

RENATA PEREIRA GEORJUTTI

**PATOFISIOLOGIA DO ZIKA VÍRUS EM GLÂNDULAS
SALIVARES E DETECÇÃO BIOFOTÔNICA DO ZIKA VÍRUS NA
SALIVA ASSOCIADO COM ALGORITMO DE INTELIGÊNCIA
ARTIFICIAL**

**PATHOPHYSIOLOGY OF ZIKA VIRUS IN SALIVARY GLANDS
AND BIOPHOTONIC DETECTION OF ZIKA VIRUS IN SALIVA
ASSOCIATED WITH ARTIFICIAL INTELLIGENCE ALGORITHM**

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia da Universidade Federal
de Uberlândia, para obtenção do título
de doutora em Odontologia na Área
de Clínica Odontológica Integrada.

Uberlândia, 2022

RENATA PEREIRA GEORJUTTI

**PATOFISIOLOGIA DO ZIKA VÍRUS EM GLÂNDULAS
SALIVARES E DETECÇÃO BIOFOTÔNICA DO ZIKA VÍRUS NA
SALIVA ASSOCIADO COM ALGORITMO DE INTELIGÊNCIA
ARTIFICIAL**

**PATHOPHYSIOLOGY OF ZIKA VIRUS IN SALIVARY GLANDS
AND BIOPHOTONIC DETECTION OF ZIKA VIRUS IN SALIVA
ASSOCIATED WITH ARTIFICIAL INTELLIGENCE ALGORITHM**

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia da Universidade Federal
de Uberlândia, para obtenção do título
de doutora em Odontologia na Área
de Clínica Odontológica Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Robinson Sabino-Silva
Co- Orientadora: Dra. Ana Carolina Jardim Gomes

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Robinson Sabino-Silva
Prof. Dr. Diego Pandeló José
Prof. Dr. Rafael Rodrigues Lima
Prof. Dr. Rui Miguel Pinheiro Vitorino
Prof^a. Dr^a Veridiana Resende Novais
Simamoto

Uberlândia, 2022

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

| | |
|--------------|--|
| G352 2022 | <p>Georjutti, Renata Pereira, 1983- Patofisiologia do ZIKA VÍRUS em glândulas salivares e detecção biofotônica do ZIKA VÍRUS na saliva associado com algoritmo de inteligência artificial [recurso eletrônico] / Renata Pereira Georjutti. - 2022.</p> <p>Orientador: Robinson Sabino-Silva. Coorientadora: Ana Carolina Jardim Gomes. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Odontologia. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.te.2022.288 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Odontologia. I. Sabino-Silva, Robinson ,1981-, (Orient.). II. Gomes, Ana Carolina Jardim,1981-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Odontologia. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 616.314</p> |
|--------------|--|

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

ATA DE DEFESA

31/05/2022 07:33

SEI/UFU - 3606132 - Ata de Defesa - Pós-Graduação



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Av. Pará, 1720, Bloco 4L, Anexo B, Sala 35 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: (34) 3225-8115/8108 - www.ppgoufu.com - copod@umuarama.ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

| | | | | | |
|-------------------------------|---|-----------------|-------|-----------------------|-------|
| Programa de Pós-Graduação em: | Odontologia | | | | |
| Defesa de: | Tese Doutorado, 74, PPGODONTO | | | | |
| Data: | Vinte e Nove de Abril de Dois Mil e Vinte e Dois | Hora de início: | 13:30 | Hora de encerramento: | 17:45 |
| Matrícula do Discente: | 117130D0019 | | | | |
| Nome do Discente: | Renata Pereira Georjutti | | | | |
| Título do Trabalho: | Patofisiologia do Zika vírus em glândulas salivares e detecção biofotônica do Zika vírus na saliva associado com algoritmo de inteligência artificial | | | | |
| Área de concentração: | Clínica Odontológica Integrada | | | | |
| Linha de pesquisa: | Patologia e Diagnóstico Bucal | | | | |
| Projeto de vinculação: | Patologia e Diagnóstico Bucal | | | | |

Reuniu-se em Web Conferência pela plataforma Zoom, em conformidade com a PORTARIA Nº 36, DE 19 DE MARÇO DE 2020 da COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR - CAPES, pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Odontologia, assim composta: Professores Doutores: Veridiana Resende Novais Simamonto (UFU); Diego Pandeló José (UFTM); Rafael Rodrigues Lima (UFGA); Rui Miguel Pinheiro Vitorino (AU-Portugal); Robinson Sabino da Silva (UFU) orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Robinson Sabino da Silva, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(as) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutora.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

https://www.sei.ufu.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=4048496&infra_siste... 1/2

31/05/2022 07:33

SEI/UFU - 3606132 - Ata de Defesa - Pós-Graduação

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Rui Miguel Pinheiro Vitorino, Usuário Externo**, em 18/05/2022, às 07:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Veridiana Resende Novais, Professor(a) do Magistério Superior**, em 18/05/2022, às 13:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Robinson Sabino da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 18/05/2022, às 14:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Diego Pandeló José, Usuário Externo**, em 18/05/2022, às 19:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Rodrigues Lima, Usuário Externo**, em 30/05/2022, às 22:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_documento=4048496&infra_siste..., informando o código verificador **3606132** e o código CRC **ASB2A098**.

Referência: Processo nº 23117.025405/2022-62

SEI nº 3606132

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha filha Laura,
meu maior amor!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder saúde e sabedoria para seguir sempre em frente. Obrigada por ser a minha força e o meu guia em todos os momentos.

Aos meus pais, Maria do Carmo e Wanderley, pelo apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida. Por acreditarem em mim, e não medirem esforços para a concretização dos meus sonhos. Sem vocês, nada seria possível. Amo vocês com amor eterno!

Ao meu esposo Luciano, por seu meu refúgio, meu porto seguro, minha base, meu suporte, meu amigo e meu companheiro de vida. Minha filha Laura, por alegrar os meus dias e tornar minha vida mais leve e mais feliz.

Agradeço imensamente a minha prima Daniela por ser minha irmã, suporte e amiga. Meu agradecimento a minha sogra Chirlei por não medir esforços para sempre nos ajudar.

Agradeço ao professor e meu querido orientador Robinson Sabino da Silva a oportunidade de tê-lo como orientador. Tenho muito orgulho de citá-lo como um dos responsáveis pela minha formação profissional. Agradeço pela confiança, pela dedicação e paciência. O senhor é um exemplo de simplicidade, compreensão e competência. Obrigada pela oportunidade de aprender com o senhor! Minha eterna gratidão e admiração.

A professora Ana Carolina Jardim pela coorientação no trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia e todos os excepcionais professores que dele fazem parte, vocês são fantásticos. A CAPES, FAPEMIG CNPq, Innovation Center in Salivary Diagnostics and Nanobiotechnology, INCT TeraNano (National Institute of Science & Technology in Theranostics and Nanobiotechnology) e ICBIM.

Meus agradecimentos aos colegas do grupo de pesquisa, em especial a Cardoso, Douglas Caixeta, Marco Guevara, Igor Andrade, Murillo Guimarães e Elisa Borges que tanto contribuíram no desenvolvimento das pesquisas e desenvolvimento do trabalho.

Aos meus amigos, irmãos que eu não tive, e anjos que Deus colocou em meu caminho. Obrigada pelo companheirismo, apoio e amizade incondicional. Amo vocês!

Ao Centro Universitário do Triângulo (UNITRI) instituição a qual me deu a oportunidade de viver a docência e a coordenação do curso de Odontologia, aos colegas de trabalho, funcionários e colaboradores que compartilham comigo a arte de ensinar.

Aos meus alunos, nem tenho palavras. Se eu ensinei vocês tanto quanto vocês me ensinaram sobre mim, minha missão está cumprida (por ora). Obrigada por acreditarem em mim e me mostrarem o real sentido da minha profissão.

Às demais pessoas que contribuíram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho ou participam da minha vida, e que, porventura, eu tenha me esquecido de agradecer.

E a cada um que de alguma forma, não me deixou desistir. Gratidão!

EPÍGRAFE

Os sonhos não determinam o lugar onde vocês vão chegar, mas produzem a força necessária para tirá-los do lugar em que vocês estão.

Sonhem com as estrelas para que vocês possam pisar pelo menos na Lua.

Sonhem com a Lua para que vocês possam pisar pelo menos nos altos montes.

Sonhem com os altos montes para que vocês possam ter dignidade quando atravessarem os vales das perdas e das frustrações.

Bons alunos aprendem a matemática numérica, alunos fascinantes vão além, aprendem a matemática da emoção, que não tem conta exata e que rompe a regra da lógica.

Nessa matemática você só aprende a multiplicar quando aprende a dividir, só consegue ganhar quando aprende a perder, só consegue receber, quando aprende a se doar.

Augusto Cury

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| RESUMO/ PALAVRAS-CHAVE | 8 |
| ABSTRACT/ KEYWORDS | 10 |
| 1 INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO | 12 |
| 2 CAPÍTULO 1 | 23 |
| 3 CAPÍTULO 2 | 33 |
| 4 CAPÍTULO 3 | 45 |
| 5 CONCLUSÃO | 61 |
| REFERÊNCIAS | 63 |

RESUMO

O vírus Zika (ZIKV) pertence à família *Flaviridae* e ao gênero *Flavivirus* sendo, portanto, similar do ponto de vista evolutivo com outros arbovírus transmitidos por mosquitos. O ciclo natural de transmissão do ZIKV na África envolve majoritariamente vetores silvestres do gênero *Aedes* e macacos. No fim de 2013, uma epidemia fora da África foi reportada na Polinésia Francesa com mais de 35 mil casos, alertando autoridades de saúde para o potencial de espalhamento pandêmico desta virose que também foi identificada na Nova Caledônia, Ilhas Cook e Ilha de Páscoa. Em 2015 foi confirmada a circulação do vírus no Nordeste do Brasil, a partir de isolamento viral em casos suspeitos de dengue. Recentemente, o Ministério da Saúde do Brasil publicou uma nota afirmando que casos da doença já haviam sido confirmados em mais de oito estados do país, nas regiões Norte, Nordeste e Sudeste. Foi demonstrado a presença do vírus zika (ZIKV) no sangue, sémen, urina e saliva, sugerindo que a detecção poderia ocorrer por estes fluidos corporais. A saliva é um biofluido não-invasivo, indolor, com custo de coleta reduzido em relação ao sangue e pode apresentar alta acurácia utilizando plataformas analíticas adequadas para cada doença. No entanto, as evidências com a infecção de ZIKV nas glândulas salivares e seu potencial efeito no diagnóstico salivar ainda apresentam literatura incipiente. Diante deste contexto o objetivo da tese foi dividido em 3 capítulos: 1) apresentação de um mecanismo patofisiológico da entrada do ZIKV em células de glândulas salivares e seu potencial impacto no diagnóstico salivar; 2) avaliação da composição molecular de glândulas submandibulares em um modelo animal de ZIKV; e 3) avaliação da capacidade de discriminação do ZIKV diluído em diferentes concentrações de saliva utilizando uma plataforma biofotônica sustentável, livre de reagentes, rápida e não invasiva. No primeiro capítulo foi revisitada a expressão de mRNA e proteínas em glândulas salivares relacionadas ao mecanismo molecular da infecção pela entrada do ZIKV em glândulas salivares. Entre eles estão os receptores de lectina tipo C e receptores de fosfatidilserina (PS do tipo TIM1, TIM3, TIM4, TYRO3 e AXL). Em uma perspectiva fisiopatológica relacionada com o diagnóstico, as glândulas salivares

podem permitir a entrada do ZIKV pelos transportadores supracitados, permitir a replicação do ZIKV e sua secreção para o lúmen acinar e ductal até atingir a cavidade oral com a saliva, o que é fundamental para desenvolver estratégias adequadas para realizar plataformas diagnósticas para detecção precoce do ZIKV na saliva. No segundo capítulo foi desenvolvido um modelo animal de infecção por ZIKV utilizando camundongos machos C57/BL6 *knockout* para o gene *interferon-gama*. A infecção por ZIKV foi realizada por administração intradérmica com ZIKV (50 µL, 1×10^5 PFU), e os camundongos controle receberam apenas veículo (50 µL). Para confirmar a infecção pelo ZIKV neste modelo animal, a replicação do RNA do ZIKV foi confirmada no baço de camundongos. Baseado em uma análise por ATR-FTIR, foi observado que a presença de colágeno reduziu ($p < 0,05$) e os ácidos nucleicos aumentaram ($p < 0,05$) nas glândulas submandibulares de camundongos infectados por ZIKV. No terceiro capítulo, identificamos que um algoritmo de aprendizado de máquinas baseado em LDA classificou com 80,5% de acurácia (sensibilidade: 77,7% e especificidade: 83,3%) amostras de saliva infectadas com 10^4 PFU/mL, o que é similar à concentração encontrada clinicamente na infecção pelo ZIKV. Desta forma, os resultados demonstram uma aplicação potencial desta plataforma biofotônica sustentável sem o uso de reagentes, acoplada com algoritmos de aprendizado de máquina para detectar ZIKV na saliva. Em conjunto, a revisão sobre a expressão dos transportadores para a entrada do ZIKV nas células de glândulas salivares permitiu a compreensão da patofisiologia do ZIKV nas glândulas salivares maiores e menores, e seus efeitos na saúde oral. A detecção de alterações na expressão de colágeno e ácidos nucleicos em um modelo animal de ZIKV reforça a importância da compreensão da patofisiologia do ZIKV em tecidos da cavidade oral, e também que mais estudos devem ser direcionados aos efeitos do ZIKV em glândulas salivares. Além disso, demonstrou-se que uma plataforma biofotônica sustentável utilizando espectros infravermelho da saliva, acoplado com algoritmos de inteligência artificial, pode detectar o ZIKV em concentrações similares às encontradas clinicamente.

Palavras-chave: Zika Vírus, saliva, diagnóstico, ATR-FTIR.

ABSTRACT

The Zika virus (ZIKV) belongs to the Flaviviridae family, therefore, it is related from the evolutionary point of view to other arboviruses transmitted by mosquitoes. The natural cycle of ZIKV transmission in Africa mainly involves wild vectors of the genus *Aedes* and monkeys. In late 2013, an epidemic outside Africa was reported in French Polynesia with more than 35,000 cases. This event alerted health officials to the potential for a pandemic spread of this virus which has also been identified in New Caledonia, the Cook Islands, and Easter Island. In 2015, the circulation of the ZIKV in Northeast Brazil was confirmed. Recently, the Ministry of Health of Brazil published a letter to confirm the presence of ZIKV in eight states, in the Northeast and Southeast regions of Brazil. Recent findings show the presence of ZIKV in blood, semen, urine, and saliva, suggesting that the transmission could also be through these additional fluids. Saliva is a non-invasive, painless biofluid, with a reduced collection cost compared to blood and can be highly accurate using analytical platforms appropriate for each disease. However, evidence of ZIKV infection in salivary glands and its potential effect on salivary diagnosis is still incipient literature. In this context, the objective of the thesis was divided into 3 chapters: 1) present a physiological mechanism of ZIKV entry into salivary gland cells and its potential impact on salivary diagnosis; 2) evaluate the molecular composition of the submandibular glands in an animal model of ZIKV; and 3) assess the discriminatory discrimination ability of ZKV in different saliva products using a sustainable, reagent-free, rapid, and non-invasive biophonic platform. In the first chapter, it was revisited the expression of mRNA and proteins in salivary glands related to the molecular mechanism of ZIKV infection in salivary glands. Among them are type C lectin receptors and phosphatidylserine receptors (PS type TIM1, TIM3, TIM4, TYRO3, and AXL). From a pathophysiological perspective related to diagnosis, the salivary glands can allow the entry of ZIKV through the aforementioned transporters, allow the replication of ZIKV and its secretion to the acinar and duct lumen until it reaches the oral cavity with saliva, which is essential to develop appropriate strategies to perform diagnostic platforms for early detection of ZIKV in saliva. In the second chapter, it was developed an animal model of ZIKV infection using two-month-old

male C57/BL6 knockout mice for the interferon-gamma gene. ZIKV infection was performed by intradermal administration with ZIKV (50 μ L, 1×10^5 PFU) and the control received vehicle (50 μ L). To confirm ZIKV infection in this animal model, ZIKV RNA replication was evaluated in the spleen of mice. It was observed that the presence of collagen reduced ($p < 0.05$) and nucleic acids increased ($p < 0.05$) in the submandibular glands of ZIKV-infected mice. In the third chapter, it was identified that a machine learning algorithm based on LDA discriminated infected saliva with 10^4 PFU/mL, which is similar to that found clinically in ZIKV infection, with 80.5% accuracy (sensitivity: 77.7% and specificity: 83.3%) from non-infected saliva. In this way, the results demonstrate a potential application of this sustainable biophotonic platform without the use of reagents coupled with machine learning algorithms to detect ZIKV in saliva. Together, the review on the expression of transporters for ZIKV entry into salivary gland cells allowed an understanding of the pathophysiology of ZIKV in the major and minor salivary glands and its effects on oral health. The detection of alterations in the expression of collagen and nucleic acids in an animal model of ZIKV reinforces the importance of the pathophysiology of ZIKV in tissues of the oral cavity, and also that further studies should be directed to the effects of ZIKV in salivary glands. Furthermore, we demonstrate that a sustainable biophotonic platform using infrared spectra of saliva coupled with an artificial intelligence algorithm can detect ZIKV at concentrations similar to those found clinically.

