

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia

LÍGIA ROSA SALES LEAL

**CONSTRUÇÃO DE CANDIDATOS A VACINAS DE DNA BASEADOS NOS GENES
prM E ENVELOPE DO ZIKA VÍRUS**

RECIFE
2017

LÍGIA ROSA SALES LEAL

**CONSTRUÇÃO DE CANDIDATOS A VACINAS DE DNA BASEADOS NOS GENES
prM E ENVELOPE DO ZIKA VÍRUS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia, Centro de Biociências, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Morfotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas

Co-orientador: Dr. André Luiz Santos Jesus

RECIFE

2017

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Leal, Lígia Rosa Sales

Construção de candidatos a vacinas de DNA baseados nos genes prM e envelope do Zika vírus / Recife: O Autor, 2017.

52 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Antonio Carlos de Freitas

Coorientador: André Luiz Santos Jesus

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Morfotecnologia, Recife, 2017.

Inclui referências

- 1. Zika vírus 2. Vacinas 3. Epidemiologia I. Freitas, Antonio Carlos de (orient.) II. Jesus, André Luiz Santos (coorient.) III. Título**

616.9185

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017- 542

LÍGIA ROSA SALES LEAL

**CONSTRUÇÃO DE CANDIDATOS A VACINAS DE DNA BASEADOS NOS GENES
PRM E ENVELOPE DO ZIKA VÍRUS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia, Centro de Biociências, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Morfotecnologia.

Aprovado em 27/07/2017

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas / Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto / Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Antonio Roberto Lucena de Araújo / Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Fernanda Cristina Bezerra Leite / Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dedico este trabalho a minha vó Maria e a tia Rita. Sinceramente, não tenho como explicar o amor que sinto por vocês.

AGRADECIMENTOS

É com bastante alegria que finalmente concluo este trabalho e com ele mais uma etapa de minha vida. Neste período, aprendi, cresci e amadureci um pouco mais. Devo isso e muito mais ao apoio, carinho, amor e paciência de todos. A todos vocês muito obrigado! Mas para algumas pessoas especiais de dedicar mais umas poucas palavras de gratidão:

A minha vó Maria, querida Mamá, que apesar de não entender mais o quanto a amo e a quero bem ficaria muito feliz com mais esta conquista.

A minha tia Rita, Ritchinha! Não sou boa em falar dessas coisas e a senhora sabe (e como!). Mas não duvide de quanto a amo e sou grata por tudo! Esses últimos anos sem a senhora teriam sido muito difíceis.

Aos meus pais, Wladimir e Cinara, nem sempre estamos próximos mas amo muito os senhores e agradeço por terem me educado e preparado para os desafios da vida.

Ao meu orientador, Dr. Antonio Carlos de Freitas, por mais essa oportunidade e pelos ensinamentos dados, desde a iniciação científica, sempre com bastante paciência e atenção.

Ao meu co-orientador, André Luiz (JESUS!!!), pela paciência, sugestões e explicações, eventuais repetições delas, pela disponibilidade e prontidão.

A Anna Jéssica (Príncipa), pelo carinho, incentivo e pela paciência nas horas de estresse e companhia na madrugada em vários momentos de processo criativo.

A Amanda (Gise-L), pelo apoio e torcida desde sempre, mesmo a distância.

A todos do LEMTE, em especial para Ana Paula, Karin, Laryssa, Rita e Ruany que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho, com ensinamentos, incentivos, idas a outros laboratórios e momentos de descontração.

“Muitos de nós encontramos nossas próprias vozes apenas depois de soarmos como diferentes pessoas.”

- Neil Gaiman

RESUMO

Diretamente associado ao surto de casos de malformações fetais e ao aumento de casos de adultos afetados com a Síndrome de Guillain-Barré na América Latina, e especialmente no Brasil, o Zika vírus (ZIKV) é alvo de diversas pesquisas em todo mundo. Assim como o vírus da Dengue e da Febre Amarela, o ZIKV pertence a família *Flaviviridae* e tem como principais vetores de transmissão os mosquitos do gênero *Aedes*, mas pode ser transmitido por outras vias tais como por relações sexuais e fluídos corporais. Desse modo, e frente a sua rápida disseminação, o desenvolvimento de estratégias profiláticas e terapêuticas contra a infecção por ZIKV é de fundamental importância. Atualmente, não há ainda nenhuma vacina profilática disponível contra o ZIKV. Assim, neste trabalho foram desenvolvidos candidatos a vacinas de DNA baseados nos genes prM e Envelope que foram selecionados em razão da resposta imune humoral que são capazes de elicitar. Três construções foram desenvolvidas neste estudo: a primeira contendo a sequência completa do Envelope (E), a segunda contendo apenas os últimos 34 aminoácidos da região C-terminal de prM e a sequência completa do Envelope (prM34.E), e a terceira trata-se do Envelope com uma deleção de seus os últimos 108 aminoácidos da região C-terminal (Env Δ 108). Todas as construções foram clonadas no vetor pGEM-T easy, subclonadas no vetor de expressão para células de mamíferos pVAX1 e transfectadas em culturas de células Vero. Após as transfecções, a detecção das proteínas de interesse foi realizada por *western blot* e a verificação da transcrição gênica por meio de RT-PCR. Os resultados obtidos demonstraram a expressão de E, mas não foi possível a detecção da expressão de prM34.E e Env Δ 108. De modo similar, apenas foi possível a detecção da proteína E. Sendo, portanto, necessárias otimizações aos protocolos para futuras detecções. A eficiência da construção E como candidato vacinal deve ser avaliada em futuros ensaios imunológicos em animais.

Palavras chave: Zika vírus. prM. Envelope. Vacinas de DNA.

Abstract

Directly associated with the outbreak of fetal malformations and the increase of cases of adults affected with Guillain-Barré Syndrome in Latin America, and especially in Brazil, Zika virus (ZIKV) is the subject of several researches worldwide. Like Dengue and Yellow Fever viruses, ZIKV belongs to the *Flaviviridae* family and has as main transmission vector the mosquitoes from the genus *Aedes*. But also, it can be transmitted by other routes such as sexual relations and body fluids. Thus, in view of its rapid spread, the development of prophylactic and therapeutic strategies against ZIKV is extremely important. Currently, there are no prophylactic vaccines available against ZIKV. In this sense, in this work we developed candidates for DNA vaccines based on the prM and Envelope genes of ZIKV, which were selected for the humoral immune response that they can elicit. Three constructs were developed in this study: the first containing the complete Envelope (E) sequence, the second containing only the last 34 amino acids of the C-terminal region of prM and the complete Envelope sequence (prM34.E), and the third was Envelope with a deletion of the last 108 amino acids of the C-terminal region (Env Δ 108). All constructs were cloned into the pGEM-T easy vector, and then subcloned into the expression vector for mammalian cells pVAX1 and transfected into Vero cell cultures. After the transfections, detection of proteins of interest was performed by western blot and the verification of gene transcription was done by RT-PCR. The results obtained demonstrated expression of E, although expression of prM34.E and Env Δ 108 was detected. Similarly, only E protein detection was possible, and protocol optimizations are required for future detection. The efficacy of the E-construct as a vaccine candidate should be evaluated in future animal immunological assays.

Key-words: Zika virus. prM. Envelope. DNA vaccines.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	12
2.1. O ZIKA VÍRUS.....	12
2.1.1. Epidemiologia do Zika vírus.....	12
2.1.2. Manifestações clínicas e transmissão.....	14
2.1.3. Classificação e genoma do Zika vírus.....	15
2.1.4. Estrutura e ciclo viral dos flavivírus.....	17
2.1.5. O precursor de Membrana (prM).....	20
2.1.6. A proteína E.....	21
2.1.7. Resposta imune e desenvolvimento vacinal.....	23
3. OBJETIVOS.....	26
3.1. OBJETIVO GERAL.....	26
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1. DESENHO DOS GENES SINTÉTICOS.....	27
4.2. DESENHO DE PRIMERS PARA A E, PRM34.E E ENV Δ 108 DO ZIKV.....	27
4.3. AMPLIFICAÇÃO POR PCR DE PRM34.E E ENV Δ 108.....	29
4.4. SEQUENCIAMENTO DE PRM34.E E ENV Δ 108.....	29
4.5. CLONAGENS NOS VETORES PGEM T-EASY E PVAX1.....	30
4.6. SUBCLONAGEM DO GENE E.....	31

4.7. TRANSFEÇÕES DAS CONSTRUÇÕES PVAX1-PRM34.E, PVAX1-E E PVAX-ENV Δ 108 EM CÉLULAS EUCARIÓTICAS <i>IN VITRO</i>	31
4.8. COLETA DAS CÉLULAS VERO TRANSFECTADAS POR PVAX1 VAZIO, PVAX1-PRM34.E, PVAX1-E E PVAX-ENV Δ 108.....	32
4.9. ANÁLISE DA TRANSCRIÇÃO DE PVAX1-PRM34.E, PVAX1-E E PVAX-ENV Δ 108 ATRAVÉS DE RT-PCR E AMPLIFICAÇÃO DO CDNA.....	32
4.10. LISE MECÂNICA PARA OBTENÇÃO DE PROTEÍNAS.....	33
4.11. ANÁLISE DAS PROTEÍNAS POR GEL DE POLIACRILAMIDA.....	33
4.12. WESTERN BLOT DAS PROTEÍNAS PRM34.E, E E ENV Δ 108.....	34
5. RESULTADOS.....	35
5.1. OBTENÇÃO E CLONAGEM DAS CONSTRUÇÕES PRM34.E E ENV Δ 108 EM PGEM-T EASY E PVAX1.....	35
5.2. ANÁLISE DA TRANSCRIÇÃO DE PRM34.E, E E ENV Δ 108.....	36
5.3. VISUALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS POR GEL DE POLIACRILAMIDA.....	37
5.4. WESTERN BLOT DAS PROTEÍNAS PRM34.E, E E ENV Δ 108.....	38
6. DISCUSSÃO.....	40
7. CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS.....	46

1. INTRODUÇÃO

Dentre os vírus que compõem a família Flaviviridae, estão alguns patógenos humanos importantes causadores de diversas doenças que podem resultar em graves sequelas e em mortes (Vasilakis e Weaver, 2017). O Zika vírus (ZIKV) foi primeiramente descrito no ano de 1947, na Uganda (Dick et al., 1952). Por quase seis décadas a infecção por ZIKV permaneceu sendo considerada uma doença de pouca relevância, com relatos de casos esporádicos e de curta duração na África e na Ásia (Weaver et al., 2016).

Desde o ano de 2007, surtos de infecções por Zika vírus foram documentados em diversos locais na Oceania (Shuaib et al., 2016; Weaver et al., 2016). No entanto, apenas no ano 2016 a infecção por Zika vírus tornou-se relevante devido a sua associação a microcefalia e outras malformações fetais, bem como ao aumento de casos de adultos afetados com a Síndrome de Guillain-Barré na América Latina, e especialmente no Brasil relatados em diversas publicações (Brasil et al., 2016; Cao-Lormeau et al., 2016; Cauchemez et al., 2016; Mlakar et al., 2016; Rasmussen et al., 2016).

O desenvolvimento de estratégias profiláticas e terapêuticas contra a infecção por ZIKV é de fundamental importância haja vista a rápida disseminação do vírus. A principal forma de transmissão do ZIKV ocorre através de seus principais vetores, os mosquitos do gênero *Aedes*, com destaque ao *Aedes aegypti*, assim como observado para outros flavivírus (Vasilakis e Weaver, 2017). Ainda, o ZIKV é capaz de manter um ciclo de transmissão urbano, sendo os humanos tanto hospedeiros como reservatórios, através destes vetores (Rather et al., 2017).

Além de transmissão vetorial, o ZIKV é também capaz de disseminar-se via transmissão materno-fetal (Mlakar et al., 2016), por transfusão sanguínea (Barjas-Castro et al., 2016; Musso et al., 2016), e por relações sexuais, com casos descritos nos quais o vírus foi detectado em amostras de sêmen, urina e saliva (D'Ortenzio et al.,

2016; Hamer et al., 2017; McCarthy, 2016). Ainda é possível que ZIKV seja transmitido durante a amamentação (Dupont-Rouzeyrol et al., 2016).

Atualmente, não existem vacinas disponíveis contra o ZIKV, mas pesquisas desenvolvendo diversas estratégias vacinais vêm sendo realizadas (Barouch et al., 2017; Dowd et al., 2016; Larocca et al., 2016). Dentre estas, vacinas de DNA que utilizam as sequências dos genes prM e Envelope do ZIKV demonstraram altos níveis de eficiência em testes com camundongos e macacos *rhesus* (Abbink et al., 2016; Larocca et al., 2016).

