane Aparecida Vieira de Souza. . - 2026.

72 f.: il.: tab..

Orientadora: Ma. Ana Clara Gomes de Souza.

Coorientador: Prof. Dr. Breno de Mello Silva.

Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas .

1. Biologia computacional. 2. Proteínas recombinantes. 3. Proteínas não Estruturais Virais. 4. Zika virus. I. , . II. Souza, Ana Clara Gomes de. III. Silva, Breno de Mello. IV. Universidade Federal de Ouro Preto. V. Título.

CDU 681.3:573

Bibliotecário(a) Responsável: Renata Mara de Almeida - CRB-6: 2507



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



FOLHA DE APROVAÇÃO

Rayane Aparecida Vieira de Souza

Análise in-silico de dois antígenos estruturais e do anticorpo 4B8 para o diagnóstico diferencial de *Orthoflavivirus zikaense*

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas

Aprovada em 21 de julho de 2026

Membros da banca

Dr - Breno de Mello Silva - Orientador (Universidade Federal de Ouro Preto)
Ms - Ana Clara Gomes de Souza - Co-orientadora (Universidade Federal de Ouro Preto)
Ms - Ubiratan Batista da Silva - Avaliador (Universidade de São Paulo)
Dr - Ricardo Lemes Gonçalves - Avaliador (Instituto Federal Goiano)

Breno de Mello Silva, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 21/08/2026



Documento assinado eletronicamente por **Breno de Mello Silva, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 21/08/2026, às 14:36, 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 http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1171372** e o código CRC **02D1E697**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por esta conquista, e pela realização de mais um sonho na minha vida. Sou grata por não me deixar desistir e me dar forças nos momentos mais difíceis ao longo dessa trajetória, longe de casa e da minha família.

Aos meus pais, Joelma Vieira da Silva e Geraldo Teixeira de Souza, por genuinamente apoiarem, acreditarem e investirem no meu sonho e na minha educação, sem medir esforços para minha formação.

As minhas irmãs Emanuely Vieira e Jéssica Vieira pelo apoio, ajuda e desafios compartilhados.

Ao meu namorado, Elvis Bonfatti, pelo incentivo diário, apoio e companheirismo ao longo dessa jornada. Obrigada por estar ao meu lado nos momentos em que mais precisei.

Aos meus amigos(as) Nathan Baeta, Emilly Arantes, Natália Saad, Anna Rita, Giovanna Ávila, Isabela Teixeira e Gabriela Rosa, pela amizade, por todo o carinho e apoio, e pelos momentos especiais. Sou imensamente grata por ter pessoas tão incríveis e importantes na minha vida.

Dedico este trabalho, com profundo respeito e admiração, aos meus orientadores, Breno de Mello Silva e Ana Clara Gomes de Souza que contribuíram significativamente para minha formação acadêmica e científica. Em especial, ao professor Breno, pela oportunidade de integrar a excelente equipe do LBTM. À Ana Clara, agradeço pela orientação cuidadosa, paciente e enriquecedora ao longo do desenvolvimento deste projeto. Sou eternamente grata pelos dois anos de aprendizado, apoio e acolhimento no laboratório.

Às agências de fomento à pesquisa, CAPES e CNPq, pelo indispensável apoio financeiro que tornou possível este projeto. À UFOP, expressei minha profunda gratidão por proporcionar uma formação pública, inclusiva e de excelência, capaz de transformar caminhos e construir oportunidades. Aos docentes do curso de Biologia (DECBI) deixo meu reconhecimento pelos ensinamentos, dedicação e inspiração compartilhados ao longo dessa caminhada acadêmica.

Por fim, dedico com todo carinho a todos os meus – familiares, amigos e colegas do âmbito acadêmico – que, de alguma forma, estiveram presentes e contribuíram para que essa trajetória fosse mais leve, especial e cheia de significado. Amo todos vocês!

RESUMO

A febre Zika é uma arbovirose causada pelo *Orthoflavivirus zikaense* (ZIKV), associada a complicações neurológicas e congênitas. O diagnóstico diferencial é dificultado pela sobreposição das manifestações clínicas entre as infecções por *Orthoflavivirus* e pela elevada similaridade estrutural e antigênica da proteína não estrutural 1 (NS1) entre ZIKV, dengue vírus (DENV) e o vírus da febre amarela (YFV), levando a ocorrência de reações cruzadas em testes sorológicos. Nesse contexto, a proteína NS1 destaca-se como biomarcador promissor para diagnóstico específico, devido à presença de regiões antigênicas capazes de reconhecimento imunológico. Este estudo teve como objetivo caracterizar estruturalmente proteínas recombinantes putativas derivadas de epítomos da NS1 do ZIKV e explorar, por meio de ferramentas bioinformáticas, seu potencial teórico para futura aplicação diagnóstica. Foram selecionados dois epítomos descritos na literatura, denominados E e F, utilizados na construção das proteínas recombinantes PRE e PRF. As sequências foram submetidas à modelagem tridimensional e análise de propriedades físico-químicas, com foco em hidrofobicidade e acessibilidade superficial. Em seguida, realizou-se o mapeamento dos resíduos críticos envolvidos no reconhecimento do anticorpo monoclonal 4B8, bem como a modelagem do fragmento variável de cadeia única (scFv). A interação entre as proteínas recombinantes e o anticorpo foi avaliada por docking molecular no servidor HADDOCK, complementada pela análise de interfaces e interações intermoleculares pelo PLIP. Os resultados indicaram que a PRE apresentou maior compatibilidade estrutural com o padrão de reconhecimento do anticorpo 4B8, preservando resíduos críticos e essenciais, além de maior área de superfície encoberta (2023,28 Å²), menor número de violações de restrições (14) e interface mais extensa em comparação à PRF. Além disso, as análises mostraram maior especificidade do complexo PRE–scFv 4B8, sustentada por ligações de hidrogênio. A PRF apresentou, entre outras análises, ausência de resíduos essenciais e menor compatibilidade estrutural com o padrão de reconhecimento da NS1 nativa. Conclui-se que a PRE apresenta maior potencial para aplicações em testes sorológicos destinados ao diagnóstico diferencial do ZIKV. O estudo reforça a relevância das ferramentas bioinformáticas na identificação de moléculas com potencial diagnóstico, contribuindo para estratégias mais específicas e sensíveis no contexto das arboviroses.

Palavras-chave: ZIKV; NS1; bioinformática; proteínas recombinantes; diagnóstico diferencial; docking molecular.

ABSTRACT

Zika fever is an arboviral disease caused by *Orthoflavivirus zikaense* (ZIKV), associated with neurological and congenital complications. Differential diagnosis is challenging due to the overlap of clinical manifestations among *Orthoflavivirus* infections and the high structural and antigenic similarity of the non-structural protein 1 (NS1) among ZIKV, dengue virus (DENV), and yellow fever virus (YFV), which may lead to cross-reactive responses in serological tests. In this context, NS1 has emerged as a promising biomarker for specific diagnosis due to the presence of antigenic regions capable of immune recognition. This study aimed to structurally characterize putative recombinant proteins derived from ZIKV NS1 epitopes and to explore, using bioinformatics tools, their theoretical potential for future diagnostic applications. Two epitopes described in the literature, designated E and F, were selected and used to construct the recombinant proteins PRE and PRF. The sequences were subjected to three-dimensional modeling and analysis of physicochemical properties, focusing on hydrophobicity and surface accessibility. Subsequently, critical residues involved in the recognition of the 4B8 monoclonal antibody were mapped, and the single-chain variable fragment (scFv) was modeled. The interaction between the recombinant proteins and the antibody was evaluated by molecular docking using the HADDOCK server, complemented by interface and intermolecular interaction analyses using PLIP. The results indicated that PRE showed greater structural compatibility with the recognition pattern of the 4B8 antibody, preserving critical and essential residues, as well as a larger buried surface area (2023.28 Å²), fewer restraint violations (14), and a more extensive interface compared with PRF. Furthermore, the analyses indicated greater specificity of the PRE–scFv 4B8 complex, supported by hydrogen bonds. PRF showed, among other findings, the absence of essential residues and lower structural compatibility with the recognition pattern of native NS1. It is concluded that PRE has greater potential for applications in serological tests aimed at the differential diagnosis of ZIKV. This study reinforces the relevance of bioinformatics tools in the identification of molecules with diagnostic potential, contributing to the development of more specific and sensitive strategies in the context of arboviral diseases.

Keywords: ZIKV; NS1; bioinformatics; recombinant proteins; differential diagnosis; molecular docking.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura viral e organização do genoma do <i>Orthoflavivirus zikaense</i>	15
Figura 2 - Ciclo de replicação do ZIKV	16
Figura 3 – Distribuição dos casos suspeitos e confirmados de febre zika por município de notificação, até a Semana Epidemiológica 13, Brasil, 2016.....	19
Figura 4 - Distribuição do coeficiente de incidência (casos por 100 mil habitantes) de ZIKV e óbitos confirmados e investigação segundo Unidade Federativa – Brasil, SE 1 à SE 23 de 2024.....	21
Figura 5 - Estrutura tridimensional da NS1.....	25
Figura 6 - Mapeamento tridimensional da hidrofobicidade do epítipo E.....	38
Figura 7 - Mapeamento tridimensional da hidrofobicidade do epítipo F.....	39
Figura 8 - Estrutura por crio-microscopia eletrônica (Cryo-EM) do tetrâmero NS1 do ZIKV em complexo com Fab 3G2 e Fab 4B8.....	41
Figura 9 - Alinhamento entre a sequência NS1 consenso e sequência da cepa ZIKV GZ02, evidenciando a conservação dos resíduos de aminoácidos entre as sequências.....	42
Figura 10 - Mapeamento dos resíduos críticos para o reconhecimento pelo anticorpo 4B8 no dímero da proteína NS1 de ZIKV, em vista superior.....	43
Figura 11 - Estrutura tridimensional da proteína recombinante E (PRE), evidenciando a localização espacial dos resíduos epitópicos críticos 5, 6, 7, 8, 9 e 39 destacados em vermelho.....	45
Figura 12 - Estrutura tridimensional da proteína recombinante F (PRF), evidenciando a localização espacial dos resíduos epitópicos críticos 3, 6 e 11 destacados em vermelho.....	47
Figura 13 - Modelo tridimensional do fragmento variável de cadeia única (scFv).....	49
Figura 14 - Representação tridimensional do complexo molecular formado entre a PRE e o anticorpo scFv 4B8 obtido por docking molecular no servidor HADDOCK.....	60
Figura 15 - Representação tridimensional do complexo molecular formado entre a PRF e o anticorpo scFv 4B8 obtido por docking molecular no servidor HADDOCK.....	61

LISTA DE ABREVIACÕES

ABSIS/YABSIS – Simulação da Estrutura e da Interface de Anticorpos

CDR – Região Determinante de Complementaridade

DENV – *Dengue virus*

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

Fab – Fragmento de Ligação ao Antígeno

Fc – Fragmento Cristalizável

HADDOCK – Acoplamento Proteína-Proteína Orientado por Ambiguidade

IgG – Imunoglobulina G

MEGA X – Análise Evolutiva Genética Molecular X

NS1 – Proteína Não Estrutural 1

PDB – Banco de Dados de Estruturas de Proteínas

PLIP – Perfilador de Interações Proteína-Ligante

PR – Proteína Recombinante

PRE – Proteína Recombinante E

PRF – Proteína Recombinante F

RCSB PDB – Banco de Dados Colaborativo para Bioinformática Estrutural de Proteínas

RNA – Ácido Ribonucleico

scFv – Fragmento Variável de Cadeia Única

ssRNA+ – RNA de Fita Simples de Sentido Positivo

VH – Domínio Variável da Cadeia Pesada

VL – Domínio Variável da Cadeia Leve

VMD – Dinâmica Molecular Visual

WHO – Organização Mundial da Saúde

YFV – *Yellow fever virus*

ZIKV – *Zika virus*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Taxa de incidência de febre zika, por região e Unidade da Federação, até a Semana Epidemiológica 13, Brasil, 2016.....	20
Tabela 2 - Parâmetros de validação estrutural do modelo tridimensional do fragmento de anticorpo scFv derivado do anticorpo monoclonal 4B8 obtidos pela plataforma Molprobit.....	50
Tabela 3A – Identificação das regiões determinantes de complementaridade (CDRs) da cadeia leve (VL) do anticorpo monoclonal 4B8 obtidas pela plataforma Abysis.....	51
Tabela 3B – Identificação das regiões determinantes de complementaridade (CDRs) da cadeia pesada (VH) do anticorpo monoclonal 4B8 obtidas pela plataforma Abysis.....	51
Tabela 4 - Parâmetros obtidos no docking molecular entre o anticorpo scFv 4B8 e a proteína recombinante PRE utilizando o servidor HADDOCK.....	53
Tabela 5 – Ligações de hidrogênio identificadas na interface de interação entre o anticorpo scFv 4B8 e a proteína recombinante PRE por meio da análise realizada no servidor PLIP.....	55
Tabela 6 - Parâmetros obtidos no docking molecular entre o anticorpo scFv 4B8 e a proteína recombinante PRF utilizando o servidor HADDOCK.....	56
Tabela 7 – Ligações de hidrogênio identificadas na interface do complexo molecular formado entre a proteína recombinante PRF e o anticorpo scFv 4B8.....	58

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 - Arbovírus.....	13
1.2 - Família <i>Flaviviridae</i> e gênero <i>Orthoflavivirus</i>	14
1.2.1 - <i>Orthoflavivirus zikaense</i>	16
1.2.2 - Epidemiologia.....	18
1.2.3 - Tratamento e profilaxia.....	21
1.2.4 - Diagnóstico.....	22
1.2.5 - Proteína viral NS1.....	24
1.3 - Bioinformática aplicada à caracterização estrutural de proteínas recombinantes e anticorpos.....	27
2- OBJETIVOS.....	31
2.1 - Objetivo Geral.....	31
2.2 - Objetivos Específicos.....	31
3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1. Recuperação das proteínas recombinantes desenhadas pelo grupo de pesquisa.....	32
3.2. Análise de hidrofobicidade dos modelos tridimensionais das proteínas recombinantes.	32
3.3. Busca bibliográfica e seleção dos anticorpos anti-NS1 com potencial diagnóstico.....	33
3.4. Alinhamento entre a sequência NS1 da cepa ZIKV GZ02 de referência e a sequência NS1 consenso obtida in silico no laboratório.....	33
3.5. Visualização das regiões de ligação das proteínas recombinantes ao anticorpo 4B8 e identificação dos resíduos-chave.....	34
3.6. Modelagem estrutural do scFv e definição das CDRs.....	34
3.7. Docking molecular entre as proteínas recombinantes e o scFv do anticorpo 4B8.....	35
3.8. Interpretação das análises de interações intermoleculares e distância de ligação.....	36
3.9. Elaboração das figuras finais e interpretação dos dados estruturais.....	36
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1. Caracterização físico-química.....	37
4.2. Identificação e seleção de um anticorpo anti-NS1 com potencial diagnóstico.....	40

4.3. Alinhamento da sequência da cepa ZIKV GZ02 e NS1 consenso.....	42
4.4. Mapeamento tridimensional dos resíduos epitópicos da PRE e PRF.....	44
4.5. Modelagem estrutural do scFv e mapeamento das regiões determinantes de complementaridade.....	48
4.6. Docking molecular entre o scFv 4B8 e a proteína recombinante PRE e PRF.....	52
4.7. Representação estrutural dos complexos antígeno-anticorpo obtidos por docking molecular.....	59
5 - CONCLUSÃO.....	62
6 - PERSPECTIVAS FUTURAS.....	63
7 - REFERÊNCIAS.....	64
8 - ANEXO.....	72

1. INTRODUÇÃO

1.1 - Arbovírus

Os arbovírus, também conhecidos como *arthropod-borne viruses*, constituem um grupo diverso de vírus transmitidos por artrópodes hematófagos, como moscas, mosquitos e carrapatos, sendo responsáveis por um amplo espectro de doenças infecciosas que afetam humanos e animais (VARGHESE; DE SILVA; MILLAR, 2023). Atualmente, já foram identificados mais de 140 arbovírus associados a infecções em humanos, bem como cerca de 50 relacionados a doenças em animais domésticos e selvagens, evidenciando a ampla diversidade e impacto desses vírus (CIOTA, 2019).

Dentre as principais arboviroses, destacam-se a dengue causada pelo *Dengue virus* (DENV); a febre amarela causada pelo *Yellow fever virus* (YFV); e a febre zika causada pelo *Zika virus* (ZIKV), amplamente distribuídas e frequentemente associadas a surtos epidêmicos (WHO, 2024). Esses arbovírus apresentam estratégias adaptativas complexas que permitem sua replicação tanto em hospedeiros vertebrados quanto em artrópodes. Essa dualidade impõe pressões evolutivas específicas, resultando em vírus altamente adaptáveis e com elevada capacidade de mutação (HOLMES; TWIDDY, 2003).

Esses agentes virais pertencem a diferentes famílias taxonômicas, incluindo *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae*; e compartilham como característica central a necessidade de um vetor biológico para sua manutenção e transmissão no ambiente (VARGHESE; DE SILVA; MILLAR, 2023).

A transmissão dos arbovírus ocorre predominantemente por meio da picada de artrópodes infectados, sendo os mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Culex* os principais vetores envolvidos na disseminação dessas doenças em regiões tropicais e subtropicais (REIS *et al.*, 2023; FACCHINELLI; BADOLO; McCALL, 2023). O ciclo de transmissão pode envolver hospedeiros vertebrados, como primatas e aves, estabelecendo ciclos silvestres e urbanos que favorecem a persistência viral na natureza. No caso de arboviroses de importância em saúde pública, como dengue, febre amarela e infecção pelo Zika vírus, o ciclo urbano envolvendo o mosquito *Aedes aegypti* é o principal responsável por ocorrências epidêmicas em populações humanas (MAYER; TESH; VASILAKIS, 2017).

A relevância dos arbovírus tem aumentado significativamente nas últimas décadas, em decorrência de fatores como mudanças climáticas, urbanização desordenada, globalização e intensificação de viagens internacionais. Essas condições favorecem a expansão geográfica dos vetores e, consequentemente, a introdução e disseminação de arboviroses em regiões

anteriormente não endêmicas. Eventos recentes, como a epidemia do Zika vírus nas Américas entre 2015 e 2016, evidenciam o potencial emergente desses patógenos, além de seus impactos sociais e econômicos (MUSSO; GUBLER, 2016).

As manifestações clínicas associadas às arboviroses variam desde quadros assintomáticos até doenças graves e potencialmente fatais. Em humanos, essas infecções podem se apresentar como síndromes febris inespecíficas, doenças hemorrágicas ou manifestações neurológicas, dependendo do vírus envolvido e da resposta do hospedeiro (PUCCIONI-SOHLER *et al.*, 2023). No caso específico dos *Orthoflavivirus*, como o vírus da dengue e o Zika vírus, destaca-se a capacidade de induzir respostas imunológicas dinâmicas, incluindo fenômenos de reação cruzada entre anticorpos, o que representa um desafio significativo para o diagnóstico diferencial (ROTHMAN, 2011).