Keywords: Zika Virus, saliva, diagnosis, ATR-FTIR.

1- INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO

O vírus Zika (ZIKV) pertence à família *Flaviridae* e ao gênero *Flavivirus*, é formado por estruturas nanométricas formadas por proteínas, RNA e membrana lipídica (Figura 1). Cada partícula viral consiste de uma cadeia simples de RNA viral dobrada dentro de uma cápsula proteica formada por proteínas C, envolta por uma membrana lipídica e por uma estrutura proteica formada por proteínas M e dímeros da proteína E conhecida como envelope. Sendo assim, ele é considerado similar sob o ponto de vista evolutivo a outros arbovírus transmitidos por mosquitos, e seu ciclo natural de transmissão envolve majoritariamente vetores silvestres do gênero *Aedes* (entre eles, *Ae. aegypti*, *Ae. Albopictus*, *Ae. furcifer*, *Ae. taylori*, *Ae. luteocephalus*, *Ae. vittatus*, *Ae. opock* e *Ae. africanus*)¹.

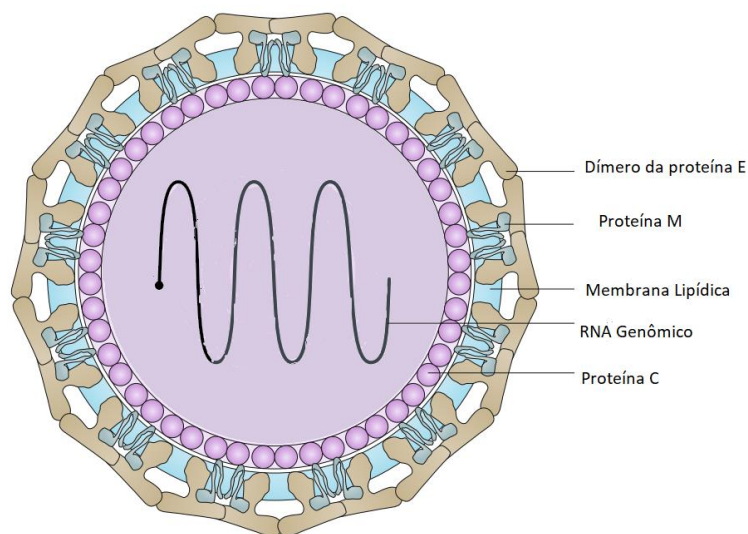


Figura 1- Estrutura do vírus zika. Modificado de: Abbink, Stephenson, Barouch, 2018.

O ZIKV foi isolado pela primeira vez em 1947 na floresta de Zika (Figura 2), em Uganda, a partir de uma amostra de soro de um macaco *Rhesus* que servia de sentinela para estudo de vigilância da febre amarela². Desde então, inquéritos sorológicos e entomológicos têm reportado o ZIKV no continente africano e no sudeste asiático. Após análise filogenética do genoma viral, percebeu-se que provavelmente o vírus surgiu nesta localidade em torno

de 1920, e após duas fases de migração para o Oeste Africano deu início as duas linhagens africanas. O vírus teria migrado na década de 1940 de Uganda para a Ásia, onde originou a linhagem asiática, com surtos registrados na Indonésia e epidemia na Micronésia³. Porém, o vírus contaminou os primeiros humanos sete anos depois, em 1954, na Nigéria, também localizada na África. O primeiro grande surto da doença em humanos causado pela infecção por Zika foi notificada na ilha de Yap (Estados Federados da Micronésia), em 2007⁴.

No fim de 2013, outra epidemia fora da África foi reportada na polinésia francesa com mais de 35 mil casos, alertando autoridades de saúde para o potencial de espalhamento pandêmico desta virose que também foi identificada na Nova Caledônia, Ilhas Cook e Ilha de Páscoa⁵. Em 2015 foi confirmada a circulação do vírus no Nordeste do Brasil após um isolamento viral em casos suspeitos de dengue⁶. O Ministério da Saúde do Brasil publicou recentemente uma nota afirmando que a detecção do ZIKV foi confirmada em mais oito estados do país, compreendendo as regiões Norte, Nordeste e Sudeste⁷.

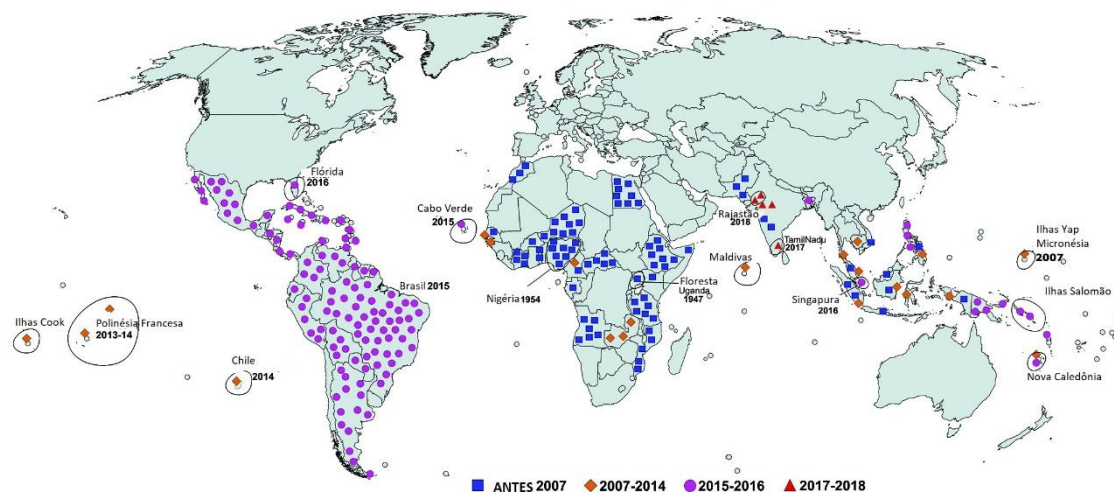


Figura 2- Distribuição global da infecção pelo vírus Zika em humanos, incluindo grandes surtos até 2018. Modificado de: Sharma et al., 2019.

Transmissão

Assim como outros flavivírus, o ZIKV é transmitido majoritariamente através da picada de mosquitos, que agem como vetores da doença, sendo os

primatas não-humanos e humanos provavelmente os principais reservatórios do vírus. A saliva infectada com o vírus do vetor é injetada durante a picada na corrente sanguínea do hospedeiro, constituindo assim, a forma biológica mais comum de transmissão do ZIKV⁸. Os principais vetores são do gênero *Aedes*, em particular *Ae. aegypti* originário da África e o *Ae. albopictus*, da região asiática⁹.

Dentre as arboviroses, somente o ZIKV demonstrou a transmissão através da via sexual e vertical, da mãe para o feto¹⁰ (Figura 3). A transmissão vertical foi verificada através da barreira placentária, durante o parto com o contato do bebê e os fluidos maternos, e durante a amamentação, visto que o vírus foi encontrado no leite materno¹¹. Após a descoberta transmissão viral pela via sexual, o CDC (*Centre of Disease Control and Prevention* – Agência de Saúde dos EUA) recomendou adiamento de gravidez por pelo menos 180 dias após infecção, considerando que o material genético do ZIKV foi detectado em sêmen depois de 188 dias de infecção e em secreção vaginal após oito semanas¹².

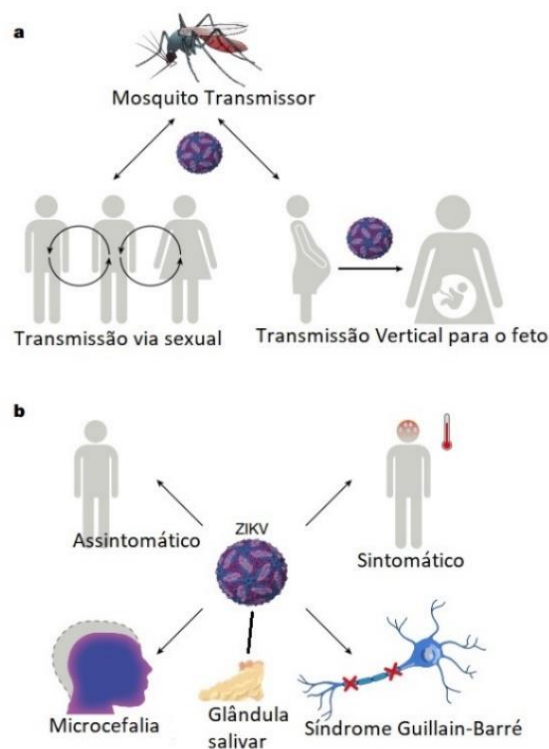


Figura 3- Transmissão, infecção celular e manifestações clínicas do ZIKV. Modificado de: Pierson & Diamond, 2018.

Estudos epidemiológicos baseados em amostras de sangue coletadas de residentes de Uganda revelaram uma prevalência de anticorpos anti- ZIKV de 6%¹³ da população. Adicionalmente, este vírus veio a ser repetidamente isolado de mosquitos colhidos na África e Ásia, permitindo sugerir que espécies como *Ae. africanus*, *Ae. aegypti* e *Ae. hensilli* participem na sua manutenção enzoótica¹⁴. A competência vetorial para transmissão do ZIKV pelo *Ae. aegypti* e pelo *Ae. albopictus* impõe grande preocupação para a saúde pública. Estes artrópodes encontram-se amplamente distribuídos em zonas tropicais, subtropicais (*Ae. aegypti*) e temperadas (*Ae. albopictus*), abrangendo um enorme contingente de indivíduos suscetíveis¹⁵. Menos frequentemente, a transmissão do ZIKV já foi descrita por via sexual, perinatal e por hemotransfusão. Apesar de possíveis, ainda não se tem a dimensão da importância epidemiológica destes mecanismos¹⁶.

Achados recentes demonstram a presença do ZIKV no sangue, sêmen, urina e saliva, sugerindo que a transmissão poderia ser também por esses fluidos corporais^{17,18}. No entanto, até agora, não há evidências científicas de que a infecção de ZIKV possa acontecer através da saliva humana.

Foi detectado também a presença de ZIKV em RT-PCR no tecido cerebral. De acordo com o Ministério da Saúde do Brasil, em 2015, mais de 1,2 milhões de casos de dengue e 9.000 casos de febre Zika foram oficialmente identificados no país. Além disso, o número total de casos de ZIKV relacionados à microcefalia em recém-nascidos é cerca de 3.000¹⁹. Acredita-se que, num futuro próximo, o número crescente de microcefalia associados ao ZIKV poderá aumentar a necessidade de investimento nas áreas médicas e para a realização de uma odontologia personalizada voltada para o cuidado odontológico da saúde oral destes pacientes.

Quadro clínico

O período de incubação do ZIKV é de 3 a 12 dias. Frequentemente, os sinais e sintomas da infecção pelo ZIKV frequentemente podem ser dor de cabeça, erupção maculopapular na planta dos pés e mãos, febre, mialgia, conjuntivite, artralgia, e sintomas abdominais²⁰. Especialmente em países de

economias subdesenvolvidas ou emergentes, o início de um surto de ZIKV pode apresentar desafios para um diagnóstico de larga-escala devido a sintomatologia semelhante com outras infecções advindas de arbovírus, especialmente Dengue e Chikungunya²¹. Contudo, o surto de Zika Vírus tem recebido maior atenção das autoridades sanitárias devido a sua associação entre a infecção pelo ZIKV, casos de microcefalia em neonatos (Síndrome Congênita da Zika) e desordens neurológicas (Síndrome de Guillain-Barré)²². Assim, o relato de sintomas clínicos é uma ferramenta de triagem ineficaz para a avaliação do risco relativo de infecção por ZIKV.

Em alguns casos, foram descritas infecções assintomáticas baseadas em inquéritos sorológicos²³. Descrições de casos da doença na África caracterizaram a febre Zika como um episódio febril de início agudo, acompanhado de cefaleia discreta, surgimento de exantema maculopapular pruriginoso, no segundo dia, acometendo face, tronco, membros, palmas das mãos e plantas dos pés. A febre desaparece um dia ou dois após o aparecimento do exantema, que pode persistir por mais dois a 14 dias (duração média de seis dias)²³.

A infecção por ZIKV também tem sido associada ao desenvolvimento de anormalidades fetais graves, que incluem aborto espontâneo, morte no momento do parto, hidrocefalia, microcefalia e insuficiência placentária que podem causar restrição de crescimento^{24,25,26}. As informações acerca das alterações hematológicas e bioquímicas na febre relacionada ao ZIKV são escassas embora conflitantes²⁷.

Diagnóstico

O diagnóstico da infecção por ZIKV pode ser realizado por meio de RT-PCR (amplificação por reação em cadeia da polimerase, antecedida de transcrição reversa), a partir de RNA diretamente extraído do soro do doente, preferencialmente colhido até o sexto dia de doença. No entanto, em um caso da epidemia da ilha Yap, o vírus foi identificado (através da amplificação de genoma viral) no 11º dia após o início dos sintomas²⁸. O vírus também pode ser detectado por meio de técnicas moleculares aplicadas em outros fluidos

corporais como a saliva e a urina²⁹.

Anticorpos IgM podem ser encontrados a partir do terceiro dia de doença e anticorpos IgG devem ser pesquisados no soro agudo e convalescente³⁰. Um problema em relação aos testes sorológicos é a possibilidade de reação cruzada como resultado de infecções prévias por outros flavivírus³¹. A ocorrência de epidemias de ZIKV em territórios onde previamente ocorre circulação do vírus da dengue pode representar um desafio diagnóstico. Mesmo com a realização de um teste de neutralização por redução de placa (PRNT), também utilizado na epidemia na ilha Yap, foi encontrada dificuldade em diferenciar casos prováveis de infecção por ZIKV em doentes com anticorpos contra dengue adquiridos previamente, apesar de os títulos anti-ZIKV apresentados sempre serem maiores que os heterólogos (não-ZIKV)²⁸.

Ainda assim, tem sido reportada a detecção de anticorpos anti-ZIKV em amostras biológicas, sendo que algumas das técnicas empregadas não são técnicas padronizadas, utilizadas em contextos laboratoriais específicos (técnicas *in-house*). Apesar do desenvolvimento de testes diagnósticos para o ZIKV, seu uso ainda é bastante restrito por não haver kits comerciais disponíveis para o autoteste aprovados no mercado brasileiro. Portanto, o diagnóstico é limitado às instituições públicas e privadas, ligadas à vigilância em saúde. A detecção de genomas virais por RT-PCR é o método mais sensível e específico para permitir um diagnóstico de infecções por ZIKV, mas esses métodos não são, por enquanto, *fail-safe*. Ao contrário do que acontece com outros vírus, a circulação restrita deste vírus tem limitado o conhecimento sobre a sua real diversidade genética, pelo fato de que há uma probabilidade razoável de que os *primers* utilizados nas amplificações de genoma de ZIKV possam não permitir as amplificações pretendidas (falsos negativos de amplificação)³².

