

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

ANNA JÉSSICA DUARTE SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIA VACINAL CONTRA O ZIKA VÍRUS
UTILIZANDO A LEVEDURA *Pichia Pastoris* COMO CARREADORA DE
ANTÍGENOS**

Recife

2020

ANNA JÉSSICA DUARTE SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIA VACINAL CONTRA O ZIKA VÍRUS
UTILIZANDO A LEVEDURA *Pichia Pastoris* COMO CARREADORA DE
ANTÍGENOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Genética.

Área de concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas

Coorientadores: Dr. André Luiz Santos de Jesus

Prof. Dra. Cristiane Moutinho Lagos de Melo

Recife

2020

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Silva, Anna Jéssica Duarte
Desenvolvimento de estratégia vacinal contra o Zika Vírus utilizando a levedura
Pichia Pastoris como carreadora de antígenos / Anna Jéssica Duarte Silva. - 2020.

104 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas.
Coorientador: Dr. André Luiz Santos de Jesus.
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Cristiane Moutinho Lagos de Melo.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
Bióciências. Programa de Pós-graduação em Genética, Recife, 2020.
Inclui referências e anexos.

1. Arboviroses. 2. Infecção pelo Zika Vírus. 3. Vacinas. 4. Leveduras. I. Freitas, Antonio Carlos de (orientador). II. Jesus, André Luiz Santos de (coorientador) III. Melo, Cristiane Moutinho Lagos de (coorientadora). IV. Título.

616.9

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-100

ANNA JÉSSICA DUARTE SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIA VACINAL CONTRA O ZIKA VÍRUS
UTILIZANDO A LEVEDURA *Pichia Pastoris* COMO CARREADORA DE
ANTÍGENOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Genética.

Aprovado em 18/02/2020

BANCA EXAMINADORA

Dr. Antonio Carlos de Freitas
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Danielle Maria Nascimento Moura
Instituto Aggeu Magalhães

Dra. Fernanda Cristina Bezerra Leite
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dra. Laura Helena Vega Gonzales Gil
Instituto Aggeu Magalhães

Dr. Marcos Antônio De Moraes Junior
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico esse trabalho às mulheres da minha família, professoras inspiradoras dentro e fora das salas de aula.

AGRADECIMENTOS

Muito do que me fez conseguir chegar até essa etapa da minha vida acadêmica se deve a torcida, incentivo, carinho e esforços de muita gente.

Começo agradecendo à minha mãe, Graça, uma das mulheres mais extraordinárias que eu conheço. É uma honra ser sua filha e parceira de vida, e sou imensamente grata a ela por tudo: sua força, seu amor e seus cuidados. A meu pai, Luiz, que muito me ensina dentro sua simplicidade; sou grata por tanto amor e confiança em mim. A meu irmão, melhor amigo e anjo da guarda, Alexandre, certamente, uma das pessoas mais fundamentais ao longo desse tempo de mestrado e doutorado. Sou imensamente grata e feliz por tê-lo perto de mim, segurando minha mão e sendo tão amoroso, paciente e cuidadoso comigo. Aqui agradeço especialmente a minha avó de coração, Coca, e às minhas tias Socorro, Emília e Penha: grandes professoras que me incentivaram e me deram suporte em todos os momentos da minha vida escolar e universitária. Em especial, à Emília, *in memoriam*, sou cheia de saudades e gratidão por tudo o que ela representa para mim.

Agradeço ao Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas por esses oito anos de trabalho e aprendizado no LEMTE (Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental). Sou grata pela oportunidade dada desde a iniciação científica, pelos conhecimentos compartilhados, pela paciência, pelos incentivos e pela confiança depositada em mim. É muito satisfatório receber reconhecimento e apoio de alguém que admiramos.

Aproveito para agradecer também aos meus co-orientadores: Dr. André Luiz dos Santos e Dra. Cristiane Moutinho. André que tem me acompanhado desde o início, ainda no estágio, me ensinou muita coisa e sempre se mostrou disponível para trocar conhecimentos e dividir ideias. Tenho muito a agradecer a Prof. Cristiane que também tem sido fundamental para a minha formação. Não sou grata apenas por sua contribuição acadêmica, mas também por seu olhar generoso e preocupação comigo, por acreditar em mim e me instigar a estar sempre melhorando.

O LEMTE foi praticamente minha segunda casa ao longo dos últimos anos e nele fiz bons amigos e companheiros de jornada. Agradeço em especial a Ana Paula, Bianca, Lígia e Karin pelo companheirismo dentro e fora do laboratório,

compartilhando planos, projetos, experimentos e aperreios, e por tornarem os dias mais leves e engraçados. Agradeço a Talita, Elias, Ruany e Daffany pelo carinho sempre demonstrado. Agradeço a Larissa, Gabriel e Carine pela oportunidade de coorientar seus trabalhos, pois o aprendizado adquirido ao longo desse tempo tem sido valioso para mim. Tenho um grande carinho e gratidão por Eliane, Filipe e Marcelo os quais acompanhei durante minha iniciação científica, e embora não tenhamos mais juntos, sei da importância da contribuição deles para minha formação.

Agradeço muito à acolhedora equipe do LAIA (Laboratório de Análises Imunológicas e Antitumorais): Bárbara, Geo, Dayane, Lethícia, Guilherme e Ricardo. Trabalhar com eles me ensinou muito não só em relação aos experimentos, mas também como trabalhar em grupo de maneira coordenada e generosa.

Aos amigos que estão sempre comigo de maneira tão especial: Taynah, Tomas, Enny, Filipe, Thayse, Gustavo e Adalúcia. A Micaelly e Jéssica, amigas de toda vida, sou grata por tudo inclusive pela paciência em ouvir meus aperreios e preocupações acadêmicas.