Desse modo, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de candidatos a vacinas de DNA de caráter profilático baseados nos genes E e prM do ZIKV. Para isso, tendo como base pesquisas realizadas com o vírus da Dengue (Mani et al., 2013; Hsieh et al., 2014) foram desenvolvidas três construções. Sendo estas: A primeira, chamada E que possui a sequência completa do Envelope. A segunda, dita prM34.E, que contém apenas os últimos 34 aminoácidos da região C-terminal de prM e a sequência completa do Envelope. E a terceira, a Env Δ 108 trata-se do Envelope com uma deleção dos últimos 108 aminoácidos da região C-terminal. Estas construções foram então transfectadas em culturas de células Vero para avaliação de sua capacidade de expressão e produção protéica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O ZIKA VÍRUS

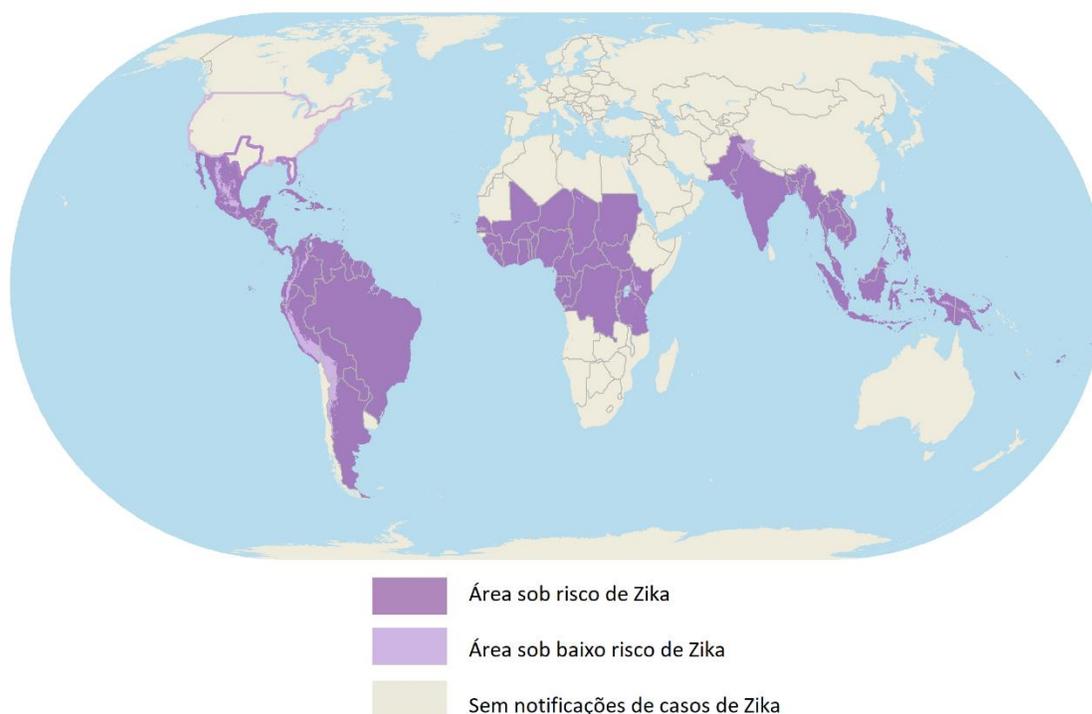
2.1.1. Epidemiologia do Zika vírus

O Zika vírus foi descrito pela primeira vez no ano de 1947, em macacos Rhesus infectados na Floresta Zika, Uganda (Dick et al., 1952) e detectado em humanos pela primeira vez na Uganda e Tanzânia no ano de 1952 (Dick, 1952). Até meados dos anos 2000 apenas casos isolados, de curta duração e de sintomas brandos foram relatados na África e Ásia. Embora seja provável que as semelhanças entre os sintomas desenvolvidos durante a infecção por ZIKV e os sintomas de manifestações brandas de outras doenças endêmicas tais como a Dengue e a Chikungunya sejam responsáveis pelo baixo número de casos relatados (Weaver et al., 2016).

Apenas em 2007 esta situação modificou-se, com a ocorrência do primeiro grande surto de casos de ZIKV na Micronésia (Weaver et al., 2016). Subsequentemente, ZIKV espalhou-se pelo Pacífico à Polinésia Francesa, local onde ocorreu o segundo grande surto em 2013 (Shuaib et al., 2016). Ao princípio do terceiro grande surto de ZIKV, em Março de 2015 no Brasil, vários casos de uma doença inicialmente desconhecida caracterizada por febre baixa e erupções cutâneas foram notificados (Hennessey et al., 2016). Nos meses seguintes, os numerosos casos desta infecção foram então confirmados como sendo causados por ZIKV não apenas no Brasil, mas também em vários países da América Latina (Weaver et al., 2016).

Análises de filogenia e relógios moleculares estimam que a introdução do ZIKV no Brasil ocorreu entres os meses de Maio-Dezembro de 2013 (Faria et al., 2016). É interessante observar que durante este período houve um aumento do número de turistas oriundos de áreas sob risco de ZIKV ao país em decorrência de eventos esportivos. Este mesmo aumento no fluxo de visitantes aliado as diversas formas transmissão do ZIKV levaram a rápida e continua disseminação viral em mais de 50 países (WHO, 2017) (Figura 1).

Figura 1 - Mapa mundial das áreas de risco de infecção por ZIKV.



Fonte: Adaptado do Centro de Controle e Prevenção de Doenças – CDC (2017).

Ao fim do ano de 2015 e início de 2016 o crescente número de casos de malformações fetais tal como a microcefalia e de adultos acometidos por síndromes neurológicas como a Guillain-Barré, nas Américas Central e Sul, e especialmente no Brasil, foram associados a infecção por Zika vírus (ZIKV), com diversas publicações corroborando esta hipótese (Brasil et al., 2016; Mlakar et al., 2016; Rasmussen et al., 2016). Posteriormente esta correlação casual foi confirmada pela Organização Mundial da Saúde.

No Brasil, país com maior número de casos de ZIKV e doenças relacionadas dados do Ministério da Saúde estimam que no ano de 2015 mais de 1,5 milhão de pessoas foram infectadas, e que em 2016 o número de casos tenha diminuído para cerca de 210 mil novas infecções (Ministério da Saúde, 2016). No entanto, apesar da

drástica diminuição dos casos, até Maio de 2017 foram notificados mais de 191 mil casos prováveis para a infecção (Ministério da Saúde, 2017).

2.1.2. Manifestações clínicas e transmissão

Os sintomas associados a infecção por ZIKV surgem em torno de 2 a 7 dias após a infecção e em geral persistem de 3 a 10 dias (Petersen et al., 2016). No entanto, estima-se que aproximadamente 80% das infecções por ZIKV sejam assintomáticas (Duffy et al., 2009). Em pessoas cujas infecções levam a manifestações clínicas semelhantes a formas brandas da infecção por Dengue e Chikungunya, sendo os principais sintomas observados em pessoas infectadas por ZIKV a febre baixa, dores nas articulações, erupções cutâneas e conjuntivite. Embora estudos mais aprofundados sejam necessários, atualmente é largamente aceito que em alguns adultos a infecção por ZIKV seja responsável pelo desenvolvimento da Síndrome de Guillain-Barré, provavelmente devido ao neurotropismo observado neste vírus (Olagnier et al., 2016; Morrison e Diamond, 2017).

A principal forma de transmissão do ZIKV ocorre através durante o repasto sanguíneo de mosquitos do gênero *Aedes* infectados, principalmente por mosquitos da espécie *Aedes aegypti*, assim como observado para outros flavivírus (Vasilakis & Weaver, 2017). Durante os surtos de ZIKV, este mantém um ciclo de transmissão urbano, sendo os humanos tanto hospedeiros como reservatórios para o vírus (Rather et al., 2017).

Além de transmissão vetorial, o ZIKV é também capaz de disseminar-se por transmissão materno-fetal tanto no momento do parto de uma mãe infectada durante a viremia, quanto durante a gravidez provavelmente por via transplacentária, sendo esta última forma a que pode causar o desenvolvimento das malformações congênitas associada a infecção viral (Mlakar et al., 2016).

Possíveis casos de infecção por transfusão sanguínea já foram relatados na Polinésia Francesa e Brasil (Barjas-Castro et al., 2016; Musso et al., 2016). É possível

ainda adquirir a infecção através de relações sexuais, que possivelmente pode ser atribuída a infecção e replicação do ZIKV nos sistemas reprodutivos e urinários, com casos descritos nos quais o vírus foi detectado em amostras de sêmen e urina (D'Ortenzio et al., 2016; Hamer et al., 2017; McCarthy, 2016).

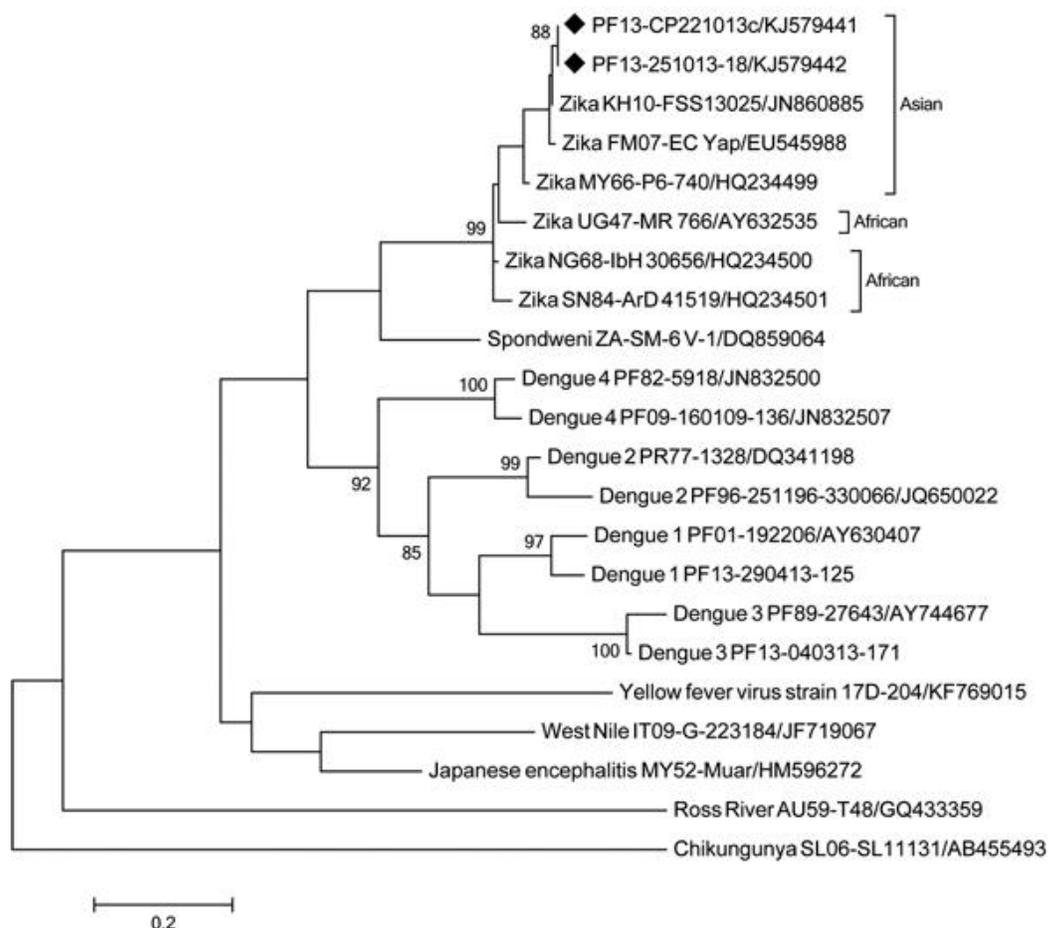
Em um estudo realizado por Musso et al (2015) foi demonstrada a persistência de partículas virais em amostras de sêmen e urina além do período de viremia detectável no sangue e, em estudo realizado por Atkinson et al (2016), ZIKV foi detectado em amostras de sêmen 62 dias após as manifestações clínicas da doença. Até o presente momento, ainda não foram registrados casos de infecção através da amamentação, mas a detecção de partículas virais em leite materno já foi observada (Dupont-Rouzeyrol et al., 2016).

2.1.3. Classificação e genoma do Zika vírus

Assim como os vírus da Dengue (DENV), Febre amarela (YFV), Encefalite japonesa (JEV) e do Oeste do Nilo (WNV), o ZIKV é membro da família *Flaviviridae* (Lindenbach e Rice, 2003). Dentre os flavivírus, o ZIKV é mais próximo do *Spondeweni* vírus, cuja infecção em humanos resulta em manifestações clínicas similares as observadas durante a infecção por ZIKV (Haddow et al., 2016).

Em relação a divergências entre cepas virais do ZIKV, análises filogenéticas e de sequências genômicas de diferentes isolados definiram a existência de duas linhagens sendo elas: a Africana e a Asiática (Faye et al., 2014) (Figura 2). É importante destacar que as cepas virais identificadas em todos os surtos recentes nas Américas, Ásia e Oceania pertencem a linhagem Asiática (Sharma & Lal, 2017). Acredita-se que a maior incidência de cepas desta linhagem, bem como as modificações na patogenicidade (como a capacidade de afetar o Sistema Nervoso Central) e nos mecanismos de interação entre os hospedeiros com o ZIKV associadas a estas cepas, estejam fortemente relacionadas com o acúmulo de mutações observadas na linhagem Asiática quando comparada a linhagem Africana (Weaver et al., 2016).