A positividade do RT-PCR para ZIKV é dependente do tipo de amostra e do tempo a partir da infecção. No soro foi detectada positividade até o 5º dia de doença. Na urina pode-se detectar o ZIKV em até 15 dias após o início da sintomatologia²⁹. No entanto, a grande limitação reside na sorologia. Devido à extensa reatividade cruzada com outros *Flavivirus*, principalmente o vírus da dengue, a sorologia não define o diagnóstico em áreas endêmicas para dengue

ou em populações extensamente vacinadas para a febre Amarela. Alguns testes sorológicos, com elevada sensibilidade e especificidade documentada, apresentam resultados baseados em número amostral excessivamente baixo, o que ainda impede maior generalização dos resultados até o momento³³.

A saliva possui propriedades importantes que permitem a sua utilização como ferramenta diagnóstica para doenças virais. Além da presença do vírus na saliva, alguns vírus apresentam uma correlação direta entre a carga viral a presença de vírus na saliva³⁴, apesar de muitos vírus não infectarem o hospedeiro, destacando o possível papel da saliva na modulação da infecção viral³⁵.

A presença de ZIKV na saliva realça a relevância do uso da saliva como uma ferramenta diagnóstica. Desta forma, a saliva tem sido cada vez mais reconhecida como fluido de diagnóstico especialmente pela auto-coleta não-invasiva, indolor e de baixo custo³⁶, além disso, devido a utilização de novas plataformas nanobiotecnológicas de alta sensibilidade como a espectrometria de massas, uma série de estudos tem sido divulgados usando saliva para identificação de biomarcadores para doenças como câncer de mama, câncer de ovário, câncer hepatocelular e cânceres orais, bem como leucoplasia e Síndrome de Sjogren³⁷. Espera-se que os novos estudos focados em detecção do ZIKV utilizem métodos seguros e não invasivos, permitindo que medidas terapêuticas possam ser utilizadas de forma precoce para melhor efetividade do tratamento.

Considerando que a presença do ZIKV na saliva foi detectada em níveis mais elevados durante um período mais prolongado, torna-se necessário análises neste biofluido para ser aplicado em novas plataformas de diagnóstico. A saliva é fundamental para a manutenção da saúde oral. Ela é um fluido biológico que expressa uma série de componentes como proteínas, lipídios, hormônios, derivados glicídicos, enzimas, anticorpos, ácidos nucleicos e centenas de tipos de microrganismos, como os vírus. A composição da saliva pode refletir variações da composição do sangue derivada de doenças ou de diversos estados fisiológicos. Desta forma, tem sido considerado um fluido clinicamente informativo e potencialmente eficaz para abordagens de

diagnóstico, monitoramento e prognóstico de diversas patologias. Este biofluido pode facilitar a detecção precoce de doenças, através da descoberta de biomarcadores e desenvolvimento de tecnologias para o diagnóstico salivar, o que pode ser decisivo na detecção de doenças orais e sistêmicas³⁸. Estes biomarcadores são indicadores de processos biológicos normais, processos patológicos ou respostas farmacológicas de intervenções terapêuticas. Os biomarcadores salivares podem ter origem do sangue e atingir a saliva por vias transcelular ou paracelular em células acinosas ou ductais de glândulas salivares. Adicionalmente, os biomarcadores salivares podem ter origem de sua secreção específica principalmente em células acinosas de glândulas salivares, o que pode ser clinicamente relevante na prática médica e odontológica³⁹.

Sendo assim, a saliva surge como uma ferramenta de diagnóstico, que possui a vantagem de ser coletada facilmente e de forma não invasiva, o que diminui o desconforto quando associada a coleta de sangue, além da melhora em termos de privacidade quando comparada a coleta de urina. É fundamental destacar que o diagnóstico pelo sangue é uma realidade e apresenta em geral grande eficácia com uma utilização ampla em sistemas de saúde por todo o mundo. O diagnóstico salivar não deve ser evidenciado como um substituto do sangue, mas como um método alternativo quando os exames de sangue em cada doença apresentam limitações. O diagnóstico salivar tem uma variedade de vantagens quando comparado com o sangue, mas ainda existem barreiras translacionais para sua aplicação clínica. Entre as vantagens do diagnóstico salivar, destacam-se a sua facilidade de coleta, armazenamento e transporte, capacidade de coleta com custo reduzido em quantidades menores e satisfatórias, permite obtenção simplificada de amostras sequenciais para a monitoramento de longo prazo e oferece segurança para os profissionais de saúde no momento da coleta e do manuseio de amostras³⁸.

A detecção precoce da doença desempenha um papel crucial no sucesso da terapia. Na maioria dos casos, o diagnóstico precoce da doença aumenta as probabilidades de efetividade no tratamento, reduzindo a severidade do seu impacto na vida dos doentes e permitindo também adiar possíveis complicações⁴⁰. Desta forma, a saliva tem despertado interesse entre os

pesquisadores por ser um exame alternativo na promoção e na pesquisa de cuidados em saúde. Além disso, os recentes avanços científicos e tecnológicos produziram melhorias significativas no limiar de detecção e na especificidade da detecção dos componentes salivares, possibilitando incremento na acurácia dos testes diagnósticos por meio da saliva. Esses progressos apontam para uma nova era, em que o diagnóstico salivar terá grande importância como forma alternativa de detecção.

Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier acoplada a sistema de reflectância total atenuada

A espectroscopia de infravermelho (IR) está emergindo como uma poderosa técnica quantitativa e qualitativa para monitorar a composição molecular de biofluidos. A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier acoplada a sistema de reflectância total atenuada (ATR-FTIR) é uma plataforma global, sensível e considerada uma técnica analítica físico-química de alta reprodutibilidade para identificação de grupos funcionais com base em sua absorção de IR⁴⁰. Considerando que uma biomolécula é determinada por sua única estrutura, cada uma exibirá um espectro infravermelho específico, representando o espectro em modos vibracionais de acordo com as ligações estruturais presentes⁴¹.

A ATR-FTIR é uma tecnologia verde devido a processos que eliminam o uso de reagentes, o que permite uma abordagem abrangente que é aplicável para diagnóstico e monitoramento de doenças. Os modos espectrais de IR de amostras biológicas, como saliva, podem ser considerados como impressões digitais bioquímicas que se correlacionam diretamente com a presença ou ausência de doenças. A reflectância total atenuada (ATR) é uma técnica de amostragem usada em conjunto com a espectroscopia de infravermelho que permite que as amostras sejam examinadas de forma rápida, com alta sensibilidade e com análise de baixo custo, pois não necessita o uso de reagentes⁴².

O diagnóstico da infecção pelo ZIKV poderia ter um papel central para saúde pública, mesmo em momentos em que há controle de surtos e menos

casos de infecção detectados. Isso se deve ao grande impacto social e econômico causado pelos casos de microcefalia em neonatos, além da necessidade de diferenciação entre as demais arboviroses⁴³. Em muitas circunstâncias, o teste de diagnóstico é fundamental para o gerenciamento clínico tanto personalizado e como público para implementação de medidas de controle da saúde. Os diagnósticos são importantes para as decisões relacionadas ao período gestacional. No entanto, a longo prazo, o diagnóstico preciso e precoce se torna importante para o desenvolvimento de intervenções direcionadas e eficazes, além de estimar a história natural de uma infecção para fornecer estimativas de risco²⁰.

Desta forma, para fomentar a utilização clínica da saliva como fluido diagnóstico e de monitoramento da ZIKV, é necessário ampliar o entendimento da composição salivar e do fluxo de saliva em modelos animais de ZIKV. A descoberta de biomarcadores salivares para desenvolvimento de uma plataforma diagnóstica não-invasiva e sem utilização de reagentes para detecção da doença nos permitirá a criação de novas estratégias para o desenvolvimento de biosensores para triagem e/ou diagnóstico da ZIK.

Sabe-se que estudos que avaliem o mecanismo de infecção do ZIKV em diferentes tecidos podem auxiliar no entendimento da patofisiologia e da terapêutica da doença. Além disso, a compreensão do mecanismo de entrada do ZIKV em glândulas salivares pode ter impacto considerável no desenvolvimento de formas inovadoras de detecção, utilizando métodos seguros e não-invasivos, permitindo medidas terapêuticas mais céleres após o desenvolvimento de terapias antivirais para este vírus, o que pode permitir uma tomada de decisão médica mais apropriada no momento da terapêutica e gerar menos desconforto para o paciente.

Considerando todos os aspectos supracitados, este trabalho tem como objetivos:

- 1) Apresentar um mecanismo patofisiológico da entrada do ZIKV em células de glândulas salivares e seu potencial impacto no diagnóstico salivar;
- 2) Avaliar a composição molecular de glândulas submandibulares em um modelo animal de ZIKV;

3) Avaliar a capacidade de discriminação do ZIKV diluído em diferentes concentrações de saliva utilizando uma plataforma biofotônica sustentável, livre de reagentes, rápida e não invasiva.

2- CAPÍTULO 1

PATHOPHYSIOLOGICAL MECHANISM OF ZIKA VIRUS ENTRY IN SALIVARY GLANDS AND ITS IMPACT ON SALIVARY DIAGNOSTICS

Renata Pereira Georjutti¹, Marco Guevara-Vega¹, Bruno Silva Andrade², Douglas C. Caixeta¹, Thulio M. Cunha³, Ana Carolina Gomes Jardim⁴, Robinson Sabino-Silva¹

¹Innovation Center in Salivary Diagnostic and Nanobiotechnology, Department of Physiology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

²Laboratory of Bioinformatics and Computational Chemistry, Department of Biological Sciences, State University of Southwest of Bahia (UESB), Jequié, Bahia, Brazil

³Department of Pulmonology, School of Medicine, Federal University of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

⁴Laboratory of Virology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

Corresponding Author:

Robinson Sabino-Silva; Federal University of Uberlandia (UFU), Institute of Biomedical Sciences (ICBIM), ARFIS, Av. Pará, 1720, Campus Umuruama, CEP 38400-902, Uberlandia, MG, Brazil

Phone: +55 34 3218 2100

E-mail: robinsonsabino@gmail.com

ABSTRACT

The Zika virus (ZIKV) is a mosquito-borne viral infection transmitted to humans primarily by *Aedes spp.* The clinical symptoms are similar to dengue and chikungunya. Considering the pitfalls to adequate diagnostics, it is strongly required a significant improvement to obtain rapid, non-invasive, and accurate ZIKV-diagnostic. In this context, we revisited the mRNA and proteins expression related to the molecular mechanism of ZIKV infection in salivary glands by the analysis of the C-type lectin receptors and Phosphatidylserine (PS) receptors (TIM1, TIM3, TIM4, TYRO3, and AXL) in both minor and major salivary glands. Although some specific protein analysis can be improved, these data indicate that ZIKV entry to the salivary gland cells is mediated by multiple transporters molecules in combination for infectious entry. It is in accordance with the highest level of viral RNA detected in the parotid, submandibular and sublingual glands of non-human primates. A robust salivary ZIKV RNA was detected in a prolonged period in comparison to viremia in guinea pigs and rhesus macaques. In humans, the ZIKV RNA was detected more frequently in the saliva than in blood samples. In these pathophysiology and diagnostic views, salivary glands could replicate ZIKV and secrete this virus to the oral cavity with the saliva, which is critical to developing adequate strategies to perform diagnostic platforms for early ZIKV detection using saliva.

Keywords: Zika Virus, salivary glands, salivary diagnostics.

INTRODUCTION

Zika virus (ZIKV) is an arbovirus of the *Flaviviridae* family. ZIKV was firstly isolated in 1947 from a Rhesus monkey in Uganda¹. In the last years, some ZIKV-related outbreaks occurred in Africa, Asia, and Latin America², however critical attention in 2015 when a significant part of the infected pregnant woman were related to neurological disorders in neonates (microcephaly)³. The Zika virus (ZIKV) is a mosquito-borne viral infection transmitted to humans primarily by *Aedes spp.* The clinical symptoms of ZIKV infection are not unique and it appears within 3–12 days post infection⁴, which is similar to dengue and chikungunya³. Nevertheless, alternative other routes of ZIKV infection were reported, as blood transfusion⁵, transplacental⁶, and sexual⁷ transmissions.

ZIKV presents an icosahedral shell embedded with several surface protein projections and its diameter is around 50 nm⁴. The ZIKV genome is a positive-sense single-stranded RNA with 5' NCR and 3' NCR as noncoding regions. The open reading frame (ORF) can be translated into structural capsid (C), premembrane/membrane (PrM), and envelope (E) proteins, other nonstructural proteins involved in the viral replication process (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, and NS5)^{8,3}.

The envelope (E) protein in the surface of the ZIKV virion surface is critical to the receptor attachment in the ZIKV entry. The herringbone pattern of ZIKV E protein formed by antiparallel homodimers is involved in membrane fusion and receptor attachment to ZIKV entry cells^{9,10}. E protein can interact with several ZIKV-recognized receptors such as C-type lectin receptors (or dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin (DC-SIGN))^{10,11}. The ZIKV entry into host cells can also be mediated between negatively charged lipids present in the viral surface of the membrane, such as phosphatidylserine (PS), in a mechanism not mediated by ZIKV E protein. These anionic lipid cell receptors, also recognized as ZIKV receptors are also involved in viral entry mechanisms and belong to distinct types of transmembrane phosphatidylserine receptors: TIM (TIM1, TIM3, and TIM4) and TAM (AXL and TYRO3)^{10,11} (Figure

1).

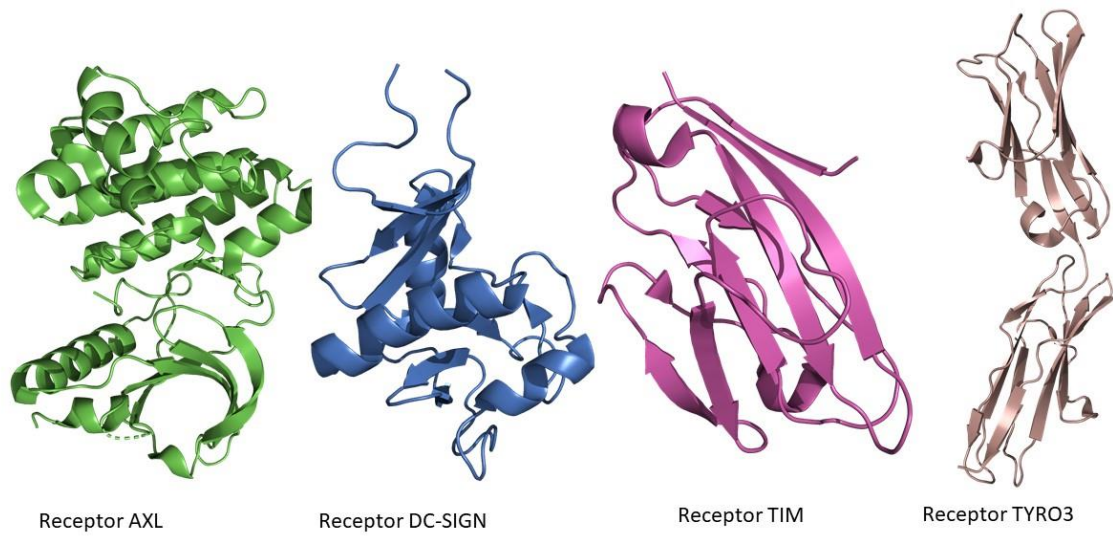


Figure 1. Zika virus receptors in the salivary glands.

These mRNA and/or protein expressions of these several ZIKV receptors involved in the viral entry were also detected in salivary glands (Table 1). Recently, the functional interaction of E protein with glucose-regulated proteins 78 (GRP78) was considered a key activity to the internalization of ZIKV into host cells, and subsequent viral replication¹¹. As expected, the GRP78 protein expression was expressed in the acinar and ductal of parotid, submandibular, and labial minor salivary glands¹². In general, this data indicates multiple ZIKV entry receptors in combination for viral infection in both minor and major salivary glands.