Agradeço ao Programa de Pós - Graduação em Genética, aos professores que tive contato ao longo do período do curso, em especial à professora Neide Santos com quem aprendi muito durante o estágio de docência. Agradeço também aos funcionários do Laboratório Central do CB da UFPE. Por fim, agradeço às agências de fomento que viabilizaram financeiramente a execução deste trabalho.

Bom saber que ciência é mais do que uma simples escolha profissional; ciência é uma paixão, uma filosofia de vida, uma entrega que vai além da mera rotina do dia-a-dia. Ciência é uma entrega ao novo, ao desconhecido. (Gleiser, 2007, p.19)

RESUMO

Leveduras, como *Pichia pastoris*, vêm sendo exploradas não apenas para produção de proteínas recombinantes, mas também como carreadoras de antígenos em estratégias vacinais. O desenvolvimento de vacinas para o vírus da Zika é importante para a saúde pública, devido às manifestações clínicas neurológicas que podem ser desencadeadas pela infecção. O presente trabalho visou a produção de proteínas do ZIKV em *P. pastoris* e a avaliação imunológica frente às leveduras recombinantes dispondo os antígenos em sua superfície. Os cassetes de expressão foram compostos por epítomos das proteínas Envelope e NS1, preditos *in silico* quanto a capacidade de ligação a células B, e a MHC classes I e II. Os genes foram fusionados ao gene da proteína âncora α -Aglutinina, clonados em vetor de expressão e utilizados para transformar *P. pastoris*. *Western blot* e imunofluorescência foram empregados para confirmar a produção e a ancoragem das proteínas recombinantes. A resposta imune promovida pelas leveduras foi avaliada, *in vitro* e *in vivo* (em modelo murino). A dosagem de citocinas indicou um perfil de resposta tipo Th1, similar ao induzido pelo vírus. *P. pastoris* expressando os epítomos EnvNS1 se destacou frente as outras construções compostas pelos conjuntos de epítomos de cada proteína, individualmente. *EnvNS1* apresenta uma seleção de epítomos arranjados de forma inédita, e se mostra um candidato vacinal promissor diante do seu potencial imunogênico, em relação a ativação de linfócitos T CD4+ e CD8+, e às citocinas induzidas.

Palavras-chave: ZIKV. *Pichia pastoris*. Vacina de célula inteira. Ancoragem de proteínas.

ABSTRACT

Yeasts, such as *Pichia pastoris*, have been explored not only for the production of recombinant proteins, but also as carriers of antigens in vaccine strategies. The development of vaccines for the Zika virus is important for public health, due to the neurological clinical manifestations that can be triggered by the infection. The present work aimed at the production of ZIKV proteins in *P. pastoris* and the immunological evaluation of recombinant yeasts displaying the antigens on their surface. The expression cassettes were composed of epitopes of the Envelope and NS1 proteins, *in silico* predicted in terms of their capacity to bind to B cells, and to MHC classes I and II. The genes were fused to the anchor protein α -Agglutinin gene, cloned into an expression vector and used to transform *P. pastoris*. Western blot and immunofluorescence were used to confirm the production and anchorage of the recombinant proteins. The immune response promoted by yeasts was evaluated, *in vitro* and *in vivo* (in murine model). The cytokine dosage indicated a Th1-type response profile, similar to that induced by the virus. *P. pastoris* expressing the EnvNS1 epitopes stood out compared to the other constructions composed of the sets of epitopes of each protein, individually. EnvNS1 presents a set of epitopes arranged in an inedited way, and shows an promising vaccine candidate in view of its immunogenic potential, in relation to the activation of CD4 + and CD8 + T lymphocytes and induced cytokines.

Key – words: ZIKV. *Pichia pastoris*. Whole cell vaccine. Protein anchoring.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Mapa-múndi destacando áreas de risco de infecção pelo ZIKV.....	22
Figura 2 -	Representação da estrutura do ZIKV.....	25
Figura 3 -	Organização genômica da virus Zika e processamento da poliproteína viral.....	26
Figura 4 -	Resumo do ciclo viral dos Flavivírus.....	28
Figura 5 -	Maturação das partículas virais.....	30
Figura 6 -	Dímero da proteína do envelope e epítomos alvos de anticorpos neutralizantes monoclonais Anti-E.....	34
Figura 7 -	Representação esquemática da exposição de antígenos na superfície de células de leveduras.....	43
Figura 8 -	Disposição dos epítomos selecionados dentro das proteínas Envelope e NS1.....	46
Figura 9 -	Esquema geral do cassete de expressão e disposição das sequências espaçadoras para cada construção vacinal.....	47
Figura 10 -	Representação do vetor de passagem pCloneEnvNS1 α Ag.....	48
Figura 11 -	Mapas esquemáticos dos vetores para expressão em <i>P. pastoris</i>	49
Figura 12 -	Representação dos grupos experimentais adotados para estimulação <i>in vitro</i>	54
Figura 13 -	Placas YPD semeadas com as leveduras após o tratamento térmico.....	56
Figura 14 -	Esquema de imunização.....	57
Figura 15 -	Verificação dos plasmídeos recombinantes por análise de restrição.....	60
Figura 16 -	Confirmação da produção das proteínas de interesse por <i>western blot</i>	61
Figura 17 -	Imunofluorescência das leveduras recombinantes, observação das fusões antígeno/ α -aglutinina.....	61