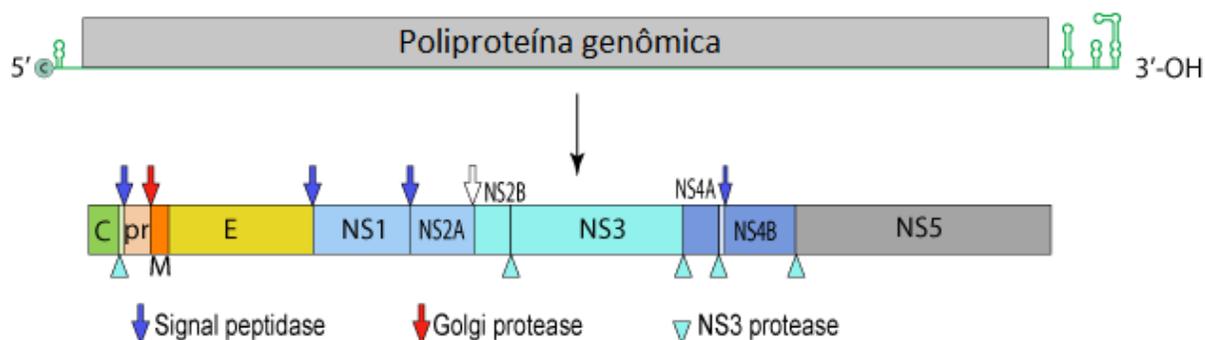
Figura 2 - Árvore filogenética da análise parcial dos genes M e E do ZIKV.



Fonte: Cao-Lormeau et al. (2013).

Assim como outros vírus do gênero Flavivirus, o ZIKV é um vírus envelopado cujo genoma é composto por um RNA de fita simples e senso positivo com cerca de 11.000 pares de bases, com uma única ORF, flanqueada por regiões não traduzidas (UTR), que codifica apenas uma poliproteína que é processada de modo a dar origem, nesta ordem, a três proteínas estruturais: o capsídeo (C), ao precursor da membrana/membrana (prM/M) e a proteína do envelope (E) e a sete proteínas não estruturais NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5 (Lindenbach e Rice, 2003). A organização do genoma dos flavivirus pode ser vista na Figura 3 a seguir.

Figura 3 - Estrutura da poliproteína e genoma dos Flavivírus. As setas indicam os locais de ação das proteases do hospedeiro e virais.



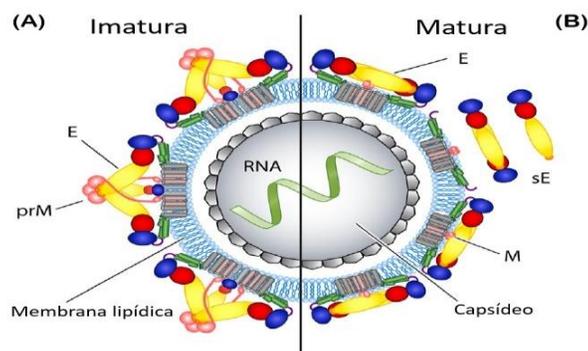
Fonte: Adaptado de ViralZone - SIB Instituto Suíço de Bioinformática (2016).

O processo de clivagem da poliproteína viral que ocorre durante e/ou após a transcrição dá-se tanto por meio de proteases do hospedeiro que atuam na clivagem de pr-M, M-E, E-NS1, NS1-NS2A e de NS4A-NS4B, como por proteases virais que atuam nas junções existentes na proteína do capsídeo viral e o domínio hidrofóbico em sua porção C-terminal, NS2A-NS2B, NS2B-NS3, NS3-NS4A, NS4A-peptídeo 2K, NS4B-NS5 (Kuno e Chang, 2007).

2.1.4. Estrutura e ciclo viral dos flavivírus

De modo semelhante a outros flavivírus, a partícula do ZIKV apresenta-se em três formas diferentes durante seu ciclo viral, sendo estas: imatura e não infectante, madura e infectante, e fusogênica que ocorre durante a ligação e entrada nas células de hospedeiros (Sirohi et al., 2016). Na Figura 4 a seguir, é possível observar um desenho esquemático dos vírions nas formas imaturas (A) e imaturas (B).

Figura 4 - Representação esquemática das virions imaturos (A) e maduros (B).



Fonte: Adaptado de Heinz e Stiasny (2017).

O ZIKV é capaz de replicar-se com sucesso em vários tipos de tecidos e células em diversos mamíferos. Estudos *in vivo* em camundongos demonstram que ZIKV replica-se em células do Sistema Nervoso (Cugola et al., 2016; Li et al., 2016; Wu et al., 2016). Em humanos, já foi observada a replicação viral em células da pele e em células dendríticas imaturas (Hamel et al., 2015), bem como em células tronco neurais (McGrath et al., 2017; Tang et al., 2016), em cordões umbilicais, fluidos amnióticos, citotrofoblastos e células Hofbauer placentárias (Bhatnagar et al., 2017; Simoni et al., 2017). Apesar destes achados, ainda não é claro quais receptores e mecanismos estão envolvidos na entrada do ZIKV nas células.

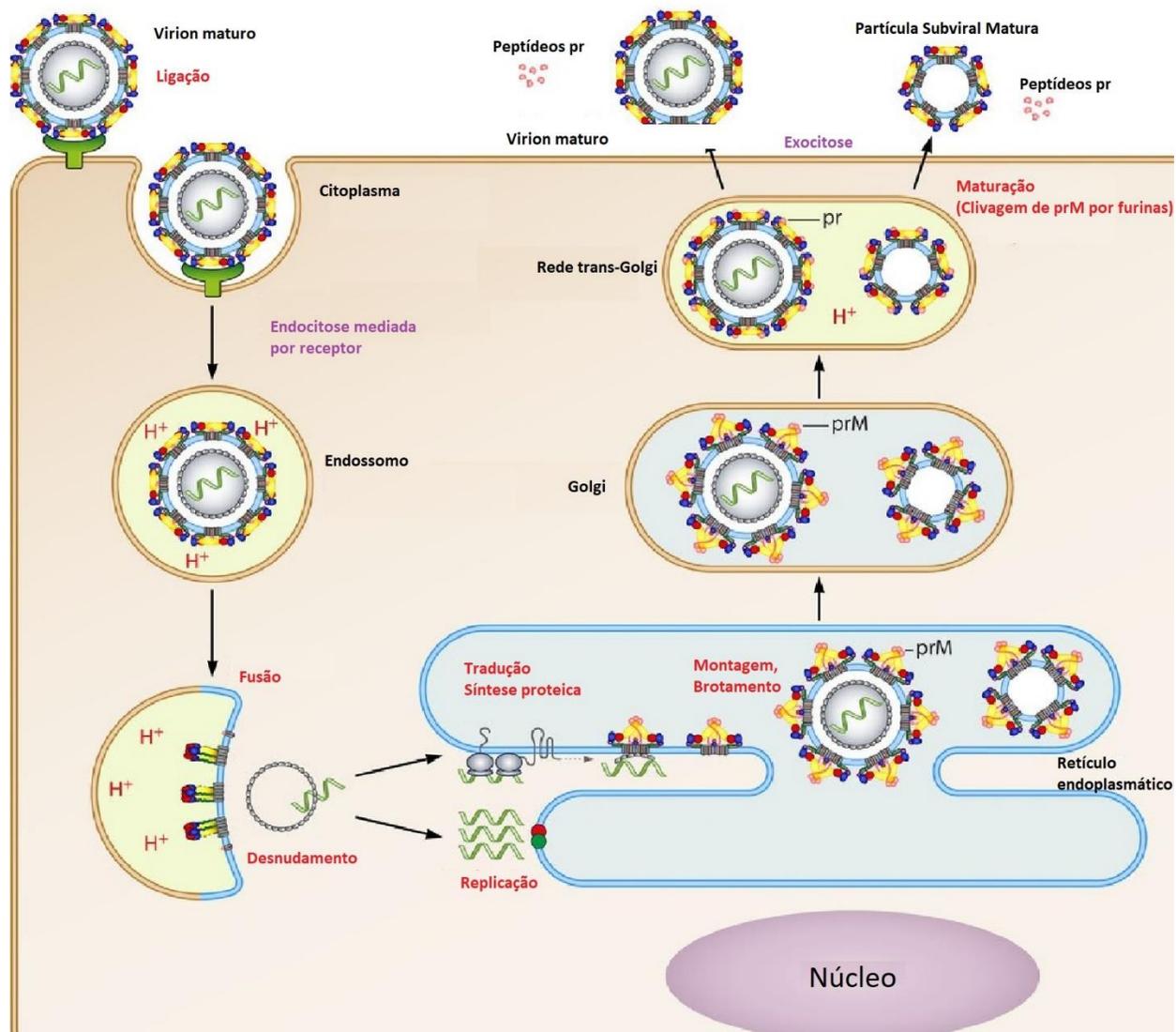
No entanto, vários estudos têm reportado interações com receptores conhecidos por estarem associados com a infecção por outros flavivírus. Como exemplo, o ZIKV é capaz de infectar células através do receptor DC-SIGN, presente na superfície de macrófagos e células dendríticas assim como observado em vírus da Dengue (Hamel et al., 2015). Entre outros receptores já descritos para ZIKV está TIM1, um membro da família de receptores dos domínios mucina e imunoglobulina de células T (TIM) (Tabata et al., 2016). E ainda, AXL e TYRO3 membros da família de receptores tirosina-quinases de superfície celular (TAM) (Hamel et al., 2015; Nowakowski et al., 2016).

Estruturalmente, os flavivírus possuem capsídeo encoberto por uma bicamada lipídica na qual as proteínas do envelope (E) e da pre-membrana/membrana (prM/M) encontram-se ancoradas (Kuhn et al., 2002; Li et al., 2008; Sirohi et al., 2016). A

ligação e a fusão dos vírus a células de seus hospedeiros ocorre por endocitose mediada por interações entre receptores celulares e a proteína E, e o baixo pH endossomal altera a estrutura da proteína E levando a fusão do vírus com a membrana endossomal com subsequente liberação do nucleocapsídeo viral no citosol (Smit et al., 2011).

No início da montagem viral no retículo endoplasmático, estas proteínas arranjam-se em 60 trímeros compostos por E/prM, conferindo aos vírus imaturos uma forma 'espetada' (Prasad et al., 2017). Por brotamento, os virions chegam a rede trans do aparelho de Golgi, onde o baixo pH local leva a mudanças conformacionais nas proteínas do envelope e prM é clivado em M por ação de furinas, uma protease celular (Yu et al., 2009), então em sua forma madura, os virions são liberados. Durante a montagem viral são também geradas as chamadas partículas subvirais (SVPs) compostas apenas pelas proteínas da Membrana e uma bicamadada lipídica, sem o nucleocapsídeo viral. Estas SVPs são liberadas das células assim como os virions maduros (Heinz e Stiasny, 2017). A Figura 5 a seguir trata-se de um esquema resumido do ciclo viral dos flavivírus.

Figura 5 - Representação esquemática do ciclo viral dos flavivírus



Fonte: Adaptado de Heinz e Stiasny (2017).

2.1.5. O precursor de Membrana (prM)

Nos flavivírus, a proteína da Membrana (M) observada nos virions maduros é originada da proteólise de sua forma precursora, dita prM (Zhang et al., 2003). O evento de clivagem da proteína prM ocorre durante a passagem das partículas virais imaturas compostas por E:prM pela rede trans-Golgi, onde o pH ácido leva a mudanças

nas glicoproteínas de membrana e as furinas, que são proteases celulares, clivam prM, gerando a proteína M e o peptídeo solúvel pr, que são liberados para o meio extracelular junto aos vírus maduros (Yu et al., 2009; Sirohi et al., 2016). A presença do peptídeo pr, nas partículas virais imaturas está diretamente envolvida no impedimento da fusão viral aos endossomos pois sua estrutura sobrepõe-se a Alça de fusão da proteína E (Li et al., 2008).

Embora a clivagem de prM seja necessária para o amadurecimento viral e, portanto, a sua infectividade, diferentes níveis de eficiência da clivagem de prM são observados em diversos flavivírus (Junjhon et al., 2008; Pierson e Diamond, 2012). Como resultado, vírus parcialmente imaturos foram observados (Mukhopadhyay et al., 2005).

As mudanças conformacionais ocasionadas por estas clivagens alteram a acessibilidade a epítomos de prM e E antes não expostos como regiões de M, que em geral não estão expostas e são inacessíveis para ligação a anticorpos e a região e da Alça de fusão de E, e de induzir a produção de anticorpos pouco ou não neutralizantes. Anticorpos contra prM compõem parte da resposta imunológica nas infecções por flavivírus, com relatos de serem capazes de conferir a vírus imaturos a capacidade de serem infecciosos (Dejnirattisai et al., 2010; Colpitts et al., 2011).