1.2 - Família *Flaviviridae* e gênero *Orthoflavivirus*

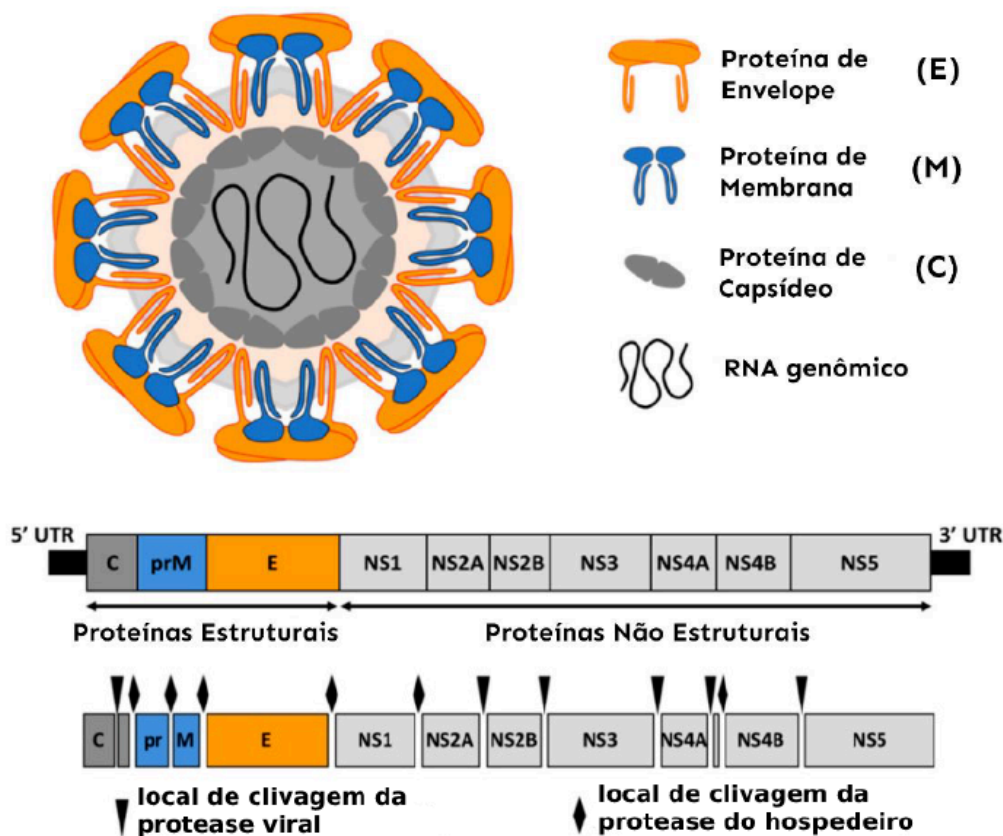
A família *Flaviviridae* compreende vírus envelopados, esféricos, e de RNA genômico (gRNA) de fita simples, senso positivo (ssRNA+) com 9,6-12,3 kb. Atualmente esta família é classificada em quatro gêneros: *Pestivirus*, *Hepacivirus*, *Pegivirus* e *Orthoflavivirus* (sendo anteriormente denominado *Flavivirus*). Esses vírus possuem genoma linear não segmentado e são caracterizados por codificar uma única poliproteína, posteriormente clivada em proteínas estruturais e não estruturais (POSTLER *et al.*, 2023).

Os vírus pertencentes ao gênero *Orthoflavivirus* apresentam estrutura relativamente conservada, composta por três proteínas estruturais principais: a proteína do capsídeo (C), a proteína de membrana (prM/M) e a glicoproteína de envelope (E), conforme ilustrado na **Figura 1**. Além disso, possuem sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5), que desempenham funções essenciais na replicação viral e na modulação da resposta imune do hospedeiro (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2021).

Do ponto de vista estrutural, os *Orthoflavivirus* apresentam partículas virais esféricas com diâmetro médio de 40 a 60 nm (SHAH; BANO, 2016). O envelope viral contém glicoproteínas, especialmente a proteína E (envelope), que desempenha papel fundamental na ligação e entrada do vírus na célula hospedeira. Por estar exposta na superfície da partícula viral e mediar a interação com receptores celulares, essa proteína é prontamente reconhecida pelo sistema imunológico, sendo altamente imunogênica e um dos principais alvos de anticorpos neutralizantes. Em razão dessas características, constitui um importante alvo para o desenvolvimento de vacinas e testes diagnósticos (LUNARDELLI *et al.*, 2023;

WOODSON; MORABITO, 2024). Além disso, a proteína C (capsídeo) e a proteína M (membrana) também fazem parte da estrutura viral, contribuindo para a estabilidade e infectividade da partícula viral (LATANOVA; STARODUBOVA; KARPOV, 2022).

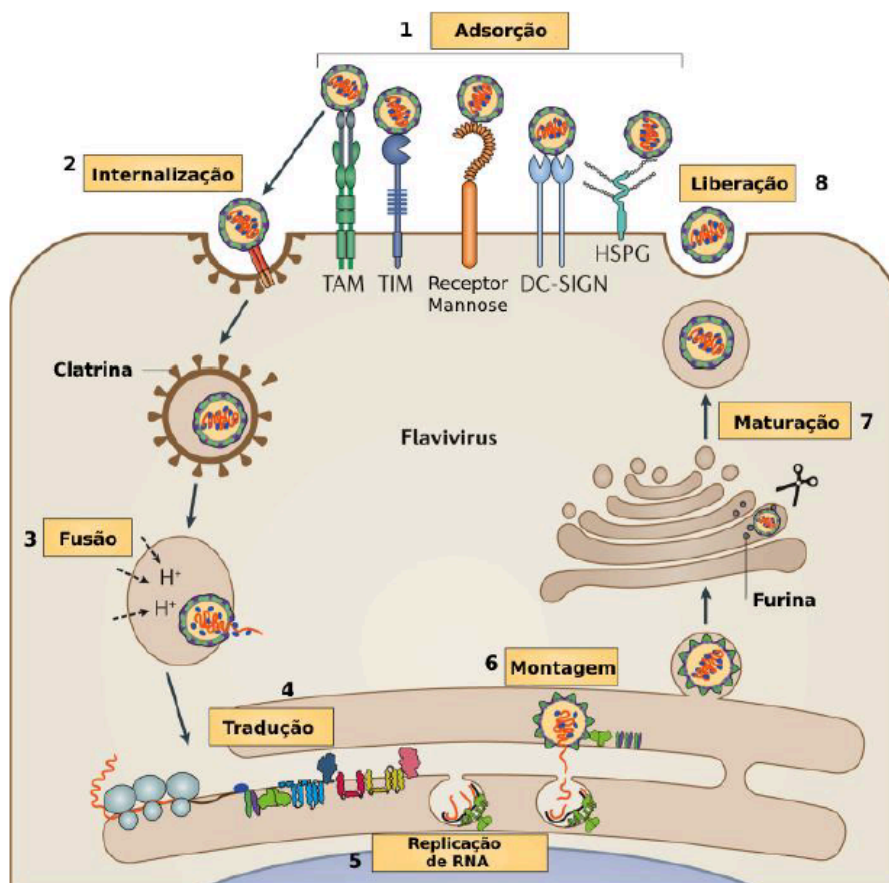
Figura 1 - Estrutura viral e organização do genoma do *Orthoflavivirus zikaense*. Cada segmento no retângulo abaixo representa os sítios de clivagem. O vírus é constituído por proteínas estruturais e um RNA que irá codificar para proteínas não estruturais. Ademais, existem duas regiões não codificantes 3' e 5'.



Fonte: ÁVILA-PÉREZ *et al.*, 2018.

A replicação dos vírus da família *Flaviviridae* ocorre no citoplasma das células hospedeiras, geralmente associada a modificações das membranas do retículo endoplasmático, que formam estruturas especializadas para a replicação viral. O processo inicia-se com a ligação do vírus a receptores celulares específicos, seguida de endocitose mediada por receptor. Após a fusão do envelope viral com a membrana endossomal, o RNA viral é liberado no citoplasma, onde atua diretamente como RNA mensageiro para a síntese da poliproteína viral, como ilustrado na **Figura 2**. Esse mecanismo eficiente contribui para a rápida replicação e disseminação do vírus no organismo infectado (LATANOVA; STARODUBOVA; KARPOV, 2022).

Figura 2 - Ciclo de replicação do ZIKV. (1) Adsorção viral mediada por receptores; (2) Internalização mediada por clatrina; (3) Fusão do envelope viral e membrana do endossomo pela acidificação e liberação do RNA; (4) Tradução do mRNA no ER; (5) Replicação e processamento do RNA; (6) Montagem da partícula viral e início da maturação; (7) clivagem da PrM na rede trans-golgi, maturação da partícula; (8) liberação da partícula viral madura.



Fonte: Adaptado de NEUFELDT *et al.*, 2018.

1.2.1 - *Orthoflavivirus zikaense*

A infecção conhecida como Febre Zika é provocada pelo agente etiológico *Orthoflavivirus zikaense* (ZIKV), sendo o mosquito *Aedes aegypti* o principal vetor da disseminação. Esse vírus foi inicialmente identificado em 1947, na região de Entebbe, em Uganda, a partir de amostras coletadas de um macaco do gênero *Rhesus*, durante estudos voltados à vigilância da febre amarela, doença associada ao vírus Yellow Fever. No ano seguinte, em 1948, o patógeno foi novamente detectado, desta vez em mosquitos da espécie *Aedes africanus* (DE SALAZAR *et al.*, 2016).

O ZIKV é geneticamente classificado em duas principais linhagens filogenéticas, denominadas africana e asiática. A linhagem asiática foi responsável pelos surtos de maior

impacto epidemiológico registrados nas últimas décadas, iniciando-se em 2007 na Ilha de Yap, localizada na Micronésia. Posteriormente, o vírus expandiu sua circulação para a Polinésia Francesa e outras ilhas do Pacífico Sul, onde provocou epidemias expressivas entre 2013 e 2014 (MALHOTRA *et al.*, 2016).

Em 2015, o ZIKV foi introduzido no continente americano, desencadeando ampla disseminação, especialmente no Brasil, onde foram estimados aproximadamente 1,5 milhão de casos no mesmo ano. A partir desse cenário, a identificação de uma possível relação entre a infecção por ZIKV durante a gestação e o aumento de casos de microcefalia em recém-nascidos brasileiros despertou grande preocupação internacional. A rápida propagação do vírus para diferentes continentes, associada ao surgimento da síndrome congênita do zika, levou a Organização Mundial da Saúde (OMS) a reconhecer, em fevereiro de 2016, a epidemia de Zika vírus como uma Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (MALHOTRA *et al.*, 2016).

A manifestação clínica da febre zika é variável. Em crianças e fetos, a infecção pode causar desde alterações graves no desenvolvimento, como malformações congênitas, até sintomas mais comuns, incluindo erupções cutâneas, febre e conjuntivite. A maioria dos adultos infectados permanece assintomática; contudo, após um período médio de incubação de 13 a 14 dias, alguns indivíduos podem apresentar mialgia, artralgia, febre baixa e conjuntivite. Ressalta-se ainda que, em decorrência do tropismo viral, podem surgir complicações neurológicas severas, como a síndrome de Guillain-Barré, configurando um quadro de elevada gravidade (MASMEJAN *et al.*, 2020).

Evidências experimentais demonstram que o ZIKV apresenta capacidade de se multiplicar tanto em células da placenta quanto em tecidos fetais humanos, reforçando seu potencial de atravessar a barreira placentária e comprometer o desenvolvimento embrionário. Além disso, a presença do vírus já foi confirmada em diferentes amostras de tecidos fetais humanos, o que sustenta sua associação com danos durante a gestação, como nos casos de microcefalia. Resultados obtidos em modelos com primatas não humanos também reproduziram alterações semelhantes às observadas em infecções humanas, incluindo lesões no sistema nervoso central, fortalecendo a relação causal entre a infecção por ZIKV e desfechos neurológicos adversos (CUMBERWORTH *et al.*, 2017).

Um dos mecanismos mais aceitos para explicar a ocorrência de microcefalia associada à infecção pelo ZIKV está relacionado à sua capacidade de atingir preferencialmente células progenitoras neurais, induzindo morte celular programada nessas populações. Como essas células são essenciais para a formação e organização do tecido nervoso durante o

desenvolvimento embrionário, sua destruição pode comprometer diretamente a neurogênese e, conseqüentemente, o crescimento adequado do encéfalo. Embora o ZIKV também seja capaz de infectar neurônios já diferenciados, essa interação ocorre de forma menos intensa. Dessa maneira, a elevada suscetibilidade das células progenitoras neurais à infecção viral constitui um dos principais fatores envolvidos nos prejuízos ao desenvolvimento cerebral observados na infecção congênita por febre zika (MINER; DIAMOND, 2017).

Outras formas de transmissão do ZIKV ocorrem por vias não vetoriais, especialmente por contato sexual entre indivíduos infectados e suscetíveis. Estimativas baseadas em modelos matemáticos indicam que essa via pode estar relacionada a uma pequena parcela das infecções humanas, em torno de 3%, embora esse percentual ainda dependa de mais estudos. Além da transmissão sexual, há registros de infecção entre pessoas por mecanismos não sexuais ainda não totalmente esclarecidos, possivelmente associados ao contato com fluidos corporais contaminados, como saliva e lágrimas, nos quais já foi detectada a presença de partículas virais e material genético do vírus. Também foram descritos casos de transmissão por transfusão de sangue e de plaquetas, reforçando que o ZIKV pode ser disseminado por rotas alternativas além da picada de mosquitos. Essa capacidade de transmissão entre humanos por vias não relacionadas a vetores artrópodes diferencia o ZIKV de outros *Orthoflavivirus* e pode estar associada à sua maior persistência em fluidos corporais, bem como à sua habilidade de infectar diferentes tipos celulares e tecidos (MINER; DIAMOND, 2017).

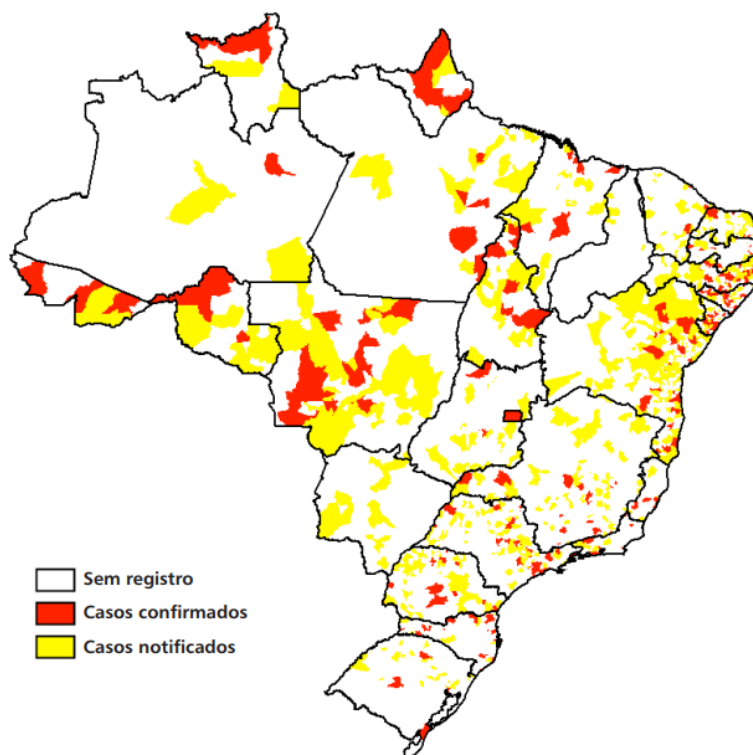
1.2.2 - Epidemiologia

A epidemia de ZIKV representou um importante marco epidemiológico mundial devido à sua associação com complicações neurológicas e congênitas. A partir de 2015, observou-se aumento expressivo nos casos de microcefalia em recém-nascidos no Brasil, especialmente na região Nordeste, levando a Organização Mundial da Saúde a declarar Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional em 2016. Esse cenário evidenciou a necessidade de fortalecimento das estratégias de vigilância epidemiológica, diagnóstico precoce e desenvolvimento de métodos mais específicos para diferenciação entre infecções por flavivírus em regiões endêmicas (WHO, 2024; BRASIL, 2016).

A ampla disseminação geográfica do ZIKV durante a epidemia de 2015–2016 evidenciou o elevado potencial de transmissão do vírus em regiões tropicais e subtropicais. Conforme demonstrado na **Figura 3 e na Tabela 1**, o Brasil apresentou elevada incidência de

casos, consolidando-se como um dos principais epicentros da circulação viral nas Américas. Além do território brasileiro, a transmissão do vírus foi confirmada em mais de 60 países e territórios distribuídos entre América Latina, Caribe, Sudeste Asiático e África, demonstrando a forte associação entre a expansão viral e fatores ambientais favoráveis à proliferação do mosquito *Aedes aegypti*, como clima tropical, urbanização desordenada e deficiência em saneamento básico (WHO, 2024; MUSSO; GUBLER, 2016).

Figura 3 – Distribuição dos casos suspeitos e confirmados de febre zika por município de notificação, até a Semana Epidemiológica 13, Brasil, 2016.



Fonte: Ministério da Saúde., 2016.

Os dados epidemiológicos da **Tabela 1** evidenciam elevadas taxas de incidência em estados como Bahia e Rio de Janeiro, refletindo condições ambientais e climáticas favoráveis à proliferação do vetor *Aedes aegypti*. Esses fatores contribuíram significativamente para a rápida disseminação viral em áreas urbanas e periurbanas do país (BRASIL, 2016; WHO, 2024).

Tabela 1 – Taxa de incidência de febre zika, por região e Unidade da Federação, até a Semana Epidemiológica 13, Brasil, 2016.

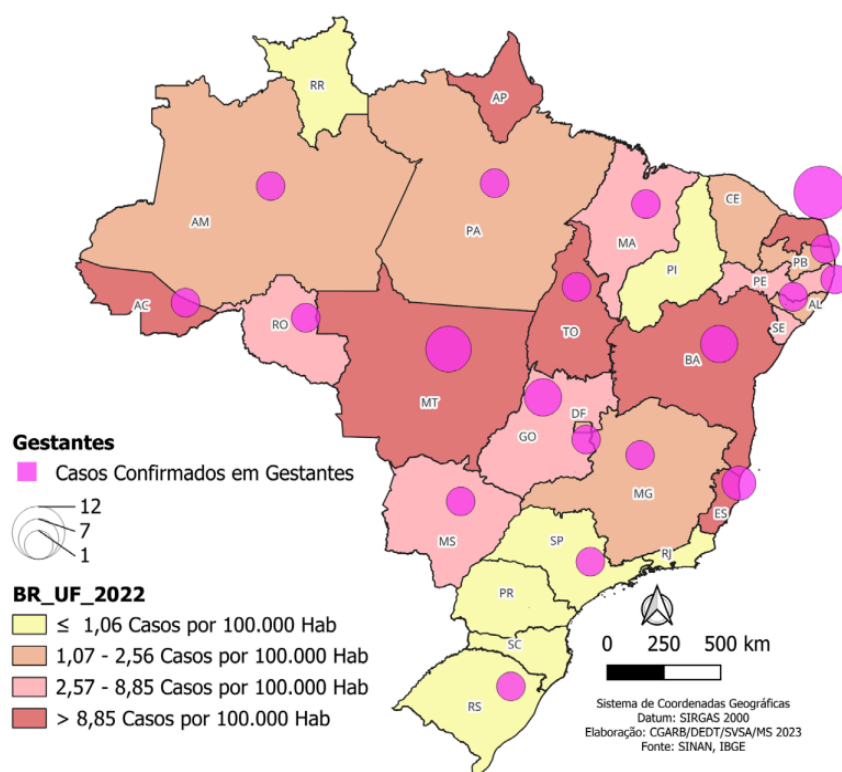
Região/Unidade da Federação	Casos (n)	Incidência (/100 mil hab.)
Norte	6.295	36,0
Rondônia	618	35,0
Acre	375	46,7
Amazonas	1520	38,6
Roraima	44	8,7
Pará	771	9,4
Amapá	74	9,7
Tocantins	2893	190,9
Nordeste	30.286	53,5
Maranhão	1.202	17,4
Piauí	7	0,2
Ceará	156	1,8
Rio Grande do Norte	640	18,6
Paraíba	1.060	26,7
Pernambuco	333	3,6
Alagoas	1.479	44,3
Sergipe	348	15,5
Bahia	25.061	164,8
Sudeste	35.505	41,4
Minas Gerais	6.693	32,1
Espírito Santo	1.382	35,2
Rio de Janeiro	25.930	156,7
São Paulo	1.500	3,4
Sul	1.797	6,1
Paraná	1.540	13,8
Santa Catarina ^a	62	0,9
Rio Grande do Sul	195	1,7
Centro-Oeste	17.504	113,4
Mato Grosso do Sul	296	11,2
Mato Grosso	16.055	491,7
Goiás	920	13,9
Distrito Federal	233	8,0
Total	91.387	44,7

Fonte: Ministério da Saúde., 2016.