Figura 18 - Secreção de citocinas a partir das células imunológicas após estímulo com <i>P. pastoris</i> e ZIKV.....	62
Figura 19 - Perfil de estímulo para produção das citocinas induzidas pelas células imunológicas após incubação com as leveduras recombinantes.....	63
Figura 20 - Expressão de marcadores de superfície presents em células imunológicas incubadas com diferentes estímulos: <i>P. pastoris</i> não-recombinante, <i>P. pastoris_EnvNS1</i> e Zika vírus.....	65
Figura 21 - Perfil das citocinas liberadas pelas células imunológicas primadas com as leveduras recombinantes e desafiadas com o ZIKV, após 24h.....	66
Figura 22 - Perfil de citocinas dosadas a partir do sangue dos camundongos vacinados.....	67
Figura 23 - Análises das subpopulações dos linfócitos circulantes no sangue dos camundongos após a imunização (14 dias após a dose de reforço).....	68
Figura 24 - Perfil dos linfócitos isolados do baço dos animais imunizados com <i>P. pastoris_Env</i> , re – estimulados <i>in vitro</i> com as leveduras e com o ZIKV.....	70
Figura 25 - Perfil dos linfócitos isolados do baço dos animais imunizados com <i>P. pastoris_EnvNS1</i> , re – estimulados <i>in vitro</i> com as leveduras e com o ZIKV.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Resumo das principais características atribuídas às proteínas não-estruturais dos Flavivírus.....	27
Tabela 2 -	Principais estratégias de imunização profilática anti-ZIKV em fase de avaliação clínica.....	33
Tabela 3 -	Produtos biofarmacêuticos comercializados produzidos em <i>P. pastoris</i>	36
Tabela 4 -	Exemplos de estratégias vacinais baseadas na utilização de leveduras como plataforma de <i>delivery</i> antigênico.....	39
Tabela 5 -	Sequências e posições dos epítomos selecionados a partir das proteínas Envelope e NS1.....	46
Tabela 6 -	Citocinas que não tiveram aumentos significativo induzido pelos grupos experimentais.....	63
Tabela 7 -	Média do peso dos grupos dos camundongos ao longo do ensaio pré-clínico.....	72
Tabela 8 -	Parâmetros hematológicos e bioquímicos dos camundongos no final do experimento de imunização (média por grupo).....	73
Tabela 9 -	Parâmetros hematológicos dos camundongos no final do experimento de imunização (média por grupo).....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	<i>Antigen presenting cell</i> (Célula Apresentadora de Antígeno)
AOX	Álcool oxidase
BRM	<i>Biological response mediators</i> (Mediadores de Resposta Biológica)
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i> (Centro de Controle e Prevenção a Doenças)
CHIKV	<i>Chikungunya vírus</i>
DENV	<i>Dengue vírus</i>
ER	<i>Endoplasmic Reticulum</i> (Retículo Endoplasmático)
GAP	<i>Glyceraldehydes-3-phosphate</i>
GPI	<i>Glycosylphosphatidylinositol</i>
GRAS	<i>Generally Regarded As Safe</i> (Geralmente considerado como seguro)
IFN	Interferon
JEV	<i>Encefalite Japonesa virus</i>
LAV	<i>Live Attenuated Virus</i> (Vírus vivo atenuado)
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complexo Principal de Histocompatibilidade)
MV	<i>Measles virus-based Vaccine</i> (Vacina baseada no vírus do Sarampo)
MVA	<i>Modified Vaccinia virus Ankara</i> (Vírus Vaccinia Ankara modificado)
NK	<i>Natural killer</i>
NTPase	Nucleosídeo 5'- trifosfatase
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> (Células mononucleares de sangue periférico)
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PGK	<i>Phosphoglycerate kinase</i>
RSV	<i>Respiratory syncytial virus</i> (vírus respiratório sincicial)
RTPase	RNA-trifosfatase
TBEV	<i>Tick-borne encephalitis virus</i>
TAM	Tyro3-Axl-Mer
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TIM	<i>T-cell immunoglobulin mucin</i> (domínios imunoglobulina e mucina de células T)

TGN	Trans-Golgi
TLR	<i>Toll-like receptors</i> (Receptores do tipo Toll)
TNF	<i>Tumour Necrosis Factor</i> (Fator de Necrose Tumoral)
UTR	<i>Untranslated Regions</i> (Regiões não-traduzidas)
VLP	<i>Virus-like particles</i> (Partículas semelhantes a vírus)
YFV	Yellow fever vírus (Vírus da Febre Amarela)
YPD	<i>Yeast extract – Peptone – Dextrose</i>
ZIKV	Zika vírus
ZPIV	<i>ZIKV purified inactivated virus vaccine</i> (Vacina com Zika vírus inativado purificado)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	OBJETIVOS.....	20
1.1.1	Objetivo Geral.....	20
1.1.2	Objetivos Específicos.....	20
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
2.1	ZIKA VÍRUS.....	21
2.1.1	Descoberta e epidemiologia do Zika vírus.....	21
2.1.2	Transmissão e Manifestações Clínicas.....	23
2.1.3	Genoma e Ciclo viral.....	24
2.1.4	Tropismo viral e Patogênese.....	30
2.1.5	Aspectos imunológicos e estratégias vacinais anti-ZIKV.....	32
2.2	LEVEDURAS COMO HOSPEDEIRAS PARA EXPRESSÃO HETERÓLOGA.....	36
2.2.1	O modelo <i>Pichia pastoris</i>.....	36
2.2.2	Leveduras como vetores vacinas.....	37
2.2.3	Ancoragem de proteínas na superfície de leveduras.....	42
3	MÉTODO.....	44
3.1	MATERIAIS.....	44
3.1.1	Linhagens de Microorganismos e condições de cultivo.....	44
3.1.2	Soluções e Tampões.....	44
3.1.3	Géis para Eletroforese de DNA e de Proteínas.....	45
3.2	METODOLOGIA.....	45
3.2.1	<i>Design</i> dos Genes.....	45
3.2.2	Construção do Cassete de Expressão.....	47
3.2.3	Subclonagem no Vetor de Expressão.....	48
3.2.4	Transformação e Análise dos Recombinantes em <i>P. Pastoris</i>.....	50
3.2.5	Indução da Expressão.....	51
3.2.6	Análise da Produção das Proteínas.....	52
3.2.6.1	<i>Western blot</i>.....	52