Table 1. Expression of ZIKV transporters in salivary glands.

| Database | Receptor | Name Gen | Uberon | Anatomical entity | Expression score | | | |
|---------------------|-------------------------|--------------------|----------------------|------------------------|----------------------|-------------|----------------------------------|--------------|
| Bgee | C-type lectin receptors | DC-SIGN | 0001830 | Minor salivary gland | 68.24 | | | |
| | | Phosphatidylserine | TIM1 | 0001830 | Minor salivary gland | 89.35 | | |
| | 0001831 | | | Parotid gland | 94.36 | | | |
| | TIM3 | | 0001830 | Minor salivary gland | 77.22 | | | |
| | TIM4 | | 0001830 | Minor salivary gland | 54.84 | | | |
| | TYRO3 | | 0001044 | Saliva-secreting gland | 89.13 | | | |
| | | | 0001830 | Minor salivary gland | 78.69 | | | |
| | AXL | 0001830 | Minor salivary gland | 83.98 | | | | |
| 0001831 | | Parotid gland | 84.82 | | | | | |
| Database | Receptor | Name Gene | Anatomical entity | RNA Expression | | | | Protein |
| | | | | Consensus, nTPM | HPA, pTPM | GTEEx, pTPM | FANTOM5, Scaled Tags Per Million | |
| Human Atlas Protein | C-type lectin | DC-SIGN | Salivary Gland | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.9 | Not detected |
| | Phosphatidyl-serine | TIM3 | Salivary Gland | 2.9 | 2.6 | 2.9 | 18.3 | Not detected |
| | | TIM4 | Salivary Gland | 0.2 | 0.2 | 0.1 | 27.1 | Not detected |
| | | TYRO3 | Salivary Gland | 1.9 | 1.9 | 1.9 | 10.4 | Medium |
| | | AXL | Salivary Gland | 10.7 | 6.8 | 10.7 | 30.6 | Low |

Considering the overlap of symptomatology with other arboviruses, high-sensitive and -specific diagnostic platforms for ZIKV detection that distinguish this virus from dengue and chikungunya viruses are needed to impact public health. The gold standard technique to detect ZIKV is virus isolation, however, it is frequently not effective for massive diagnostic testing due to laborious, time-consuming, and costly characteristics. Therefore, suspected ZIKV infection has been detected using molecular RT-PCR and serological assays. ZIKV has been detected in the acute phase or up to 14 days after infection using RT-PCR. The antibody-based platforms have presented difficulties in differentiating antibodies against the dengue virus¹³. ZIKV mRNA detection was performed in several biofluids such as breast milk¹⁴, urine¹⁵, blood, semen, and saliva¹⁶. It is in accordance with the highest level of viral RNA detected in the parotid, submandibular and sublingual glands of non-human primates^{17,18}. It was showed overexpression of inflammatory biomarkers derived from the lipooxygenase system (hepoxilins A3 and B3), both are proinflammatory molecules related to neurological inflammation and neurite regeneration in congenital Zika syndrome patients subjects in saliva. The detection for longer periods after the birth of non-specific anti-inflammatory components in saliva of congenital Zika syndrome children suggests the high activity of the immune system after birth against ZIKV¹⁹. A robust salivary ZIKV RNA was detected in a prolonged period in comparison to viremia in guinea pigs²⁰ and rhesus macaques^{21,22}.

In humans, the ZIKV RNA was detected more frequently in the saliva than in blood samples¹⁶. Besides, the identification of ZIKV peptides in saliva²³ and the presence of ZIKV-specific IgA in saliva²⁴ of infected patients indicates specific antibodies can be detected in lateral flow devices, colorimetric assays, or electrochemical biosensors for ZIKV detection. The optimizing of adequate handling and efficient storage are critical to preserve the 3D structural integrity of salivary biomarkers²⁵ due to the powerful and fast proteolysis in the whole saliva²⁶, which can also affect the ZIKV protein degradation in the oral cavity.

Salivary biomarkers derived directly from ZIKV virion or indirectly by the immunological response to ZIKV infection are a potential alternative to develop novel ZIKV diagnostic platforms using a non-invasive, and self-collected

sample^{27,28}. Altogether, we revisited the molecular expression of ZIKV entry receptors and indicated multiple entry mechanisms of the ZIKV onto acinar and ductal cells of salivary glands, which can be related to ZIKV mRNA/peptide/protein expression in saliva to scientifically support non-invasive and self-collected salivary diagnostic platforms to ZIKV.

REFERENCES

- 1- Dick GW, Kitchen SF, Haddow AJ. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 1952 Sep;46(5):509-20.
- 2- Chan JF, Choi GK, Yip CC, Cheng VC, Yuen KY. Zika fever and congenital Zika syndrome: An unexpected emerging arboviral disease. **J Infect.** 2016 May;72(5):507-24.
- 3- Silva S, Shimizu JF, Oliveira DM, Assis LR, Bittar C, Mottin M et al. A diarylamine derived from anthranilic acid inhibits ZIKV replication. **Sci Rep.** 2019 Nov 27;9(1):17703.
- 4- Sharma V, Sharma M, Dhull D, Sharma Y, Kaushik S, Kaushik S. Zika virus: an emerging challenge to public health worldwide. **Can J Microbiol.** 2020 Feb;66(2):87-98.
- 5- Musso D, Roche C, Robin E, Nhan T, Teissier A, Cao-Lormeau VM. Potential sexual transmission of Zika virus. **Emerg Infect Dis.** 2015 Feb;21(2):359-61.
- 6- Ventura CV, Maia M, Ventura BV, Linden VV, Araújo EB, Ramos RC, Rocha MA, Carvalho MD, Belfort R Jr, Ventura LO. Ophthalmological findings in infants with microcephaly and presumable intra-uterus Zika virus infection. **Arq Bras Oftalmol.** 2016 Feb;79(1):1-3.
- 7- Nicastrì E, Castillettì C, Liuzzi G, Iannetta M, Capobianchi MR, Ippolito G. Persistent detection of Zika virus RNA in semen for six months after symptom onset in a traveller returning from Haiti to Italy, February 2016. **Euro Surveill.** 2016 Aug 11;21(32):30314.
- 8- Sirohi D, Chen Z, Sun L, Klose T, Pierson TC, Rossmann MG, Kuhn RJ. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. **Science.** 2016 Apr 22;352(6284):467-70.

- 9- Yang C, Zeng F, Gao X, Zhao S, Li X, Liu S et al. Characterization of two engineered dimeric Zika virus envelope proteins as immunogens for neutralizing antibody selection and vaccine design. **J Biol Chem**. 2019 Jul 5;294(27):10638-10648.
- 10- Dai L, Song J, Lu X, Deng YQ, Musyoki AM, Cheng H et al. Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. **Cell Host Microbe**. 2016 May 11;19(5):696-704.
- 11- Khongwichit S, Sornjai W, Jitobaom K, Greenwood M, Greenwood MP, Hitakarun A et al. A functional interaction between GRP78 and Zika virus E protein. **Sci Rep**. 2021 Jan 11;11(1):393.
- 12- Guidelines for clinical intracardiac electrophysiologic studies. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Assessment of Diagnostic and Therapeutic Cardiovascular Procedures (Subcommittee to Assess Clinical Intracardiac Electrophysiologic Studies). **J Am Coll Cardiol**. 1989 Dec;14(7):1827-42.
- 13- Sharma V, Sharma M, Dhull D, Sharma Y, Kaushik S, Kaushik S. Zika virus: an emerging challenge to public health worldwide. **Can J Microbiol**. 2020 Feb;66(2):87-98.
- 14- Blohm GM, Lednicky JA, Márquez M, White SK, Loeb JC, Pacheco CA, et al. Evidence for Mother-to-Child Transmission of Zika Virus Through Breast Milk. **Clin Infect Dis**. 2018 Mar 19;66(7):1120-1121.
- 15- Gourinat AC, O'Connor O, Calvez E, Goarant C, Dupont-Rouzeyrol M. Detection of Zika virus in urine. **Emerg Infect Dis**. 2015 Jan;21(1):84-6.
- 16- Musso D, Roche C, Nhan TX, Robin E, Teissier A, Cao-Lormeau VM. Detection of Zika virus in saliva. **J Clin Virol**. 2015 Jul; 68:53-5.
- 17- Li XF, Dong HL, Huang XY, Qiu YF, Wang HJ, Deng YQ et al. Characterization of a 2016 Clinical Isolate of Zika Virus in Non-human Primates. **EBioMedicine**. 2016 Oct; 12:170-177.
- 18- Coffey LL, Pesavento PA, Keesler RI, Singapuri A, Watanabe J, Watanabe R et al. Zika Virus Tissue and Blood Compartmentalization in Acute Infection of Rhesus Macaques. **PLoS One**. 2017 Jan 31;12(1):e0171148.
- 19- De Oliveira DN, Lima EO, Melo CFOR, Delafiori J, Guerreiro TM, Rodrigues

RGM et al. Inflammation markers in the saliva of infants born from Zika-infected mothers: exploring potential mechanisms of microcephaly during fetal development. **Sci Rep**. 2019 Sep 20;9(1):13606.

20- Deng YQ, Zhang NN, Li XF, Wang YQ, Tian M, Qiu YF et al. Intranasal infection and contact transmission of Zika virus in guinea pigs. **Nat Commun**. 2017 Nov 21;8(1):1648.

21- Newman CM, Dudley DM, Aliota MT, Weiler AM, Barry GL, Mohns MS et al. Oropharyngeal mucosal transmission of Zika virus in rhesus macaques. **Nat Commun**. 2017 Aug 1;8(1):169.

22- Coffey LL, Pesavento PA, Keesler RI, Singapuri A, Watanabe J, Watanabe R et al. Zika Virus Tissue and Blood Compartmentalization in Acute Infection of Rhesus Macaques. **PLoS One**. 2017 Jan 31;12(1):e0171148.

23- Zuanazzi D, Arts EJ, Jorge PK, Mulyar Y, Gibson R, Xiao Y et al. Postnatal Identification of Zika Virus Peptides from Saliva. **J Dent Res**. 2017 Sep;96(10):1078-1084.

24- Zhao LZ, Hong WX, Wang J, Yu L, Hu FY, Qiu S et al. Kinetics of antigen-specific IgM/IgG/IgA antibody responses during Zika virus natural infection in two patients. **J Med Virol**. 2019 May;91(5):872-876.

25- Thomadaki K, Helmerhorst EJ, Tian N, Sun X, Siqueira WL, Walt DR et al. Whole-saliva proteolysis and its impact on salivary diagnostics. **J Dent Res**. 2011 Nov;90(11):1325-30.

26- Helmerhorst EJ. Whole saliva proteolysis: wealth of information for diagnostic exploitation. **Ann NY Acad Sci**. 2007 Mar;1098:454-60.

27- Caixeta DC, Oliveira SW, Cardoso-Sousa L, Cunha TM, Goulart LR, Martins MM et al. One-Year Update on Salivary Diagnostic of COVID-19. **Front Public Health**. 2021 May 21;9:589564.

28- Dawes C, Wong DTW. Role of Saliva and Salivary Diagnostics in the Advancement of Oral Health. **J Dent Res**. 2019 Feb;98(2):133-141.

CONTRIBUTIONS

All authors contributed equally to this work.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by a grant from CAPES - Prevention and Combat of Outbreaks, Endemics, Epidemics and Pandemics (##88887.506792/2020-00), MCTIC/FNDCT-CNPq/MEC-CAPES/MS-DECIT/Preventing and Combating Zika Virus (#440610/2016-8), FAPEMIG (Minas Gerais Research Foundation APQ-02148-21) CNPq (National Counsel of Technological and Scientific Development), CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education), Federal University of Uberlandia, and the National Institute of Science and Technology in Theranostics and Nanobiotechnology - INCT-Teranano (CNPq-465669/2014-0). ACGJ AND RS-S also thanks to the CNPq for the productivity fellowship.

COMPETING INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests.

3- CAPÍTULO 2

THE EXPRESSION OF COLLAGEN AND NUCLEIC ACIDS OF SUBMANDIBULAR GLANDS ARE CHANGED BY ZIKA VIRUS INFECTION

Renata Pereira Georjutti^{1,#}, Leia Cardoso-Sousa L.^{1,#}, Douglas Carvalho Caixeta¹, Stephanie Wutke Oliveira¹, Marco Guevara-Vega¹, Thulio M. Cunha², Ana Carolina Gomes Jardim³, Robinson Sabino-Silva¹

¹Innovation Center in Salivary Diagnostic and Nanobiotechnology, Department of Physiology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Brazil

²Department of Pulmonology, School of Medicine, Federal University of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

³Laboratory of Virology, Institute of Biomedical Science, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, Brazil

***Corresponding Author:**

Robinson Sabino-Silva; Federal University of Uberlandia (UFU),
Institute of Biomedical Sciences (ICBIM), ARFIS, Av. Pará, 1720,
Campus Umuarama, CEP 38400-902, Uberlandia, MG, Brazil
E-mail: robinsonsabino@gmail.com

ABSTRACT

Zika virus (ZIKV) is an emerging disease with outbreaks recorded in Africa, Asia, the Pacific, and the Americas. The ZIKV diagnostic-based in saliva samples at the acute increased the rate of molecular detection of ZIKV. However, the knowledge of the effects of ZIKV in salivary glands is very limited in both human and animal models. Thus, interferon-gamma gene knockout C57/BL6 mice were intradermally challenged with ZIKV (50 μ l, 10^5 FFU, n=7) or vehicle (50 μ l, n=7). Submandibular glands were collected at day 3 (due to viremia peak) for analysis using attenuated total reflection (ATR)-Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. The changes in the submandibular spectral profile were analyzed by t-test ($p < 0.05$). Nineteen vibrational modes of saliva were detected in both control and ZIKV animals. The 1341 cm^{-1} vibrational mode (collagen) was decreased in ZIKV than control mice. Vibrational mode at 964 cm^{-1} (Nucleic acids) was increased ($p < 0.05$) in ZIKV than control mice. Our results suggest that ZIKV infection can affect the molecular composition of salivary gland tissue.

Keywords: Zika Virus, submandibular glands, ATR-FTIR, collagen, nucleic acids.

INTRODUCTION

Zika virus (ZIKV) is an enveloped and spherical flavivirus. The nuclear structure expresses the α -helical capsid (C) protein complexed with genomic RNA. This nuclear structure is enclosed by a lipid bilayer anchored with two surface proteins membrane (M) and envelope (E) with a diameter of ~50 nm. ZIKV has a single-stranded positive-sense RNA genome, which is pivotal to viral RNA replication and viral pathogenicity¹. The clinical symptomatology of ZIKV patients includes fever, joint pains, fatigue, body aches, and conjunctivitis. These symptoms are similar and can be confounded with chikungunya and dengue². Robust evidence also supports a relationship between ZIKV infection in pregnancy and fetal microcephaly³.

The ZIKV was identified using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) in blood, urine⁴, breast milk⁵, semen⁶ and saliva⁷ in the acute phase of infected patients. Considering the detection of several pathogenic viruses such as BK polyomavirus, human cytomegalovirus, and Epstein–Barr virus in salivary glands, this tissue is recognized as a typical site for immune evasion. In particular, a robust ZIKV replication was detected in the parotid glands of guinea pigs during the acute infection⁸. As a result, it is important to evaluate potential molecular changes caused by ZIKV in salivary glands.

Attenuated total reflection (ATR)-Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy is a sustainable, reagent-free, and fast platform which requires an ultra-low volume of sample allowing automated and high-throughput analyses. By interrogating biological tissues with infrared light, ATR-FTIR is a high-sensitive analytical platform capable to characterize functional groups from proteins, carbohydrates, lipids, fatty acids, polysaccharides, and nucleic acids in several tissues⁹.

Here, we tested the hypothesis that specific submandibular gland components can be changed in ZIKV-infected mice compared to healthy control mice using ATR-FTIR spectroscopy. In this context, the present study aimed to identify infrared spectral signatures of submandibular glands that are suitable for monitoring changes in molecular components promoted by ZIKV.