Tais anticorpos podem desencadear uma exacerbação da infecção por meio de um mecanismo chamado reforço dependente de anticorpos (*Antibody-dependent enhancement* - ADE), pelo qual certos flavivírus apresentam reações cruzadas a anticorpos gerados em resposta a infecções prévias a outros flavivírus e leva a uma piora no quadro clínico do hospedeiro (Holzmann et al., 1995; Nelson et al., 2008; Dowd et al., 2014; Mukherjee et al., 2014; Halstead, 2014).

2.1.6. A proteína E

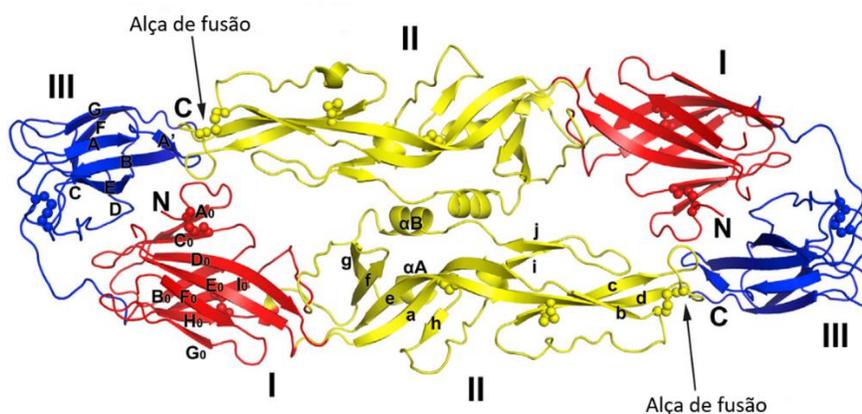
A proteína E, que é responsável pela fusão viral a células de hospedeiros nos flavivírus, é o principal alvo da ação de anticorpos neutralizantes nos flavivírus (Dai et al., 2016). Com cerca de 500 aminoácidos, a proteína tem um ectodomínio composto por cerca de 400 aminoácidos localizados em seu N-terminal (Kostyuchenko et al.,

2016). Este ectodomínio é dividido em três domínios estruturais, ditos Domínios I (E-DI), II (E-DII) e III (E-DIII) (Mukhopadhyay et al., 2005).

ED-I, que se apresenta em forma de barril beta central, é responsável pelas mudanças conformacionais necessárias a entrada do vírus na célula (Modis et al., 2003). O ED-II, que se apresenta como uma longa estrutura em forma de dedo (Dai et al., 2016) é responsável pela dimerização da proteína E, e contém a Alça de Fusão (FL) região extremamente conservada em todos os flavivírus, motivo pelo qual está diretamente envolvida nas reações cruzadas e reações ADE observadas entre os flavivírus (Lai et al., 2008; Beltramello et al., 2010; Deng et al., 2011).

O ED-III, é a região de E mais reconhecida por potentes anticorpos neutralizantes vírus-específicos sendo, portanto, um dos principais alvos de pesquisas para o desenvolvimento de estratégias vacinais e de estudos de resposta imunológica em flavivírus (Gromowski & Barrett, 2007; Sukupolvi-Petty et al., 2007; Stettler et al., 2016). Ainda, esta região também é capaz de induzir a produção de anticorpos com variados níveis de especificidade viral e de força de atuação (Sukupolvi-Petty et al., 2007). Na figura 6 a seguir, a estrutura dimérica da Proteína E do ZIKV é detalhada.

Figura 6 - Estrutura dimérica da proteína E do ZIKV. Os três domínios estão representados em: (I) em vermelho, (II) em amarelo e (III) em azul. A Alça de fusão está assinalada pelas setas pretas.



Fonte: Adaptado de Dai et al. (2016)

2.1.7. Resposta imune e desenvolvimento vacinal

Ainda se sabe pouco sobre os mecanismos de infecção e de resposta imunológica a infecção por ZIKV (Heinz e Stiasny, 2017). Em um estudo recente realizado por Dowd et al., (2016a), foram demonstrados indícios de que as cepas circulantes do ZIKV são identificadas como pertencentes apenas a um único sorotipo viral pelo sistema imune humano. Em contraste, um estudo realizado por Stauff et al., (2016) por análise de soro de camundongos Swiss recém infectados, foram observadas diferenças significativas na capacidade de indução da produção de anticorpos neutralizantes entre cepas das linhagens Africana e Asiática, quando comparadas a outros isolados da mesma linhagem (Stauff et al., 2016). Isto pode implicar em dificuldades para o desenvolvimento vacinal, assim como observado em DENV e seus sorotipos (Thisyakorn e Thisyakorn, 2014).

Embora não exista ainda uma vacina contra ZIKV disponível para uso em humanos, os grandes esforços empregados em prol do desenvolvimento de estratégias vacinais têm fornecido novos conhecimentos que facilitam o processo (Durbin, 2016). Os artigos recentemente publicados demonstram uma variedade de estratégias vacinais tais como vacinas que usam vírus inativados, vírus vivos e atenuados, vetores vivos, subunidades, partículas semelhantes a vírus (VLPs), DNA e RNA (Pierson e Graham, 2016).

A princípio, as estratégias que vem sendo utilizadas para o desenvolvimento vacinal baseiam-se nas já existentes e utilizadas para outros flavivírus, como o DENV, YFV e JEV (Pierson e Graham, 2016; Barouch et al., 2017;). Isto deve-se a grande semelhança observada no genoma e organização estrutural do ZIKV em relação a outros flavivírus, principalmente com o vírus da Dengue (Priyamvada et al., 2017). Ambos o prM e o Envelope são alvos de pesquisas devido ao alto grau de similaridade observadas nestas regiões. O Envelope em particular, figura como principal alvo destas estratégias uma vez que em outros flavivírus a ligação de anticorpos neutralizantes a E afeta a capacidade de ligação e fusão celular destes vírus (Screaton et al., 2015). Acredita-se que a neutralização completa por anticorpos contra os flavivírus seja

dependente da ligação de diversas moléculas de anticorpos a uma partícula viral para alcançar um efeito neutralizante, embora pouco se entenda sobre os mecanismos exatos de como isso ocorre (Pierson et al., 2007, 2008; Heinz e Stiasny, 2017).

Além disso, como observado no vírus da Dengue a ligação de anticorpos neutralizantes ao vírus não significa sempre que a proteção completa ocorrerá uma vez que a existência de diferentes sorotipos para este tipo viral leva a produção de anticorpos sorotipo-específicos que podem causar uma resposta cruzada devido a produção de anticorpos em resposta a uma infecção prévia. Esses anticorpos são pouco neutralizantes, e por meio de interação com receptores *Fcy* facilitam a entrada viral nas células de seus hospedeiros e levam a uma maior taxa de infecção celular e expressiva piora no quadro clínico do hospedeiro, em um quadro chamado de reforço mediado por anticorpos (ADE) (Littau et al., 1990; Screaton et al., 2015).

Devido ao grau de conservação observado entre ZIKV e DENV, a resposta ADE já foi observada em casos de infecção por ZIKV com histórico de infecção prévia por DENV, devido a ação subneutralizante dos anticorpos produzidos na infecção anterior (Stettler et al., 2016; Bardina et al., 2017). Desse modo, embora o desenvolvimento de uma vacina para o ZIKV possa aparentar ser relativamente simples devido a diminuta variação genética observada entre as cepas circulantes (Dowd et al., 2016a), o que possibilita o desenvolvimento de uma vacina única, a possibilidade de reação cruzada em relação aos demais flavivírus podem ser um problema para o desenvolvimento de uma vacina (Stettler et al., 2016), principalmente em locais onde diferentes flavivírus co-circulam.

Neste sentido, o desenvolvimento de vacinas voltadas especificamente para regiões conhecidamente imunogênicas de modo a otimizar o desenvolvimento de resposta imune é fundamental. Como alternativa, o desenvolvimento e uso de vacinas de DNA que se destacam por serem estáveis a temperatura ambiente, relativamente fáceis de serem desenvolvidas e obtidas, e principalmente permitem a seleção direta de sequências antígenos-específico (Xenopoulos e Pattnaik, 2014). Esta última característica é especialmente interessante para o desenvolvimento de vacinas para o

ZIKV e outros flavivirus por possibilitar a escolha de regiões menos envolvidas na resposta ADE.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver candidatos a vacinas profiláticas com base nos genes prM e Envelope do ZIKV, e avaliar a viabilidade destas por meio de testes *in vitro*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

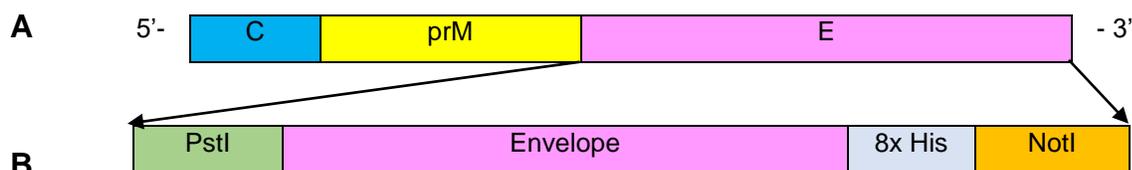
1. Obter as sequências referentes aos genes prM e Envelope do Zika vírus;
2. Construir as estratégias vacinais e cloná-las no vetor para expressão em mamíferos *pVAX1*;
3. Avaliar a expressão das construções vacinais em cultura de células;
4. Avaliar a utilização destas construções gênicas como vacinas de DNA.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. DESENHO DOS GENES SINTÉTICOS

A construção dos genes sintéticos de dois genes estruturais do Zika vírus, prM e Envelope, foi baseada na sequência da cepa ZIKV/H.sapiens/Brazil/PE243/2015 (acesso no Genbank # KX197192). Estes dois genes foram sintetizados e clonados no vetor pBSK- pela empresa GenOne (Brasil) (Figura 7 - A). À sequência original foram adicionados sítios para enzimas de restrição para excisão do gene do Envelope e para subclonagens subsequentes. Além disso, foi adicionada uma cauda polihistidina (8xhis-tag) na porção C-terminal do Envelope (Figura 7 – B).

Figura 7 - Desenho dos genes sintéticos de prM e E de Zika vírus. (A) Representação esquemática da sequência prM-E utilizada na síntese do gene sintético. (B) Design da região referente ao envelope na como encontra-se no gene sintético. As setas pretas indicam os sítios de restrição presentes no gene sintético.



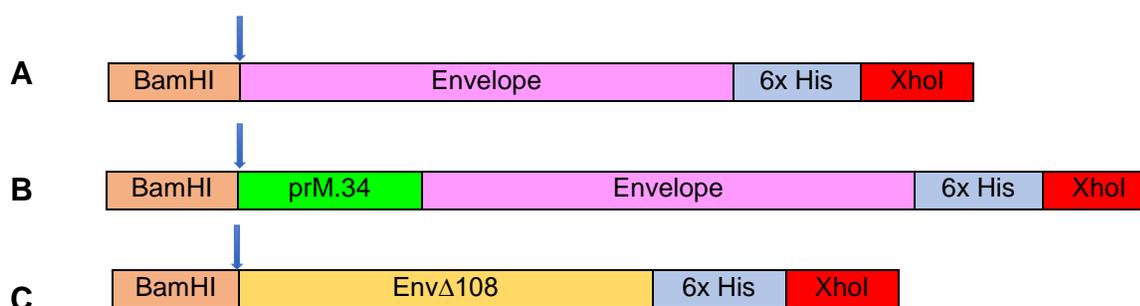
Fonte: Lígia Leal (2017).

4.2. DESENHO DE PRIMERS PARA A E, PRM34.E E ENV Δ 108 DO ZIKV

Primers específicos para sequência completa do Envelope foram desenhados. Com base no estudo sobre DENV 2 desenvolvido por Mani et al., (2013) e com intuito de utilizar as sequências de interesse do prM-E a partir dos genes sintéticos, desenhamos primers específicos para a amplificação da sequência completa do Envelope e a região referente aos últimos 34 aminoácidos do C-terminal de prM, que codifica um peptídeo sinal para assegurar o processamento pós-traducional da proteína E (denominada prM34.E). Também foram desenhados primers cujo produto de amplificação é uma forma truncada do Envelope, com uma deleção de 108 aminoácidos de sua porção C-terminal (denominada Env Δ 108), para aumento de sua imunogenicidade com base no estudo realizado por Hsieh et al., (2014). Para todas as

construções foram adicionados os sítios para enzimas de restrição *Bam*HI e sequência Kozak para início apropriado de tradução nos primers *forward*, e um sítio para enzima de restrição *Xho*I, bem como uma cauda polihistidina (6xhis-tag) nos primers *reverse*. O desenho esquemático abaixo demonstra os fragmentos gerados após o pareamento dos primers específicos descritos na Tabela 1 a cada construção (Figura 8).