Embora a epidemia de zika registrada entre 2015 e 2016 tenha representado o período de maior transmissão da doença no Brasil, dados mais recentes demonstram que o vírus permanece em circulação no território nacional, ainda que em menor magnitude, como observado na **Figura 4**. Segundo o Ministério da Saúde, entre as Semanas Epidemiológicas (SE) 1 e 23 de 2016 foram notificados 8.519 casos prováveis de zika, correspondendo a um coeficiente de incidência de 4,2 casos por 100 mil habitantes. Durante esse período, não foram confirmados óbitos relacionados à doença. A análise da distribuição espacial evidencia maior concentração da incidência na Região Nordeste, seguida pelas Regiões Sudeste e

Norte, enquanto os maiores coeficientes de incidência por Unidade Federativa foram registrados na Bahia, Espírito Santo e Rio Grande do Norte (BRASIL, 2024). Além disso, a vigilância epidemiológica identificou 764 casos prováveis em gestantes, dos quais a maioria permanecia em investigação, reforçando a necessidade de monitoramento contínuo em virtude do potencial de transmissão vertical e das complicações associadas à Síndrome Congênita do Zika.

Figura 4 - Distribuição do coeficiente de incidência (casos por 100 mil habitantes) de ZIKV e óbitos confirmados e investigação segundo Unidade Federativa – Brasil, SE 1 à SE 23 de 2024.



Fonte: Ministério da Saúde., 2024.

1.2.3 - Tratamento e profilaxia

Até o momento, não há vacina disponível ou medicamentos antivirais específicos licenciados para o tratamento ou prevenção da infecção. Diante disso, a recuperação do paciente baseia-se em medidas de suporte clínico, com uso de medicamentos analgésicos destinados ao alívio sintomático, além da recomendação de hidratação adequada e repouso (MALONE *et al.*, 2016).

Em relação ao desenvolvimento de vacinas, diferentes estratégias vacinais têm sido utilizadas, incluindo formulações com vírus inativado e vírus vivo atenuado (KIM *et al.*, 2024). Além dessas abordagens, também vêm sendo estudadas plataformas baseadas em subunidades proteicas, vacinas de DNA e vetores virais, todas desenvolvidas com foco na utilização ou expressão das proteínas estruturais do ZIKV como principais alvos antigênicos (MALONE *et al.*, 2016).

Diante da ausência de vacinas e de tratamentos antivirais específicos contra o ZIKV, as principais medidas de prevenção concentram-se no controle dos mosquitos vetores, especialmente *Aedes aegypti* e, em menor escala, *Aedes albopictus*. Nesse contexto, destaca-se a importância da participação da população na eliminação de criadouros, por meio da remoção de recipientes que possam acumular água, da aplicação de larvicidas quando recomendada pelas autoridades sanitárias. Também são recomendadas medidas individuais de proteção, como o uso de roupas que cubram maior parte do corpo, incluindo peças de manga longa e calças compridas, preferencialmente associadas a substâncias repelentes. Além disso, devido à possibilidade de transmissão sexual, orienta-se que homens com histórico recente de viagem para áreas endêmicas evitem relações sexuais desprotegidas, sobretudo com gestantes, e que viajantes assintomáticos adotem métodos de barreira por período determinado após o retorno (SHARMA; LAL, 2017).

A relação entre a infecção por zika e complicações congênitas, especialmente a microcefalia, evidenciou a necessidade de intensificar a vigilância epidemiológica e o acompanhamento pré-natal em regiões com circulação viral. Nesse cenário, torna-se fundamental ampliar o acesso a métodos contraceptivos, assistência pré-natal e orientações em saúde reprodutiva, além de fortalecer ações educativas voltadas à prevenção e às formas de transmissão da infecção (SHARMA; LAL, 2017).

1.2.4 - Diagnóstico

Do ponto de vista evolutivo, os *Orthoflavivirus* apresentam alta taxa de mutação, característica comum aos vírus de RNA, o que favorece a adaptação a novos hospedeiros e ambientes. Essa variabilidade genética é um dos principais desafios para o controle das infecções por *Orthoflavivirus*, dificultando o desenvolvimento de vacinas universais e favorecendo o surgimento de novas variantes virais com potencial epidêmico (SIMMONDS *et al.*, 2017). Dessa forma, o desenvolvimento de testes para diagnóstico diferencial utilizando antígenos específicos, capazes de distinguir diferentes infecções por

Orthoflavivirus, constitui uma importante estratégia complementar para a vigilância epidemiológica e saúde pública.

Os métodos empregados para identificar infecções virais são, em sua maioria, classificados em abordagens diagnósticas diretas e indiretas. O diagnóstico direto baseia-se na detecção do próprio agente infeccioso ou de seus componentes na amostra clínica. Entre essas abordagens destacam-se o isolamento viral, realizado por meio da inoculação da amostra em culturas celulares para obtenção de partículas virais viáveis; a detecção de antígenos virais, que identifica proteínas estruturais ou não estruturais do vírus por meio de ensaios imunológicos; e a detecção do material genético viral por técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR), ainda considerada o método de referência para o diagnóstico da infecção aguda pelo ZIKV (CECONI; ARIËN; DELPUTTE, 2024). Contudo, limitações como a rápida queda da carga viral nos fluidos corporais e a necessidade de infraestrutura laboratorial especializada têm impulsionado o desenvolvimento de técnicas moleculares alternativas de amplificação isotérmica, como a RT-LAMP (*loop-mediated isothermal amplification*) e a RPA (*recombinase polymerase amplification*), que dispensam termocicladores e permitem resultados em poucos minutos, viabilizando plataformas portáteis voltadas ao diagnóstico laboratorial remoto (*point-of-care*) (BURCIAGA-FLORES *et al.*, 2020; BALEA *et al.*, 2023).

Em contrapartida, o diagnóstico indireto baseia-se na detecção da resposta imune humoral do hospedeiro, por meio da identificação de anticorpos específicos produzidos contra antígenos virais, principalmente as imunoglobulinas IgM e IgG, utilizando ensaios sorológicos como ELISA e imunofluorescência indireta (MULLER; DEPELSENAIRE; YOUNG, 2017; MUSSO; DESPRÈS, 2020). No entanto, devido à alta reatividade cruzada desses anticorpos entre o ZIKV e outros *Orthoflavivirus*, especialmente o vírus da dengue, em regiões onde esses vírus cocirculam, os resultados sorológicos podem apresentar reações falso-positivas ou dificultar a diferenciação entre infecções, fenômeno atribuído sobretudo à similaridade estrutural entre as proteínas de envelope (E) e não estrutural 1 (NS1) dos *Flavivirus* (GASPAR-CASTILLO *et al.*, 2023). Nesse cenário, ensaios de ELISA baseados especificamente na proteína NS1 têm sido propostos como alternativa para reduzir a cross-reatividade sorológica com o vírus da dengue, embora sua sensibilidade ainda varie conforme o tempo decorrido desde o início dos sintomas (MERAKOU *et al.*, 2024). Nesses casos, recomenda-se a realização de testes confirmatórios mais específicos, como o teste de neutralização por redução de placas (PRNT), considerado o padrão de referência para

confirmação sorológica, ou de métodos moleculares, como a RT-PCR, quando indicados pela fase da infecção (DENANI *et al.*, 2025; MERAKOU *et al.*, 2024).

O diagnóstico diferencial entre as infecções causadas pelo ZIKV e outros *Orthoflavivirus*, como o vírus da DENV e YFV, constitui um importante desafio na saúde pública, uma vez que esses vírus apresentam manifestações clínicas semelhantes e compartilham características antigênicas. Nesse contexto, a proteína NS1 se destaca por ser amplamente empregada como biomarcador em testes diagnósticos durante a fase aguda da infecção. Entretanto, as proteínas NS1 do ZIKV, DENV e YFV apresentam aproximadamente 70% de similaridade estrutural e de sequência, favorecendo a ocorrência de reações cruzadas em ensaios sorológicos convencionais (PUERTA-GUARDO *et al.*, 2019). Essa elevada similaridade compromete a especificidade e a acurácia do diagnóstico diferencial, podendo resultar em resultados falso-positivos ou dificultar a distinção entre esses *Orthoflavivirus*, com impacto na condução clínica dos pacientes e nas ações de vigilância epidemiológica.

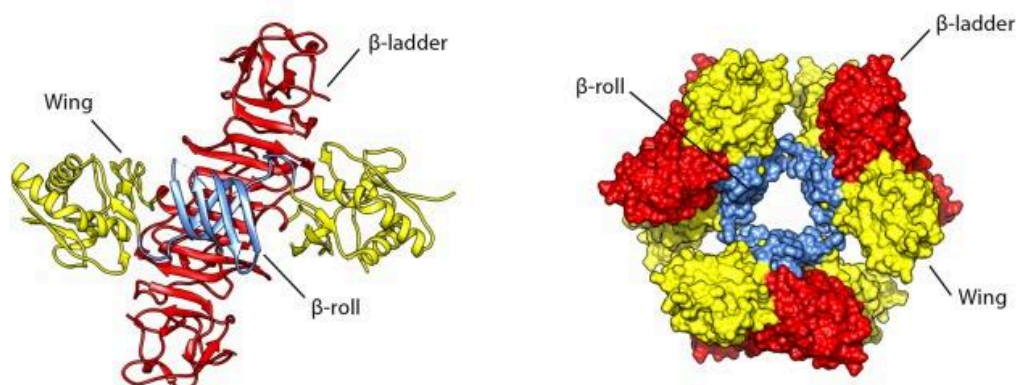
Contudo, aproximadamente 30% da sequência de aminoácidos da proteína NS1 difere entre o ZIKV e outros *Orthoflavivirus*. Essas regiões variáveis correspondem aos trechos da proteína cuja sequência de aminoácidos não é conservada, conferindo características antigênicas específicas a cada vírus. Dessa forma, essas regiões podem ser exploradas para a identificação de epítomos capazes de discriminar o Zika vírus de outros *Orthoflavivirus*, contribuindo para o desenvolvimento de testes diagnósticos com maior especificidade e menor ocorrência de reações cruzadas (PUERTA-GUARDO *et al.*, 2019).

1.2.5 - Proteína viral NS1

A proteína NS1 é codificada por 1.056 nucleotídeos, os quais dão origem a uma cadeia polipeptídica composta por 352 aa (aminoácidos), apresentando massa molecular entre 44 e 50 kDa. Além de desempenhar papel essencial no processo de replicação viral, essa proteína também está associada à capacidade dos *Orthoflavivirus* de se adaptarem e infectarem hospedeiros distintos (YEN *et al.*, 2016).

Do ponto de vista estrutural, essa proteína é organizada em três domínios distintos: o domínio β -roll localizado na região N-terminal (resíduos 1–29), o domínio *Wing* (resíduos 30–180), e o domínio β -ladder, situado na porção C-terminal (resíduos 181–352) (WEN *et al.*, 2024) **Figura 5**.

Figura 5 - Estrutura tridimensional da NS1. A figura ilustra a proteína NS1 em suas duas conformações oligoméricas: na forma dimérica, apresentada à esquerda, e na forma hexamérica, mostrada à direita. Na representação estrutural, a coloração azul corresponde ao domínio β -roll, a amarela indica o domínio *Wing* e a vermelha representa o domínio β -ladder.



Fonte: Adaptado de SCATURRO *et al.*, 2015.

A NS1 pode ser localizada em diferentes compartimentos celulares, dependendo de sua conformação estrutural: a forma monomérica (mNS1) é observada no retículo endoplasmático, enquanto a forma dimérica se associa às membranas celulares e de organelas. Adicionalmente, a proteína também pode ser liberada para o meio extracelular em sua forma secretada (sNS1) na forma hexamérica (MULLER; YOUNG, 2013).

Sabendo disso, a proteína NS1 destaca-se como um importante marcador imunológico em infecções por Zika vírus, apresentando expressão precoce durante a infecção e sendo detectável no plasma sanguíneo a partir do 2º dia após o início dos sintomas. Estudos indicam que sua detecção é mais consistente durante a fase aguda da infecção, especialmente entre o 5º e o 15º dia pós-início dos sintomas, período em que apresenta maior sensibilidade diagnóstica e potencial aplicação como biomarcador de infecção aguda (LUSTIG *et al.*, 2017; LUSTIG *et al.*, 2021).

Estudos demonstraram que formas recombinantes de NS1 (proteína recombinante) foram capazes de aumentar a especificidade e a sensibilidade de ensaios sorológicos, reduzindo reações cruzadas com outros *Orthoflavivirus*, como o DENV (ZAIDI *et al.*, 2020). Nesse contexto, Zaidi *et al.* desenvolveram uma proteína recombinante derivada de NS1 para a detecção específica de infecção por Zika vírus, demonstrando seu potencial em ensaios sorológicos com maior acurácia diagnóstica. De forma semelhante, Lopes-Luz *et al.* (2020) e Pereira *et al.* (2023) também evidenciaram que antígenos recombinantes baseados em NS1 constituem ferramentas promissoras para o desenvolvimento de testes mais específicos e

sensíveis, reforçando a aplicabilidade dessa abordagem no diagnóstico sorológico da infecção por Zika vírus.

Proteína recombinante é a denominação atribuída às proteínas produzidas por organismos geneticamente modificados que expressam genes de interesse previamente inseridos por técnicas de DNA recombinante em vetores de expressão, os quais são posteriormente introduzidos em células hospedeiras, como bactérias, leveduras ou células de mamíferos, para a produção da proteína desejada. Essa tecnologia revolucionou a biotecnologia moderna ao possibilitar a produção segura e em larga escala de proteínas utilizadas em terapias, diagnósticos e pesquisas científicas, incluindo anticorpos monoclonais, hormônios, vacinas e proteínas virais empregadas como antígenos em testes diagnósticos (TRIPATHI; SHRIVASTAVA, 2019).

Adicionalmente, ferramentas de bioinformática e abordagens *in silico* podem ser utilizadas no desenho racional, modelagem estrutural e otimização de proteínas recombinantes. Essa estratégia tem demonstrado grande potencial em aplicações diagnósticas, uma vez que pode favorecer maior sensibilidade na detecção de anticorpos ou antígenos por meio da seleção e combinação de regiões imunogênicas específicas, quando comparada ao uso de proteínas em sua conformação natural (CAMUSSONE *et al.*, 2009; ROCKSTROH *et al.*, 2015).

Um dos principais aspectos dessa metodologia é a versatilidade funcional da estrutura obtida, que pode ser modificada conforme sua conformação, características físico-químicas e composição molecular (ROGERS; HARTL, 2012). Para que a proteína recombinante seja empregada em plataformas diagnósticas, alguns critérios precisam ser atendidos, entre eles a presença de epítomos lineares, de modo que a conformação tridimensional não interfira na detecção ou no isolamento do peptídeo, além da capacidade de induzir resposta imunológica no hospedeiro (DIPTI; JAIN; NAVIN, 2006).

Além de sua relevância científica, o estudo de proteínas recombinantes de *Orthoflavivirus* possui implicações diretas no enfrentamento das arboviroses. O diagnóstico precoce e preciso permite um acompanhamento clínico mais eficaz, reduz complicações e contribui para a adoção de medidas epidemiológicas de contenção. Ademais, em regiões endêmicas onde há co-circulação de múltiplos *Orthoflavivirus*, como o Brasil, a utilização de marcadores diagnósticos mais específicos é essencial para reduzir falhas de monitoramento e para orientar políticas públicas de saúde (GLASNER *et al.*, 2018; WHO, 2024).

1.3 - Bioinformática aplicada à caracterização estrutural de proteínas recombinantes e anticorpos

A bioinformática consiste na aplicação de ferramentas computacionais para aquisição, armazenamento, organização e análise de dados biológicos, sendo amplamente utilizada em áreas como genômica, proteômica e imunologia (LESK, 2023). Tais análises contribuem para a seleção racional de epítopos e anticorpos específicos, reduzindo custos laboratoriais e acelerando o desenvolvimento de diagnósticos com maior sensibilidade e especificidade (SUNITA *et al.*, 2020 ; MULLER; YOUNG, 2013).

Neste contexto, a utilização de proteínas recombinantes como ferramenta diagnóstica em bioinformática, tem sido promissora pois permite selecionar regiões específicas de proteínas virais capazes de preservar características antigênicas relevantes, reduzindo potenciais reações cruzadas e aumentando a especificidade dos ensaios imunológicos. Associada a esse processo, a bioinformática desempenha papel fundamental na caracterização estrutural e funcional dessas moléculas, possibilitando a análise de propriedades físico-químicas, a predição de estruturas tridimensionais, a identificação de epítopos e a avaliação de interações biomoleculares por métodos computacionais (ROSANO; CECCARELLI, 2014; ALMO *et al.*, 2013).

Os anticorpos, também denominados imunoglobulinas (Ig), são glicoproteínas produzidas por linfócitos B diferenciados em plasmócitos e desempenham papel fundamental na resposta imune adaptativa por meio do reconhecimento específico de antígenos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2022). Devido à sua elevada especificidade de ligação, a identificação de anticorpos direcionados a antígenos específicos e a agentes infecciosos representa uma das estratégias mais empregadas no diagnóstico clínico, devido à sua ampla aplicabilidade em diferentes doenças. Além de seu valor diagnóstico, essas moléculas desempenham papel central na resposta imune adaptativa, atuando como um dos principais mecanismos de reconhecimento e proteção do organismo frente a patógenos (FREIRE *et al.*, 2017).

Diversos epítopos reconhecidos por anticorpos com atividade protetora contra a proteína NS1 já foram identificados, demonstrando que as regiões de maior antigenicidade concentram-se principalmente no domínio wing e na porção C-terminal do domínio β -ladder. Estudos recentes têm demonstrado que anticorpos anti-NS1 direcionados ao domínio β -ladder exercem papel importante na prevenção das formas graves das infecções por *Orthoflavivirus*. Em contrapartida, os mecanismos moleculares envolvidos na proteção conferida por

anticorpos voltados para outros domínios estruturais da NS1 ainda permanecem pouco esclarecidos (WEN *et al.*, 2024).

Anticorpos do tipo scFv (single-chain variable fragment) correspondem a fragmentos recombinantes formados pela fusão das regiões variáveis das cadeias leve (VL) e pesada (VH) de um anticorpo, conectadas por um peptídeo linker flexível. Diferentemente dos anticorpos completos, os scFv não possuem a região constante (Fc), mantendo apenas a porção responsável pelo reconhecimento específico do antígeno (ASAADI *et al.*, 2021; AHMAD *et al.*, 2012).

Os anticorpos reconhecem seus antígenos por meio de regiões específicas localizadas nos domínios variáveis das cadeias VH e VL, denominadas regiões determinantes de complementaridade (Complementarity Determining Regions – CDRs). Essas regiões correspondem a segmentos hipervariáveis responsáveis pela formação do sítio de ligação ao antígeno (parátipo), conferindo elevada especificidade e afinidade ao reconhecimento molecular. Cada domínio variável contém três CDRs (CDR1, CDR2 e CDR3), totalizando seis regiões que atuam de forma coordenada no estabelecimento das interações com os epítomos presentes no antígeno (SCHROEDER; CAVACINI, 2010; BANSIA; RAMAKUMAR, 2023).

A caracterização estrutural das CDRs é de grande relevância em estudos bioinformáticos e biotecnológicos, uma vez que pequenas alterações conformacionais nessas regiões podem influenciar diretamente a capacidade de reconhecimento e ligação do anticorpo ao seu alvo. Nesse contexto, ferramentas computacionais de modelagem molecular permitem prever a organização tridimensional dessas regiões e avaliar suas possíveis interações com o antígeno de interesse (XU *et al.*, 2010; BANSIA; RAMAKUMAR, 2023).