METHODS

Animals

All experimental procedures were approved by the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Uberlandia (UFU) (License #CEUA-UFU #071/2017). The procedures were carried out in accordance with the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals of the International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS), countersigned by the Brazilian National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA).

Induction of ZIKV infection and samples collection

Two-month-old interferon-gamma gene knockout C57/BL6 male mice (30g) from Rodent Animal Facility Network (REBIR/PROPP/UFU) were divided into Control (n= 5) and ZIKV (n = 7). The animals were maintained under standard conditions (22 ± 1 °C, 60% ± 5% humidity and 12-hour light/dark cycles, light on at 7 AM) and were allowed free access to standard diet and water in a rodent facility.

ZIKV infection was induced by an intradermally challenge with ZIKV (50 µL, 1 x10⁵ FFU) and control mice received vehicle (50 µL). After the intradermally challenge with vehicle or ZIKV, we performed a careful analysis in animals to perform a humane endpoint with specific criteria: 1) ruffled fur and ocular discharge; and 2) in cases of ataxia, tremor, and cyanosis. However, it was not necessary to perform euthanasia in this set of control or ZIKV animals. On day 3, due to the peak of viremia, the animals were anesthetized with 12 mg/kg of xylazine and 80mg/kg of ketamine, and submandibular glands and spleen were collected and frozen (-80 ° C).

ZIKV infection confirmation using reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

The ZIKV mRNA detection was analyzed by real-time reverse

transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) in the spleen. The ZIKV mRNA detection was analyzed by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) in the spleen. Viral RNA was extracted from spleen samples using the Direct-zol RNA miniPrep Plus Kit (Zymo Research) following the manufacturer's protocol. Further, RNA was converted to cDNA using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem). The RT-qPCR assay was prepared following SYBR Green JumpStart Taq ReadyMix (SIGMA) protocol using ZIKV specific primers (5 pmol), 5'TTGGTCATGATACTGCTGATTGC3' (Forward), and 5'CCTTCCACAAAGTCCCTATTGC3' (Reverse). The RT-qPCR was carried out in an Applied Biosystem 7300 system for 40 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min, and 1 cycle at 95 °C for 15 s, 60 °C for 1min, 95 °C for 15 s, and 60 °C for 15s. Each sample was analyzed in triplicates. Positive and negative template control was also included in all experiments. ¹⁰

Chemical profile by ATR-FTIR Spectroscopy

Submandibular glands spectra were recorded in the transmission mode (OPUS v.6.5 software, Bruker) using ATR-FTIR spectrophotometer Vertex 70 (Bruker Optics) using a micro-attenuated total reflectance (ATR) component. The lyophilized samples were directly placed on ATR-crystal and infrared spectra were recorded. Spectra were acquired with 4 cm⁻¹ spectral resolution and 32 scans per sample, from 400 to 4000 cm⁻¹. Two replicates per sample were studied and the mean was used for each sample. ^{11, 12} Some bands of interest in submandibular glands contain CH₂ wagging proposed for collagen of lipids (1341 cm⁻¹); symmetric stretching mode of dianionic phosphate monoesters of phosphorylated of nucleic acids) proposed for nucleic acid (969 cm⁻¹); and a left-handed helix of nucleic acids was also proposed for nucleic acid (917 cm⁻¹). ¹³

Spectra data procedures

The original spectra were normalized by vector and a rubber band baseline was performed. The obtained band areas were performed using Opus 6.5 software (Bruker Optics, Reinstetten, Germany). ^{11, 12}

Statistical analysis

The Kolmogorov-Smirnov test was applied to assess the normality of variables and the data were analyzed using the unpaired T-test or Mann Whitney test. All analyses were performed using GraphPad Prism (GraphPad Prism version 7.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Values of $p < 0.05$ were considered significant and the results were expressed as mean \pm S.D.

RESULTS

To confirm ZIKV infection in this animal model, ZIKV RNA replication was evaluated in the spleen of mice. As expected, ZIKV mRNA expression was present only in the ZIKV mice and its detection was undetermined in control mice (Table 1). The body weight was similar ($p > 0.05$) in ZIKV-infected mice (25.4 ± 1.8 g) compared with the control group (25.0 ± 1.2 g).

Table 1. Spleen ZIKV RNA expression of control and ZIKV mice was measured using RT-qPCR.

| Groups | ZIKV mRNA expression (FFU/mL) |
|---------|----------------------------------|
| Control | 0 (undetermined) |
| ZIKV | 730 ± 155 |

Figure 1A displayed the average spectra of submandibular glands from control and ZIKV mice between 3700 cm^{-1} and 900 cm^{-1} . We can observe a superposition of protein, lipid, DNA/RNA, and carbohydrate components in the submandibular glands of control and ZIKV mice. The spectral components of submandibular were evaluated by band area in a univariate analysis comparing both control and ZIKV mice. Several other functional groups were similar ($p > 0.05$) in the submandibular gland comparing control and ZIKV mice (data not

shown). The spectral band area in 1341 cm^{-1} (CH_2 wagging), proposed for collagen, decreased in ZIKV compared to control mice (Figure 1B). Furthermore, the band area at 969 cm^{-1} (symmetric stretching mode of dianionic phosphate monoesters of phosphorylated nucleic acids) proposed for nucleic acid was increased in ZIKV than control mice. Besides, the band area at 917 cm^{-1} related to nucleic acids (a left-handed helix of nucleic acids) was also higher in ZIKV compared to control mice (Figure 1C-D, respectively).

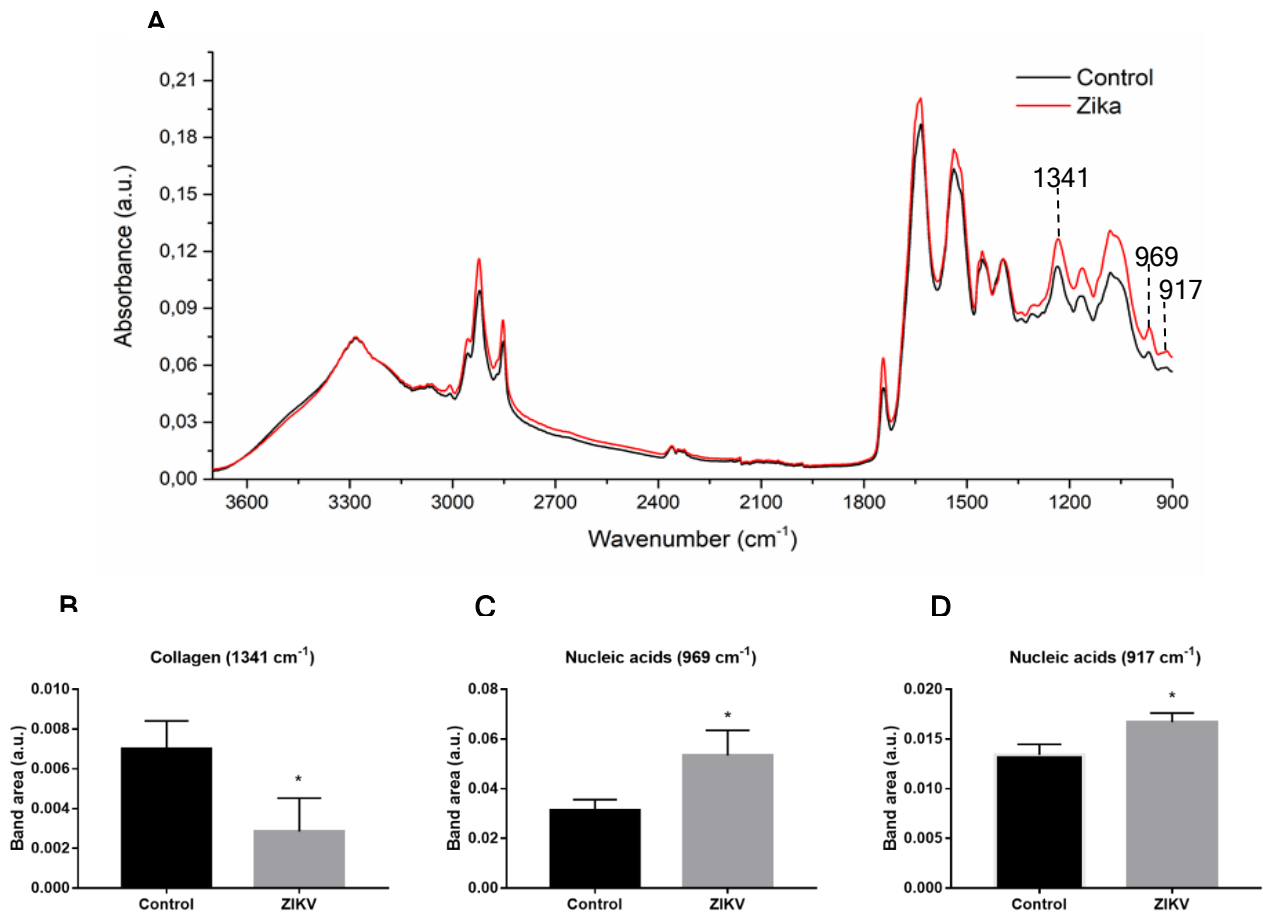


Figure 1. ATR-FTIR average spectra ($3700\text{--}900\text{ cm}^{-1}$) of submandibular glands in control and ZIKV mice (A). Band area at 1341 cm^{-1} (B). Band area at 969 cm^{-1} (C). Band area at 917 cm^{-1} (D). Results are mean \pm SD of 5 control and 7 ZIKV mice; * $P < 0.05$ vs control.

DISCUSSION

ZIKV infection can promote changes in saliva and salivary gland components in both humans and animals^{8, 14, 15}. Here, we observed that collagen components in the submandibular glands significantly decreased and nucleic acids increased in ZIKV mice. According to this information, the infrared spectroscopy coupled with univariate analysis indicated vibrational modes capable to evaluate differences in tissue composition of submandibular glands ZIKV and control mice.

The ZIKV RNA was detected in blood and saliva within 5-d after symptoms onset using a highly sensitive RT-qPCR.¹⁶ The origin of ZIKV proteins present in the saliva is unknown, however, it was predicted ZIKV may be latent in the salivary glands.¹⁴ Bearing in mind the presence of ZIKV in salivary gland epithelium and surrounding connective tissue⁸, then we also suggest either totally or at least part of the ZIKV RNA detectable in saliva derived from salivary glands. ZIKV has a propensity to infect derived neural epithelial cells in the brain cortex,¹⁷ fibroblasts, and keratinocytes¹⁸ by multiple transporters. Therefore, it is also expected ZIKV entry to the salivary gland cells is mediated by multiple transporters molecules in combination for infectious entry, including receptor C-type lectin receptors and Phosphatidylserine.

In particular, the morphofunctional organization of submandibular glands is organized by a collagen network structure, a triple-helical domain of collagen composed of the amino acid sequence Glycine-X-Y (GXY).¹⁹ Thus, the reduced collagen expression in the submandibular glands under ZIKV infection could reinforce the direct or indirect effects of ZIKV in the subcellular organization of this gland. Although the authors are aware that additional studies are needed to clarify the ZIKV effects in salivary glands, these findings give support to the concept that ZIKV entry in salivary glands⁸ is a source of morphofunctional changes based on changes in collagen expression.

The vibrational region of nucleic acids is an important indicator of carcinogenesis and viral infections^{20, 21}. Here, we showed an increase in two

vibrational modes related to nucleic acid in submandibular glands of ZIKV-infected mice. The processes of DNA transcription could be increased locally during viral infection. Likewise, increased signals of nucleic acids may arise from RNA during transcription and translation in infected cells/tissues compared to normal.²² The variation in nucleic acid signals can also be influenced by changes in glycogen and phosphate levels; which have overlapping absorbance with the nucleic acids²². Benedetti et al.²³ also showed that it might be possible to partially identify the contribution of nucleic acids and other macromolecules to absorbance at certain wavenumbers. These wavenumbers can be used to monitor changes in nucleic acid levels. Likewise, there are changes in absorbance due to the different composition and structure of nucleic acids and between RNA and DNA²⁴.

The absorbance of collagen and nucleic acids is also markedly influenced by the presence or absence of other biological components. Therefore, we suggest the need for further studies with a larger sample size in human samples that can contribute to novel discoveries about the pathophysiology of ZIKV in submandibular, such as western blotting and immunohistochemical analyzes to assess glandular tissue alterations caused by ZIKV infection.

CONCLUSION

The 1341 cm^{-1} vibrational mode (collagen) was decreased in ZIKV than control mice. Both vibrational modes at 969 and 917 cm^{-1} (nucleic acids) were increased ($p < 0.05$) in ZIKV than control mice. Our results suggest that ZIKV can affect collagen and nucleic acids components of salivary gland tissue which can contribute to the presence of ZIKV in saliva.

ACKNOWLEDGMENT

This research was supported by a grant from CAPES - Prevention and Combat of Outbreaks, Endemics, Epidemics and Pandemics (##88887.506792/2020-00), MCTIC/FNDCT-CNPq/MEC-CAPES/MS-

DECIT/Preventing and Combating Zika Virus (#440610/2016-8), FAPEMIG, Federal University of Uberlandia and National Institute of Science and Technology in Theranostics and Nanobiotechnology (CNPq Process N.: 465669/2014-0). Sabino-Silva, R received a fellowship from FAU/UFU and PrInt CAPES/UFU. We also thank Rodent Animal Facility Network (REBIR/PROPP-UFU) for animal support.

COMPETING INTERESTS

No competing interests.

REFERENCES

- 1- Yun SI, Lee YM. Zika virus: An emerging flavivirus. **J Microbiol.** 2017 Mar; 55(3):204-19.
- 2- Mittal R, Nguyen D, Debs LH, Patel AP, Liu G, Jhaveri VM, et al. Zika Virus: An Emerging Global Health Threat. **Front Cell Infect Microbiol** 2017 Dec; 8; 7:486.
- 3- Mlakar J, Korva M, Tul N, Popović M, Poljšak-Prijatelj M, Mraz J, et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. **N Engl J Med** 2016 Mar; 10;374(10):951-8.
- 4- Martinez Viedma MDP, Puri V, Oldfield ML, Shabman RS, Tan GS, Pickett B Optimization of qRT-PCR assay for zika virus detection in human serum and urine. **Virus Res** 2019 Apr; 2;263:173 8.
- 5- Regla-Nava JA, Viramontes KM, Vozdolska T, Huynh A-T, Villani T, Gardner G, Johnson M, et al. Detection of Zika virus in mouse mammary gland and breast milk. **Plos Negl Trop Dis** 2019 Fev; 11;13(2):1-16.
- 6- Musso D, Richard V, Teissier A, Stone M, Lanteri MC, Latoni G, et al. Detection of Zika virus RNA in semen of asymptomatic blood donors. **Clin Microbiol Infect** 2017 Dec; 23(12):1001.e1-1001.e3.
- 7- Musso D, Roche C, Nhana TX, Robina E, Teissier A, Cao-Lormeub VM. Detection of Zika virus in saliva. **J Clin Virol** 2015 Jul; 68:53-5.