3.2.6.2	Imunofluorescência.....	52
3.2.7	Análises imunológicas <i>in vitro</i>.....	53
3.2.7.1	Obtenção de esplenócitos de camundongos.....	53
3.2.7.2	Cultura de células.....	53
3.2.7.3	Desafio imunológico das células tratadas com as leveduras e re-estimuladas com o vírus.....	54
3.2.7.4	Dosagem de citocinas.....	54
3.2.7.5	Imunofenotipagem.....	55
3.2.8	Ensaio imunológico <i>in vivo</i>.....	56
3.2.8.1	Preparação das leveduras.....	56
3.2.8.2	Camundongos, parâmetros éticos e protocolo de imunização.....	56
3.2.8.3	Estimulação <i>in vitro</i> das células mononucleares esplênicas.....	57
3.2.8.4	Avaliação imunológica após a cultura.....	58
3.2.8.5	Avaliação imunológica do sangue dos camundongos.....	58
3.2.8.6	Análises hematológicas e bioquímicas.....	58
3.2.9	Análise estatística.....	59
4	RESULTADOS.....	60
4.1	ANÁLISES DE RESTRIÇÃO E CONFIRMAÇÃO DA SUBCLONAGEM.....	60
4.2	CONFIRMAÇÃO DA PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	60
4.3	VERIFICAÇÃO DA ANCORAGEM DAS PROTEÍNAS NA SUPERFÍCIE DE <i>P. pastoris</i>	61
4.4	AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO POTENCIAL IMUNOLÓGICO DAS LEVEDURAS.....	61
4.4.1	Produção de citocinas.....	62
4.4.2	Imunofenotipagem.....	64
4.4.3	Dosagem de citocinas a partir células imunológicas tratadas com as leveduras e re-estimuladas com o vírus.....	65
4.5	ENSAIOS IMUNOLÓGICOS PÓS-IMUNIZAÇÃO.....	67
4.5.1	Análises das citocinas presentes no sangue e imunofenotipagem dos linfócitos circulantes.....	67

4.5.2	Avaliação do estímulo aos linfócitos isolados do baço dos animais vacinados.....	68
4.5.2.1	Cultura com células dos animais vacinados com <i>P. pastoris</i> _Env.....	69
4.5.2.2	Cultura com células dos animais vacinados com <i>P. pastoris</i> _EnvNS1.....	70
4.5.3	Avaliação dos efeitos colaterais das vacinas.....	72
5	DISCUSSÃO.....	74
6	CONCLUSÕES.....	82
	REFERÊNCIAS.....	83
	ANEXO A- Carta de aprovação pela CEUA UFPE.....	103
	ANEXO B- Carta de aprovação da CEUA do Instituto Aggeu Magalhães.....	104

1 INTRODUÇÃO

A emergência e re-emergência de arbovírus como os vírus da Dengue, Zika e Chikungunya despertam atenção devido à patogênese associada às infecções e a rápida disseminação desses vírus em diversos países do mundo. Estratégias que visam o controle dessas arboviroses incluem o controle do mosquito-vetor e o desenvolvimento de drogas antivirais e vacinas.

Em relação ao vírus da Zika (ZIKV), sua infecção é associada ao desenvolvimento de malformações congênitas devido a transmissão vertical do vírus e a síndromes neurológicas, como a de Guillain-Barré, em adultos. A partir do momento em que foram confirmados o caráter neurotrópico do vírus e a associação da infecção a desordens neurológicas, o combate e a prevenção ao vírus da Zika se tornaram uma questão mundial de saúde pública. Vacinas anti-ZIKV vêm sendo desenvolvidas por diferentes grupos de pesquisa. Boa parte das abordagens em curso, quando não são baseadas no vírus atenuado ou inativado, utilizam as proteínas do Envelope e NS1 visto que elas são alvo de reconhecimento por anticorpos neutralizantes e desempenham importantes papéis dentro do ciclo viral.

De maneira geral, no contexto do desenvolvimento de vacinas, além da escolha do antígeno vacinal adequado, a forma como ele será apresentado ao sistema imune é crucial para o sucesso da imunização, seja ela profilática ou terapêutica. Diferentes estratégias vêm sendo desenvolvidas e aprimoradas nesse sentido e dentre elas está o uso de células de levedura como veículos para administração de antígenos recombinantes. Essas vacinas são capazes de induzir respostas imunes humoral e celular, apresentando a vantagem adicional de dispensar o uso de adjuvantes em suas formulações, devido às propriedades imunoestimulatórias de componentes da parede celular.

Abordagens nesse sentido vêm sendo testadas e têm demonstrado sucesso para diferentes agentes infecciosos, incluindo vírus, parasitas e fungos. As principais leveduras empregadas nesse tipo de vacina são *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*, que não são patogênicas, dispõem de suas características genéticas e metabólicas bem elucidadas, são considerados organismos GRAS (*'generally regarded as safe'*) e são largamente utilizadas na produção de proteínas recombinantes com aplicações biotecnológicas diversas. Além dessas vantagens, é possível utilizar sistemas de ancoragem à superfície da levedura (*"cell surface*

display”) como ferramenta para melhorar a apresentação dos antígenos ao sistema imune.