Já os anticorpos monoclonais (MAbs) são proteínas produzidas em laboratório a partir de um único clone de células do sistema imunológico, chamadas linfócitos B. Por serem originados de uma única célula, todos os anticorpos monoclonais são idênticos e reconhecem especificamente o mesmo antígeno ou epítipo (MITRA; TOMAR, 2021).

Em estudo anterior, Gao *et al.* isolaram um conjunto de anticorpos monoclonais específicos para NS1 de Zika vírus (3G2, 4B8, 4F10, 2E11 e 14G5) a partir de pacientes em fase de convalescença da infecção. Entre esses anticorpos, o 4F10, direcionado à região C-terminal da NS1, apresentou menor capacidade protetora e sua atividade mostrou-se predominantemente dependente dos mecanismos efetores mediados pela região Fc do anticorpo. Em contrapartida, o anticorpo 4B8, que reconhece epítipo localizado na região N-terminal da proteína, exibiu maior eficácia protetora, atuando tanto por mecanismos

dependentes quanto independentes da porção Fc. Esses resultados sugerem que a eficácia protetora dos anticorpos anti-NS1 está diretamente relacionada ao padrão de reconhecimento dos epítomos presentes na proteína viral (GAO *et al.*, 2021).

Sabendo que o anticorpo 4B8 apresentou atividade protetora parcialmente independente da região Fc, a modelagem estrutural de anticorpos de um modelo scFv derivado desse anticorpo possibilita investigar especificamente os mecanismos de reconhecimento molecular associados às regiões variáveis responsáveis pela ligação ao antígeno. Além disso, por preservar os domínios variáveis das cadeias VH e VL, o scFv mantém a especificidade de reconhecimento do anticorpo original, tornando-se uma ferramenta adequada para análises estruturais e estudos de interação antígeno-anticorpo (NELSON, 2010).

Posteriormente, Pan e colaboradores demonstraram que os anticorpos monoclonais direcionados à proteína NS1 podem ser classificados em dois grupos distintos de acordo com o padrão de reconhecimento estrutural. Os anticorpos do Grupo I (3G2 e 4B8) ligam-se a epítomos localizados no domínio asa e no domínio β -ladder exposto na superfície externa do dímero de NS1. Em contrapartida, os anticorpos do Grupo II (4F10, 2E11 e 14G5) reconhecem a porção distal do domínio β -ladder, porém em diferentes orientações espaciais, evidenciando diferenças conformacionais no modo de interação entre os anticorpos e a proteína (PAN *et al.*, 2024).

Em análises bioquímicas complementares, foi observado que os anticorpos do Grupo I apresentaram maior capacidade de reconhecimento da NS1 expressa na superfície celular em comparação aos anticorpos do Grupo II. Além disso, tanto as imunoglobulinas G (IgG) quanto os fragmentos Fab pertencentes ao Grupo I foram capazes de inibir completamente o aumento da permeabilidade endotelial induzido pela proteína sNS1. Em contraste, a atividade protetora dos anticorpos do Grupo II mostrou-se mais dependente da afinidade de ligação com a sNS1 e da presença da molécula íntegra de IgG (PAN *et al.*, 2024).

Em conjunto, as evidências estruturais e funcionais demonstram que a eficácia protetora dos anticorpos anti-NS1 está intimamente relacionada ao modo como esses anticorpos reconhecem seus epítomos na proteína viral (PAN *et al.*, 2024). Considerando que essa interação é mediada principalmente pelas regiões determinantes de complementaridade (CDRs) presentes nos domínios variáveis das cadeias VH e VL, a caracterização estrutural do scFv derivado do anticorpo 4B8 representa uma abordagem promissora para investigar os determinantes moleculares envolvidos no reconhecimento da NS1. Ademais, a aplicação de ferramentas bioinformáticas para modelagem estrutural, validação conformacional e análise

de interação molecular permite ampliar a compreensão dos mecanismos que determinam a ligação antígeno-anticorpo, contribuindo para a identificação e caracterização de candidatos moleculares com potencial aplicação diagnóstica para infecções causadas pelo vírus Zika (PAN *et al.*, 2024; XU *et al.*, 2010; BANSIA; RAMAKUMAR, 2023).

2- OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

Caracterizar e comparar, *in silico*, protótipos de proteínas recombinantes derivadas de epítomos da proteína NS1 de *Orthoflavivirus zikaense*, visando identificar a candidata mais promissora para o diagnóstico diferencial de arboviroses.

2.2 - Objetivos Específicos

1. Obter as estruturas das proteínas recombinantes PRE e PRF previamente desenvolvidas pelo grupo de pesquisa.
2. Caracterizar *in-silico* as propriedades físico-químicas das proteínas recombinantes, com ênfase na hidrofobicidade, exposição ao solvente e acessibilidade antigênica.
3. Realizar levantamento bibliográfico e selecionar anticorpos anti-NS1 com potencial aplicação diagnóstica para arboviroses.
4. Avaliar a conservação dos resíduos da proteína NS1 envolvidos no reconhecimento do anticorpo selecionado.
5. Identificar e mapear tridimensionalmente os resíduos epitópicos presentes nas proteínas recombinantes.
6. Modelar, *in silico*, o fragmento scFv derivado do anticorpo monoclonal 4B8 e identificar suas regiões determinantes de complementaridade (CDRs).
7. Avaliar a interação molecular entre as proteínas recombinantes e o scFv por meio de docking molecular.
8. Caracterizar estruturalmente as interações antígeno-anticorpo, com base na análise de resíduos-chave, energia de ligação e representações tridimensionais dos complexos moleculares.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Recuperação das proteínas recombinantes desenhadas pelo grupo de pesquisa

As proteínas recombinantes PRE e PRF contendo os epítomos da NS1 foram obtidas a partir do trabalho de dissertação de mestrado da aluna Ana Clara Gomes de Souza, intitulado como “Análise da variabilidade antigênica da proteína NS1 de *Flavivirus* para desenvolvimento de novos testes diagnósticos” no ano de 2024 (SOUZA, 2024), desenvolvido no Laboratório de Biologia e Tecnologia de Microrganismos (LBTM), Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto. Esses epítomos foram previamente selecionados por apresentarem regiões de maior conservação aminoacídica em relação às proteínas NS1 de outros *Orthoflavivirus*, característica que os torna candidatos promissores para o desenvolvimento de antígenos recombinantes com maior especificidade diagnóstica.

3.2. Análise de hidrofobicidade dos modelos tridimensionais das proteínas recombinantes

Os modelos tridimensionais das proteínas recombinantes PRE e PRF foram analisadas utilizando o software BIOVIA Discovery Studio (DASSAULT SYSTÈMES BIOVIA, 2020) v21.1, acessado por meio do site oficial <https://www.3ds.com/products/biovia/discovery-studio/visualization/>. Inicialmente, os arquivos estruturais no formato PDB foram importados para o programa. Em seguida, a superfície molecular das proteínas foi gerada por meio da ferramenta **Molecular Surface**, acessada no menu **Structure**, na opção **Surface**, selecionando o comando **Add**, que cria a representação da superfície molecular da estrutura. Esse procedimento permitiu a visualização tridimensional da superfície das estruturas analisadas. Posteriormente, a propriedade de hidrofobicidade foi visualizada por meio da opção **Color by Hydrophobicity**, permitindo identificar regiões hidrofóbicas e hidrofílicas distribuídas na superfície das quimeras. Essa análise foi realizada para caracterizar propriedades superficiais das proteínas que podem influenciar sua estabilidade conformacional, solubilidade e o reconhecimento molecular por anticorpos, aspectos relevantes para a avaliação do potencial diagnóstico das proteínas recombinantes.

3.3. Busca bibliográfica e seleção dos anticorpos anti-NS1 com potencial diagnóstico

Foi realizada uma busca em bases de dados científicas, incluindo PubMed e RCSB Protein Data Bank (RCSB PDB), com o objetivo de identificar anticorpos monoclonais previamente descritos com capacidade de reconhecimento específico da proteína NS1. Foram utilizadas palavras chave como “*anti-NS1 monoclonal antibody ZIKV*”, “*NS1 epitope*” e “*diagnosis NS1 antibody*”. Após a análise dos estudos encontrados, foi selecionado o anticorpo monoclonal 4B8 (PDB: 8JHK), devido à sua capacidade de reconhecer a proteína NS1 de Zika vírus e à acessibilidade da estrutura tridimensional do complexo antígeno-anticorpo depositada no RCSB PDB.

3.4. Alinhamento entre a sequência NS1 da cepa ZIKV GZ02 de referência e a sequência NS1 consenso obtida in silico no laboratório

Os dados estruturais referentes ao anticorpo 4B8 encontram-se depositados no banco de dados RCSB Protein Data Bank (RCSB PDB), sob o código de acesso 8JHK. A partir da análise do trabalho de referência (PAN *et al.*, 2024), observou-se que a cepa GZ02 (GenBank: KX056898.1) foi utilizada nos ensaios *in vitro* e *in silico* relacionados à caracterização da interação entre o anticorpo 4B8 e a proteína NS1.

Uma sequência consenso representa uma sequência que reúne, para cada posição, o aminoácido mais frequentemente observado entre as sequências alinhadas, permitindo representar as características mais conservadas de uma determinada proteína. Dessa forma, a utilização de uma sequência consenso possibilita a obtenção de uma representação da NS1 que contempla os resíduos mais conservados entre as diferentes sequências avaliadas.

Considerando que as proteínas recombinantes desenvolvidas pelo grupo de pesquisa foram obtidas a partir dessa sequência consenso, realizou-se uma análise comparativa entre a proteína NS1 da cepa GZ02 de Zika vírus e a sequência consenso da NS1 obtida no trabalho de dissertação de SOUZA, 2024; com o objetivo de avaliar o grau de similaridade entre ambas, especialmente nas regiões correspondentes aos epítomos de interesse.

Para isto, a sequência da proteína NS1 da cepa GZ02 foi alinhada com a sequência de NS1 consenso através do software MEGA X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis X) v12.1.2, disponibilizado pela plataforma <https://megasoftware.net/>, utilizando o algoritmo ClustalW, com o objetivo de identificar regiões conservadas e possíveis substituições de aminoácidos entre a NS1 da cepa GZ02 e a sequência consenso do laboratório. A ferramenta permitiu a visualização e comparação detalhada dos resíduos localizados nas regiões

epitópicas descritas para o anticorpo 4B8, auxiliando na avaliação da conservação dos sítios de interação antígeno-anticorpo.

3.5. Visualização das regiões de ligação das proteínas recombinantes ao anticorpo 4B8 e identificação dos resíduos-chave

Com base nos dados descritos na literatura (PAN *et al.*, 2024), foram elaboradas figuras das proteínas recombinantes contendo os resíduos correspondentes aos sítios de ligação do anticorpo 4B8. Essa construção teve como objetivo visualizar, de forma didática, a localização dos epítomos ao longo da estrutura das proteínas recombinantes e facilitar a interpretação das análises posteriores.

Para isso, os modelos das proteínas PRE e PRF foram analisadas no software VMD (Visual Molecular Dynamics) v1.9.4 (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996), disponível em <https://tcbg.illinois.edu/Research/vmd/>, utilizado para visualização e manipulação de moléculas biológicas em ambiente computacional. No programa, os resíduos de aminoácidos correspondentes às regiões epitópicas descritas para o anticorpo 4B8 foram selecionados e destacados em vermelho nas estruturas das proteínas recombinantes PRE e PRF. Essa representação gráfica permitiu visualizar a localização espacial dos resíduos de interesse e identificar os possíveis sítios de interação entre o antígeno e o anticorpo 4B8.

A análise comparativa dos resíduos epitópicos críticos envolvidos na interação entre as proteínas recombinantes e o anticorpo 4B8 foram então confrontados com aqueles descritos no artigo de referência (PAN *et al.*, 2024), a fim de verificar a conservação dos sítios de interação estrutural dos complexos obtidos.

3.6. Modelagem estrutural do scFv e definição das CDRs

Foi realizada a modelagem estrutural do scFv derivado do anticorpo monoclonal 4B8. Para a modelagem, foi utilizada a sequência de aminoácidos correspondentes aos domínios variáveis da cadeia pesada - VH (EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTISSKYMSWVRQAPGKGLEWVSIYSSGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLGSGSAFGYWGGTLTVSS) e da cadeia leve - VL (DIVMTQSPSSVSASVGDRV TITCRASQGISTWLAWYQQKPGKAPRLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPFTFGPGTKVEIK), organizados em uma única cadeia polipeptídica e conectados por um peptídeo linker flexível (GGGGSGGGGSGGGGS), característica típica das construções scFv.

Em seguida, a estrutura tridimensional do scFv foi predita utilizando a plataforma web Robetta, disponível em <https://rosetta.bakerlab.org/>, amplamente empregada para modelagem estrutural de proteínas por métodos de homologia e predição *ab initio* (KIM; CHIVIAN; BAKER, 2004). A predição por homologia baseia-se na construção de um modelo tridimensional a partir da similaridade da sequência-alvo com proteínas de estrutura já conhecida, assumindo que sequências semelhantes tendem a apresentar conformações estruturais conservadas. Já a abordagem *ab initio* realiza a predição estrutural sem depender de moldes experimentais, estimando a conformação tridimensional da proteína com base em princípios físico-químicos, energia molecular e organização espacial dos aminoácidos.

Após a obtenção do modelo tridimensional, sua qualidade estrutural foi avaliada por meio do servidor web Molprobit, acessado por meio da plataforma oficial <https://molprobit.biochem.duke.edu/>, utilizando parâmetros estereoquímicos, conformacionais e geométricos e qualidade global da estrutura predita (CHEN *et al.*, 2010).

A identificação das regiões determinantes de complementaridade (CDRs) do anticorpo selecionado foi realizada com base na sequência descrita no estudo de referência. A plataforma web ABYSSIS (Integrated Antibody Sequence and Structure Management, Analysis and Prediction), disponível em <http://www.abysis.org/abysis/>, também foi utilizada para definição das regiões CDR1, CDR2 e CDR3 presentes nos domínios variáveis do anticorpo (HONEGGER; PLÜCKTHUN, 2001). Essas regiões foram posteriormente utilizadas para orientar as análises de interação molecular entre o scFv e as proteínas recombinantes.

3.7. Docking molecular entre as proteínas recombinantes e o scFv do anticorpo 4B8

A interação molecular entre a proteína NS1 e os fragmentos dos anticorpos foi avaliada por meio de docking molecular, utilizando o servidor web HADDOCK[®] (*High Ambiguity Driven protein-protein DOCKing*) v2.4, através da plataforma de acesso <https://wenmr.science.uu.nl/haddock2.4/>, empregado para prever e avaliar interações biomoleculares, como complexos entre proteínas, anticorpos e antígenos (VAN ZUNDERT *et al.*, 2016).

O docking foi empregado para prever possíveis orientações espaciais da interação antígeno-anticorpo e estimar a formação e a estabilidade dos complexos moleculares obtidos. A qualidade dos modelos gerados foi avaliada por meio das métricas fornecidas pelo HADDOCK, incluindo energia de ligação, área de superfície de interface (BSA – Buried

Surface Area), energia de dessolvatação, RMSD (Root Mean Square Deviation) e número de violações das restrições.

Para a submissão na plataforma, os modelos tridimensionais das PRs e dos fragmentos de anticorpos foram obtidas em formato PDB e inseridas no servidor HADDOCK como moléculas de interação (VAN ZUNDERT *et al.*, 2016). Posteriormente, foram definidos os resíduos ativos correspondentes às regiões de interação previamente identificadas na literatura e nas análises estruturais realizadas no estudo (PAN *et al.*, 2024). Os demais parâmetros foram utilizados de modo padrão. Após a configuração dos parâmetros, o servidor executou as etapas de refinamento e predição do complexo molecular, gerando modelos estruturais classificados de acordo com parâmetros energéticos e scores de interação.

3.8. Interpretação das análises de interações intermoleculares e distância de ligação

Foi utilizado o servidor web PLIP (Protein-Ligand Interaction Profiler) para interpretação dos resultados do docking molecular e análise de interações antígeno-anticorpo, disponível em <https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>. Analisamos as interações intermoleculares com base na distância entre os resíduos e nos padrões de contato molecular, permitindo identificar possíveis ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e contatos hidrofóbicos relevantes para a estabilidade do complexo.

3.9. Elaboração das figuras finais e interpretação dos dados estruturais

Após a conclusão do docking molecular no servidor HADDOCK, os complexos proteína-anticorpo obtidos em formato PDB foram utilizados para a geração das representações estruturais finais. Esses modelos foram visualizados e processados para a elaboração das figuras tridimensionais do complexo, permitindo a análise da interação entre a proteína NS1 e os anticorpos avaliados.

As imagens obtidas foram utilizadas para a representação visual dos resultados e para apoiar a interpretação estrutural das interações moleculares identificadas, contribuindo para a consolidação da análise dos complexos formados.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

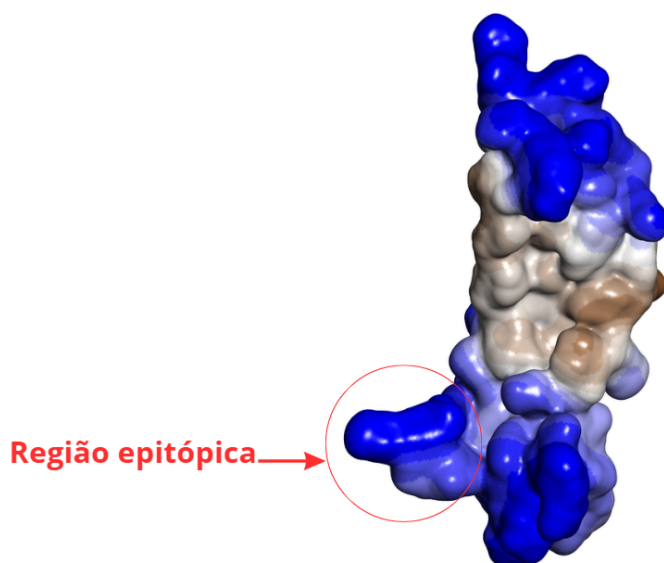
4.1. Caracterização físico-química

Os epítomos derivados da proteína NS1 de ZIKV, presentes nas proteínas recombinantes PRE e PRF, foram denominadas, respectivamente, epítopo E e F. A caracterização estrutural desses epítomos foi realizada utilizando o software BIOVIA Discovery Studio, permitindo a análise das propriedades físico-químicas associadas ao reconhecimento molecular, com ênfase no perfil de hidrofobicidade das estruturas tridimensionais.

A distribuição de resíduos hidrofóbicos e hidrofílicos desempenha papel fundamental na antigenicidade de proteínas virais, influenciando diretamente a acessibilidade dos epítomos ao solvente e, conseqüentemente, ao sistema imune. Regiões superficialmente expostas tendem a favorecer o reconhecimento por anticorpos, enquanto resíduos internalizados geralmente apresentam menor participação na interface antígeno-anticorpo. Além disso, alterações na composição química e conformacional dessas regiões podem modificar a afinidade e a especificidade das interações moleculares (RASTOGI; SHUKLA; SINGH, 2016). A distribuição diferencial da hidrofobicidade em proteínas virais pode impactar significativamente a sensibilidade e a especificidade de ensaios sorológicos (MULLER; YOUNG, 2013).

A análise tridimensional do epítopo E, apresentada na **Figura 6**, demonstrou um perfil físico-químico predominantemente hidrofílico e relativamente homogêneo ao longo da estrutura. A interpretação da escala de cores evidencia a presença de regiões em azul mais intenso, indicando maior caráter hidrofílico e possível concentração de resíduos polares superficialmente expostos. Em contrapartida, as demais regiões apresentaram coloração marrom clara e áreas esbranquiçadas, sugerindo caráter mais neutro e alta hidrofobicidade. Destaca-se que a região epitópica da PRE predita, indicada no círculo em vermelho, encontra-se predominantemente associada a áreas hidrofílicas e superficialmente expostas, característica favorável para a interação com anticorpos. Essa distribuição favorece a acessibilidade da proteína, uma vez que epítomos expostos tendem a ser mais facilmente reconhecidos por anticorpos presentes em amostras biológicas, como o soro sanguíneo. Além disso, observou-se que os resíduos que compõem o epítopo permaneceram estruturalmente expostos, sugerindo preservação conformacional adequada da região antigênica e reforçando seu potencial para aplicações diagnósticas.