Figura 8 - Desenho das construções obtidas por amplificação de regiões dos genes prM e E de Zika vírus. (A) Desenho da construção do Envelope. (B) Design da construção do Envelope precedido dos últimos 34 aminoácidos de prM. (C) Design da construção do Envelope com a deleção de seus últimos 108 aminoácidos. As setas em azul representam o local onde a sequência Kozak se encontra.



Fonte: Lígia Leal (2017).

Tabela 1 - Tabela de informações sobre os primers utilizados para construção de prM34.E e EnvΔ108 e os tamanhos dos *amplicons* gerados. Em vermelho: sítio de restrição para a enzima *Bam*HI. Em azul: sítio de restrição para a enzima *Xho*I. Em laranja: cauda polihistidina. Em verde: sequência Kozak. Sequências sublinhadas: regiões de anelamento nos genes de interesse.

Genes/ Regiões		Primers	Amplicons
E	Forward	GGATCCACGATGGCAATCAGGTGCATAGGAGTCAG	1557 bp
	Reverse	GCGGCCGCCTCGAGTTAATGGTGATGGTGATGATGAGCA GAGACGGCTGTGGATAAG	
	Forward	GGATCCACGATGGCATTTCGCGTTAGCAGCAGCTGC	

prM34.E	<i>Reverse</i>	GCGGCCGCCTCGAGTTAATGGTGATGGTGATGATGAGCA <u>GAGACGGCTGTGGATAAG</u>	1676 bp
EnvΔ108	<i>Forward</i>	<u>GGATCCACGATGGCAATCAGGTGCATAGGAGTCAG</u>	1232 bp
	<i>Reverse</i>	GCGGCCGCCTCGAGTTAATGGTGATGGTGATGATGCTTC <u>TTCTCCCCGACTCCTATG</u>	

Fonte: Lígia Leal (2017).

4.3. AMPLIFICAÇÃO POR PCR DE PRM34.E E ENV Δ 108

Os fragmentos referentes a prM34.E e Env Δ 108 foram amplificados a partir do genes sintéticos por PCR de alta fidelidade (Invitrogen, Platinum®), utilizando *primers* específicos para cada *amplicon*. O programa da reação foi o seguinte: Desnaturação inicial a 94°C por 1 minuto, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 10 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e alongamento a 68°C por 2 minutos, com extensão final a 68°C por 10 minutos. O produto de PCR obtido foi purificado usando o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) de acordo com o protocolo do fabricante e armazenado a – 20°C.

4.4. SEQUENCIAMENTO DE PRM34.E E ENV Δ 108

Os *amplicons* positivos para as sequências prM34.E e Env Δ 108 de obtidos nas reações de PCR, bem como os clones das construções clonadas em pGEM-T Easy (Promega) foram purificados utilizando o kit *Invisorb Fragment Cleanup* (Invitex) e então foram sequenciados pelo método Sanger, utilizando o kit *BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction 3.1* (Thermo Fisher) e o sequenciador ABI PRISM 3100 (Applied Biosystem, Thermo Fisher), pelo serviço de sequenciamento da Plataforma Multiusuário do Laboratório Central-UFPE, obedecendo aos padrões estabelecidos nesta unidade.

4.5 CLONAGENS NOS VETORES PGEM T-EASY E PVAX1

As construções purificadas referentes a prM34.E e Env Δ 108 foram clonadas no vetor pGEM-T Easy (Promega). Em seguida, as colônias obtidas pós-transformação foram digeridas com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Xho*I, para liberação dos insertos. Após análises de sequenciamento, os clones selecionados foram digeridos com as enzimas de restrição previamente descritas, e o mesmo foi feito com o vetor de expressão em células de mamíferos pVAX1 (Invitrogen). Após a digestão, foi realizada a purificação do vetor e insertos a partir do gel de agarose a 0,8% com o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System*. Em seguida, foi realizada a reação de ligação entre o vetor e cada um dos insertos utilizando a enzima T4 *ligase* (Promega), segundo orientações do fabricante, em uma proporção 3:1 (inserto:vetor).

A reação de ligação foi utilizada para transformar bactérias *Escherichia coli* da linhagem DH5 α . O protocolo de transformação utilizado consistiu das seguintes etapas: os produtos da reação de ligação (5 μ L) foram adicionados a 50 μ L de células quimiocompetentes (previamente tratadas com CaCl₂), homogeneizados e mantidos no gelo por 20 minutos. Após esta incubação, as células foram submetidas a um choque térmico a 42°C por 5 minutos. Em seguida, foi realizada uma nova incubação gelo por 5 minutos. Oitocentos microlitros de meio LB sem antibiótico foi acrescido as células e estas foram incubadas a 37°C por uma hora. As células foram então centrifugadas a 1200 rpm e alíquotas de 200 μ L foram semeadas em placas de LB com canamicina (50 μ g/mL).

As colônias resistentes a canamicina foram selecionadas e repicadas para triagem das colônias recombinantes, com subsequente inóculo e extração do DNA plasmidial (segundo protocolo descrito por SAMBROOK et al., 1989). A confirmação da clonagem se deu por análise dos fragmentos obtidos após o tratamento das moléculas de DNA resultantes com enzimas de restrição e análise dos insertos gerados. Preservados dos clones confirmados foram armazenados a -80°C em glicerol a 50%.

4.6 SUBCLONAGEM DO GENE E

A sequência referente ao Envelope do ZIKV foi isolada por digestão com as enzimas de restrição *PstI* e *NotI* do vetor pBSK-, purificado e então subclonado no vetor para expressão em mamíferos, pVAX1 previamente digerido com as enzimas *PstI* e *NotI* como descrito no tópico 4.5.

4.7. TRANSFECCÕES DAS CONSTRUÇÕES PVAX1-PRM34.E, PVAX1-E E PVAX-ENV Δ 108 EM CÉLULAS EUCARIÓTICAS *IN VITRO*

Os vetores vacinais pVAX1 contendo os genes prM34.E, E e Env Δ 108 foram propagados em culturas de 10mL de *E.coli* (DH5 α) em meio LB com o antibiótico Canamicina (50 μ g/mL) para seleção adequada. O DNA plasmidial foi extraído com o kit *PureYield™ Plasmid Miniprep System* (Promega). Os plasmídeos de interesse obtidos foram utilizados para a transfecção transiente em células Vero (Células de rim de Macaco Verde Africano), cultivadas em meio DMEM completo (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*-Invitrogen) acrescido de soro bovino fetal 10% (Gibco) e L-glutamina 1% (Sigma-Aldrich). As células foram transfectadas após atingirem uma confluência de aproximadamente 80%, em garrafas T25, preparadas 24 horas antes, para uma concentração de $1,2 \times 10^6$ células/mL. O reagente de transfecção utilizado foi o *Polyfect Transfection Reagent* (Qiagen). Todas as transfecções foram realizadas segundo o seguinte protocolo: 4 μ g das construções foram misturadas a 100 μ l de meio DMEM sem soro. Em seguida 20 μ l do reagente foram adicionados a solução de DNA e incubados a temperatura ambiente por 20 minutos. Após o período de incubação, 890 μ l de meio DMEN completo foram adicionados aos complexos de transfecção e imediatamente transferidos para garrafas T25. Após um período de incubação de 4 horas em estufa 5% de CO₂ a 37°C, foram acrescidos 3ml de meio DMEM completo a cada garrafa para a manutenção das culturas durante o período de incubação. Foram realizados cultivos das células transfectadas com duração de 24, 48 e 72 horas. As células também foram transfectadas com o vetor pVAX1 vazio, utilizado como controle negativo.

4.8. COLETA DAS CÉLULAS VERO TRANSFECTADAS POR PVAX1 VAZIO, PVAX1-PRM34.E, PVAX1-E E PVAX-ENV Δ 108

Após os períodos de incubações, as células transfectadas foram colhidas para obtenção do RNA total e extrato protéico para detecção do mRNA e proteína específicas aos antígenos de interesse, respectivamente. Para isso, após os períodos de cultivo o meio DMEM foi retirado de cada garrafa T25 e as células aderidas foram lavadas com 3ml de PBS estéril. Em seguida, o PBS foi descartado e 1ml de tripsina foi adicionada a cada garrafa T25 e estas foram incubadas por 5 minutos a 37°C. Para inativação da tripsina foi acrescentado 1ml de meio DMEM completo e os volume totais foram transferidos para tubos de 2ml e centrifugados a 1500 RCF, por 10 minutos. O sobrenadante resultante da centrifugação foi descartado e o pellet celular resuspendido em 200 μ l de PBS estéril.

4.9. ANÁLISE DA TRANSCRIÇÃO DE PVAX1-PRM34.E, PVAX1-E E PVAX-ENV Δ 108 ATRAVÉS DE RT-PCR E AMPLIFICAÇÃO DO CDNA

Com o objetivo de obter o RNA total e conseqüentemente detectar a presença de mRNA dos genes de interesse, 100 μ l das células transfectadas foram resuspendidas em PBS foram utilizados para a extração do RNA realizada com o kit *ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System* (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA extraído foi armazenado a -80°C para uso posterior. Para a síntese do cDNA, foram utilizados 1 μ g do RNA total extraído na RT-PCR realizada com o kit *ImProm-II™ Reverse Transcription System* (Promega) utilizando os *primers* Oligo(dT)15 disponíveis no kit. Em todas as reações, foram feitos controles negativos para a reação utilizando água e para a transfecção utilizando o RNA das células transfectadas com pVAX1 vazio. O programa em termociclador para as reações consistiu em 3 etapas: 25°C por 5 minutos, 42°C por 1 hora e 70°C por 15 minutos.

A amplificação do cDNA dos genes de interesse foi feita através de PCR, utilizando 100 ng de cDNA, 1 μ l de cada um dos *primers* (10pmol/ μ l) específicos a cada

sequência de interesse (previamente descritos na tabela 1), e 12,5µl do *GoTaq® Green Master Mix* (Promega), para um volume final de 25µl de reação. Os *primers* utilizados foram os mesmos utilizados para obtenção das construções e detecção dos clones, e encontram-se descritos na Tabela 1, juntamente com os tamanhos dos *amplicons* gerados. O programa usado no termociclador foi: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 3 minutos. Por fim, a extensão final a 72°C por 10 minutos. A análise dos *amplicons* obtidos após a PCR foi realizada em gel de agarose a 1% com brometo de etídio. Reações de *Nested PCR* foram realizadas após a obtenção dos cDNAs, para esta nova reação 5µl dos cDNAs obtidos foram amplificados seguindo os mesmos parâmetros utilizados para a obtenção dos cDNAs. A análise dos *amplicons* obtidos foi realizada em gel de agarose a 1% com brometo de etídio.

4.10. LISE MECÂNICA PARA OBTENÇÃO DE PROTEÍNAS

Os 100µl restantes da resuspensão do pellet das células transfectadas foram lisados mecanicamente por meio de passagem em agulhas de 0,7mm. Aos lisados obtidos foi adicionado o inibidor de proteases PMSF a 1mM. Os lisados então foram armazenados a -80°C para uso futuro.

4.11. ANÁLISE DAS PROTEÍNAS POR GEL DE POLIACRILAMIDA

A verificação da produção protéica das proteínas de interesse foi feita inicialmente por meio de análise de SDS-PAGE. Os lisados das células transfectadas foram misturadas ao tampão de amostras L2X e aquecidas a 74°C por 10 minutos e aplicadas em géis de poliacrilamida 10-12,5% para corrida de eletroforese a 25mA por 1 hora e 30 minutos. A visualização das bandas nos géis por coloração com corante *Commassie brilliant blue* por 60 minutos, e em seguida em solução descorante (etanol 10% e ácido acético glacial 7 %).

4.12. WESTERN BLOT DAS PROTEÍNAS PRM34.E, E E ENV Δ 108

Para detecção das proteínas dos genes de interesse produzidas nas células transfectadas, as amostras previamente fracionadas em géis de SDS-PAGE a 10-12,5% foram transferidas por 35-45 minutos a 25V para membranas *Immobilon-P* (Millipore, Merck) em sistema semi-seco de transferência (Bio-Rad), segundo recomendações do fabricante. Após as transferências, as membranas foram bloqueadas por 1 hora TBS 1X-Tween (0,05%) com leite 5%. Em seguida, com o intuito de obter boas amostras visuais da produção protéica foram utilizadas três formas para imunodeteção que são descritas a seguir.

Na primeira, utilizou-se o anticorpo monoclonal 6xHis-tag conjugado a fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich), diluído 1:1500 e 1:3000 em solução TBS 1X-Tween (0,05%) com leite 1% para incubação overnight a 4°C. Após a incubação foram realizadas 3 lavagens por 10 minutos com TBS 1X-Tween (0,05%) sob agitação. Por fim, a membrana foi revelada com *BCIP®/NBT Liquid Substrate System* em incubação no escuro por 15 minutos e lavada com água destilada para a retirada do substrato.