Dentro deste contexto, o presente trabalho propôs a utilização de *P. pastoris* para produção de epítomos derivados das proteínas Env e NS1 do ZIKV, e a ancoragem das proteínas recombinantes na superfície da levedura. Inicialmente, foi avaliado, *in vitro*, o potencial da levedura *P. pastoris* como adjuvante e plataforma vacinal. Nesse estudo, foi observado a indução de resposta imune tipo Th1, a partir da avaliação do perfil de citocinas e células T ativadas. Os resultados obtidos viabilizaram a continuidade da avaliação através de ensaio pré-clínico em modelo murino. As vacinas promoveram aumento no número de linfócitos T CD4+ e CD8+, ao passo que também estimularam a produção de citocinas efetoras importantes como TNF- α , IFN- γ , IL-2 e IL-4. Não foram notificados efeitos adversos provocados pela administração intramuscular das leveduras atestando a segurança das vacinas no modelo animal estudado.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O presente projeto visou o desenvolvimento e avaliação de estratégia vacinal para o vírus da Zika utilizando a levedura *Pichia pastoris* como plataforma para produção e carregamento dos antígenos recombinantes.

1.1.2 Objetivos específicos

- Construir cassetes de expressão compostos pelos genes do Envelope e NS1 do ZIKV, fusionados à proteína âncora α -aglutinina 1.
- Obter linhagens de *Pichia pastoris* recombinantes expressando os genes de interesse, expondo as proteínas na superfície celular.
- Caracterizar o perfil imunoestimulatório das leveduras – teste.
- Avaliar a resposta imune induzida pelas leveduras recombinantes em modelo murino.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ZIKA VÍRUS

2.1.1 Descoberta e epidemiologia do Zika vírus

A infecção pelo Zika vírus (ZIKV) foi descrita pela primeira vez em 1947, a partir de um macaco-sentinela *rhesus* na floresta Zika, localizada em Uganda (Dick et al. 1952). No ano seguinte, o vírus foi isolado de mosquitos e, em 1952, foi isolado a partir de humanos infectados (MacNamara, 1954). A infecção pelo Zika vírus permaneceu pouco conhecida e notificada até a primeira década dos anos 2000. As limitações nas notificações do ZIKV ao longo desses anos são atribuídas às semelhanças existentes entre os sintomas observados em outras infecções endêmicas como as causadas por arbovírus como o vírus da Dengue (DENV) e o da Chikungunya (CHIKV) que podem ter mascarado o número real de casos de infecção pelo ZIKV (Weaver et al. 2016).

Esse cenário se modificou a partir de 2007, quando houve o primeiro surto de maior impacto ocorrido na ilha de Yap, no Pacífico Ocidental (Parte dos Estados Federados da Micronésia), seguida por outros surtos na Polinésia Francesa no sul do Pacífico, em 2013-14 com uma estimativa de 30.000 infecções sintomáticas (Duffy et al. 2009; Cao-Lormeau et al. 2014). Essas epidemias foram seguidas por surtos menores no Pacífico em 2014, em Nova Caledônia, nas Ilhas Cook, Ilha de Páscoa e, em 2015, em Vanuatu, Ilhas Salomão, Samoa e Fiji (Musso e Gubler, 2016).

A multiplicidade de modos de transmissão e o fato de compartilhar o mosquito-vetor do, bem estabelecido, vírus da dengue, fez com que o ZIKV se espalhasse por regiões onde o DENV é endêmico. Desse modo, o ZIKV alcançou proporções epidêmicas rapidamente, de forma que, desde 2015, a infecção de indivíduos já foi notificada em aproximadamente 65 países (Figura 1) (Shi e Gao, 2017).

Existem múltiplas sugestões de como o ZIKV foi introduzido na América do Sul. Uma delas aponta o Caribe e a América Central como importantes rotas de entrada não só para o ZIKV, mas também para outros arbovírus. Estudos recentes sugerem uma cepa originária do Haiti como ancestral comum para os isolados do Zika vírus obtidos a partir de indivíduos com infecção confirmada no Brasil. A partir

de 2014, imigrantes e militares infectados vindos do Haiti poderiam ter sido pontos de entrada do vírus. Esse padrão também é sugerido para introdução do CHIKV no país (Campos et al. 2018).