Figura 6 - Mapeamento tridimensional da hidrofobicidade do epítipo E. As regiões em azul indicam áreas predominantemente hidrofílicas, enquanto as tonalidades marrons representam regiões mais hidrofóbicas. Regiões em branco correspondem a áreas com características intermediárias ou neutras. A área destacada pelo círculo vermelho corresponde à região epitópica predita.



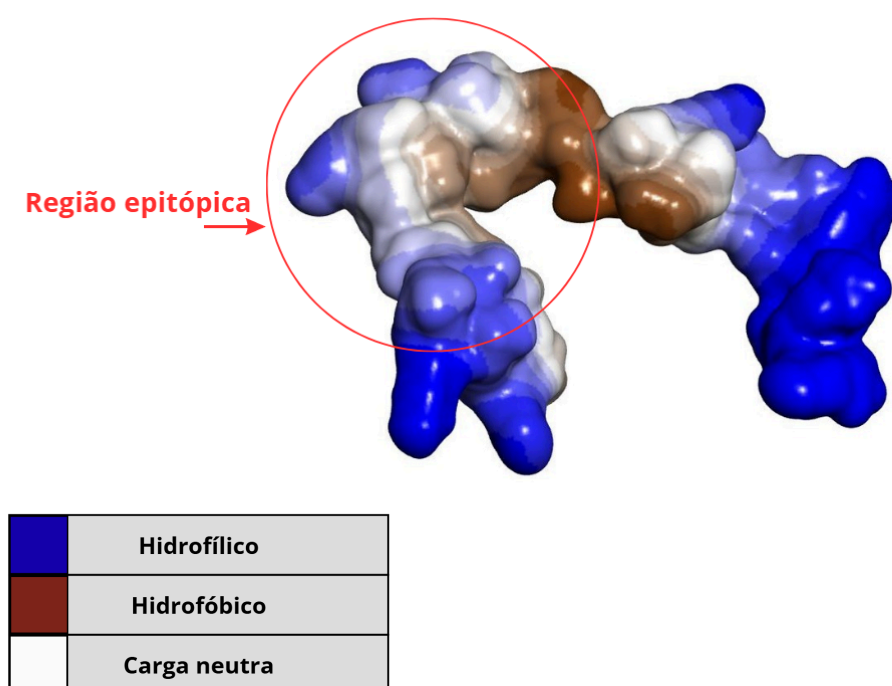
	Hidrofílico
	Hidrofóbico
	Carga neutra

Do ponto de vista estrutural, a manutenção desse perfil hidrofílico pode representar uma característica favorável para aplicações diagnósticas, especialmente em ensaios sorológicos dependentes do reconhecimento de epítopos conformacionalmente acessíveis. Estudos prévios indicam que proteínas recombinantes com adequada exposição superficial apresentam maior capacidade de interação antígeno-anticorpo e melhor desempenho em sistemas diagnósticos baseados em reconhecimento imunológico (MULLER; YOUNG, 2013).

A análise do epítipo F, apresentada na **Figura 7**, revelou um perfil físico-químico distinto do observado para o epítipo E. A interpretação da escala de cores demonstrou maior presença de regiões hidrofóbicas, evidenciadas pelas tonalidades de marrom mais intenso distribuídas ao longo da estrutura. Além disso, observou-se menor homogeneidade na distribuição das propriedades hidrofílicas, sugerindo uma organização estrutural mais heterogênea. Destaca-se que a região epitópica predita, indicada no círculo em vermelho, apresenta concentração expressiva de resíduos com características hidrofóbicas, evidenciadas

pelas tonalidades marrons predominantes na área de interação potencial com o anticorpo. Como a acessibilidade antigênica e a exposição ao meio aquoso são fatores importantes para o reconhecimento molecular em testes sorológicos, a predominância dessas características na região de interesse pode reduzir sua exposição superficial e dificultar o reconhecimento por anticorpos. Dessa forma, o perfil observado sugere que o epítipo F apresenta potencial antigênico mais limitado quando comparado ao epítipo E.

Figura 7 - Mapeamento tridimensional da hidrofobicidade do epítipo F. As regiões em azul indicam áreas hidrofílicas, enquanto as tonalidades marrons representam regiões hidrofóbicas. A área destacada pelo círculo vermelho corresponde à região epitépica predita.



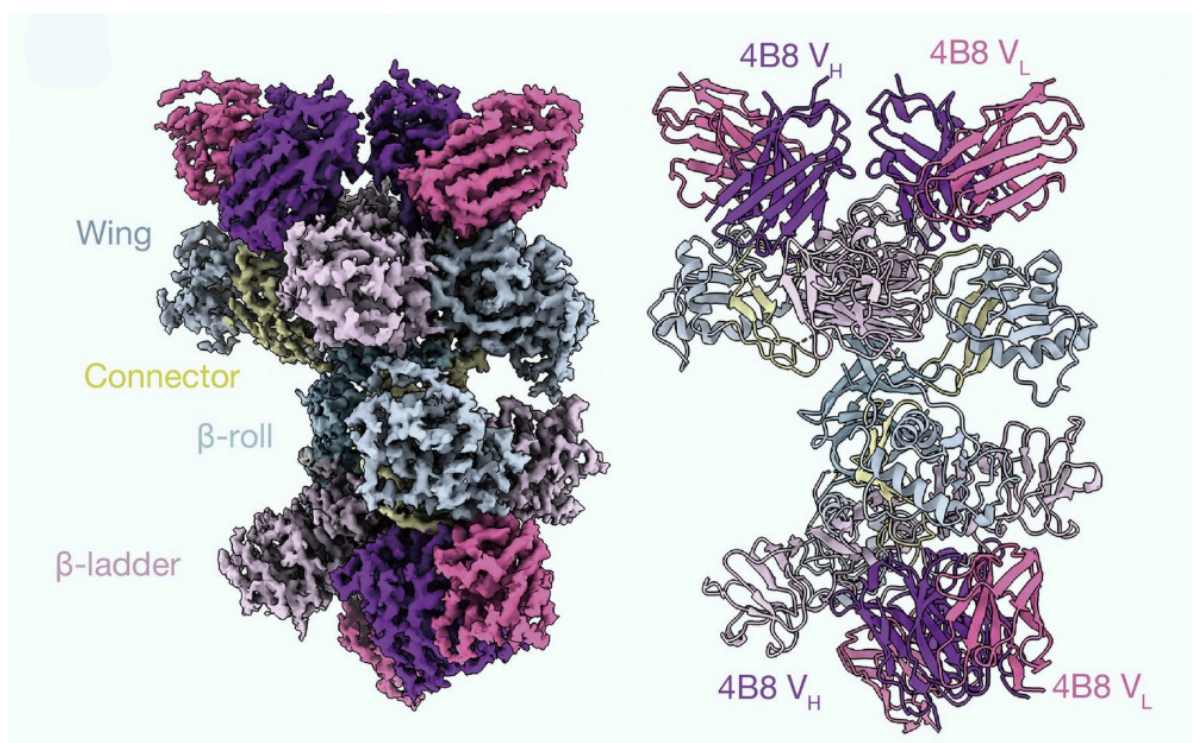
Essas modificações, ainda que sutis, podem influenciar a organização espacial local e as propriedades da superfície protéica, interferindo nas características da interface de interação molecular. A estrutura tridimensional, a mobilidade dos resíduos e as propriedades físico-químicas da superfície do antígeno constituem fatores relevantes para o reconhecimento e a interação com anticorpos (GREENSPAN, 2023; MADSEN *et al.*, 2024). Dessa forma, a distribuição das regiões hidrofóbicas e hidrofílicas observada no epítipo F pode influenciar as características da superfície de interação com o anticorpo e, consequentemente, contribuir para as diferenças observadas no potencial de reconhecimento das proteínas recombinantes.

Comparativamente, ambos os epítomos apresentaram regiões potencialmente acessíveis ao reconhecimento imunológico. Entretanto, o epítopo E demonstrou distribuição mais homogênea de regiões hidrofóbicas e hidrofílicas, maior predominância de regiões hidrofílicas e maior exposição ao solvente, características frequentemente associadas a uma melhor interação antígeno-anticorpo. Por outro lado, o epítopo F apresentou maior concentração de regiões hidrofóbicas e menor uniformidade estrutural, fatores que podem limitar sua acessibilidade imunológica. Em conjunto, esses resultados sugerem que o epítopo E apresenta características mais favoráveis para aplicações diagnósticas, reforçando seu potencial como candidato para o desenvolvimento de ensaios sorológicos direcionados ao diagnóstico diferencial de ZIKV.

4.2. Identificação e seleção de um anticorpo anti-NS1 com potencial diagnóstico

O anticorpo monoclonal humano 4B8, modelo estrutural PDB 8KJH, foi identificado através do levantamento de literatura realizada no banco de dados PubMed e RCSB Protein Data Bank. No estudo de Pan *et al.* (2024), o anticorpo foi obtido a partir do isolamento de anticorpos monoclonais humanos provenientes de pacientes convalescentes infectados pelo Zika vírus, seguido de ensaios de ligação, neutralização funcional e caracterização estrutural por microscopia crioeletrônica (Cryo-EM). O anticorpo 4B8 foi representado no trabalho na forma de fragmento Fab (fragmento de ligação ao antígeno) associado ao tetrâmero da proteína NS1, sendo utilizado para análise estrutural e determinação dos resíduos envolvidos na interação antígeno-anticorpo (PAN *et al.*, 2024) **Figura 8**.

Figura 8 - Estrutura por crio-microscopia eletrônica (Cryo-EM) do tetrâmero NS1 do ZIKV em complexo com Fab 3G2 e Fab 4B8.



Fonte: Adaptado de PAN *et al.*, 2024.

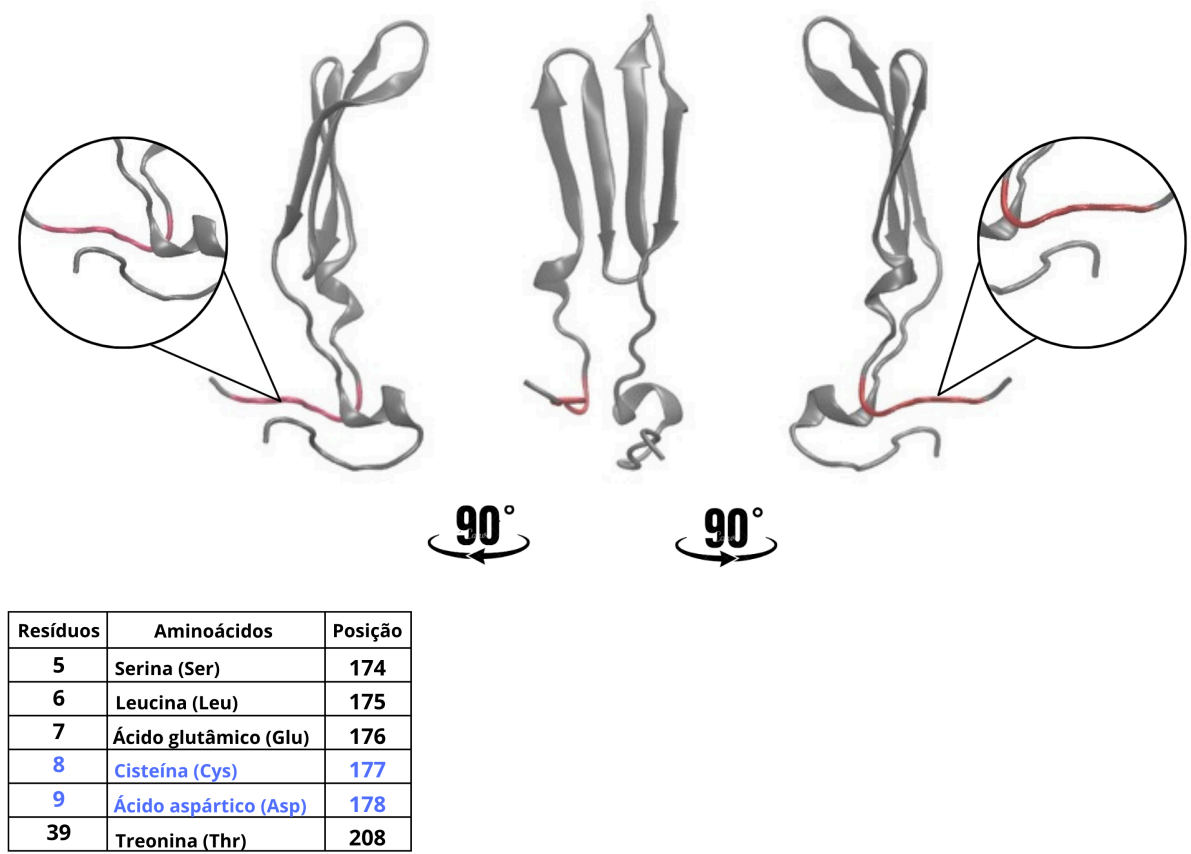
O complexo estrutural tNS1-4B8, correspondente à proteína NS1 em sua forma tetramérica (composta por quatro subunidades associadas) ligada ao anticorpo 4B8, revelou que o anticorpo reconhece epítomos localizados predominantemente nas regiões Wing e β -ladder da proteína NS1, estabelecendo interações com resíduos expostos na superfície externa do dímero proteico (PAN *et al.*, 2024). Essa interface apresenta uma superfície exposta e enriquecida em resíduos carregados, característica que pode contribuir para o reconhecimento específico do epítipo pelo anticorpo 4B8. A localização desse epítipo na superfície externa do dímero também está associada ao maior reconhecimento da NS1 presente na superfície celular e à capacidade do anticorpo 4B8 de inibir a permeabilidade endotelial induzida pela NS1 secretada (PAN *et al.*, 2024). Além disso, os experimentos de ELISA, citometria de fluxo e ensaios de permeabilidade endotelial demonstraram elevada afinidade do anticorpo 4B8 pela NS1 do ZIKV e baixa ou ausência de reatividade cruzada com NS1 de outros *Orthoflavivirus*, reforçando seu potencial para aplicações em diagnóstico diferencial e sorologia específica (Liu *et al.*, 2021; PAN *et al.*, 2024).

4.4. Mapeamento tridimensional dos resíduos epitópicos da PRE e PRF

A fim de avaliar a conservação estrutural e a acessibilidade dos epítomos presentes na proteína recombinante E e F, foi realizada a análise tridimensional dos resíduos previamente descritos como importantes para o reconhecimento do anticorpo monoclonal 4B8. Essa abordagem permitiu avaliar a localização espacial e a acessibilidade dos resíduos epitópicos envolvidos na interação molecular.

A **Figura 11** demonstra a localização tridimensional dos resíduos epitópicos presentes na proteína recombinante E, evidenciando que os resíduos críticos 5, 6, 7, 8, 9 e 39 encontram-se expostos na superfície da estrutura proteica. Esses resíduos foram considerados críticos por estarem relacionados à região de reconhecimento do anticorpo 4B8, cuja interface com a NS1 envolve resíduos localizados nos domínios Wing e β -ladder, conforme demonstrado pela caracterização estrutural do complexo NS1–4B8 por Cryo-EM (PAN *et al.*, 2024). Essa característica estrutural é relevante, uma vez que a exposição ao solvente favorece o reconhecimento molecular por anticorpos, aumentando o potencial de interação antígeno-anticorpo. Entre os resíduos citados, destacam-se 8 e 9 por apresentarem resíduos essenciais segundo o artigo referência (PAN *et al.*, 2024) para o reconhecimento do epítomo, estando localizados entre as posições 177 e 178 da proteína NS1. A presença desses aminoácidos essenciais em uma região superficial sugere que eles participam diretamente da interface de ligação com o anticorpo monoclonal 4B8, potencialmente contribuindo para a interação antígeno-anticorpo. Ademais, é válido salientar que estes resíduos foram selecionados e estavam presentes na região epitópica do trabalho anterior (SOUZA, 2024).

Figura 11 - Estrutura tridimensional da proteína recombinante E (PRE), evidenciando a localização espacial dos resíduos epitópicos críticos 5, 6, 7, 8, 9 e 39 destacados em vermelho. Os resíduos 8 e 9, destacados em azul claro na tabela inferior, foram classificados como essenciais para o reconhecimento do anticorpo monoclonal 4B8, correspondendo às posições 177 (Cys) e 178 (Asp) da proteína NS1, respectivamente.



A distribuição espacial observada indica que os resíduos epitópicos permaneceram acessíveis mesmo após a modelagem da proteína recombinante, sugerindo que a construção da PRE preservou características conformacionais importantes da NS1 nativa. Esse resultado preliminar corrobora com a hipótese de que a proteína recombinante pode manter capacidade antigênica suficiente para aplicações diagnósticas, especialmente em ensaios sorológicos voltados para a detecção específica de ZIKV (SOUZA, 2024). Assim, a conservação estrutural dos resíduos críticos previamente descritos por Pan (PAN *et al.*, 2024) reforça o potencial antigênico da PRE e sua aplicabilidade como candidata promissora para o diagnóstico diferencial de infecções por ZIKV.

Além da presença dos resíduos críticos 5, 6, 7, 8, 9 e 39, a PRE apresentou também os resíduos classificados como essenciais para o reconhecimento do anticorpo monoclonal 4B8, correspondentes às posições 177 e 178 da NS1. Segundo Pan (PAN *et al.*, 2024), esses resíduos desempenham papel indispensável na interface de ligação antígeno-anticorpo,

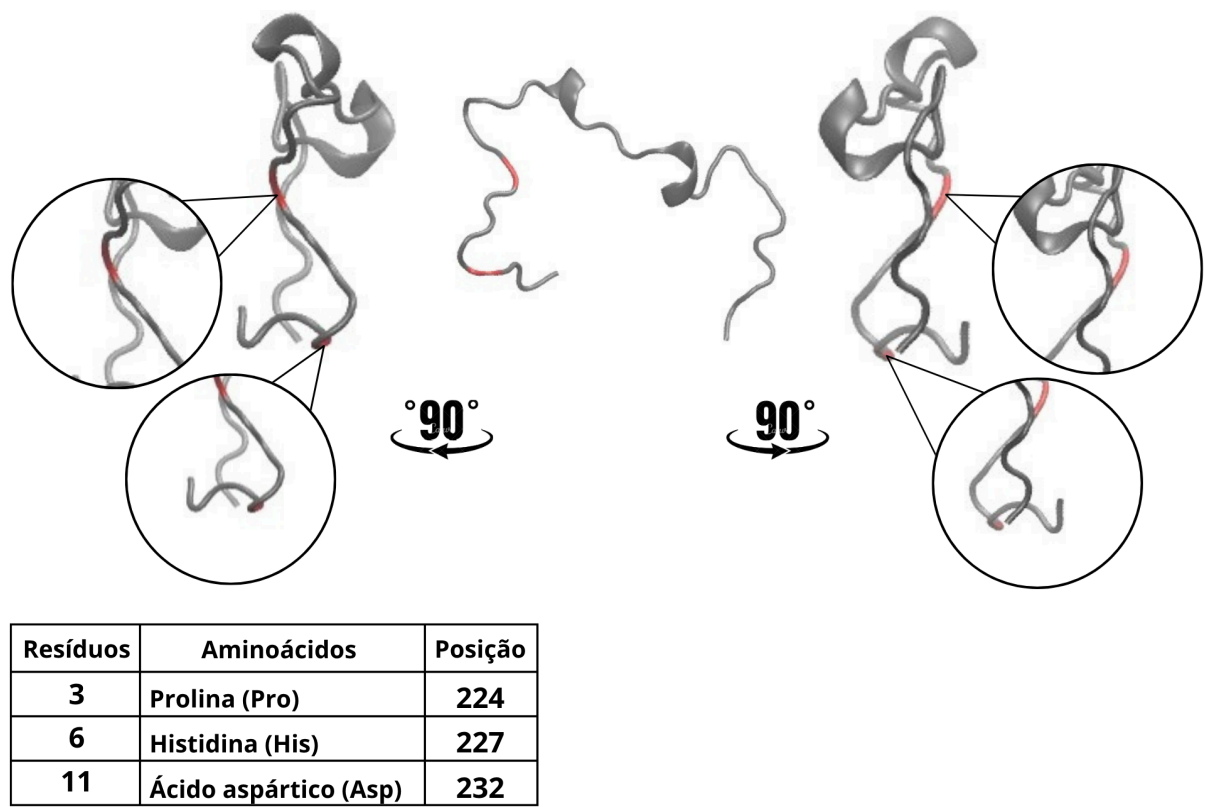
sugerindo participação direta na estabilidade e especificidade do reconhecimento molecular. Nesse contexto, a presença simultânea de resíduos críticos e essenciais na PRE representa um indicativo estrutural importante de que a proteína recombinante preservou regiões determinantes para a afinidade do anticorpo 4B8.