Na segunda, após o bloqueio as membranas foram incubadas com anticorpo primário His-probe AD1.1.10 (Santa Cruz Biotechnology), diluído em 1:1000 por 1 hora sob agitação, lavadas 2 vezes com TBS 1X-Tween (0,05%) por 5 minutos e então incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (Sigma-Aldrich) diluído 1:5000, também por 1h, sob agitação. Após 3 lavagens com TBS 1X-Tween (0,05%) por 5 minutos a membrana foi submetida à revelação por quimioluminescência com o uso do *kit WesternSure® ECL Substrate* (LI-COR, Inc).

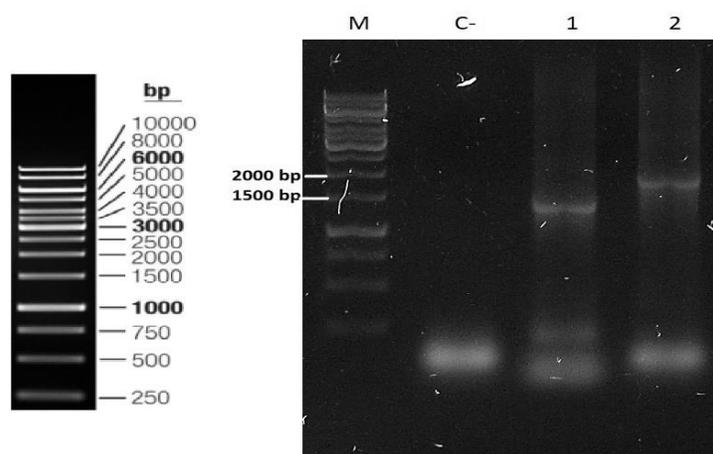
Na terceira, as etapas seguidas até a revelação da membrana foram as mesmas descritas no parágrafo anterior com modificações apenas nas diluições utilizadas para o anticorpo primário (1:500) e secundário (1:10000). Para a revelação da membrana foi utilizado o *3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) Liquid Substrate System* (Sigma-Aldrich) em incubação no escuro por 15 minutos e lavada com água destilada para a retirada do substrato.

5. RESULTADOS

5.1. OBTENÇÃO E CLONAGEM DAS CONSTRUÇÕES PRM34.E E ENV Δ 108 EM PGEM-T EASY E PVAX1

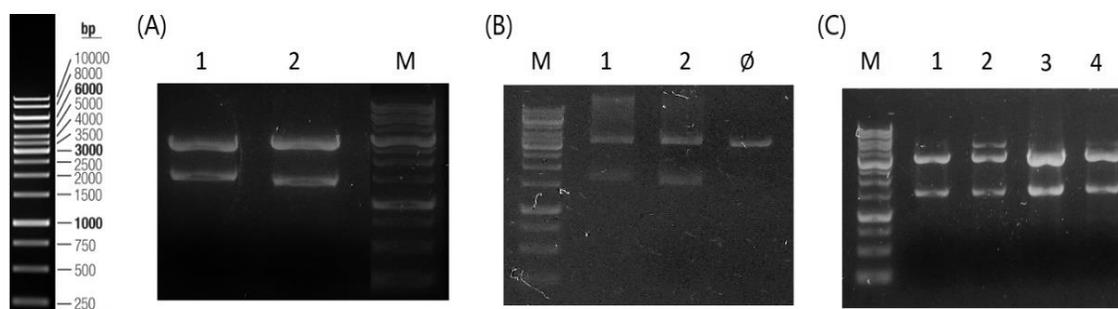
Após recebimento dos genes sintéticos contendo as sequências completas dos genes prM e Envelope reações de PCR de alta fidelidade foram realizadas utilizando os genes sintéticos como molde para obtenção dos fragmentos referentes a prM34.E e Env Δ 108 (Figura 9).

Figura 9 - Fragmentos dos genes prM34.E e Env Δ 108 por PCR. C- Controle negativo de reação. 1 - Env Δ 108 (1232 bp). 2 - prM34.E (1676 bp). M- Marcador Ladder Gene Ruler 1Kb (Thermo Scientific); Eletroforese em gel de agarose a 0.8% corado com brometo de etídeo.



As construções prM34.E e Env Δ 108 previamente obtidas por PCR foram purificadas, ligadas ao vetor pGEM-T easy e replicadas em *E. coli*. Após análise e confirmação dos clones obtidos por digestão com as enzimas *Bam*HI e *Xho*I as regiões referentes aos insertos foram purificadas. Ao mesmo tempo, a sequência do Envelope foi retirada do vetor por digestão enzimática por *Pst*I e *Not*I e purificada. O vetor pVAX1 foi então digerido com os pares de enzimas *Bam*HI/*Xho*I (Para inserção de prM34.E e Env Δ 108) e *Pst*I/*Not*I (Para a inserção de Envelope). Após transformação e seleção de possíveis clones de *E. coli* por resistência a canamicina, os clones foram confirmados por digestão enzimática com as respectivas enzimas (Figura 10).

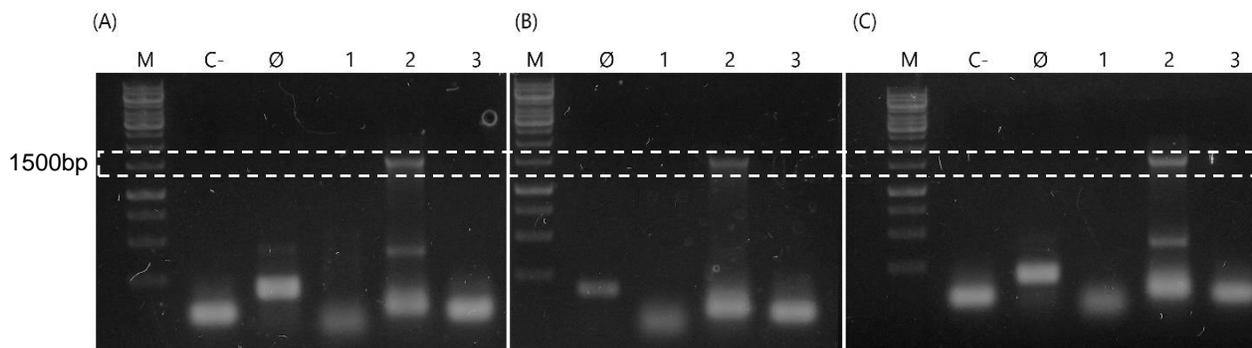
Figura 10 - Digestões dos fragmentos de interesse em pGEM-T easy e pVAX1 - (A) Clones em pGEM-T easy e (B) Clonagens em pVAX1. 1- prM34.E (1676 bp). 2- Env Δ 108 (1232 bp). \emptyset - pVAX1 sem insertos (3 Kb); (C) Clonagens em pVAX1. 1 – 4- Envelope (1557 bp); Em todos os géis, M- Marcador *Ladder Gene Ruler* 1Kb (Thermo Scientific). Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.



5.2. ANÁLISE DA TRANSCRIÇÃO DE PRM34.E, E E ENV Δ 108

Para a análise da transcrição, a partir dos RNAs totais extraídos das células transfectadas e a detecção do mRNA das sequências de prM34.E, E e Env Δ 108 foram feitas por RT-PCR utilizando *primers* Oligo(dT)₁₅. Em seguida, uma segunda reação de PCR foi realizada para a amplificação dos cDNAs de interesses com os *primers* descritos na Tabela 1. Como pode ser visto na figura abaixo, em todos os períodos de transfecção (24, 48 e 72 horas) apenas foi possível a detecção da expressão da construção referente ao Envelope (Figura 11). Em uma tentativa de detecção dos cDNAs referentes a prM34.E e Env Δ 108 uma PCR *Nested* foi realizada. No entanto não houve alterações aos resultados já observados.

Figura 11 - Detecção de cDNA em células Vero transfectadas em períodos de 24, 48 e 72 horas. (A) cDNAs da transfecção de 24 horas; (B) cDNAs da transfecção de 48 horas; (C) cDNAs da transfecção de 72 horas; C- Controle negativo de reação. Ø-vetor pVAX1 sem insertos utilizado como controle negativo de transfecção. 1- prM34.E. 2- Envelope (1557 bp) . 3- Env Δ 108; Em todos os géis, M- Marcador *Ladder Gene Ruler* 1Kb (Thermo Scientific). Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.



5.3. VISUALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS POR GEL DE POLIACRILAMIDA

Após a lise mecânica, os lisados obtidos das células obtidas da transfecção de 48 horas foram separados por centrifugação em porções de sobrenadante e pellet. As amostras do sobrenadante foram então fracionadas em gel de SDS a 12,5%. No entanto, no perfil apresentado, as bandas esperadas para prM34.E (~60KDa), E (~55KDa) e Env Δ 108 (~45KDa) não podem ser evidenciadas com precisão (Figura 12). Também foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% com os extratos protéicos dos lisados obtidos das células transfectadas em 24 e 72 horas. Diferenças na intensidade das bandas obtidas em 24 e 72 horas foram observados. No entanto, não foram observadas diferenças nos padrões das bandas entres os períodos de tempo como demonstrado na Figura 13.

Figura 12 - SDS-PAGE 12,5% corado com *Comassie Blue* de sobrenadantes de lisados das células transfectadas por 48 horas. \emptyset - Vetor pVAX1 sem insertos utilizado como controle negativo de transfecção 1- prM34.E. 2- Env Δ 108. 3- Envelope; M- Marcador de peso molecular *PageRuler*TM (Thermo Scientific).

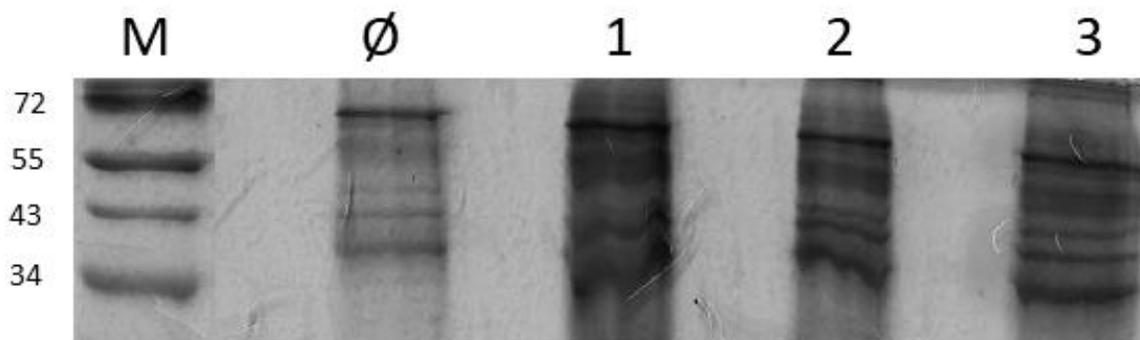
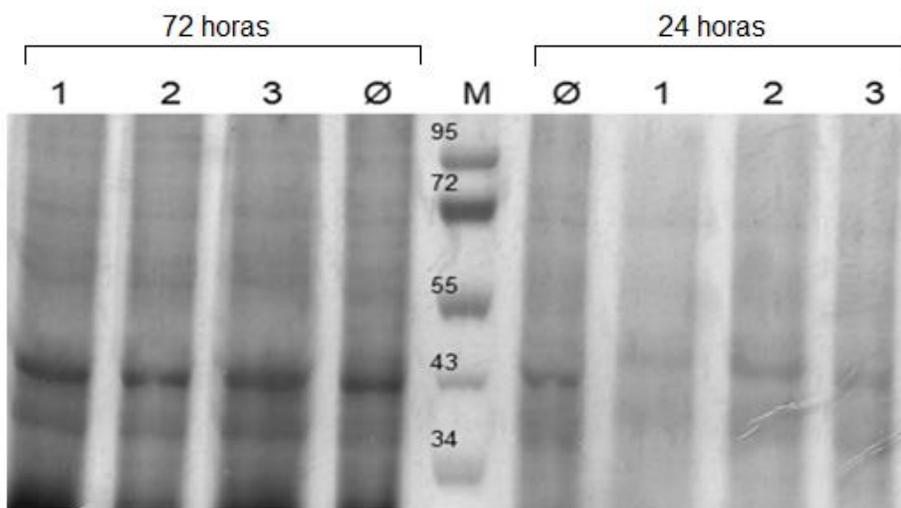


Figura 13 - SDS-PAGE 10% corado com *Comassie Blue* do extrato protéico dos lisados das células transfectadas. \emptyset - Vetor pVAX1 sem inserto utilizado como controle negativo de transfecção. 1- prM34.E (60 kDa). 2- Env Δ 108 (45 kDa). 3- Envelope (55 kDa); M- Marcador de peso molecular *PageRuler*TM (Thermo Scientific).



5.4. WESTERN BLOT DAS PROTEÍNAS PRM34.E, E E ENV Δ 108

Para detecção das proteínas recombinantes foram realizados ensaios de imunodeteção, utilizando duas estratégias. A primeira consistiu na utilização do anticorpo monoclonal 6xHis-tag conjugado a fosfatase alcalina. Para isso as amostras

referentes aos extratos solúveis e insolúveis obtidos dos lisados das células transfectadas por 48 horas que foram previamente fracionadas em gel de poliacrilamida a 10% foram transferidas para membrana PVDF (0.45 μm), incubadas com o anticorpo e reveladas por reação colorimétrica. No entanto, não foi possível a detecção clara das bandas referentes a prM34.E (~60 kDa), E (~55 kDa) e Env Δ 108 (~45 kDa) em nenhuma das revelações realizadas.