- 8- Deng YQ, Zhang NN, Li XF, Wang YQ, Tian M, Qiu YF et al. Intranasal infection and contact transmission of Zika virus in guinea pigs. *Nat Commun*. 2017 Nov 21;8(1):1648.
- 9- Butler HJ, Brennan PM, Cameron JM, Finlayson D, Hegarty MG, Jenkinson MD, et al. Development of high-throughput ATR-FTIR technology for rapid triage of brain cancer. *Nat Commun* 2019 Oct; 8;10(1):4501.
- 10- Silva S, Shimizu JF, Oliveira DM, Assis LR, Bittar C, Mottin M, Sousa BKP, Mesquita NCMR, Regasini LO, Rahal P, Oliva G, Perryman AL, Ekins S, Andrade CH, Goulart LR, Sabino-Silva R, Merits A, Harris M, Jardim ACG. A diarylamine derived from anthranilic acid inhibits ZIKV replication. *Sci Rep*. 2019 Nov 27;9(1):17703.
- 11- Caixeta DC, Aguiar EMG, Cardoso-Sousa L, Coelho LMD, Oliveira SW, Espindola FS, Raniero L, Crosara KTB, Baker MJ, Siqueira WL, Sabino-Silva R. Salivary molecular spectroscopy: A sustainable, rapid and non-invasive monitoring tool for diabetes mellitus during insulin treatment. *PLoS One*. 2020 Mar 17;15(3):e0223461.
- 12- Rodrigues RP, Aguiar EM, Cardoso-Sousa L, Caixeta DC, Guedes CC, Siqueira WL, Maia YCP, Cardoso SV, Sabino-Silva R. Differential Molecular Signature of Human Saliva Using ATR-FTIR Spectroscopy for Chronic Kidney Disease Diagnosis. *Braz Dent J*. 2019 Oct 7;30(5):437-445.
- 13- Movasaghi Z, Rehman S, Rehman DIU. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, v. 43, n. 2, p. 134-179, 2008.
- 14- Zuanazzi, Arts EJ, Jorge PQ, Mulyar Y, Gibson R, Xiao Y, et al. Postnatal Identification of Zika Virus Peptides from Saliva. *J Dent Res* 2017 Sep; 96(10):1078-84.
- 15- Castellanos JE. Could the Use of Saliva Improve the Zika Diagnosis Challenge? Contributions from a Proteomics Perspective. *J Dent Res* 2017 Sep; 96(10):1076-7.
- 16- Bingham AM, Cone M, Mock V, Heberlein-Larson L, Stanek D, Blackmore C, Likos A. Comparison of test results for Zika virus RNA in urine, serum, and

saliva specimens from persons with travel-associated Zika virus disease—Florida. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep** 2016 May; 13;65(18):475-8.

17- Nowakowski TJ, Pollen AA, Di Lullo E, Sandoval-Espinosa C, Bershteyn M, Kriegstein AR. Expression analysis highlights AXL as a candidate Zika virus entry receptor in neural stem cells. **Cell Stem Cell** 2016 May; 5;18(5):591-6.

18- Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A, Luplertlop N, et al. 2015. Biology of Zika virus infection in human skin cells. **J Virol** 2015 Sep; 89(17):8880-96.

19- Tumer MK, Cicek M. Differential immunohistochemical expression of type I collagen and matrix metalloproteinase 2 among major salivary glands of young and geriatric mice. **J Appl Oral Sci.** 2018 Jun 11;26:e20170484.

20- Chiriboga L, Xie P, Yee H, Zarou D, Kakim D, Diem M. Infrared Spectroscopy of Human Tissue. IV. Detection of Dysplastic and Neoplastic Changes of Human Cervical Tissue via Infrared Microscopy. **Cell Mol Biol** 1998 Feb; 44(1):219-29.

21- Morris BJ, Lee C, Nightingale BN, Molodysky E, Morris LJ, Appio R et al. Fourier transform infrared spectroscopy of dysplastic, papillomavirus-positive cervicovaginal lavage specimens. **Gynecol. Oncol** 1995 Feb; 56(2):245–9.

22- Sahu RK, Argov S, Salman A, Huleihel M, Grossman N, Hammody Z et al. Characteristic Absorbance of Nucleic Acids in the Mid-IR Region as Possible Common Biomarkers for Diagnosis of Malignancy. **Technol Cancer Res Treat** 2004 Dec; 3(6):629-38.

23- Benedetti E., Bramanti E., Papineschi F, Rossi I, Benedetti E. Determination of the Relative Amount of Nucleic Acids and Proteins in Leukemic and Normal Lymphocytes by Means of Fourier Transform Infrared Microspectroscopy. **Appl. Spectroscopy** 1997 June; 51(6):792-7.

24- Liquier, J. and Taillandier, E. In *Infrared Spectroscopy of Biomolecules*. Eds. H. H. Mantsch and D. Chapman. Wiley-Liss, John Wiley & Sons, INC.,; 1996. 131-158 p. ISBN: 978-0-471-02184-1.

4 CAPÍTULO 3

DIFFERENTIAL CONCENTRATIONS OF ZIKA VIRUS IN SALIVA USING A REAGENT-FREE BIOPHOTONIC PLATFORM SUPPORTED WITH MACHINE LEARNING ALGORITHMS

Renata Pereira Georjutti^{1#}, Marco Guevara-Vega^{1#}, Leia Cardoso Sousa^{1#}, Igor Andrade Santos², Douglas C. Caixeta¹, Thulio M. Cunha³, Murillo Guimarães Carneiro⁴, Ana Carolina Gomes Jardim², Robinson Sabino-Silva¹

¹Innovation Center in Salivary Diagnostic and Nanobiotechnology, Department of Physiology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

²Laboratory of Virology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

³Department of Pulmonology, School of Medicine, Federal University of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

⁴Faculty of Computing, Federal University of Uberlandia, UFU, MG, Brazil.

Both authors work equally in this work.

Corresponding Author:

Robinson Sabino-Silva; Federal University of Uberlandia (UFU), Institute of Biomedical Sciences (ICBIM), ARFIS, Av. Pará, 1720, Campus Umuruama, CEP 38400-902, Uberlandia, MG, Brazil

Phone: +55 34 3218 2100

E-mail: robinsonsabino@gmail.com

ABSTRACT

The Zika virus (ZIKV) is a global health issue from a perspective related to the potential for the emergence and the association with neurological congenital malformation and Guillain-Barré syndrome. The development of novel sensitive diagnostic platforms to detect ZIKV as an alternative to serologically based assays with low accuracy. Here, we used attenuated total reflection (ATR)-Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy supported by machine learning algorithms to identify unique infrared vibrational modes of ZIKV diluted in different concentrations in saliva samples to develop a sustainable, reagent-free, and non-invasive platform for ZIKV detection. Some machine learning algorithms were used to discriminate ZIKV in 6 different concentrations with 10 samples for each concentration, thus, sixty salivary samples were infected with ZIKV and the other 6 salivary samples without ZIKV were used as a control for ATR-FTIR analysis. The machine learning algorithms successfully classified the saliva with 10^4 in 80.5% (sensitivity: 77.7%, and specificity: 83.3%), in this similar concentration of ZIKV-infected patients. Our findings demonstrate a potential application of this reagent-free biophotonic platform supported by machine learning algorithms to detect ZIKV in saliva.

Keywords: Zika Virus, saliva, biophotonic platform

INTRODUCTION

In 1947 Zika virus (ZIKV) was first isolated in Uganda, Africa. Subsequently, the infection promoted by this flavivirus has spread geographically to North Pacific, South Pacific, and French Polynesia. In 2015 and 2016, ZIKV was detected in Latin America and spreads rapidly to North America with locally acquired and travel-associated cases^{1,2}. The global spread of ZIKV is related to mosquito-borne transmission, including species with a high capacity of proliferation in tropical and subtropical regions such as *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* species³. Furthermore, alternative transmission routes were also confirmed, such as blood transfusion⁴, sexual⁵, and perinatal⁶. The common symptoms of ZIKV infection are macular rash, headache, fever, arthritis, and myalgia^{3,7}. In the last decade, ZIKV infection was also related to neurological manifestations of congenital Zika virus infection such as microcephaly, and Guillain–Barré syndrome³.

Although the ZIKV was also detected in saliva, urine, and breast milk^{8,9} the ZIKV diagnostic is performed frequently by viral nucleic acid detection using RT-PCR and serological assays using IgM-capture enzyme-linked immunosorbent assay in blood samples¹⁰. Considering the transient characteristic of ZIKV viremia, the profitable RT-PCR diagnostic frequently occurs within 1 week after the onset of clinical illness¹¹. However, recent data have been suggested ZIKV virus detection for longer periods in saliva and urine compared to blood^{8,12}, which opens an avenue to detect this flavivirus using other non-invasive biofluids. The saliva sample was considered more sensitive than blood using RT-PCR in a large study with 855 patients with ZIKV-related symptoms^{13,14}.

The attenuated total reflection Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy is highly reproducible, highly sensitive, and green technology capable to monitor several vibrational modes related to unique molecules based on their infrared absorption in biofluids. This reagent-free and more sustainable platform removes completely the application of hazardous reagents in diagnostic assays^{15,16,17}. Salivary infrared profile

projects several spectral bands as lipids ($\sim 2920\text{ cm}^{-1}$); amide I ($\sim 1650\text{ cm}^{-1}$); amide II (1550 cm^{-1}); methyl groups of proteins (1452 cm^{-1}); amide III band components of proteins (1313 cm^{-1}); DNA/RNA (1225 cm^{-1} and 1080 cm^{-1}) and carbohydrates C2 conformation of sugar (836 cm^{-1})^{18,16,19}. In this perspective, ATR-FTIR technology coupled with multivariate analysis was efficient to discriminate blood samples from ZIKV-infected patients and non-infected healthy subjects¹⁷.

Here, we tested the hypothesis that ATR-FTIR spectroscopy supported with machine learning algorithms can detect unique infrared vibrational modes of ZIKV diluted in different concentrations in saliva samples. Thus, the present study aimed to apply machine learning algorithms in infrared non-infected and ZIKV-infected salivary profiles in different concentrations to develop a sustainable, reagent-free, rapid, and non-invasive platform for a significant impact on public health.

MATERIAL AND METHODS

Ethical Aspects and Study design

The experimental procedures were carried out following the Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) and were approved by the Institutional Review Board of the Federal University of Uberlandia (protocol number 5582016.0.0000.5152). Before samples collection, written informed consent was obtained from the participants of the present study. Patients were recruited from a decentralized health care center from healthy subjects.

Cell culture

Vero cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma–Aldrich) supplemented with 100 U/mL penicillin (Gibco Life Technologies), 100 mg/mL streptomycin (Gibco Life Technologies), 1% (v/v) non-essential amino acids (Gibco Life Technologies) and 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS; Hyclone) at 37 °C in a humidified 5% CO₂ incubator.

Virus assay

A wild-type ZIKV isolate from a clinical patient in Brazil (ZIKV^{BR}) was gently provided by the Evandro Chagas Institute in Belém, Pará²⁰. The virus was amplified employing Vero cells in a 175 cm² flask. To determine viral titers, 1×10^4 Vero cells were seeded in each of 24 wells plate 24 hours before the infection. Cells were infected with 10-fold serially dilutions of ZIKV^{BR} for 1 hour at 37°C and then, supplemented with a medium containing 1% penicillin, 1% streptomycin, 2% FBS and 1% carboxymethyl cellulose (CMC). Infected cells were incubated for 7 days in a humidified 5% CO₂ incubator at 37°C, followed by fixation with 4% formaldehyde and stained with 0.5% violet crystal. The viral foci were counted, and the viral titer was confirmed as 1×10^7 pfu/mL.

Saliva Sample Collection and Preparation

Unstimulated saliva was collected for 3 minutes in sterile conical polypropylene tubes (Kolpast, Brazil) for ATR-FTIR analysis. Subjects were asked to refrain from eating, drinking (except water), or smoking for at least 1 hour previous to the saliva collection from 8 A.M. to 9 A.M.

ZIKV sample preparation

The samples were prepared in biosafety level 2 (BSL2) rooms to ensure the researchers' safety. The saliva samples collected from patients were distributed in six microtubes of 1.5mL, with a final volume of 360µL of saliva. A ten-fold dilution was performed by applying 40µL of a concentrated ZIKV at 1×10^7 pfu/mL diluted in PBS 1X will be added. Through the dilution, the concentrations of ZIKV were 4×10^4 , 4×10^3 , 4×10^2 , 4×10^1 , 4×10^0 pfu/mL. The 4×10^4 pfu/mL concentration is the typically ZIKV concentration in saliva of primates²¹. The samples were maintained at 4°C until processing.

ATR-FTIR spectroscopy

For the analysis of each sample, the FTIR Benchtop System Cary 630 FTIR Spectrometer equipment will be used, 1 µL of each sample will be placed in the equipment crystal and allowed to dry at room temperature inside the

laminar cabin with activated airflow following biosafety recommendations NB2 for 5 minutes. Each sample will be analyzed in duplicate.

Data Pre-processing

The spectra samples were pre-processed using the following strategies: aggregation, baseline correction, normalization, and truncation. Aggregation returns the arithmetic mean of the duplicate of each sample, rubberband is adopted to obtain baseline-corrected spectra, which are further normalized by amide I. After that, the spectra were analysed in two spectral region: 4000-650 cm^{-1} and 1800-900 cm^{-1} .

Data Analysis with Machine Learning

We analyzed the infrared vibrational profile of the different concentrations of ZIKV in saliva samples using the Linear Discriminant Analysis (LDA) and Support Vector Machine (SVM) techniques. LDA transforms the original data onto a lower-dimensional space in which class separation is maximized and computational costs are reduced. We conducted five-fold stratified cross-validation to evaluate the discrimination power of LDA over the different concentrations of ZIKV. In such a procedure, the spectra were pooled into five subsets and for each interaction test, four subsets were used to train the algorithm and one exclusively to analyze its sensitivity, specificity, and accuracy. This strategy was repeated three times using different configurations of subsets to obtain a fairer predictive performance of the algorithm. The SMV analysis used a similar strategy applied to LDA.

RESULTS

Figure 1 shows the pre-processed spectra of the 4000-600 cm^{-1} region following amide I normalization of the different dilutions of pure saliva as control and saliva samples with different concentrations of ZIKA virus.

Figure 2A indicates implied changes in the spectra of saliva infected by ZIKV at the concentration (4×10^4 pfu/mL), which is a similar concentration of ZIKV-infected samples. The spectra for other reduced concentrations of ZIKV in

saliva (4×10^3 , 4×10^2 , 4×10^1 pfu/mL) tend to have a reduced disparity small difference from saliva (Figures 2B-D). As expected, the spectra of ZIKV in saliva at 4×10^0 pfu/mL appear similar to the control (Figures 2E-F).

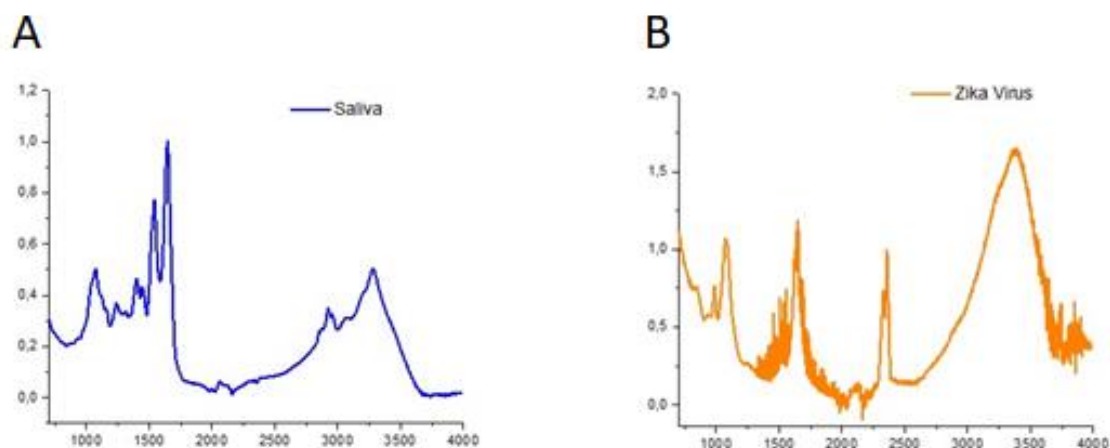


Figure 1. The pre-processed spectra of the 4000-600 cm^{-1} region following amide I normalization of the different dilutions of pure saliva as control and saliva samples with different concentrations of ZIKA virus.