Do ponto de vista bioquímico, destaca-se que os resíduos essenciais identificados correspondem aos aminoácidos cisteína (Cys) e ácido aspártico (Asp). A cisteína possui elevada relevância estrutural devido à sua capacidade de participar de interações estabilizadoras e contribuir para a organização conformacional local da proteína. Já o ácido aspártico apresenta caráter ácido e polar, favorecendo interações eletrostáticas e formação de ligações de hidrogênio importantes para o reconhecimento molecular. Dessa forma, a presença desses aminoácidos em regiões superficialmente expostas pode favorecer a estabilidade da interface antígeno-anticorpo e contribuir para maior especificidade diagnóstica da PRE (NELSON; COX, 2021; BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2019).

Estudos prévios demonstram que regiões localizadas próximas ao domínio wing da NS1 estão associadas ao reconhecimento por anticorpos com maior especificidade e menor reatividade cruzada entre *Orthoflavivirus*, especialmente em relação ao DENV e YFV (WEN *et al.*, 2024; PAN *et al.*, 2024). Considerando que os resíduos essenciais preservados na PRE encontram-se associados a essa região estrutural, os resultados sugerem que a proteína recombinante pode manter propriedades antigênicas relevantes da NS1 nativa, favorecendo futuras aplicações em testes sorológicos mais específicos para ZIKV.

Por sua vez, a **Figura 12** apresenta a estrutura tridimensional da proteína recombinante F (PRF), permitindo avaliar a disposição espacial dos resíduos epitópicos previamente associados ao reconhecimento do anticorpo monoclonal 4B8. A análise estrutural demonstrou que os resíduos 3, 6 e 11 permanecem localizados em regiões superficialmente acessíveis da proteína, indicando preservação conformacional parcial dos epítomos descritos na literatura.

Figura 12 - Estrutura tridimensional da proteína recombinante F (PRF), evidenciando a localização espacial dos resíduos epitópicos críticos 3, 6 e 11 destacados em vermelho, correspondentes às posições 224, 227 e 232 da proteína NS1, respectivamente. Diferentemente do observado na PRE, os resíduos identificados na PRF não foram classificados como essenciais para o reconhecimento do anticorpo monoclonal 4B8.



As diferentes orientações estruturais observadas evidenciam que os resíduos destacados não se encontram internalizados na estrutura tridimensional da proteína recombinante, permanecendo expostos ao solvente. Essa característica favorece o reconhecimento molecular por anticorpos e sugere manutenção da acessibilidade antigênica necessária para interações intermoleculares em análises de docking e ensaios sorológicos.

Entretanto, diferentemente do observado para a PRE, a PRF apresentou apenas resíduos classificados como críticos (PAN *et al.*, 2024), não contendo resíduos considerados essenciais para o reconhecimento do anticorpo 4B8. Embora os resíduos críticos contribuam significativamente para a interação antígeno-anticorpo, os resíduos essenciais são descritos como indispensáveis para a manutenção da afinidade e estabilidade da interface molecular. Dessa forma, a ausência desses aminoácidos na PRF pode indicar menor capacidade de preservar integralmente o padrão de reconhecimento estrutural observado na NS1 nativa.

Esse aspecto torna-se particularmente relevante ao considerar que os resíduos essenciais identificados na PRE correspondem à cisteína e ao ácido aspártico, aminoácidos associados a propriedades estruturais e eletrostáticas importantes para a interação molecular. A ausência desses resíduos na PRF pode resultar em menor contribuição para interações estabilizadoras específicas, potencialmente reduzindo a afinidade de ligação do anticorpo monoclonal 4B8.

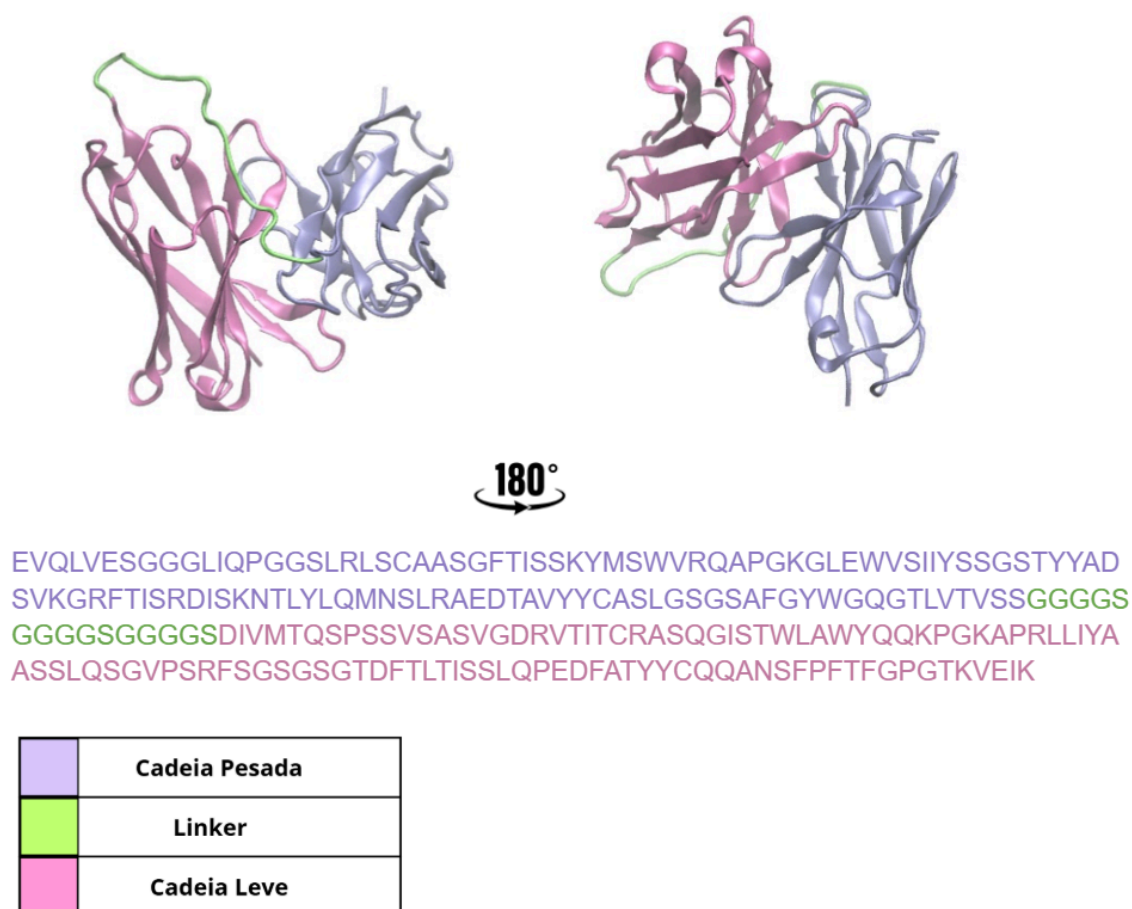
Apesar disso, a adequada exposição superficial dos resíduos críticos observada na PRF sugere que a proteína recombinante ainda mantém potencial antigênico e capacidade de interação molecular com o anticorpo. No entanto, comparativamente à PRE, os resultados indicam que a PRF pode apresentar menor potencial para aplicações diagnósticas que dependem da preservação completa dos determinantes estruturais associados ao reconhecimento específico do anticorpo 4B8.

Dessa forma, os dados estruturais obtidos sugerem que a PRE representa a candidata mais promissora entre as proteínas recombinantes analisadas, uma vez que preserva simultaneamente resíduos críticos e essenciais envolvidos no reconhecimento molecular da NS1 pelo anticorpo monoclonal 4B8. Entretanto, embora as análises tridimensionais indiquem maior potencial antigênico da PRE em relação à PRF, a confirmação dessa hipótese depende das análises de docking molecular, as quais permitirão avaliar de maneira mais detalhada a estabilidade, afinidade e os padrões de interação intermolecular estabelecidos entre as proteínas recombinantes e o anticorpo 4B8.

4.5. Modelagem estrutural do scFv e mapeamento das regiões determinantes de complementaridade

Com o objetivo de avaliar a interação entre as proteínas recombinantes derivadas da NS1 e o anticorpo selecionado, foi realizada a modelagem estrutural *in silico* do scFv do anticorpo 4B8 utilizando a plataforma Robetta como mostrado na **Figura 13**. A obtenção de um modelo tridimensional confiável constitui uma etapa fundamental para análises de docking molecular, uma vez que a qualidade estrutural da molécula influencia diretamente a predição das interfaces de ligação e dos resíduos envolvidos no reconhecimento antígeno-anticorpo.

Figura 13 - Modelo tridimensional do fragmento variável de cadeia única (scFv). Derivado do anticorpo monoclonal 4B8 obtido por modelagem estrutural na plataforma Robetta. A estrutura preserva os domínios variáveis das cadeias pesada (VH) e leve (VL), conectados por um peptídeo linker flexível.



Após a modelagem, a estrutura gerada foi submetida à validação estereoquímica utilizando o servidor Molprobit, ferramenta amplamente empregada para avaliação da qualidade estrutural de modelos proteicos. Os parâmetros obtidos encontram-se apresentados na **Tabela 2** abaixo.

Tabela 2 - Parâmetros de validação estrutural do modelo tridimensional do fragmento de anticorpo scFv derivado do anticorpo monoclonal 4B8 obtidos pela plataforma Molprobity.

Resultados da validação estrutural do modelo scFv			
Contatos de todos os átomos	Clashscore, todos os átomos:	1.16	99º percentil *
Geometria da Proteína	Ramachandran foi favorecido	97,05%	230 resíduos em região ideal e 235 resíduos em região favorável
Estabilidade da estrutura	Pontuação MolProbity ^	1,00	100º percentil *

Os resultados demonstraram elevada qualidade estrutural do modelo gerado. O valor de Clashscore de 1,16, correspondente ao 99º percentil, indica número extremamente reduzido de conflitos estéricos entre átomos da estrutura. Esse parâmetro avalia a ocorrência de sobreposições espaciais incompatíveis entre átomos vizinhos, sendo que valores mais baixos refletem melhor qualidade geométrica e maior plausibilidade biológica da conformação predita.

A análise do gráfico de Ramachandran revelou que 97,05% dos resíduos encontram-se em regiões energeticamente favoráveis, com 230 resíduos posicionados em regiões ideais e 235 resíduos em regiões favoráveis. Esse resultado demonstra que a maioria dos ângulos diedros da cadeia polipeptídica está distribuída em conformações compatíveis com estruturas proteicas experimentalmente determinadas, indicando adequada organização conformacional do modelo. O gráfico completo de Ramachandran utilizado para essa avaliação encontra-se disponibilizado no **Anexo 1** deste trabalho.

Adicionalmente, a pontuação global Molprobity obtida foi de 1,00, correspondente ao 100º percentil. Esse parâmetro integra diferentes métricas estruturais, incluindo geometria molecular, qualidade estereoquímica e conflitos atômicos, sendo amplamente utilizado como indicador global da confiabilidade de modelos tridimensionais. Valores próximos de 1 são característicos de estruturas de elevada qualidade, comparáveis àquelas obtidas por métodos experimentais de alta resolução.

Em conjunto, os resultados obtidos indicam que o modelo estrutural do anticorpo apresentou excelente qualidade geométrica e conformacional, fornecendo suporte para sua utilização nas análises subsequentes de docking molecular. Dessa forma, a elevada confiabilidade do modelo reduz a probabilidade de erros estruturais influenciarem as

predições de interação com as proteínas recombinantes, permitindo uma avaliação mais robusta dos mecanismos de reconhecimento molecular envolvidos na ligação antígeno-anticorpo.

Além da validação estrutural do modelo, foi realizado o mapeamento das regiões determinantes de complementaridade (CDRs) do anticorpo utilizando a plataforma Abysis. A análise permitiu identificar as regiões hipervariáveis responsáveis pelo reconhecimento específico do antígeno nos domínios variáveis das cadeias leve (VL) e pesada (VH), conforme apresentado na **Tabela 3 (A e B)**.

Tabela 3A – Identificação das regiões determinantes de complementaridade (CDRs) da cadeia leve (VL) do anticorpo monoclonal 4B8 obtidas pela plataforma Abysis. Ademais, são apresentados na tabela os fragmentos de sequência correspondentes às regiões CDR-L1, CDR-L2 e CDR-L3, a posição dos resíduos e o comprimento de cada região.

Region	Sequence Fragment	Residues	Length
LFR1	DIVMTQSPSSVSASVGDRVITTC	1 - 23	23
CDR-L1	RASQGISTWLA	24 - 34	11
LFR2	WYQQKPGKAPRLLIY	35 - 49	15
CDR-L2	AASSLQS	50 - 56	7
LFR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	57 - 88	32
CDR-L3	QQANSFPFT	89 - 97	9
LFR4	FGPGTKVEIK	98 - 107	10
			107

Tabela 3B – Identificação das regiões determinantes de complementaridade (CDRs) da cadeia pesada (VH) do anticorpo monoclonal 4B8 obtidas pela plataforma Abysis. Ademais, são apresentados os fragmentos de sequência correspondentes às regiões CDR-H1, CDR-H2 e CDR-H3, a posição dos resíduos e o comprimento de cada região.

Region	Sequence Fragment	Residues	Length
HFR1	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTIS	1 - 30	30
CDR-H1	SKYMS	31 - 35	5
HFR2	WVRQAPGKGLEWVS	36 - 49	14
CDR-H2	IYSSGSTYYADSVKG	50 - 65	16
HFR3	RFTISRDISKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS	66 - 97	32
CDR-H3	LGSGSAFGY	98 - 106	9
HFR4	WGQGTILVTVSS	107 - 117	11
			117

Na cadeia leve (VL), foram identificadas três regiões de complementaridade: CDR-L1 (resíduos 24–34), CDR-L2 (resíduos 50–56) e CDR-L3 (resíduos 89–97). De forma semelhante, na cadeia pesada (VH), foram identificadas as regiões CDR-H1 (resíduos 31–35), CDR-H2 (resíduos 50–65) e CDR-H3 (resíduos 98–106). Em conjunto, essas seis regiões formam o sítio de reconhecimento do anticorpo e desempenham papel fundamental na determinação da especificidade e da afinidade de ligação ao antígeno.

A identificação dessas regiões foi particularmente relevante para as etapas subsequentes do estudo, uma vez que os resíduos localizados nas CDRs foram considerados potenciais participantes das interações moleculares com as proteínas recombinantes derivadas da NS1. Dessa forma, o mapeamento das regiões de complementaridade forneceu informações estruturais essenciais para orientar as análises de docking molecular realizadas no servidor HADDOCK, permitindo uma avaliação mais precisa dos possíveis resíduos envolvidos no reconhecimento antígeno-anticorpo.

Adicionalmente, observou-se que, dentre os resíduos localizados nas regiões determinantes de complementaridade, foi identificado o resíduo 101 da cadeia pesada (VH), pertencente à região CDR-H3, previamente descrito na literatura como crítico para o reconhecimento do antígeno. Esse achado sugere que a CDR-H3 pode desempenhar papel central na interação entre o scFv 4B8 e a proteína NS1 do vírus Zika, uma vez que essa região é frequentemente associada à especificidade e à afinidade de ligação dos anticorpos (SILVA *et al.*, 2020).

4.6. Docking molecular entre o scFv 4B8 e a proteína recombinante PRE e PRF

Após a identificação das CDRs, foi realizado o docking molecular entre o anticorpo scFv 4B8 e a proteína recombinante PRE utilizando o servidor HADDOCK. O objetivo dessa etapa foi avaliar a capacidade de reconhecimento molecular do anticorpo em relação ao antígeno e identificar os principais resíduos envolvidos na formação do complexo antígeno-anticorpo.

Os resultados obtidos demonstraram a formação de um complexo estruturalmente estável e energeticamente favorável entre a PRE e o anticorpo scFv 4B8. Os parâmetros calculados pelo servidor HADDOCK encontram-se na **Tabela 4**.

Tabela 4 - Parâmetros obtidos no docking molecular entre o anticorpo scFv 4B8 e a proteína recombinante PRE utilizando o servidor HADDOCK. São apresentados os valores de energia de ligação, área de superfície encoberta, energia de dessolvatação, RMSD e violações de restrições, utilizados para avaliar a estabilidade e a qualidade do complexo antígeno-anticorpo gerado.

Parâmetros HADDOCK	Valores Obtidos
Energia de Ligação	-101,61 kcal/mol
Área de Superfície Encoberta	2023,28 Å ²
Energia de Dessolvatação	-28,46 kcal/mol
RMSD	0,91 Å
Violações de Restrições	14

O melhor agrupamento gerado apresentou energia de ligação de -101,61 kcal/mol. Esse parâmetro corresponde à soma ponderada dos componentes energéticos envolvidos na interação intermolecular do complexo, incluindo as energias eletrostática, de van der Waals e de dessolvatação. Valores mais negativos indicam maior estabilidade energética do complexo predito, sendo utilizados pelo servidor HADDOCK como critério para classificação e seleção do modelo mais representativo dentre os agrupamentos gerados. Dessa forma, o valor obtido indica elevada afinidade computacionalmente estimada entre as moléculas.

Adicionalmente, foi observada uma área de superfície encoberta (buried surface area) de 2023,28 Å², calculada como a diferença entre a área de superfície acessível ao solvente das moléculas isoladas e a do complexo formado. Esse valor representa a extensão da região de contato entre o antígeno e o anticorpo que deixa de estar exposta ao solvente após a formação do complexo, refletindo a abrangência espacial da interface de interação. Interfaces antígeno-anticorpo descritas na literatura costumam apresentar áreas entre aproximadamente 600 e 2000 Å², de modo que o valor obtido está compatível com esse padrão, evidenciando uma interface de contato extensa e consistente com o reconhecimento imunológico específico.

O valor de energia de dessolvatação (-28,46 kcal/mol) também contribuiu favoravelmente para a estabilidade do complexo. Esse parâmetro, calculado pelo HADDOCK com base em parâmetros atômicos de solvatação (ASP), estima o custo energético associado à remoção das moléculas de água presentes na interface no momento da formação do

complexo antígeno-anticorpo. Valores negativos indicam que a composição da interface, geralmente rica em resíduos hidrofóbicos que se tornam enterrados durante a interação, favorece energeticamente a exclusão do solvente dessa região, contribuindo para a estabilização termodinâmica do complexo formado entre o scFv 4B8 e a PRE.

O valor de RMSD de 0,91 Å, calculado entre os modelos pertencentes ao melhor agrupamento em relação à estrutura de menor energia do cluster, indicou boa convergência estrutural entre as simulações realizadas. Esse resultado reflete a reprodutibilidade geométrica dos modelos gerados pelo HADDOCK, sugerindo que o algoritmo convergiu de forma consistente para uma mesma orientação de interação entre a proteína recombinante e o anticorpo.