Na segunda estratégia, foram utilizados os anticorpos anti - 6xhis tag não conjugado e o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (Sigma-Aldrich). As revelações das membranas obtidas após as incubações foram reveladas por reação colorimétrica e por quimioluminescência. Com esta segunda estratégia também não foram detectadas as proteínas de interesse.

6. DISCUSSÃO

Dada a importância das complicações associadas a infecção por ZIKV, como as malformações fetais e a síndrome de Guillain-Barré em adultos, o desenvolvimento de vacinas profiláticas a fim de impedir esta infecção e a disseminação da mesma é fundamental (Barouch et al., 2017). No entanto, até o presente momento não existem vacinas disponíveis contra infecção para uso em humanos (Durbin, 2016). Diversos estudos já foram publicados, sendo muitos destes baseados em estratégias previamente testadas contra a infecção por outros flavivírus, que lançam bons prospectos para o desenvolvimento de vacinas em diversas plataformas (Dowd et al., 2016b; Larocca et al., 2016; Barzon e Palú, 2017).

Dentre estas, a escolha do desenvolvimento de vacinas de DNA oferece vantagens quanto a especificidade na escolha do imunógeno e de respostas imunes desejadas, assim como a relativa facilidade de obtenção e armazenamento após desenvolvimento tornam as vacinas de DNA bastante atrativas (Porter e Raviprakash, 2017).

Neste sentido, diversos estudos que empregam vacinas de DNA focadas nos genes prM/M-E foram desenvolvidos com bons resultados (Abbink et al., 2016; Dowd et al., 2016b; Larocca et al., 2016). Em um estudo feito por Larocca et al., (2016), camundongos vacinados com uma construção de M-E apresentaram proteção completa a infecção por ZIKV após uma única dose vacinal. Ainda no mesmo estudo, construções com apenas E, e versões com deleções na sequência de E conferiram proteção parcial e de diferentes intensidades (Larocca et al., 2016). Em estudo subsequente realizado pelo mesmo grupo, utilizando macacos rhesus, a mesma construção M-E conferiu proteção completa contra a infecção por ZIKV após duas imunizações (Abbink et al., 2016).

A escolha recorrente dos genes e proteínas prM/M-E para o desenvolvimento vacinal está relacionado diretamente com os papéis desenvolvidos por Envelope no processo de fusão e entrada celular (Modis et al., 2003), bem como regiões vírus-específicas observadas no ED-III que são capazes de gerar forte resposta neutralizante

(Stettler et al., 2016). A associação do prM/M ao Envelope ocorre para a melhor expressão e produção de subpartículas virais em diversos sistemas, uma vez que prM parece estar envolvida no *folding* e processamento adequado da proteína E durante a passagem do vírus imaturo pelo no retículo endoplasmático (Mukhopadhyay et al., 2005; Barouch et al., 2017). No entanto, em ambos os genes, regiões extremamente conservadas entre os flavivírus são conhecidas, o que possibilita o desenvolvimento da resposta ADE (Heinz e Stiasny, 2017). Devido a isto, é interessante o uso de estratégias que minimizem a resposta anti-prM e anti-E durante o desenvolvimento de candidatos vacinais (Dejnirattisai et al., 2010).

Assim, neste estudo foram desenvolvidos candidatos a vacina de DNA contra o ZIKV. Para isso, foi realizado o desenho de genes sintéticos referente as sequências completas do prM e Envelope de ZIKV (prM-E ZIKV). A partir destes genes sintéticos, três construções foram idealizadas e obtidas a fim de obter indícios quanto ao uso de sequências parciais e completas de prM e E, como forma de minimizar a resposta ADE gerada com a imunização com estes candidatos vacinais.

O Envelope viral, devido a especificidade viral conferida por seu ED-III é amplamente utilizado no desenvolvimento de vacinas contra diversos flavivirus, tais como os vírus da Dengue, da Febre Amarela, do Oeste do Nilo e mais recentemente para o ZIKV (Larocca et al., 2016; Collins e Metz, 2017; Urakami et al., 2017). Dessa forma, a fim de estabelecer um padrão para futuras análises de ensaios imunológicos a primeira das construções desenvolvidas neste trabalho apresenta apenas a sequência completa de E. Este fragmento foi excisado do gene sintético e diretamente subclonado no vetor para expressão em mamíferos pVAX1.

Na segunda construção desenvolvida, a sequência de prM encontra-se incompleta, apresentando apenas os últimos 34 aminoácidos da região C-terminal de prM e o Envelope (prM34.E). Esta escolha teve como base artigos de desenvolvimento de vacinas contra DENV publicados por Tang et al., (2012); Mani et al., (2013) e foi utilizada como uma das alternativas para a possível diminuição da resposta ADE. A pequena sequência de prM presente nesta construção é referente ao peptídeo sinal de

prM e foi mantida como tentativa de assegurar o processamento pós-traducional de Envelope (Tang et al., 2012). Em ambos os artigos, altos títulos de anticorpos neutralizantes em experimentos com camundongos foram observados (Tang et al., 2012; Mani et al., 2013).

Ainda com o objetivo de obter uma construção capaz de elicitar a produção de anticorpos, mas que evite a indução das respostas cruzadas indesejadas associadas a prM, uma terceira construção foi desenvolvida. Nesta, não houve a adição da sequência de prM, e apenas os 396 aminoácidos do C-terminal são codificados, sendo essa região correspondente ao ectodomínio de E do ZIKV (Env Δ 108) com base no artigo realizado por Hsieh et al., (2014). Em análises de radioimunoprecipitação com diferentes percentuais da sequência de Envelope de DENV4, Men et al., (1991) concluiu que a região correspondente ao ectodomínio de DENV4, de 392 aminoácidos localizados no C-terminal (dita 79%E), apresentou a melhor capacidade de elicitar resposta imunogênica dentre os percentuais da sequência de E analisados.

Uma vez que as três construções foram obtidas, foram realizadas transfecções das mesmas em células Vero. Inicialmente foi realizada transfecção de 48 horas de duração, em placas de seis poços. Ao final do período de transfecção, as células transfectadas foram coletadas e lisadas, para a realização da extração do RNA total e análises da expressão das sequências de interesse e produção de proteínas. No entanto, na primeira transfecção realizada não foram obtidos resultados em nenhuma das análises realizadas.

Desse modo, uma nova transfecção de 48 horas foi realizada, utilizando garrafas T25, com intuito de obter mais células transfectadas e, portanto, melhorar o nível de expressão do mRNA e das proteínas oriundos das construções. Nesta nova transfecção, os resultados obtidos das análises da transcrição bem como da produção protéica indicaram apenas a transcrição e produção da proteína do Envelope.

As amostras contendo o RNA total extraídos das células transfectadas com as construções prM34.E e Env Δ 108 foram submetidas a análises de transcrição a partir da RT-PCR, amplificação dos cDNAs e subseqüentes reações de *Nested* PCR, uma vez

que não foi possível a detecção dos mRNAs e cDNAs correspondentes por meio destas mesmo quando modificações as reações de PCR, tais como aumento das concentrações de RNA inicial, e de diferentes concentrações de MgCl₂ com intuito de melhorar as detecções foram feitas (Roux, 2009). No entanto, não foram detectados sinais de transcrição ou produção de proteínas destas construções.

Frente a repetida falha na detecção de sinais de expressão das construções prM34.E e Env Δ 108, uma nova transfecção de 24 horas de duração foi realizada na tentativa de detectar essas expressões. Concomitantemente, também foi feita uma transfecção de 72 horas afim de obter uma maior quantidade de proteína E a ser imunodetectada (Stepanenko e Heng, 2017).

No entanto, após essas transfecções não houveram modificações aos resultados obtidos anteriormente, mesmo quando modificações foram empregadas aos modos de análise de transcrição bem como ao processo de detecção de proteínas previamente empregados e descritos (Roux, 2009; Stepanenko e Heng, 2017).

É possível que a utilização de células Vero para a transfecção estejam afetando a expressão ambos prM34.E e Env Δ 108 de modo tal que não pudemos observar a transcrição das mesmas (Stepanenko e Heng, 2017). Neste sentido, são necessárias investigações quanto a eficiência das transfecções realizadas com células Vero, quando comparadas a eficiência obtida em células de origem humana tal como a HEK 293T (Células de rins humano embrionárias), uma vez que foram obtidas detecções satisfatórias das construções desenvolvidas por Larocca et al., (2016) a partir de transfecções em células HEK 293T. Além disso, transfecções utilizando maiores volumes de cultura de células de mamíferos podem ser realizadas para melhor recuperação de extrato protéico.

Neste trabalho optou-se por utilizar a lise mecânica para preparação das células transfectadas com o intuito de minimizar a possibilidade de interações entres os reagentes de lise química com os de extrações de RNA e de *western blot*. Entretanto, embora seja esperado a proteína do Envelope seja detectada na porção citoplasmática das células, as construções análogas as prM34.E e Env Δ 108 nos artigos base de

DENV foram isoladas em frações referentes a membranas (Men et al., 1991; Mani et al., 2013). Sendo assim, é interessante atentar para a possibilidade que para futuras detecções destas mesmas construções o emprego de soluções de lise contendo detergentes, tal como NP-40 que é capaz de extrair e solubilizar proteínas, e possibilita a realização de imunoprecipitação, o que pode otimizar a recuperação e detecção de proteínas de interesse (Ji, 2010).

Contrariamente aos artigos utilizados como base para o desenho das construções prM34.E e Env Δ 108, não fomos capazes de detectar os antígenos de interesse, sendo necessárias otimizações aos protocolos empregados para análise e obtenção das mesmas. Da mesma forma, embora apenas a expressão e detecção da construção referente ao Envelope tenha sido observada, otimizações aos protocolos utilizados são necessárias para a melhor detecção e análise desta construção. Ainda, ensaios imunológicos em animais são necessários para obtemos indícios quanto a sua utilização como vacina de DNA em humanos.

Neste sentido, análises quanto a expressão e produção de todas as sequências e suas respectivas proteínas de interesse presentes neste estudo estão sendo realizadas em paralelo na levedura metilotrófica *Pichia pastoris* (Silva, tese em preparação). Desse modo, novos dados e comparações entres os resultados obtidos em ambos os estudos trarão novas perspectivas quanto ao uso dessas construções como agentes imunogênicos e das plataformas de expressão e produção.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos até o presente momento demonstraram a expressão e produção da construção referente a sequência completa do Envelope do Zika vírus em células de mamíferos transfectadas por complexos de lipossomas com DNA plasmidial. As construções referentes a sequências parciais de prM e de Envelope não foram detectadas com sucesso, sendo, portanto, necessárias novas análises para verificar a viabilidade da utilização destas como candidatos a vacinas de DNA.

Para todas estas construções são necessárias otimizações aos protocolos utilizados para a produção e detecção das mesmas. Uma vez realizadas essas otimizações e a viabilidade destas sejam confirmadas, a avaliação da eficiência destas deverá ser realizada em ensaios imunológicos em animais, afim de obter informações cruciais quanto as suas utilizações como vacinas de DNA em humanos.

REFERÊNCIAS

- ABBINK, P., et al. Protective efficacy of multiple vaccine platforms against Zika virus challenge in rhesus monkeys. **Science** 353, 1129–1132. 2016.
- ATKINSON, B., et al. Detection of Zika Virus in Semen. **Emerging Infectious Diseases**, 22(5), 940. 2016.
- BARDINA, S.V., et al. Enhancement of Zika virus pathogenesis by preexisting ant flavivirus immunity. **Science** 356, 175–180. 2017.
- BARJAS-CASTRO, M.L., et al. Probable transfusion-transmitted Zika virus in Brazil. **Transfusion** 56, 1684–1688. 2016.
- BAROUCH, D.H., THOMAS, S.J., MICHAEL, N.L. Prospects for a Zika Virus Vaccine. **Immunity** 46, 176–182. 2017.
- BARZON, P.L., PALÙ, P.G. Current views on Zika virus vaccine development. **Expert Opin. Biol. Ther.** 0, 1–8. 2017.
- BELTRAMELLO, M., et al. The human immune response to Dengue virus is dominated by highly cross-reactive antibodies endowed with neutralizing and enhancing activity. **Cell Host Microbe** 8, 271–283. 2010.
- BHATNAGAR, J., et al. Zika Virus RNA Replication and Persistence in Brain and Placental Tissue. **Emerg. Infect. Dis.** 23, 405–414. 2017.
- BRASIL, P., et al. Guillain-Barré syndrome associated with Zika virus infection. **Lancet Lond. Engl.** 387, 1482. 2016.
- CAO-LORMEAU, V., et al. Zika Virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. **Emerging Infectious Diseases**, 20(6), 1084-1086. 2014.
- CAO-LORMEAU, V.M., et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. **Lancet Lond. Engl.** 387, 1531–1539. 2016.
- CAUCHEMEZ, S., et al. Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013-15: a retrospective study. **Lancet Lond. Engl.** 387, 2125–2132. 2016.
- COLLINS, M.H., Metz, S.W. Progress and Works in Progress: Update on Flavivirus Vaccine Development. **Clin. Ther.** 39, 1519–1536. 2017.
- CUGOLA, F.R., et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature** 534, 267–271. 2016.
- DAI, L., et al. Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. **Cell Host Microbe** 19, 696–704. 2016.