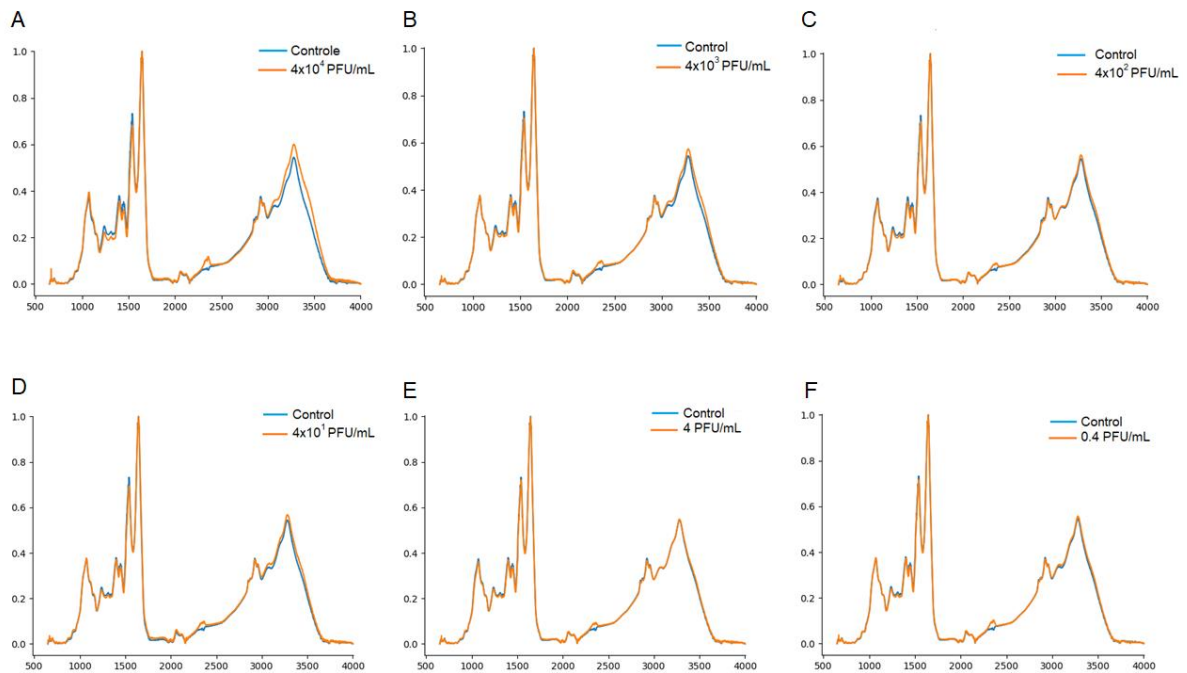


Figure 2. Original spectra after amide I normalization for each ZIKV dilution comparing with saliva: ZIKV in saliva at 4×10^4 (A), 4×10^3 (B), 4×10^2 (C), 4×10^1 (D), 4 (E) e 0,4 (F) pfu/mL.

The classification of salivary infrared spectra by machine learning algorithms was capable to distinguish efficiently ZIKV concentration in saliva at 4×10^4 pfu/mL, which is a similar concentration of ZIKV-infected in clinical samples, using both LDA and SVM machine learning algorithms. Considering the best analysis selected using SVM ($4000-650 \text{ cm}^{-1}$) the similar concentration of ZIKV-infected in clinical saliva samples (4×10^4 pfu/mL) was discriminated from non-infected saliva with a sensitivity of 88.9%, specificity of 77.8%, and accuracy of 83.3%. The classification for ZIKV concentrations in saliva at 4×10^3 , 4×10^2 , and 4×10^1 pfu/mL with an accuracy changing for 63.9% and 47.2%. The classification for ZIKV concentrations in saliva at 4 and 0,4 pfu/mL was not effective. Table 1 and Table 2 show the results of different dilutions of ZIKV.

Table 1: Performance of Linear Discriminant Analysis (LDA) and Support Vector Machine (SVM) to discriminate different concentrations of ZIKV in the infrared salivary spectra (4000-650 cm⁻¹) by ATR-FTIR spectroscopy.

| Results by dilution – region 4000-650cm ⁻¹ | | | | |
|---|---------------------|--------------|--------------|--------------|
| Technique | Dilution | Sensitivity | Specificity | Accuracy |
| LDA | 4 x 10 ⁴ | 0.777 | 0.833 | 0.805 |
| | 4 x 10 ³ | 0.611 | 0.722 | 0.666 |
| | 4 x 10 ² | 0.388 | 0.611 | 0.500 |
| | 4 x 10 ¹ | 0.333 | 0.722 | 0.527 |
| | 4 | 0.277 | 0.444 | 0.361 |
| | 0,4 | 0.444 | 0.444 | 0.444 |
| SVM | 4 x 10 ⁴ | 0.889 | 0.778 | 0.833 |
| | 4 x 10 ³ | 0.611 | 0.667 | 0.639 |
| | 4 x 10 ² | 0.333 | 0.611 | 0.472 |
| | 4 x 10 ¹ | 0.555 | 0.611 | 0.583 |
| | 4 | 0.333 | 0.555 | 0.444 |
| | 0,4 | 0.444 | 0.555 | 0.500 |

Table 2: Performance of Linear Discriminant Analysis (LDA) and Support Vector Machine (SVM) to discriminate different concentrations of ZIKV in the infrared salivary spectra (1800-900 cm^{-1}) by ATR-FTIR spectroscopy.

| Results by dilution – region 1800-900 cm^{-1} | | | | |
|--|-----------------|--------------|--------------|--------------|
| Technique | Dilution | Sensitivity | Specificity | Accuracy |
| LDA | 4×10^4 | 0.667 | 0.778 | 0.722 |
| | 4×10^3 | 0.444 | 0.444 | 0.444 |
| | 4×10^2 | 0.555 | 0.611 | 0.583 |
| | 4×10^1 | 0.167 | 0.555 | 0.361 |
| | 4 | 0.333 | 0.444 | 0.389 |
| | 0,4 | 0.222 | 0.389 | 0.305 |
| SVM | 4×10^4 | 0.778 | 0.778 | 0.778 |
| | 4×10^3 | 0.500 | 0.611 | 0.555 |
| | 4×10^2 | 0.555 | 0.555 | 0.555 |
| | 4×10^1 | 0.500 | 0.500 | 0.500 |
| | 4 | 0.444 | 0.389 | 0.417 |
| | 0,4 | 0.444 | 0.444 | 0.444 |

Figure 3 indicates the main wavenumbers used to discriminate saliva samples infected with ZIKV from control.

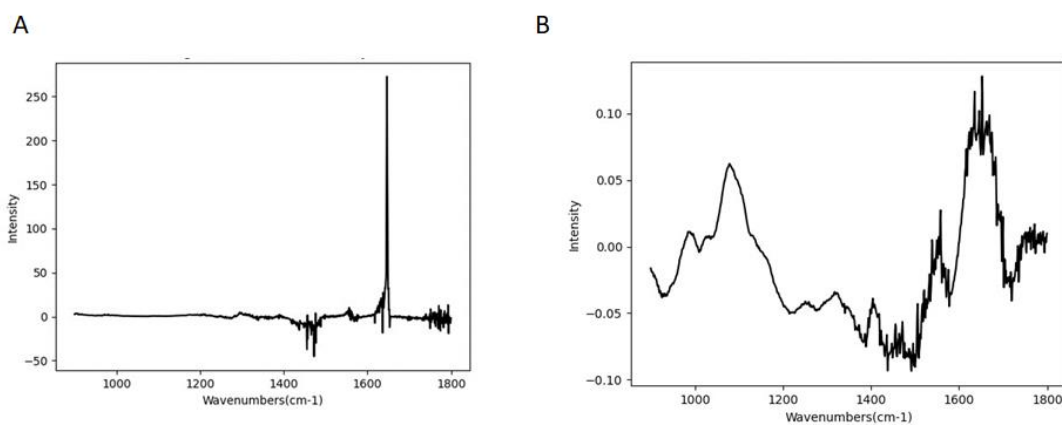


Figure 3. Loading plot data about discrimination of LDA (A) and SVM (B) analysis.

DISCUSSION

The early diagnosis of ZIKV is critical for the management of patients related to the outcomes generated by ZIKV-infection for reducing costs related to reduced work productivity and a significant impact on public health. The advances in portable ATR-FTIR devices can be the opportunity for the development of a non-invasive, sustainable, and reagent-free platform to detect ZIKV in saliva with reduced infrastructure changes in decentralized laboratory settings.

Currently, the ZIKV diagnostics are performed by RT-PCR detecting viral nucleic acid or by immunoassays detecting IgM-capture related to ZIKV in blood samples¹⁰. The transient characteristic of ZIKV viremia and its antibody response is difficult for the profitable RT-PCR diagnostic and/or immunoassays because is difficult to establish the moment of ZIKV infection, frequently the RT-PCR detect ZIKV within 1 week after the onset of clinical illness¹¹. Besides, analyses with blood samples for the detection of IgM and IgG antibodies to ZIKV have the limitation of cross-reactivity with other flaviviruses, which higher false-positive results²⁴. However, recent data have been suggested a ZIKV virus detection for longer periods in saliva compared to blood²³. It was suggested the potential of saliva when early detection of viruses is relevant, indicating salivary diagnostics in the first line diagnosis²⁵. ZIKV RNA is released in saliva and urine up to 29 days after the onset of symptoms²⁶. Thus, saliva has emerged as a diagnostic perspective in nucleic acid detection for ZIKV infection. The saliva sample was more accurate to detect ZIKV in RT-PCR analysis than blood in a large study with ZIKV patients^{13,3}; which opened perspectives to detect this flavivirus using other non-invasive biofluids.

Here, we highlight the use of saliva as a diagnostic biofluid associated with the application of ATR-FTIR spectroscopy as a sustainable and reagent-free platform for ZIKV detection. To perform it, we mimic the ZIKV concentration present in clinical samples²¹ and also diluted it in lower concentrations. The spectral differences observed were efficiently discriminated in the concentration of ZIKV in saliva at 4×10^4 pfu/mL, with 83.3%, although the

accuracy reduced for 4×10^3 , 4×10^2 , 4×10^{11} , 4, and 0,4 pfu/mL concentrations. These results indicate the possibility of identifying ZIKV through an ultra-low volume of saliva, demonstrating that ATR-FTIR spectroscopy together with classification techniques has the potential to quantitatively discriminate the ZIKV virus. It is also important to emphasize that ATR-FTIR has been used for biofluids analysis, allowing fast detection and opening new perspectives for monitoring and diagnosing a range of diseases^{27,15}.

Other studies using infrared spectroscopy have found equally relevant and satisfactory results for the direct application of this technique in biological research. An example is the effective discrimination of the dengue virus by ATR-FTIR associated with the learning machine algorithms in blood samples²⁸. In addition, the application of ATR-FTIR was also reported in plasma samples from patients infected with dengue, ZIKV, or chikungunya viruses²⁹. Altogether, these findings give support to the potential of ATR-FTIR spectroscopy to detect flaviviruses in biological samples.

The present study has some limitations. The first one is related to the absence of salivary samples collected from ZIKV-infected subjects, however, it is important to point out that clinical samples presumably present both ZIKV and anti-ZIKV antibodies to modulate immune responses to ZIKV infection. Besides, further studies with a larger sample would be beneficial to improve learning machine algorithms. However, the present study provides significant advances to detect ZIKV in a non-invasive sample and reinforces the potential of infrared spectra coupled with learning machine algorithms.

CONCLUSION

Our findings demonstrate a potential application of this portable and reagent-free biophotonic platform supported with machine learning algorithms to detect ZIKV in saliva in a similar concentration similar detected in clinically ZIKV-infected samples.

REFERENCES

- 1- Dick GW, Kitchen SF, Haddow AJ. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 1952 Sep;46(5):509-20.
- 2- Gatherer D, Kohl A. Zika virus: a previously slow pandemic spreads rapidly through the Americas. **J Gen Virol.** 2016 Feb;97(2):269-273.
- 3- Petersen LR, Jamieson DJ, Powers AM, Honein MA. Zika Virus. **N Engl J Med.** 2016 Apr 21;374(16):1552-63.
- 4- Musso D, Nhan T, Robin E, Roche C, Bierlaire D, Zisou K et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. **Euro Surveill.** 2014 Apr 10;19(14):20761.
- 5- McCarthy M. Zika virus was transmitted by sexual contact in Texas, health officials report. **BMJ.** 2016 Feb 4;352:i720.
- 6-Ventura CV, Maia M, Ventura BV, Linden VV, Araújo EB, Ramos RC, Rocha MA, Carvalho MD, Belfort R Jr, Ventura LO. Ophthalmological findings in infants with microcephaly and presumable intra-uterus Zika virus infection. **Arq Bras Oftalmol.** 2016 Feb;79(1):1-3.
- 7- Da Silva S, Oliveira Silva Martins D, Jardim ACG. A Review of the Ongoing Research on Zika Virus Treatment. **Viruses.** 2018 May 14;10(5):255.
- 8- Gourinat AC, O'Connor O, Calvez E, Goarant C, Dupont-Rouzeyrol M. Detection of Zika virus in urine. **Emerg Infect Dis.** 2015 Jan;21(1):84-6.
- 9- Dupont-Rouzeyrol M, Biron A, O'Connor O, Huguon E, Descloux E. Infectious Zika viral particles in breastmilk. **Lancet.** 2016 Mar 12;387(10023):1051.
- 10- Sharma V, Sharma M, Dhull D, Sharma Y, Kaushik S, Kaushik S. Zika virus: an emerging challenge to public health worldwide. **Can J Microbiol.** 2020 Feb;66(2):87-98.
- 11- Bearcroft WG. Zika virus infection experimentally induced in a human volunteer. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 1956 Sep;50(5):442-8.
- 12- Coffey LL, Pesavento PA, Keesler RI, Singapuri A, Watanabe J, Watanabe R, Yee J, Bliss-Moreau E, Cruzen C, Christe KL, Reader JR, von Morgenland W, Gibbons AM, Allen AM, Linnen J, Gao K, Delwart E, Simmons G, Stone M, Lanteri

- M, Bakkour S, Busch M, Morrison J, Van Rompay KK. Zika Virus Tissue and Blood Compartmentalization in Acute Infection of Rhesus Macaques. **PLoS One**. 2017 Jan 31;12(1):e0171148.
- 13- Musso D, Roche C, Nhan TX, Robin E, Teissier A, Cao-Lormeau VM. Detection of Zika virus in saliva. **J Clin Virol**. 2015 Jul;68:53-5
- 14- Petersen LR, Jamieson DJ, Powers AM, Honein MA. Zika Virus. **N Engl J Med**. 2016 Apr 21;374(16):1552-63.
- 15- Butler HJ, Brennan PM, Cameron JM, Finlayson D, Hegarty MG, Jenkinson MD, Palmer DS, Smith BR, Baker MJ. Development of high-throughput ATR-FTIR technology for rapid triage of brain cancer. **Nat Commun**. 2019 Oct 8;10(1):4501.
- 16- Caixeta DC, Aguiar EMG, Cardoso-Sousa L, Coelho LMD, Oliveira SW, Espindola FS et al. Salivary molecular spectroscopy: A sustainable, rapid and non-invasive monitoring tool for diabetes mellitus during insulin treatment. **PLoS One**. 2020 Mar 17;15(3):e0223461.
- 17- Ferreira ICC, Aguiar EMG, Silva ATF, Santos LLD, Cardoso-Sousa L, Araújo TG, Santos DW, Goulart LR, Sabino-Silva R, Maia YCP. Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy Analysis of Saliva for Breast Cancer Diagnosis. **J Oncol**. 2020 Feb 10;2020:4343590.
- 18- Khaustova S, Shkurnikov M, Tonevitsky E, Artyushenko V, Tonevitsky A. Noninvasive biochemical monitoring of physiological stress by Fourier transform infrared saliva spectroscopy. **Analyst**. 2010 Dec;135(12):3183-92.
- 19- Rodrigues RP, Aguiar EM, Cardoso-Sousa L, Caixeta DC, Guedes CC, Siqueira WL, Maia YCP, Cardoso SV, Sabino-Silva R. Differential Molecular Signature of Human Saliva Using ATR-FTIR Spectroscopy for Chronic Kidney Disease Diagnosis. **Braz Dent J**. 2019 Oct 7;30(5):437-445.
- 20- Cugola FR, Fernandes IR, Russo FB, et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature**. 2016;534(7606):267-271.
- 21-Newman CM, Dudley DM, Aliota MT, Weiler AM, Barry GL, Mohns MS et al. Oropharyngeal mucosal transmission of Zika virus in rhesus macaques. **Nat Commun**. 2017 Aug 1;8(1):169.
- 22- Crimi N, Mistretta A. Non-adrenergic non-cholinergic nervous control of

- airways. **Eur Respir J Suppl.** 1989 Jun;6:508s-511s.
- 23- Mello ML, Vidal BC. Changes in the infrared microspectroscopic characteristics of DNA caused by cationic elements, different base richness and single-stranded form. **PLoS One.** 2012;7(8):e43169.
- 24- Charrel RN, Leparc-Goffart I, Pas S, de Lamballerie X, Koopmans Marion, Reusken Chantal BEM. State of knowledge on Zika virus for an adequate laboratory response. **Publ Bull World Heal Organ Type Res Emerg.** 2016:1–29.
- 25- Corstjens PLAM, Abrams WR, Malamud D. Saliva and viral infections. **Periodontol.** 2000 2016;70:93–110.
- 26- Barzon L, Pacenti M, Berto A, Sinigaglia A, Franchin E, Lavezzo E, Brugnarò P, Palù G. Isolation of infectious Zika virus from saliva and prolonged viral RNA shedding in a traveller returning from the Dominican Republic to Italy, January 2016. **Euro Surveill.** 2016;21(10):30159.
- 27- Huber M, Kepesidis KV, Voronina L, Božić M, Trubetskov M, Harbeck N, Krausz F, Žigman M. Stability of person-specific blood-based infrared molecular fingerprints opens up prospects for health monitoring. **Nat Commun.** 2021 Mar 8;12(1):1511.
- 28- Santos MCD, Morais CLM, Nascimento YM, Araujo JMG, Lima KMG. Spectroscopy with computational analysis in virological studies: A decade (2006-2016). **Trends Analyt Chem.** 2017 Dec; 97:244-256.
- 29- Santos MCD, Nascimento YM, Monteiro JD, Alves BEB, Melo MF, Paiva AAP et al. Correction for 'ATR-FTIR spectroscopy with chemometric algorithms of multivariate classification in the discrimination between healthy vs. dengue vs. chikungunya vs. zika clinical samples' by Marfran C. D. Santos et al., **Anal. Methods**, 2018, 10, 1280–1285.