O reduzido número de violações de restrições (14), que representa a quantidade de vezes em que a distância entre os resíduos definidos como restrições ambíguas de interação (AIRs) ultrapassou o limite estabelecido no modelo final, sugere que a geometria predita está, em sua maior parte, em conformidade com as informações biológicas utilizadas para guiar a simulação, como dados de epítipo e paratopo disponíveis na literatura, reforçando a plausibilidade biológica do modelo gerado.

Em conjunto, esses parâmetros indicam que o complexo PRE-scFv 4B8 apresenta características de elevada estabilidade e robustez molecular, fornecendo suporte estrutural para a aplicação dessa proteína recombinante em estratégias diagnósticas baseadas no reconhecimento antígeno-anticorpo.

A análise detalhada da interface de ligação foi realizada utilizando a ferramenta PLIP, permitindo a identificação dos principais tipos de interação responsáveis pela estabilização do complexo molecular.

Entre as interações observadas, destacaram-se 9 ligações de hidrogênio estabelecidas entre resíduos do anticorpo e da proteína recombinante, conforme apresentado na **Tabela 5**. Essas interações representam importantes contribuições para a especificidade do reconhecimento molecular, uma vez que promovem contatos direcionais e energeticamente favoráveis entre os parceiros de ligação.

Tabela 5 – Ligações de hidrogênio identificadas na interface de interação entre o anticorpo scFv 4B8 e a proteína recombinante PRE por meio da análise realizada no servidor PLIP. São apresentados os resíduos envolvidos em cada interação e as respectivas distâncias intermoleculares, evidenciando os principais contatos responsáveis pela estabilização do complexo antígeno-anticorpo.

Número de ligações de hidrogênio	Doador (Anticorpo)	Receptor (Antígeno)	Distância (Å)
1	TYR 58	HIS 24	2.94
2	TYR 33	GLY 14	2.99
3	SER 53	THR 15	3.11
4	TYR 58	SER 33	3.13
5	THR 57	TRP 39	3.14
6	TYR 33	SER 25	3.19
7	SER 100	ASP 26	3.26
8	TYR 33	GLY 14	3.32
9	SER 100	ASP 26	3.38

Nomenclatura dos Aminoácidos	
TYR	Tirosina
SER	Serina
THR	Treonina
HIS	Histidina
GLY	Glicina
TRP	Triptofano
ASP	Ácido Aspártico

Os resíduos Tyr33 e Tyr58 do anticorpo mostraram-se particularmente relevantes, participando de múltiplas ligações de hidrogênio com resíduos da proteína recombinante, evidenciando papel central na estabilização da interface. O resíduo Tyr58 destacou-se por estabelecer três interações independentes na interface do complexo (ligações 1, 4 e possivelmente envolvida em contatos adicionais), sugerindo papel importante na compatibilidade estrutural entre as moléculas. As distâncias intermoleculares observadas (variando entre 2,94 Å e 3,38 Å) encontram-se dentro do intervalo típico para ligações de

hidrogênio biologicamente relevantes, reforçando a plausibilidade química das interações preditas.

Adicionalmente, os resíduos Ser53, Ser100 e Thr57 do anticorpo também contribuíram significativamente, estabelecendo contatos polares com resíduos da proteína recombinante (His24, Asp26, Ser33, Asp26 novamente, e Trp39), indicando uma rede diversificada de interações que distribui para estabilização ao longo de múltiplas regiões da interface de interação do scFv 4B8 e da proteína recombinante PRE.

Não foram observadas pontes salinas nem contatos hidrofóbicos significativos na interface analisada. Esse resultado sugere que o reconhecimento molecular entre o scFv 4B8 e a PRE é predominantemente mediado por interações polares, especialmente ligações de hidrogênio.

Após o docking molecular entre a proteína recombinante PRE e o anticorpo scFv 4B8, o mesmo foi feito para a PRF utilizando o servidor HADDOCK, com o objetivo de avaliar a capacidade de reconhecimento molecular e identificar os principais resíduos envolvidos na formação do complexo antígeno-anticorpo.

Os parâmetros obtidos encontram-se apresentados na **Tabela 6**. O melhor agrupamento gerado pelo HADDOCK apresentou energia de ligação de -160,40 kcal/mol, indicando elevada afinidade entre o anticorpo e a proteína recombinante. Esse valor mostrou-se mais favorável do que aquele observado para a PRE (-101,61 kcal/mol), sugerindo uma interação energeticamente mais estável entre a PRF e o scFv 4B8. Porém os demais parâmetros de qualidade do docking são importantes para determinar essa interação.

Tabela 6 - Parâmetros obtidos no docking molecular entre o anticorpo scFv 4B8 e a proteína recombinante PRF utilizando o servidor HADDOCK. São apresentados os valores de energia de ligação, área de superfície encoberta, energia de dessolvatação, RMSD e violações de restrições, utilizados para avaliar a estabilidade e a qualidade do complexo antígeno-anticorpo gerado.

Parâmetros HADDOCK	Valores Obtidos
Energia de Ligação	-160,40 kcal/mol
Área de Superfície Encoberta	1189,20 Å ²
Energia de Dessolvatação	-7,60 kcal/mol
RMSD	0,50 Å
Violações de Restrições	236,20

A área de superfície encoberta observada foi de 1189,20 Å², valor substancialmente inferior ao registrado para a PRE (2023,28 Å²). A redução de aproximadamente 834 Å² (cerca de 41%) da área de contato, comparativamente à PRE, indica uma interface de ligação mais compacta e potencialmente menos robusta, o que contrasta com a expectativa de que maior afinidade energética seria acompanhada de maior extensão de interface.

A energia de dessolvatação obtida para o complexo PRF foi de -7,60 kcal/mol, valor que, embora ainda favorável, apresentou contribuição energética substancialmente menor para a estabilidade do complexo quando comparado à PRE (-28,46 kcal/mol). Isso indica menor participação desse componente na formação da interface antígeno-anticorpo, sugerindo que a desidratação da interface contribui menos significativamente para a estabilidade nesse complexo.

Adicionalmente, o RMSD de 0,50 Å demonstrou-se levemente inferior ao observado para a PRE (0,91 Å), evidenciando maior convergência estrutural entre as soluções geradas pelo HADDOCK para esse complexo.

Ademais, foi encontrado um número maior de violações de restrição da PRE com 236.20, se comparado a PRF que apresentou apenas 14. Isso pode indicar menor consistência da PRF com as restrições biológicas fornecidas ao servidor HADDOCK.

As análises das interações intermoleculares da PRF também foram realizadas por meio da plataforma PLIP, permitindo a identificação das principais interações responsáveis pela estabilização do complexo molecular. Foram identificadas 8 ligações de hidrogênio distribuídas entre resíduos do anticorpo e da proteína recombinante, conforme apresentado na **Tabela 7** abaixo, apresentando um número a menos quando comparado às 9 ligações identificadas na PRE.

Tabela 7 – Ligações de hidrogênio identificadas na interface do complexo molecular formado entre a proteína recombinante PRF e o anticorpo scFv 4B8. A análise foi realizada utilizando o servidor PLIP, sendo apresentados os resíduos participantes da interação e as respectivas distâncias intermoleculares.

Número de ligações de hidrogênio	Doador (Anticorpo / Antígeno*)	Receptor (Antígeno / Anticorpo#)	Distância (Å)
1	SER 54 (B)	CYS 1	2.66
2	LYS 32 (B)	ASP 12	2.70
3	TRP 10 (A)*	SER 31#	2.83
4	LYS 32 (B)	ASP 12	2.83
5	SER 54 (B)	GLU 2	3.06
6	TYR 33 (B)	HIS 7	3.08
7	THR 8 (A)*	GLY 99#	3.14
8	TYR 33 (B)	PRO 4	3.44

Nomenclatura dos Aminoácidos	
CYS	Cisteína
LYS	Lisina
GLU	Glutamato
PRO	Prolina
*	Antígeno
#	Anticorpo

As distâncias observadas variaram entre 2,66 Å e 3,44 Å, valores compatíveis com ligações de hidrogênio estruturalmente relevantes em complexos proteína-proteína. Entre os resíduos do anticorpo envolvidos nas interações destacaram-se Lys32, Tyr33 e Ser54, que participaram de múltiplos contatos com a proteína recombinante. O resíduo Lys32 estabeleceu duas ligações de hidrogênio independentes com o resíduo Asp12 da PRF, aproveitando sua cadeia lateral carregada positivamente para favorecer interações eletrostáticas. O resíduo Tyr33 participou de contatos com His7 e Pro4 da proteína recombinante, reproduzindo seu papel frequentemente observado em interfaces antígeno-anticorpo como mediador simultâneo de interações polares e hidrofóbicas. Além

disso, observou-se participação dos resíduos Trp10 e Thr8 da cadeia leve do anticorpo, indicando contribuição de múltiplas CDRs no reconhecimento molecular.

Comparativamente, a PRE apresentou maior número de resíduos de Tyr (Tirosina) em relação à PRF. A tirosina é frequentemente observada em interfaces antígeno-anticorpo devido à sua capacidade de participar simultaneamente de interações hidrofílicas e hidrofóbicas, sendo considerada um dos aminoácidos mais importantes para o reconhecimento molecular em imunoglobulinas.

Embora a proteína recombinante F tenha apresentado HADDOCK Score mais negativo em comparação com a proteína recombinante E, esse resultado deve ser analisado em conjunto com os demais parâmetros de qualidade do docking.

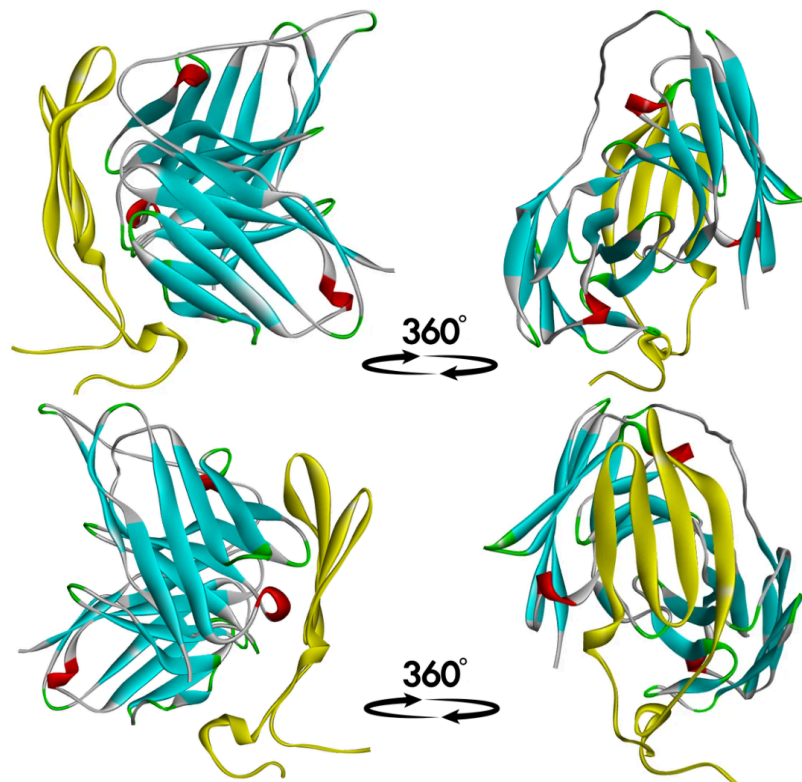
Além disso, a PRE apresentou maior área de superfície encoberta (2023,28 Å² versus 1189,20 Å²), sugerindo uma interação mais extensa e compatível com complexos antígeno-anticorpo biologicamente relevantes. Esse resultado, associado à preservação dos resíduos essenciais previamente descritos na literatura (PAN *et al.*, 2024) como fundamentais para o reconhecimento do anticorpo 4B8, reforça a consistência do complexo formado pela PRE. Em contraste, a PRF contém apenas resíduos críticos, não apresentando os resíduos essenciais, o que compromete sua capacidade de reproduzir o padrão de reconhecimento estrutural da NS1 nativa.

4.7. Representação estrutural dos complexos antígeno-anticorpo obtidos por docking molecular

Com o objetivo de visualizar os complexos antígeno-anticorpo na sua conformação tridimensional e complementar as análises de docking molecular previamente descritas, foram geradas representações tridimensionais dos complexos formados entre as proteínas recombinantes e o anticorpo scFv 4B8 (**Figuras 14 e 15**).

A representação tridimensional do complexo PRE-scFv 4B8 (**Figura 14**) evidencia uma interface de ligação extensa e bem organizada, com o anticorpo posicionado de forma compatível com múltiplos pontos de contato ao longo da estrutura proteica. A PRE permanece adequadamente posicionada no sítio de reconhecimento do anticorpo, permitindo amplo contato intermolecular. Essa observação é consistente com os parâmetros energéticos obtidos pelo HADDOCK, especialmente a elevada área de superfície encoberta (2023,28 Å²) e o grande número de interações identificadas na interface.

Figura 14 - Representação tridimensional do complexo molecular formado entre a PRE e o anticorpo scFv 4B8 obtido por docking molecular no servidor HADDOCK. As diferentes orientações espaciais evidenciam a interface de ligação e organização do complexo antígeno-anticorpo. A PRE encontra-se representada em amarelo na porção lateral das figuras, em relação ao anticorpo scFv 4B8 que se encontra representado em azul na porção central das figuras.

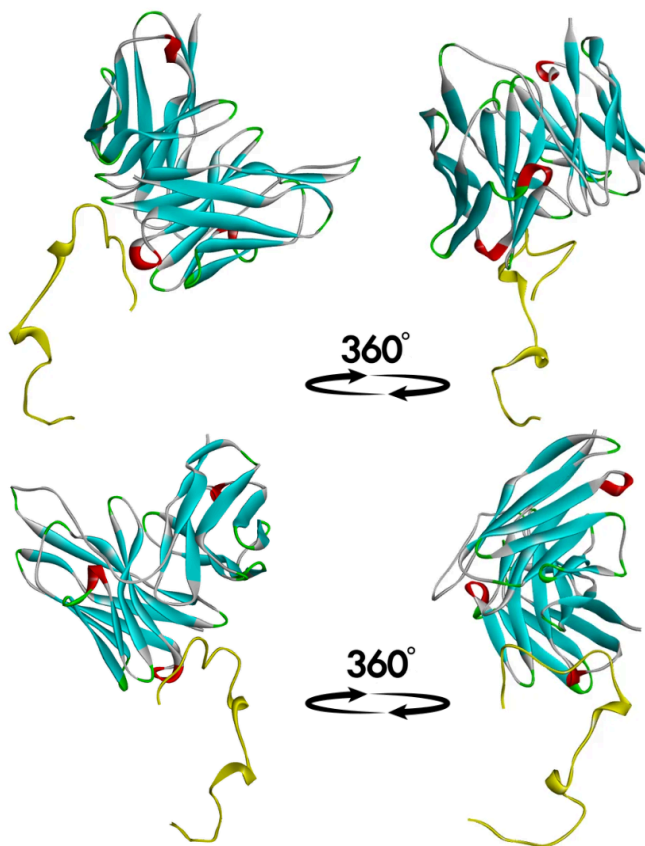


Além disso, a orientação observada sugere que os resíduos críticos e essenciais previamente mapeados na PRE permanecem acessíveis ao reconhecimento molecular, juntamente com a região epitópica, corroborando as análises estruturais realizadas anteriormente (**Figura 11**). Dessa forma, esse resultado reforça que a PRE preservou características conformacionais importantes da proteína NS1 nativa, favorecendo o reconhecimento pelo anticorpo monoclonal 4B8.

Em contraste, o complexo PR-F-scFv 4B8 (**Figura 15**) apresenta uma interface de ligação consideravelmente mais reduzida, com o anticorpo ocupando um espaço menor na superfície do antígeno, ademais, a região epitópica e os resíduos críticos não se encontram acessíveis. A estrutura resultante é visualmente menos integrada, sem a complementaridade estrutural extensiva observada na PRE. Essa observação visual está em concordância com os parâmetros quantitativo obtidos (área de superfície encoberta de 1189,20 Å² para PRF versus 2023,28 Å² para PRE, e menor contribuição da energia de dessolvatação -28,46 kcal/mol da PRE e -7,60 kcal/mol). Embora o número de violações de restrições (236,20) não constitua, isoladamente, um critério definitivo de inadequação estrutural, visto que o protocolo do

HADDOCK realiza exclusão aleatória de parte das restrições ambíguas (AIRs) a cada rodada de docking como estratégia para minimizar o impacto de possíveis restrições incorretas, seu valor consideravelmente superior ao observado para a PRE (14) reforça, em conjunto com os demais parâmetros, a interpretação de que a interface obtida para a PRF apresenta menor concordância com o padrão de reconhecimento esperado com base nos dados experimentais de Pan *et al.* (2024).

Figura 15 - Representação tridimensional do complexo molecular formado entre a PRF e o anticorpo scFv 4B8 obtido por docking molecular no servidor HADDOCK. As diferentes orientações do complexo permitem visualizar a interface de ligação no reconhecimento molecular. A PRF encontra-se representada na cor amarela, com o formato de alça na porção inferior das figuras, enquanto o anticorpo scFv 4B8 está representado em azul claro na porção superior das figuras.



Em conjunto, as visualizações tridimensionais revelam diferenças estruturais marcantes entre os dois complexos. Sabendo disso, a PRE emerge como candidata significativamente mais promissora, apresentando uma interface robusta, bem organizada e compatível com o reconhecimento específico do anticorpo 4B8. Embora a PRF preserve algum potencial antigênico, suas limitações estruturais reduzem sua adequação para aplicações diagnósticas que dependem de elevada especificidade e afinidade.

5 - CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram a aplicabilidade de ferramentas bioinformáticas na caracterização estrutural de proteínas recombinantes derivadas da NS1 do vírus Zika e na avaliação de seu potencial para aplicações diagnósticas. As análises de sequência, modelagem estrutural, mapeamento de epítopos e docking molecular evidenciaram que ambos os protótipos das proteínas recombinantes avaliadas foram capazes de interagir com o anticorpo monoclonal 4B8.

Embora a proteína recombinante PRF tenha apresentado valores energéticos mais favoráveis no HADDOCK, essa vantagem não se refletiu nos principais parâmetros, apresentando interface reduzida, ausência de resíduos essenciais, docking molecular com elevadas violações de restrições e menor contribuição da energia de dessolvatação para o reconhecimento do anticorpo 4B8, indicando menor consistência com as informações biológicas utilizadas para guiar o docking. Em contrapartida, a PRE apresentou baixa ocorrência de violações de restrições, maior área de interface molecular, além de resíduos essenciais e críticos para o reconhecimento do anticorpo 4B8. Em conjunto, esses resultados indicam que a PRE representa a candidata mais consistente entre as proteínas recombinantes avaliadas para o desenvolvimento de testes diagnóstico diferencial de *Orthoflavivirus zikaense*, sendo a mais promissora para futuras etapas de validação experimental. Estudos *in vitro* e *in vivo* são necessários para confirmar seu desempenho biológico e diagnóstico.

6 - PERSPECTIVAS FUTURAS

- Mutações em pontos chave de ligação para induzir o anticorpo a se ligar nos demais antígenos de *Orthoflavivirus*.
- Expressão gênica das proteínas recombinantes e anticorpos.
- Testes de captura de antígenos e/ou anticorpos a partir do plasma de pacientes infectados.
- Protótipos diagnósticos.