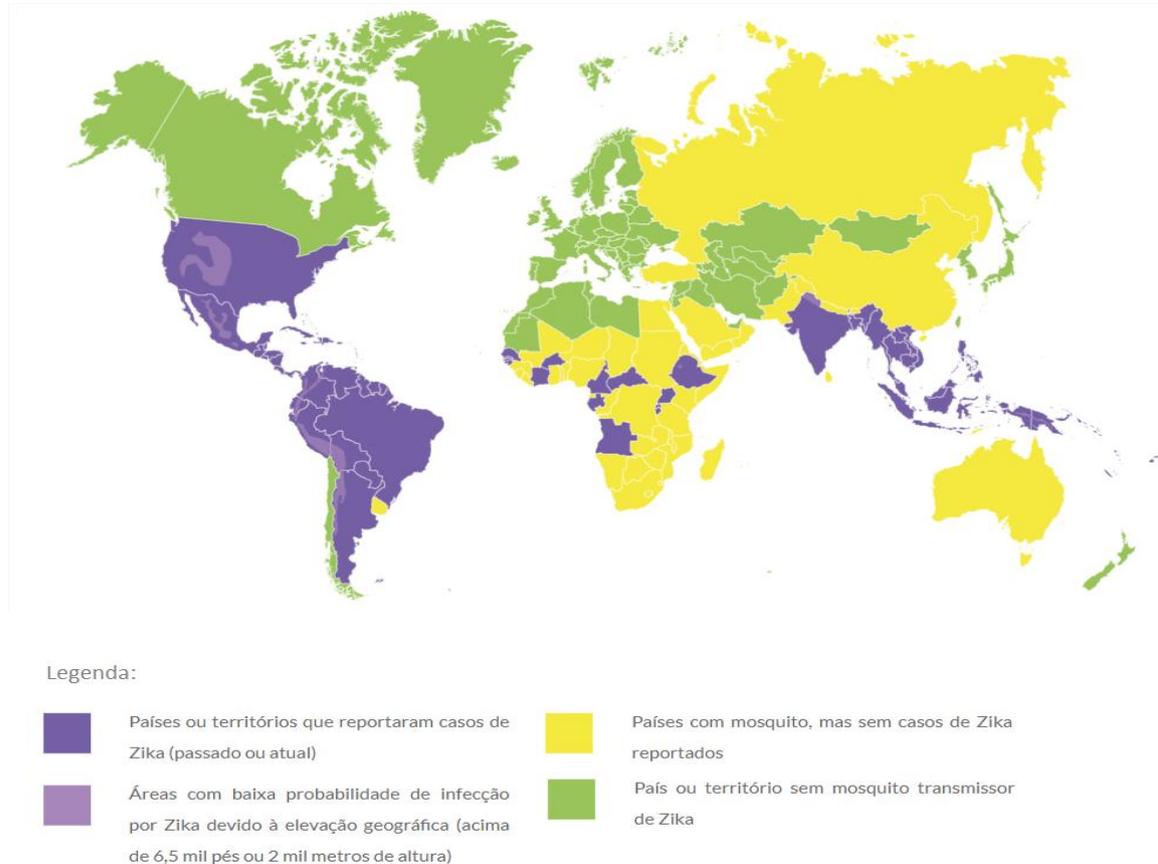


Figura 1: Mapa-múndi destacando áreas de risco de infecção pelo ZIKV. Fonte: Centers for Disease Control and Prevention, CDC, 2019 (adaptado).

Os primeiros casos de transmissão autóctone do ZIKV na América do Sul foram notificados no Brasil, a partir de março de 2015 (Campos et al. 2018). Neste mesmo ano, segundo o Ministério da Saúde, entre 440.000 e 1.300.000 casos de infecção pelo ZIKV podem ter ocorrido no Brasil. Após sua introdução, o vírus da Zika espalhou-se rapidamente pela maior parte do país. Em janeiro de 2016, 14 estados do Brasil reportaram casos, além de notificações em países vizinhos como Colômbia e Venezuela.

Entre o fim do ano de 2015 e o início de 2016, foi observado um aumento significativo no número de casos de malformações fetais, com destaque para a microcefalia no Nordeste brasileiro, e de adultos acometidos por síndromes neurológicas como a de Guillain-Barré, nas Américas Central e Sul, especialmente no Brasil. Essas manifestações clínicas severas foram associadas ao crescente

número de casos de infecção pelo vírus da Zika, tendo sido posteriormente confirmada pela Organização Mundial da Saúde (Brasil et al. 2016; Mlakar et al. 2016; Rasmussen et al. 2016). A partir de então, a infecção se tornou uma questão mundial de saúde pública, redobrando a atenção para moradores de áreas endêmicas e viajantes.

Segundo dados da Secretaria de Vigilância em Saúde, no Brasil, em 2019, foram registrados 10.686 casos prováveis de doença causada pelo vírus Zika com incidência de 5,1 casos a cada 100 mil habitantes, até a semana epidemiológica 47. A região Nordeste apresentou maior taxa de incidência em relação ao total do país, com 8,9 casos a cada 100 mil habitantes. Em seguida, aparecem as regiões Centro-oeste (5,8 casos/100 mil hab.), Norte (5,2 casos/100 mil hab.), Sudeste (4,0 casos/100 mil hab.) e Sul (0,3 casos/100 mil hab.). Em relação às gestantes, entre as semanas epidemiológicas 1 e 43, foram registrados 1547 casos prováveis, sendo 490 confirmados por critérios clínico-epidemiológicos ou laboratoriais.

As cepas virais identificadas até o presente momento pertencem ao mesmo sorotipo. Análises filogenéticas a partir das sequências de diferentes isolados definiram a existência de três linhagens: Africana, Asiática e Americana (Beaver et al. 2018). A infecção causada pelo ZIKV apresenta peculiaridades em diversos aspectos que vão desde as consequências do neurotropismo viral que levam a distúrbios neurológicos até a diversidade nas formas de transmissão. Sugere-se que essas características se devam a mudanças na estrutura genética das linhagens do ZIKV ao longo do processo de evolução viral. Essas mudanças podem ter contribuído para a rápida expansão viral, a severidade das manifestações clínicas e a ocorrência de múltiplas rotas de infecção (Sharma e Lal et al. 2017).

2.1.2 Transmissão e Manifestações Clínicas

Embora a infecção pelo ZIKV seja qualificada como uma arbovirose, ela apresenta outras formas de transmissão além da picada pelo mosquito-vetor *Aedes sp* (*Ae. Aegypti* e *Ae. Albopictus*). Essas formas alternativas incluem a transmissão vertical, a sexual e a através de transfusões sanguíneas (Musso et al. 2015; Mlakar et al. 2016; Motta et al. 2016). A forma de transmissão pode variar de acordo com a linhagem da cepa infectante. Enquanto a linhagem Africana vem sendo mais associada à transmissão através do repasto sanguíneo de mosquitos, cepas das

linhagens Americana e Asiática destacam-se pela capacidade de serem transmitidas através de relações sexuais (Beaver et al. 2018).