DEJNIRATTISAI, W., et al. Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. **Science** 328, 745–748. 2010.

DENG, Y.-Q., et al. A broadly flavivirus cross-neutralizing monoclonal antibody that recognizes a novel epitope within the fusion loop of E protein. **PloS One** 6, e16059. 2011.

DICK, G.W.A. Zika virus. II. Pathogenicity and physical properties. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 46, 521–534. 1952.

DICK, G.W.A., KITCHEN, S.F., HADDOW, A.J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 46, 509–520. 1952.

D'ORTENZIO, E., et al. Evidence of Sexual Transmission of Zika Virus. **N. Engl. J. Med.** 374, 2195–2198. 2016.

DOWD, K.A., et al. Broadly Neutralizing Activity of Zika Virus-Immune Sera Identifies a Single Viral Serotype. **Cell Rep.** 16, 1485–1491. 2016a.

DOWD, K.A., et al. Rapid development of a DNA vaccine for Zika virus. **Science** 354, 237–240. 2016b.

DUFFY, M.R., et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **N. Engl. J. Med.** 360, 2536–2543. 2009.

DUPONT-ROUZEYROL, M., et al. Infectious Zika viral particles in breastmilk. **Lancet Lond. Engl.** 387, 1051. 2016.

DURBIN, A.P. Vaccine Development for Zika Virus-Timelines and Strategies. **Semin. Reprod. Med.** 34, 299–304. 2016.

FARIA, N.R., et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. **Science** 352, 345–349. 2016.

FAYE, O., et al. Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 8. 2014.

GROMOWSKI, G.D., BARRETT, A.D.T. Characterization of an antigenic site that contains a dominant, type-specific neutralization determinant on the envelope protein domain III (ED3) of dengue 2 virus. **Virology** 366, 349–360. 2007.

HADDOW, A.D., et al. Genetic Characterization of Spondweni and Zika Viruses and Susceptibility of Geographically Distinct Strains of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) to Spondweni Virus. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 10. 2016,

HAMEL, R., et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. **J. Virol.** 89, 8880–8896. 2015.

HAMER, D.H., WILSON, M.E., JEAN, J. CHEN, L.H. Epidemiology, Prevention, and Potential Future Treatments of Sexually Transmitted Zika Virus Infection. **Curr. Infect. Dis. Rep.** 19, 16. 2017.

HEINZ, F.X., STIASNY, K. The Antigenic Structure of Zika Virus and Its Relation to Other Flaviviruses: Implications for Infection and Immunoprophylaxis. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** MMBR 81. 2017.

HENNESSEY M, FISCHER M, STAPLES JE. Zika virus spreads to new areas – region of the Americas, May 2015–January 2016. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep.** 2016; 65: 55–58. 2016.

HSIEH, S.-C., TSAI, W.-Y., NERURKAR, V.R., WANG, W.-K. Characterization of the ectodomain of the envelope protein of dengue virus type 4: expression, membrane association, secretion and particle formation in the absence of precursor membrane protein. **PloS One** 9, e100641. 2014.

JI, H. Lysis of Cultured Cells for Immunoprecipitation. **Cold Spring Harb. Protoc.** 2010, pdb.prot 54 -66. 2010.

KOSTYUCHENKO, V.A., et al. Structure of the thermally stable Zika virus. **Nature** 533, 425–428. 2016,

KUHN, R.J., et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. **Cell** 108, 717–725. 2002.

KUNO, G., CHANG, G.-J.J. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. **Arch. Virol.** 152, 687–696. 2007.

LAI, C.-Y., et al. Antibodies to envelope glycoprotein of dengue virus during the natural course of infection are predominantly cross-reactive and recognize epitopes containing highly conserved residues at the fusion loop of domain II. **J. Virol.** 82, 6631–6643. 2008.

LAROCCA, R.A., et al. Vaccine protection against Zika virus from Brazil. **Nature** 536, 474–478. 2016.

LI, C., et al. Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. **Cell Stem Cell** 19, 120–126. 2016.

LI, L., et al. The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation. **Science** 319, 1830–1834. 2008.

LINDENBACH, B.D., RICE, C.M. Molecular biology of flaviviruses. **Adv. Virus Res.** 59, 23–61. 2003.

LITTAUA, R., KURANE, I., ENNIS, F.A. Human IgG Fc receptor II mediates antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. **J. Immunol.** Baltim. Md 1950 144, 3183–3186. 1990.

MANI, S., et al. Pichia pastoris-expressed dengue 2 envelope forms virus-like particles without pre-membrane protein and induces high titer neutralizing antibodies. **PloS One** 8, e64595. 2013.

MCCARTHY, M. Zika virus was transmitted by sexual contact in Texas, health officials report. **BMJ** 352, i720. 2016.

MCGRATH, E.L., et al. Differential Responses of Human Fetal Brain Neural Stem Cells to Zika Virus Infection. **Stem Cell Rep.** 8, 715–727. 2017.

MEN, R.H., BRAY, M., LAI, C.J. Carboxy-terminally truncated dengue virus envelope glycoproteins expressed on the cell surface and secreted extracellularly exhibit increased immunogenicity in mice. **J. Virol.** 65, 1400–1407. 1991.

MLAKAR, J., et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. **N. Engl. J. Med.** 374, 951–958. 2016.

MODIS, Y., OGATA, S., CLEMENTS, D., HARRISON, S.C. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 100, 6986–6991. 2003.

MORRISON, T.E., DIAMOND, M.S. Animal Models of Zika Virus Infection, Pathogenesis, and Immunity. **J. Virol.** 91. 2017,

MUKHOPADHYAY, S., KUHN, R.J., ROSSMANN, M.G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nat. Rev. Microbiol.** 3, 13–22. 2005.

MUSSO, D., STRAMER, S.L., AABB TRANSFUSION-TRANSMITTED DISEASES COMMITTEE, BUSCH, M.P., AND INTERNATIONAL SOCIETY OF BLOOD TRANSFUSION WORKING PARTY ON TRANSFUSION-TRANSMITTED INFECTIOUS DISEASES. Zika virus: a new challenge for blood transfusion. **Lancet** Lond. Engl. 387, 1993–1994. 2016.

NOWAKOWSKI, T.J., et al. Expression Analysis Highlights AXL as a Candidate Zika Virus Entry Receptor in Neural Stem Cells. **Cell Stem Cell** 18, 591–596. 2016.

OLAGNIER, D., MUSCOLINI, M., COYNE, C.B., DIAMOND, M.S., HISCOTT, J. Mechanisms of Zika Virus Infection and Neuropathogenesis. **DNA Cell Biol.** 35, 367–372. 2016.

PARKER, R., SONG, H. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. **Nat. Struct. Mol. Biol.** 11, 121–127. 2004.

PETERSEN, L.R., JAMIESON, D.J., POWERS, A.M., HONEIN, M.A. Zika Virus. **N. Engl. J. Med.** 374, 1552–1563. 2016.

PIERSON, T.C., GRAHAM, B.S. ZIKA Virus: Immunity and Vaccine Development. **Cell** 167, 625–631. 2016.

PIERSON, T.C., et al. The stoichiometry of antibody-mediated neutralization and enhancement of West Nile virus infection. **Cell Host Microbe** 1, 135–145. 2007.

PIERSON, T.C., FREMONT, D.H., KUHN, R.J., DIAMOND, M.S. Structural insights into the mechanisms of antibody-mediated neutralization of flavivirus infection: implications for vaccine development. **Cell Host Microbe** 4, 229–238. 2008.

PORTER, K.R., RAVIPRAKASH, K. DNA Vaccine Delivery and Improved Immunogenicity. **Curr. Issues Mol. Biol.** 22, 129–138. 2017.

PRASAD, V.M., et al. Structure of the immature Zika virus at 9 Å resolution. **Nat. Struct. Mol. Biol.** 24, 184–186. 2017.

PRIYAMVADA, L., HUDSON, W., AHMED, R., WRAMMERT, J. Humoral cross-reactivity between Zika and dengue viruses: implications for protection and pathology. **Emerg. Microbes Infect.** 6, e33. 2017.

RASMUSSEN, S.A., JAMIESON, D.J., HONEIN, M.A., PETERSEN, L.R. Zika Virus and Birth Defects--Reviewing the Evidence for Causality. **N. Engl. J. Med.** 374, 1981–1987. 2016.

RATHER, I.A., KUMAR, S., BAJPAI, V.K., LIM, J., PARK, Y.-H. Prevention and Control Strategies to Counter ZIKA. **Epidemic. Front. Microbiol.** 8. 2017.

ROUX, K.H. Optimization and troubleshooting in PCR. **Cold Spring Harb. Protoc.** 2009, pdb.ip66. 2009.

SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2. ed. New York: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 800 p. 1989.

SAÚDE, M. da.. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 19**, 2017. Disponível em: <<http://portal.arquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/25/Monitoramento-dos-casos-de-dengue-febre-de-chikungunya-e-febre-pelo-virus-Zika-ate-a-Semana-Epidemiologica.pdf>> Acesso em: 7 jul. 17.

SAÚDE, M. da.. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 49**, 2016. Disponível em:

<<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/dezembro/20/2016-033---Dengue-SE49-publicacao.pdf>> Acesso em: 7 jul. 17.

SCREATON, G., MONGKOLSAPAYA, J., YACOUB, S., ROBERTS, C. New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. **Nat. Rev. Immunol.** 15, 745–759. 2015.

SHARMA, A., LAL, S.K. Zika Virus: Transmission, Detection, Control, and Prevention. **Front. Microbiol.** 8. 2017

SHUAIB, W., et al. Re-Emergence of Zika Virus: A Review on Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, Treatment, and Prevention. **Am. J. Med.** 129, 879.e7-879.e12. 2016.

SIMONI, M.K., et al. Zika virus infection of Hofbauer cells. **Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N** 1989 77. 2017.

SIROHI, D., et al. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. **Science** 352, 467–470. 2016.

SMIT, J.M., et al. Flavivirus Cell Entry and Membrane Fusion. **Viruses** 3, 160–171. 2011.

STAUF, C.B., et al. Comparison of African, Asian, and American Zika Viruses in Swiss Webster mice: Virulence, neutralizing antibodies, and serotypes. **BioRxiv** 075747. 2016.

STETTLER, K., et al. Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. **Science** 353, 823–826. 2016.

SUKUPOLVI-PETTY, S., et al. Type- and subcomplex-specific neutralizing antibodies against domain III of dengue virus type 2 envelope protein recognize adjacent epitopes. **J. Virol.** 81, 12816–12826. 2007.

TABATA, T., et al. Zika Virus Targets Different Primary Human Placental Cells, Suggesting Two Routes for Vertical Transmission. **Cell Host Microbe** 20, 155–166. 2016.

TANG, H., et al. Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. **Cell Stem Cell** 18, 587–590. 2016,

TANG, Y.-X., et al. Induction of virus-neutralizing antibodies and T cell responses by dengue virus type 1 virus-like particles prepared from *Pichia pastoris*. **Chin. Med. J. (Engl.)** 125, 1986–1992. 2012.

THISYAKORN, U., THISYAKORN, C. Latest developments and future directions in dengue vaccines. **Ther. Adv. Vaccines** 2, 3–9. 2014.

Urakami, A., et al. Envelope-modified tetravalent dengue virus-like particle vaccine: implication for flavivirus vaccine design. **J. Virol.** JVI.01181-17. 2017.

VASILAKIS, N., WEAVER, S.C. Flavivirus transmission focusing on Zika. **Curr. Opin. Virol.** 22, 30–35. 2017.

WEAVER, S.C., et al. Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. **Antiviral Res.** 130, 69–80. 2016.

WHO. **Zika situation report,** 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/emergencies/zika-virus/situation-report/10-march-2017/en/>> Acesso em: 7 jul. 17.

WU, K.-Y., et al. Vertical transmission of Zika virus targeting the radial glial cells affects cortex development of offspring mice. **Cell Res.** 26, 645–654. 2016.

XENOPOULOS, A., PATTNAIK, P. Production and purification of plasmid DNA vaccines: is there scope for further innovation? **Expert Rev. Vaccines** 13, 1537–1551. 2014.

YU, I.-M., et al. Association of the pr peptides with dengue virus at acidic pH blocks membrane fusion. **J. Virol.** 83, 12101–12107. 2009.

ZONE, V. **Genome,** 2016. Disponível em: <http://viralzone.expasy.org/24?outline=all_by_species> Acesso em: 7 jul. 17.