7 - REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Cellular and Molecular Immunology*. 10. ed. Philadelphia: Elsevier, 2022.
- AHMAD, Z. A.; YEAP, S. K.; ALI, A. M.; HO, W. Y.; ALITHEEN, N. B. M.; HAMID, M. scFv antibody: principles and clinical application. *Clinical and Developmental Immunology*, v. 2012, p. 1–15, 2012.
- ALMO, S. C.; BONANNO, J. B.; SAUDER, J. M.; *et al.* Structural genomics of protein phosphatases. *Journal of Structural and Functional Genomics*, v. 8, n. 2-3, p. 121-140, 2013.
- ASAADI, Y.; FAZLOLLAHI JOUNEGHANI, F.; JANANI, S.; RAHBARIZADEH, F. A comprehensive comparison between camelid nanobodies and single chain variable fragments. *Biomarker Research*, v. 9, n. 87, 2021.
- ÁVILA-PÉREZ, G.; GARCÍA-CORDERO, J.; SORIANO-NAVARRO, M.; *et al.* Zika virus non-structural proteins NS1 and NS1' antagonize interferon signaling. *PLoS Pathogens*, v. 14, n. 3, p. e1007001, 2018.
- BALEA, R. *et al.* Development and pre-clinical evaluation of a Zika virus diagnostic for low resource settings. *Frontiers in Microbiology*, v. 14, 1214148, 2023.
- BANSIA, H.; RAMAKUMAR, S. CDR conformations and binding modes in antibodies: structural insights from computational approaches. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, v. 91, n. 4, p. 481-495, 2023.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. *Biochemistry*. 9. ed. New York: W.H. Freeman, 2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo Zika vírus até a Semana Epidemiológica 13, Brasil, 2016. *Boletim Epidemiológico*, Brasília, v. 47, n. 13, 2016.
- BURCIAGA-FLORES, M. *et al.* Updating Zika diagnostic methods: the point-of-care approach. *Revista de Investigación Clínica*, v. 72, n. 6, p. 344-352, 2020.

CAMUSSONE, C.; MARCIPAR, I.; GIAMBARTOLOMEI, G. H.; *et al.* Rational design of recombinant protein-based vaccines for infectious and zoonotic diseases. *Current Medicinal Chemistry*, v. 16, n. 28, p. 3671-3688, 2009.

CECONI, Martina; ARIËN, Kevin K.; DELPUTTE, Peter. Diagnosing arthropod-borne flaviviruses: non-structural protein 1 (NS1) as a biomarker. *Trends in Microbiology*, v. 32, n. 7, p. 678-696, 2024.

CHEN, V. B.; ARENDALL, W. B.; HEADD, J. J.; *et al.* MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica Section D*, v. 66, n. 1, p. 12-21, 2010.

CIOTA, A. T. Arthropod-borne virus surveillance and epidemiology. *Current Opinion in Virology*, v. 37, p. 35-43, 2019.

CUMBERWORTH, A.; LAMOUR, V.; MISHRA, A.; *et al.* Zika virus infection during pregnancy and congenital complications. *Nature Reviews Microbiology*, v. 15, n. 11, p. 689-701, 2017.

DENANI, C.; HORBACH, I.; SETATINO, B.; AZEVEDO, A.; LIMA, S.; SCHWARCZ, W.; SOUSA, I. Evolution of the PRNT: merging tradition and innovation to set the gold standard in the era of automation. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, v. 21, n. 1, 2025.

DE SALAZAR, P. M.; FONTANET, A.; GASCÓ, J.; *et al.* Zika virus epidemiology in four geographically distinct regions. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 16, n. 11, p. 1270-1275, 2016.

DIPTI; JAIN, A.; NAVIN, K. Applications of recombinant proteins as diagnostics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 70, n. 2, p. 157-167, 2006.

FACCHINELLI, L.; BADOLO, A.; McCALL, P. J. Biology and Behaviour of *Aedes aegypti* in the Human Environment: Opportunities for Vector Control of Arbovirus Transmission. *Viruses*, v. 15, n. 3, p. 636, 2023.

FREIRE, M. S.; KUBELKA, C. F.; MARCHEVSKY, R. S.; *et al.* Antibodies to dengue, dengue-related flaviviruses and yellow fever vaccine in blood donors. *Transfusion Medicine*, v. 17, n. 4, p. 273-279, 2017.

GASPAR-CASTILLO, C. *et al.* Structural and immunological basis of cross-reactivity between dengue and Zika infections: implications in serosurveillance in endemic regions. *Frontiers in Microbiology*, v. 14, 1107496, 2023.

GAO, F.; DUAN, X.; XIE, Z.; *et al.* Monoclonal antibodies against NS1 protein provide protective immunity against Zika virus infection. *The Journal of Virology*, v. 95, n. 5, p. e02089-20, 2021.

GLASNER, D. R.; PUERTA-GUARDO, H.; BEATTY, P. R.; HARRIS, E. The good, the bad, and the shocking: the multiple roles of dengue virus nonstructural protein 1 in protection and pathogenesis. *Annual Review of Virology*, v. 5, p. 227–253, 2018.

GREENSPAN, Neil S. Epitopes, paratopes, and other topes 30 years on: Understanding what we are talking about. *Human Immunology*, v. 84, n. 9, p. 429-438, 2023.

GOULD, E. A.; HIGGS, S. Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 103, n. 2, p. 109-121, 2009.

HOLMES, E. C.; TWIDDY, S. S. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 3, n. 1, p. 19-27, 2003.

HONEGGER, A.; PLÜCKTHUN, A. Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool. *Journal of Molecular Recognition*, v. 14, n. 6, p. 357-367, 2001.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, v. 14, n. 1, p. 33-38, 1996.

KIM, D. E.; CHIVIAN, D.; BAKER, D. Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. *Nucleic Acids Research*, v. 32, n. Web Server issue, p. W526-W531, 2004.

KIM, Ji Hye *et al.* An updated review of Zika virus vaccine development. *Clinical and Experimental Vaccine Research*, v. 13, n. 4, p. 246-265, 2024.

LATANOVA, A. A.; STARODUBOVA, E. S.; KARPOV, V. A. Flavivirus replication and immunity. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, p. 821904, 2022.

LESK, Arthur M. *Introduction to Bioinformatics*. 6. ed. Oxford: Oxford University Press, 2023.

LIU, X.; PAN, X.; LI, Y.; *et al.* A potent and broad-spectrum neutralizing antibody against NS1 of flaviviruses. *Emerging Microbes & Infections*, v. 10, n. 1, p. 1159-1171, 2021.

LOPES-LUZ, J.; SILVEIRA-MATTOS, P. S.; VILHENA, M. B.; *et al.* Evaluation of a recombinant NS1 antigen for diagnosing Zika virus. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 26, n. 8, p. 1053-1057, 2020.

LUNARDELLI, Victória Alves Santos *et al.* Diagnostic and vaccine potential of Zika virus envelope protein (E) derivatives produced in bacterial and insect cells. *Frontiers in Immunology*, Lausanne, v. 14, art. 1071041, 2023.

LUSTIG, Y.; MANNASSE, B.; KATZ-LIKVORNIK, S.; *et al.* Sensitivity and kinetics of an NS1-based Zika virus ELISA assessed using a Zika virus outbreak serum collection. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, DC, v. 55, n. 8, p. 2462-2467, 2017.

LUSTIG, Y.; KELER, S.; KOLET, E.; *et al.* NS1 antigen detection is a useful tool to distinguish between infection stages during Zika virus epidemic in resource-limited settings. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 102, p. 289-293, 2021.

MADSEN, Andreas V.; MEJIAS-GOMEZ, Oscar; PEDERSEN, Lasse E.; MORTH, J. Preben; KRISTENSEN, Peter; JENKINS, Timothy P.; GOLETZ, Steffen. Structural trends in antibody-antigen binding interfaces: a computational analysis of 1833 experimentally determined 3D structures. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, v. 23, p. 199-211, 2024.

MALHOTRA, N.; MATHUR, A.; KANAKAVALLI, M.; *et al.* Zika virus epidemiology, genomics, pathogenesis and therapeutic interventions. *Current Molecular Pharmacology*, v. 9, n. 2, p. 150-169, 2016.

MALONE, R. W.; HOMAN, J.; CALLAHAN, M. V.; *et al.* Zika virus: medical countermeasures, vaccine development, and therapeutic interventions. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 95, n. 4, p. 772-781, 2016.

MASMEJAN, S.; POOLE, S. E.; PARK, G. S.; *et al.* Zika virus pathogenesis and host immune response. *Seminars in Immunopathology*, v. 42, n. 3, p. 287-302, 2020.

MAYER, S. V.; TESH, R. B.; VASILAKIS, N. The emergence of arthropod-borne viral diseases: a global perspective on dengue, chikungunya and Zika fevers. *Acta Tropica*, v. 166, p. 155–163, 2017.

MERAKOU, C. *et al.* Diagnosis of imported Dengue and Zika virus infections in Italy from November 2015 to November 2022: laboratory surveillance data from a national reference laboratory. *Viruses*, v. 16, n. 1, p. 50, 2024.

MINER, J. J.; DIAMOND, M. S. Zika virus pathogenesis and immunity. *The Journal of Immunology*, v. 198, n. 1, p. 3-10, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Distribuição dos casos suspeitos e confirmados de febre pelo vírus Zika por município de notificação, até a Semana Epidemiológica 13, Brasil, 2016. *Mapa epidemiológico*. Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

MITRA, R.; TOMAR, A. K. Monoclonal antibodies: production and clinical applications. *Therapeutic Delivery*, v. 12, n. 4, p. 387-401, 2021.

MULLER, D. A.; DEPELSENAIRE, A. C.; YOUNG, P. R. Clinical and laboratory diagnosis of Zika virus infection. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 216, n. Supplement_10, p. S906-S913, 2017.

MULLER, D. A.; YOUNG, P. R. The flavivirus NS1 protein as an antigen and an immunological target. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v. 372, p. 109-126, 2013.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. *Medical Microbiology*. 9. ed. Philadelphia: Elsevier, 2021.

MUSSO, D.; DESPRÈS, P. Zika virus: diagnosis and management strategies. *Antiviral Research*, v. 179, p. 104796, 2020.

MUSSO, D.; GUBLER, D. J. Zika virus. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 29, n. 3, p. 487-524, 2016.

NELSON, D. L. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 5. ed. New York: W.H. Freeman, 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 6. ed. New York: W.H. Freeman, 2021.

NEUFELDT, C. J.; CORTESE, M.; ACOSTA, E. G.; BARTENSCHLAGER, R. Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. *Nature Reviews Microbiology*, v. 16, n. 3, p. 125-142, 2018.

PAN, Q.; XING, X.; YU, J.; CHEN, Q.; JIAO, H.; ZHANG, W.; WEN, Y.; GAO, M.; ZHAO, W.; YU, L.; HU, H. Structural insights into the distinct protective mechanisms of human antibodies targeting ZIKV NS1. *hLife*, v. 2, n. 10, p. 527–541, 2024.

PEREIRA, T. N.; SILVA-NETO, D. P.; OLIVEIRA, V. C.; *et al.* Recombinant NS1-based antigens for Zika virus diagnosis. *Intervirology*, v. 66, n. 1, p. 21-28, 2023.

POSTLER, T. S.; WANG, Y.; ROBOTHAM, J. M.; *et al.* Flavivirus composition, assembly, and trafficking. *Nature Reviews Microbiology*, v. 21, n. 7, p. 445-459, 2023.

PUCCIONI-SOHLER, M.; SOARES, C. N.; CHRISTO, P. P.; ALMEIDA, S. M. *Review of dengue, zika and chikungunya infections in nervous system in endemic areas*. Arquivos de Neuro-Psiquiatria, v. 81, n. 12, p. 1112–1124, 2023.

PUERTA-GUARDO, H.; GLASNER, D. R.; HARRIS, E. Dengue priming of the innate immune response and its role in antibody-dependent enhancement of infection. *Current Opinion in Virology*, v. 43, p. 1-6, 2019.

REIS, L. A. M. *et al.* Genus *Culex* Linnaeus, 1758 (Diptera: Culicidae) as an Important Potential Arbovirus Vector in Brazil: An Integrative Review. *Life*, v. 13, n. 11, p. 2179, 2023.

ROCKSTROH, A.; BARTEL, S.; SCHOELLER, K.; *et al.* Design and production of recombinant antigen for diagnostics. *Expert Review of Vaccines*, v. 14, n. 2, p. 245-259, 2015.

ROGERS, M. B.; HARTL, D. L. *Molecular biology of the cell*. 5. ed. New York: Garland Science, 2012.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, v. 5, p. 172, 2014.

ROTHMAN, A. L. Immunity to dengue virus: creating a specific immune response to a cross-reactive pathogen. *Nature Reviews Immunology*, v. 11, n. 8, p. 532-543, 2011.

SCATURRO, P.; CORTESE, M.; CHATEL-CHAIX, L.; FISCHL, W.; BARTENSCHLAGER, R. Dengue virus non-structural protein 1 modulates infectious particle production via interaction with the structural proteins. *PLoS Pathogens*, v. 11, n. 11, p. e1005277, 2015.

SCHROEDER, H. W.; CAVACINI, L. Structure and function of immunoglobulins. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 125, n. 2 Suppl 2, p. S41-S52, 2010.

SHARMA, S.; LAL, S. Zika virus: transmission, diagnosis, and prevention strategies. *Indian Journal of Microbiology*, v. 57, n. 2, p. 161-175, 2017.

SHAH, P. S.; BANO, S. Zika virus: A review of literature. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 6, n. 12, p. 989–994, 2016.

SILVA, R. F.; SANTOS, M. A.; OLIVEIRA, P. S.; *et al.* CDR3 structures in human antibodies: structural features and functional implications. *Journal of Immunology Research*, v. 2020, p. 8192035, 2020.

SIMMONDS, P.; BECHER, P.; BUKH, J.; *et al.* ICTV Report on the classification of Viruses in the genus Hepacivirus, family Flaviviridae. *Archives of Virology*, v. 162, n. 1, p. 31-58, 2017.

SOUZA, A. C. G. *Análise da variabilidade antigênica da proteína NS1 de Flavivirus para desenvolvimento de novos testes diagnósticos*. Dissertação – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2024.

SUNITA; SAJID, A.; SINGH, Y.; SHUKLA, P. Computational tools for modern vaccine development. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, v. 16, n. 3, p. 723–735, 2020.

DASSAULT SYSTÈMES BIOVIA. *Discovery Studio Visualizer*, versão 21.1. San Diego: Dassault Systèmes, 2020.

TRIPATHI, R.; SHRIVASTAVA, S. K. Recombinant proteins in biotechnology: production, characterization and applications. *International Journal of Biotechnology and Biomedical Research*, v. 9, n. 2, p. 145-160, 2019.

VAN ZUNDERT, G. C.; RODRIGUES, J. P.; TRELLET, M.; *et al.* The HADDOCK2.2 web server: user-friendly integrative modeling of biomolecular complexes. *Journal of Molecular Biology*, v. 428, n. 3, p. 720-725, 2016.

VARGHESE, J.; DE SILVA, I.; MILLAR, D. S. Latest Advances in Arbovirus Diagnostics. *Microorganisms*, v. 11, n. 5, p. 1159, 2023.

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

WEN, Y.; HU, J.; GAO, F.; *et al.* NS1 as a biomarker for dengue, Zika, and related flavivirus infections. *Trends in Parasitology*, v. 40, n. 3, p. 201-212, 2024.

WOODSON, Sara E.; MORABITO, Kaitlyn M. Continuing development of vaccines and monoclonal antibodies against Zika virus. *npj Vaccines*, London, v. 9, art. 91, 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Zika virus outbreak update: emergency declared*. Geneva: WHO, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Zika virus: Epidemiology update*. Geneva: WHO, 2024.

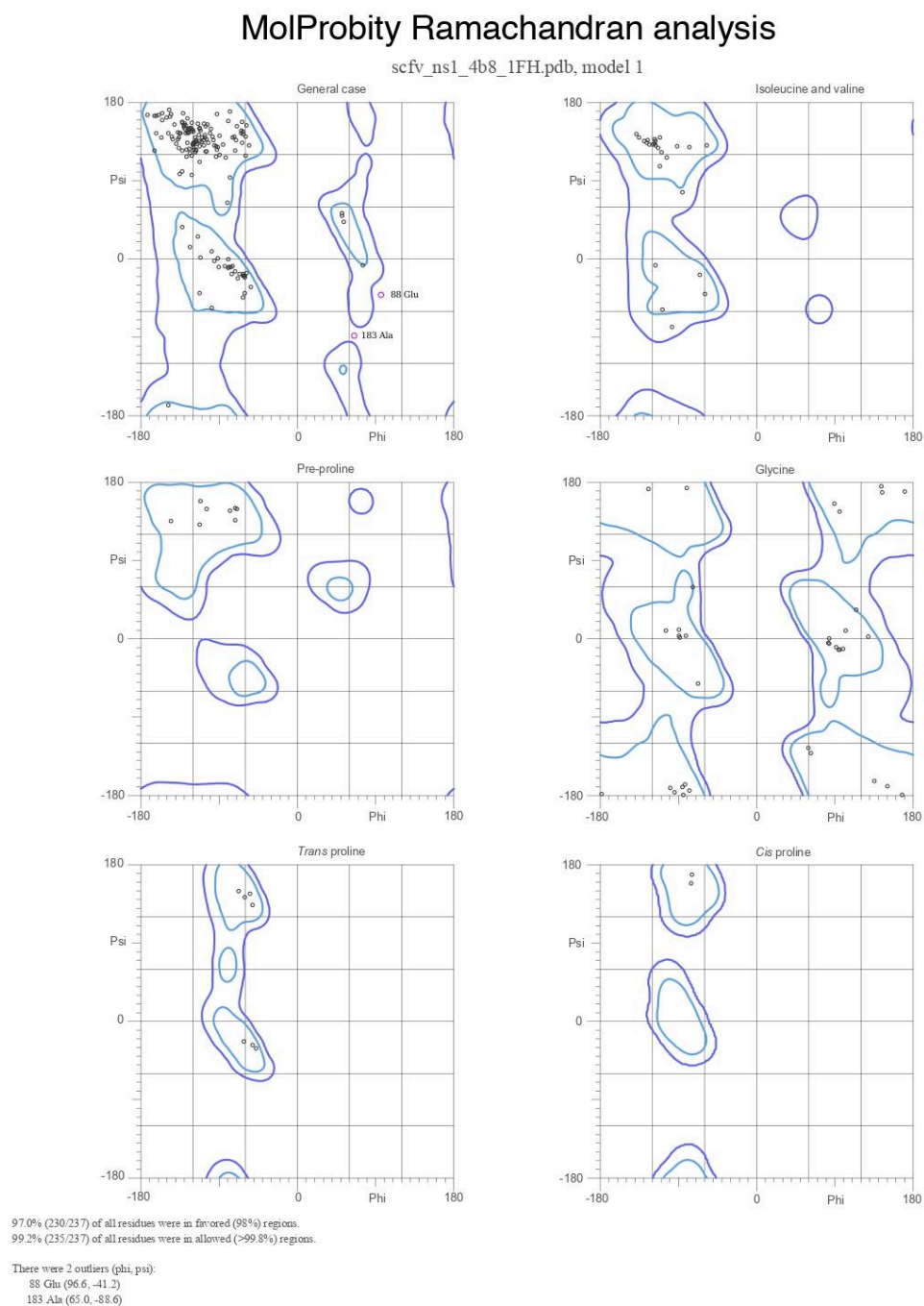
XU, Z.; JIANG, L.; URBAN, M.; *et al.* Structural basis for antibody recognition of human FGFR1. *Nature Structural & Molecular Biology*, v. 17, n. 12, p. 1484-1490, 2010.

YEN, B. C.; KUO, R. L.; LAI, M. M. Dengue virus as a vector for expressing foreign proteins. *Current Protocols in Microbiology*, v. 41, n. 1, p. 15D.3.1-15D.3.17, 2016.

ZAIDI, M. B.; ESTRADA-FLORES, H.; JÁCOME-MARROQUÍN, A.; *et al.* Zika virus detection by antigen assays in serum. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 221, n. 12, p. 1936-1944, 2020.

8 - ANEXO

Anexo 1 : Gráfico de Ramachandran do modelo tridimensional do scFv derivado do anticorpo monoclonal 4B8.



<http://kinemage.biochem.duke.edu>

Lovell, Davis, et al. Proteins 50:437 (2003)