De maneira geral, o tempo de incubação do vírus, desde a exposição até o desenvolvimento dos sintomas, é estimado ser de 3 a 14 dias (Krow-Lucal et al. 2017). Cerca de 80% dos indivíduos infectados apresenta infecção subclínica, ou assintomática. Quando o indivíduo desenvolve sintomas, geralmente eles são auto-limitantes e se apresentam por dois a sete dias e são comuns aos vivenciados em outras infecções virais (Beaver et al. 2018). Essas manifestações clínicas incluem febre, *rash* cutâneo, dor de cabeça, dor retro-orbital, conjuntivite não-purulenta, mialgia e artralgia (Charrel et al. 2016). Geralmente, a viremia de pacientes infectados pelo ZIKV é baixa, durando em torno de três a sete dias (Krow-Lucal et al. 2017).

Além da sintomatologia clássica relacionada às arboviroses, a infecção pelo ZIKV também pode trazer consequências graves aos indivíduos infectados, o que se deve a diversidade de tipos celulares que esse vírus pode infectar. A fase da vida, o *background* genético e o *status* imune do indivíduo no momento em que ele é infectado também são aspectos importantes a se considerar (Beaver et al. 2018).

A ocorrência de infecção pelo ZIKV durante a gravidez pode levar a uma série de complicações que vão além da microcefalia extensamente notificada no início do surto epidêmico (Melo et al. 2016). Essas complicações podem acontecer ainda durante a gravidez, uma vez que já foi observado que o ZIKV pode causar danos às vilosidades coriônicas, prejudicando a troca de sangue e nutrientes entre a mãe e o feto (Costa et al. 2016).

Outras anomalias neurológicas congênitas também já foram descritas como associadas à infecção pelo Zika vírus, incluindo calcificações intracranianas, dilatações no sistema ventricular e desordens no padrão de migração neuronal (Krauer et al. 2017). A infecção congênita também acarreta outras manifestações clínicas em crianças como problemas motores e alterações oculares (Freitas et al. 2016; Rice et al. 2018).

2.1.3 Genoma e Ciclo viral

Pertencente ao gênero Flavivírus, família *Flaviviridae*, o ZIKV é um vírus de cerca de 50 nm de diâmetro, envelopado, e possui RNA fita simples de polaridade positiva como material genético (Figura 2). O gênero Flavivírus abrange mais de 70

membros, dentre os quais se destacam vírus de importância médica como os vírus da Dengue (DENV), Febre Amarela (YFV) e o da Encefalite Japonesa (JEV) (Beaver et al. 2018). O Flavivírus filogeneticamente mais próximo ao ZIKV é o Spondeweni vírus apresentando, inclusive, manifestações clínicas similares (Haddow et al. 2016).

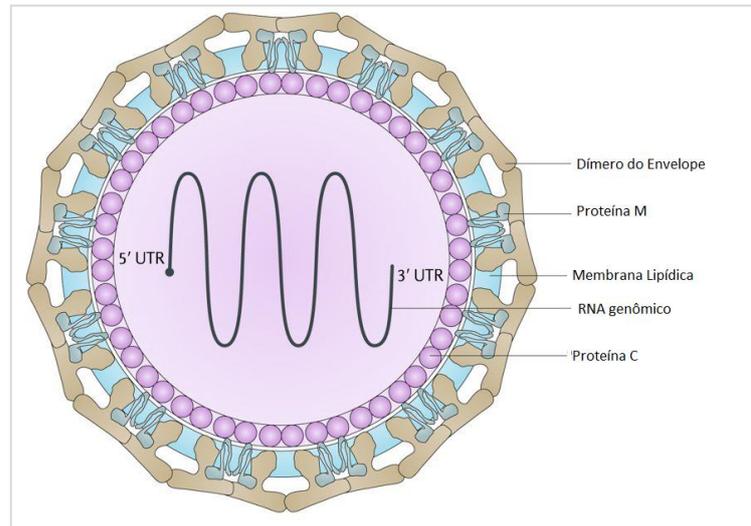


Figura 2. Representação da estrutura do ZIKV. A ilustração destaca a disposição das proteínas estruturais: capsídeo (C), membrana (M) e envelope viral. Fonte: Abbink et al. 2018 (Adaptado).

O genoma desses vírus possui aproximadamente 10,8Kb e codifica uma poliproteína única composta por três proteínas estruturais em seu N-terminal e sete não-estruturais na porção restante. A poliproteína codificada pelo genoma viral é clivada em sítios específicos por proteases virais e do hospedeiro, gerando proteínas individuais como ilustrado na Figura 3 (Sampath e Padmanabhan, 2009).

As proteínas estruturais correspondem ao capsídeo (C), a (pré) Membrana (prM) e ao envelope (Env) viral, enquanto que as proteínas não-estruturais são denominadas como NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. O genoma é flanqueado por regiões não-traduzidas (UTRs) nos terminais 5' e 3', requeridas para replicação e tradução do material genético viral (Figura 3). Além das proteínas não-estruturais, as regiões 5' e 3'-UTR fazem parte do complexo de replicação e também desempenham papéis importantes no ciclo viral. O terminal 3'-UTR codifica um RNA subgenômico de Flavivírus envolvido em mecanismos de evasão da resposta imune inata. Esses RNAs subgenômicos também vem sendo apontados como fator de proteção a clivagens mediadas por exonucleases (Beaver et al. 2018).