Acknowledgments

The authors received financial support from the CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education; #Finance Code 001; # 88887.506792/2020-00), FAPEMIG (Minas Gerais Research Foundation APQ-02148-21) CNPq (National Counsel of Technological and Scientific Development), CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education), Federal University of

Uberlandia, and the National Institute of Science and Technology in Theranostics and Nanobiotechnology - INCT-Teranano (CNPq-465669/2014-0). ACGJ AND RS-S also thank the CNPq for the productivity fellowship.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

5 CONCLUSÃO

Em uma perspectiva ampla da infecção de glândulas salivares pelo ZIKV e sua repercussão no diagnóstico salivar deste vírus, esta tese focou em pontos-chave desde interação molecular do ZIKV com a glândula salivar até o processo de repercussões intracelulares nas glândulas submandibulares avaliados em modelos *in vivo* associados com inovação no método de análise salivar do ZIKV. No capítulo 1 foi analisada a expressão de diversas proteínas nas glândulas salivares que podem realizar a entrada do ZIKV neste território, o que é essencial para permitir a replicação do ZIKV e sua secreção para o lúmen acinar e ductal até atingir a cavidade oral com a saliva. No segundo capítulo foi desenvolvido um modelo animal de infecção por ZIKV utilizando camundongos machos C57/BL6 *knockout* para o gene *interferon-gama*. A infecção por ZIKV foi confirmada pela detecção do ZIKV por meio de RT-PCR no baço de camundongos infectados. Baseado em uma análise por ATR-FTIR, foi observado que a presença de colágeno reduziu ($p < 0,05$) e a detecção de modos vibracionais relativos a ácidos nucleicos aumentou ($p < 0,05$) nas glândulas submandibulares de camundongos infectados por ZIKV. No terceiro capítulo, identificamos que um algoritmo de aprendizado de máquinas baseado em LDA classificou com 80,5% de acurácia (sensibilidade: 77,7% e especificidade: 83,3%) amostras de saliva infectadas com 10^4 PFU/mL, o que é similar à concentração encontrada clinicamente na infecção pelo ZIKV. Desta forma, os resultados demonstram uma aplicação potencial desta plataforma biofotônica sustentável sem o uso de reagentes, acoplada com algoritmos de aprendizado de máquina para detectar ZIKV na saliva.

Em conjunto, a revisão sobre a expressão dos transportadores para a entrada do ZIKV nas células de glândulas salivares permitiu a compreensão da patofisiologia do ZIKV nas glândulas salivares maiores e menores, e seus efeitos na saúde oral. A detecção de alterações na expressão de colágeno e ácidos nucleicos em um modelo animal de ZIKV reforça a importância da compreensão da patofisiologia do ZIKV em tecidos da cavidade oral, e também que mais estudos devem ser direcionados aos efeitos do ZIKV em glândulas salivares.

Além disso, demonstrou-se que uma plataforma biofotônica sustentável utilizando espectros infravermelho da saliva, acoplado com algoritmos de inteligência artificial, pode detectar o ZIKV em concentrações similares às encontradas clinicamente.

Frente aos capítulos acima expostos e corroborando com os objetivos propostos diante dos resultados apresentados podemos concluir que:

- Foi apresentado um mecanismo patofisiológico baseados em evidências de bioinformática e expressão em larga-escala dos transportadores para entrada do ZIKV nas células acinares e ductais células de glândulas salivares e seu potencial impacto no diagnóstico salivar que podem estar relacionados à expressão de mRNA/peptídeos/proteínas do ZIKV na saliva.
- Nossos resultados sugerem que o ZIKV pode afetar os componentes de colágeno e ácidos nucleicos do tecido da glândula salivar, o que pode contribuir para a presença do ZIKV na saliva.
- Os biomarcadores salivares derivados diretamente do vírus ZIKV ou indiretamente pela resposta imunológica à infecção pelo ZIKV são uma alternativa potencial para o desenvolvimento de novas plataformas de diagnóstico do ZIKV usando uma amostra não invasiva e auto coleta.
- Nossas descobertas demonstram uma aplicação potencial desta plataforma biofotônica portátil, sustentável, livre de reagentes, rápida e não invasiva, suportada com algoritmos de aprendizado de máquina para detecção do ZIKV na saliva em uma concentração semelhante à detectada em amostras clinicamente infectadas por ZIKV.

REFERÊNCIAS

- 1- Pierson TC, Kielian M. Flaviviruses: freando a entrada. **Curr Opin Virol** . 2013;3(1):3-12. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.12.001>
- 2-Dick GW, Kitchen SF, Haddow AJ. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 1952 Sep;46(5):509-20. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(52\)90042-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(52)90042-4)
- 3- Haddow AD, Schuh AJ, Yasuda CY, Kasper MR, Heang V, Huy R, Guzman H, Tesh RB, Weaver SC. Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. **PLoS Negl Trop Dis.** 2012;6(2):e1477. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001477>
- 4- Hayes EB. Zika virus outside Africa. **Emerg Infect Dis.** 2009;15(9):1347-1350. <https://doi.org/10.3201/eid1509.090442>
- 5- Musso D, Nilles EJ, Cao-Lormeau VM. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. **Clin Microbiol Infect.** 2014 Oct;20(10):O595-6. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12707>
- 6- Zanluca C, Melo VC, Mosimann AL, Santos GI, Santos CN, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2015; 110:569-72. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150192>
- 7- Brasil. Ministério da Saúde. **Secretaria de Vigilância em Saúde.** Vírus Zika no Brasil: a resposta do SUS [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília : Ministério da Saúde, 2017.
- 8- Musso D, Gubler DJ. Zika Virus. **Clin Microbiol Rev.** 2016, 29, 487-524. <https://doi.org/10.1128/CMR.00072-15>
- 9- Faye O, Freire CCM, Iamarino A, Faye O, de Oliveira JVC, et al. Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. **PLOS Neglected Tropical Diseases.** 2014; 8(1): e2636. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002636>
- 10- D'Ortenzio E, Matheron S, Yazdanpanah Y, de Lamballerie X, Hubert B, Piorkowski G, Maquart M, Descamps D, Damond F, Leparac-Goffart I. Evidence of Sexual Transmission of Zika Virus. **N Engl J Med.** 2016 Jun 2;374(22):2195-8. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1604449>
- 11- Shankar A, Patil AA, Skariyachan S. Recent Perspectives on Genome,

Transmission, Clinical Manifestations, Diagnosis, Therapeutic Strategies, Vaccine Developments, and Zika Virus Research Challenges. **Front Microbiol**, 2017, 8, 1761. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01761>

12- Musso D, Richard V, Teissier A, Stone M, Lanteri MC, Latoni G et al. Detection of Zika virus RNA in semen of asymptomatic blood donors. **Clin Microbiol Infect**. 2017, 23, 1001 e1001-1001 e1003. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.07.006>

13- Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerg Infect Dis**. 2008; 14:1232- 9. <https://doi.org/10.3201/eid1408.080287>

14- Ledermann JP, Guillaumot L, Yug L, Tided M, Machieng P, Pretrick M, et al. *Aedes hensilli* as a potential vector of Chikungunya and Zika viruses. **PLoS Negl Trop Dis**. 2014; 8:e3188. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003188>

15- Grard G, Caron M, Mombo IM, Nkoghe D, Mboui Ondo S, Jiolle D, et al. Zika virus in Gabon (Central Africa)-2007: a new threat from *Aedes albopictus*? **PLoS Negl Trop Dis**. 2014; 8:e2681. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002681>

16- Musso D, Roche C, Robin E, Nhan T, Teissier A, Cao-Lormeau VM. Potential sexual transmission of Zika virus. **Emerg Infect Dis**. 2015; 21:359-61. <https://doi.org/10.3201/eid2102.141363>

17- Mizuno Y, Kotaki A, Harada F, Tajima S, Kurane I, Takasaki T. Confirmation of dengue virus infection by detection of dengue virus type 1 genome in urine and saliva but not in plasma. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. 2007;101(7):738-9. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2007.02.007>

18- Poloni TR, Oliveira AS, Alfonso HL, Galvão LR, Amarilla AA, Poloni DF, et al. Detection of dengue virus in saliva and urine by real time RT-PCR. **Virology**. 2010;7(1):22. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-22>

19- Besnard M, Lastere S, Teissier A, Cao-Lormeau V, Musso D. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. **Euro Surveill**. 2014 Apr 3;19(13):20751. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.13.20751>

20- Loos S, Malle HP, Goffart IL, Gauthier V, Cardoso T, Herida M. Current Zika

- virus epidemiology and recent epidemics. **Med Mal Infect.** 2014, 44, 302-307. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2014.04.008>
- 21- Patterson J, Sammon M, Garg M. Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. **West J Emerg Med.** 2016, 17, 671- 679. <https://doi.org/10.5811/westjem.2016.9.30904>
- 22- Jaenisch T, Rosenberger KD, Brito C, Brady O, Brasil P, Marques ET. Risk of microcephaly after Zika virus infection in Brazil, 2015 to 2016. **Bull World Health Organ.** 2017;95(3):191-198. <https://doi.org/10.2471/BLT.16.178608>
- 23- Fagbami A. Epidemiological investigations on arbovirus infections at Igbo-Ora, Nigeria. **Trop Geogr Med.** 1977;29:187-91.
- 24- Brasil P, Pereira JP, Raja Gabaglia C, Damasceno L, Wakimoto M, Ribeiro Nogueira RM et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro - Preliminary Report. **N Engl J Med.** 2016; 375:2321-2334. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1602412>
- 25- Sarno M, Sacramento GA, Khouri R, do Rosário MS, Costa F, Archanjo G, Santos LA, Nery N Jr, Vasilakis N, Ko AI, de Almeida AR. Zika Virus Infection and Stillbirths: A Case of Hydrops Fetalis, Hydranencephaly and Fetal Demise. **PLoS Negl Trop Dis.** 2016 Feb 25;10(2):e0004517. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004517>
- 26- Ventura CV, Maia M, Bravo-Filho V, Góis AL, Belfort R Jr. Zika virus in Brazil and macular atrophy in a child with microcephaly. **Lancet.** 2016 Jan 16;387(10015):228. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00006-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00006-4)
- 27- Zammarchi L, Stella G, Mantella A, Bartolozzi D, Tappe D, Günther S, et al. Zika virus infections imported to Italy: clinical, immunological and virological findings, and public health implications. **J Clin Virol.** 2015; 63:32-5. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.12.005>
- 28- Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **N Engl J Med.** 2009;360: 2536-43. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0805715>
- 29- Gourinat AC, O'Connor O, Calvez E, Goarant C, Dupont-Rouzeyrol M. Detection of Zika virus in urine. **Emerg Infect Dis.** 2015; 21:84-6. <https://doi.org/10.3201/eid2101.140894>

- 30- European Center of Disease Control and Prevention [homepage na internet]. Rapid Risk Assessment. Zika virus infection outbreak, Brazil and the Pacific region; [consultado 2017 set]. Disponível em: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/rapid-risk-assessment-Zika-virus-south-america-Brazil-2015.pdf>2015.
- 31- Mansfield KL, Horton DL, Johnson N, Barrett AD, Smith DJ, Galbraith SE, et al. Flavivirus-induced antibody cross-reactivity. **J Gen Virol.** 2011; 92:2821-9. <https://doi.org/10.1099/vir.0.031641-0>
- 32- Licínio COL, Ayres FM. The use of real time PCR for arboviruses diagnostics: integrative review. **J Bras Patol Med Lab.** 2021; 57: 1-9. <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20210048>
- 33- Huzly D, Hanselmann I, Schmidt-Chanasit J, Panning M. High specificity of a novel Zika virus ELISA in European patients after exposure to different flaviviruses. **Euro Surveill.** 2016;21(16):pii=30203. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.16.30203>
- 34- Ferreira MC, Dios PD, Scully C. Transmission of hepatitis C virus by saliva? **Oral Dis.** 2005;11(4):230-5. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2005.01076.x>
- 35- Baron S, Poast J, Cloyd MW. Why is HIV rarely transmitted by oral secretions? Saliva can disrupt orally shed, infected leukocytes. **Arch Intern Med.** 2016; 159(3):303-10. <https://doi.org/10.1001/archinte.159.3.303>
- 36- Dawes C, Wong DTW. Role of Saliva and Salivary Diagnostics in the Advancement of Oral Health. **J Dent Res.** 2019 Feb;98(2):133-141. <https://doi.org/10.1177/0022034518816961>
- 37- Blicharz TM, Rissin DM, Bowden M, Hayman RB, DiCesare C, Bhatia JS, et al. Use of colorimetric test strips for monitoring the effect of hemodialysis on salivary nitrite and uric acid in patients with end-stage renal disease: a proof of principle. **Clin Chem.** 2008; 54(9):1473-80. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.105320>
- 38- Chiappin S, Antonelli G, Gatti R, De Palo EF. Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. **Clin Chim Acta.** 2007 Aug;383(1-2):30-40. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2007.04.011>
- 39- Castagnola M, Picciotti PM, Messana I, et al. Potenciais aplicações da saliva

humana como fluido diagnóstico. **Acta Otorrinolaringol Ital** . 2011;31(6):347-357.

40- Lee YH, Wong DT. Saliva: an emerging biofluid for early detection of diseases. **Am J Dent**. 2009 Aug;22(4):241-8.

41- Barth A. Infrared spectroscopy of proteins. **Biochim Biophys Acta**. 2007 Sep;1767(9):1073-101. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.06.004>

42- Baker MJ, Trevisan J, Bassan P, Bhargava R, Butler HJ, Dorling KM et al. Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. **Nat Protoc**. 2014 Aug; 9(8):1771-91. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.110>

43- Oduyebo T, Igbinosa I, Petersen EE, Polen KND, Pillai SK, Ailes EC. Update: Interim Guidance for Health Care Providers Caring for Pregnant Women with Possible Zika Virus Exposure — United States. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, 2016, 65, 739-744. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6529e1>