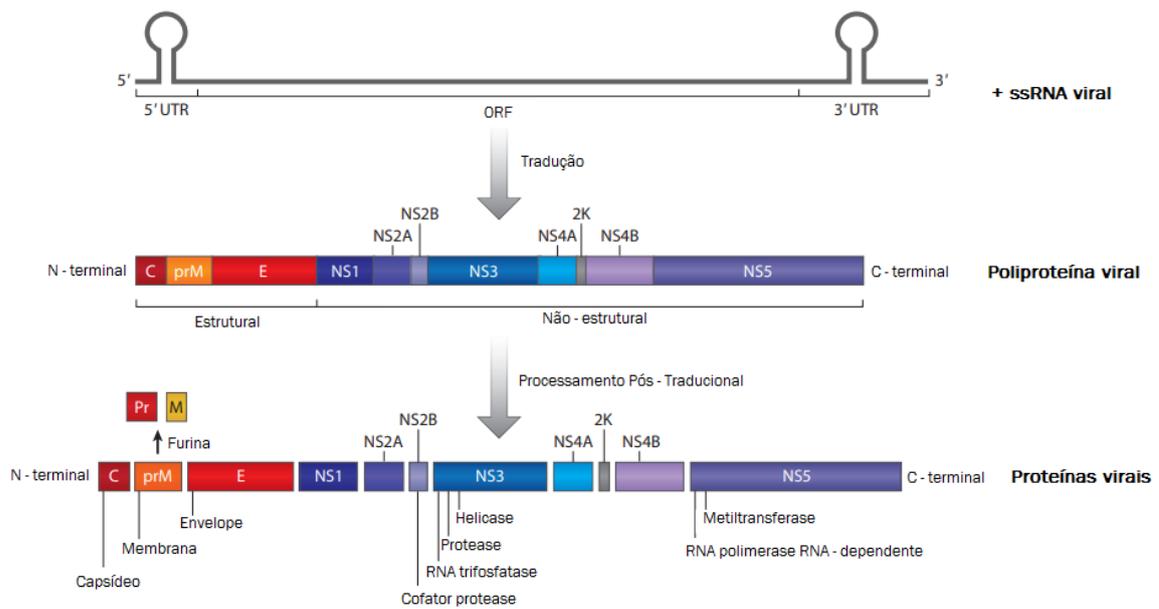


Figura 3. Organização genômica da virus Zika e processamento da poliproteína viral. Mediante a clivagem realizada por proteases virais e do hospedeiro, a poliproteína subdivide-se em proteínas estruturais e não-estruturais. Adaptado de Elong Ngono e Shresta (2018).

O RNA viral desempenha papéis fundamentais em três aspectos básicos do ciclo viral: I) como mRNA para tradução de todas as proteínas virais, II) como molde para replicação e III) como material genético infectante internalizado nas partículas virais. O genoma viral é envolvido pelo nucleocapsídeo formado por múltiplas cópias da proteína C que, por sua vez, é recoberto por uma bi-camada lipídica derivada da célula hospedeira circundada por 180 cópias de cada uma das glicoproteínas M e Env (Hasan et al. 2018). As proteínas não-estruturais desempenham funções no processamento da poliproteína, na replicação viral e em mecanismos de escape a resposta imune contra o vírus (Tabela 1).

Na fase inicial da infecção, o vírus se liga a receptores celulares e entra na célula hospedeira via endocitose (Figura 4). A ligação do vírus à célula é mediada principalmente pela proteína do envelope. Essa proteína está envolvida em diversos processos celulares que incluem ligação a receptores, fusão a membrana, penetração do vírus na célula do hospedeiro e determinação do tropismo celular, além de ser um dos principais alvos de ligação a anticorpos neutralizantes (Shi e Gao, 2017).

Tabela 1. Resumo das principais características atribuídas às proteínas não-estruturais dos Flavivírus (Lindenbach et al. 2007; Bollati et al. 2010)

Proteínas	Atribuições
NS1	<ul style="list-style-type: none"> - Essencial para replicação viral; - Inibe resposta imune mediada pelo complemento;
NS2A	<ul style="list-style-type: none"> - É requerida para replicação e montagem da partícula viral; - Antagoniza IFN tipo I;
NS2B	<ul style="list-style-type: none"> - Atua como co-fator para atividade protease de NS3;
NS3	<ul style="list-style-type: none"> - Contem múltiplos domínios importantes para o ciclo viral incluindo motivo serino-protease, nucleosídeo 5'- trifosfatase (NTPase), RNA helicase e 5'-RNA-trifosfatase (RTPase).
NS4A	<ul style="list-style-type: none"> - Interage com NS1 e o complexo de replicação; - Induz rearranjos na membrana; - Regula a atividade ATPase de NS3;
NS4B	<ul style="list-style-type: none"> - Modula a resposta imune do hospedeiro suprimindo a sinalização de IFN-α e $-\beta$, prevenindo estabelecimento de um estado antiviral; - Pode modular a replicação atuando em conjunto com NS3;
NS5	<ul style="list-style-type: none"> - Fundamental para replicação do genoma viral; - Uma das mais conservadas proteínas dos Flavivírus; - Contém os domínios metiltransferase e RNA polimerase RNA-dependente (RdRp);

Baseado na estrutura cristalizada do vírus, e similar ao observado em outros Flavivírus, a proteína Env pode ser dividida em quatro domínios: uma haste transmembrana responsável pela ancoragem à membrana; o domínio I (EDI) envolvido em rearranjos estruturais necessários a fusão do vírus à membrana; domínio II (EDII) que contem uma alça de fusão que participa de processos de fusão pH-dependentes; e o domínio III (EDIII) que abrange uma região menos conservada entre os Flavivírus e mais proeminente na superfície da proteína do envelope, sendo responsável pela ligação do vírus aos receptores da célula hospedeira (Chávez et al. 2010). A fusão entre as membranas virais e do hospedeiro se dá por intermédio da

proteína do envelope, principalmente mediante ligação a receptores lectina tipo C (Dai et al. 2016).

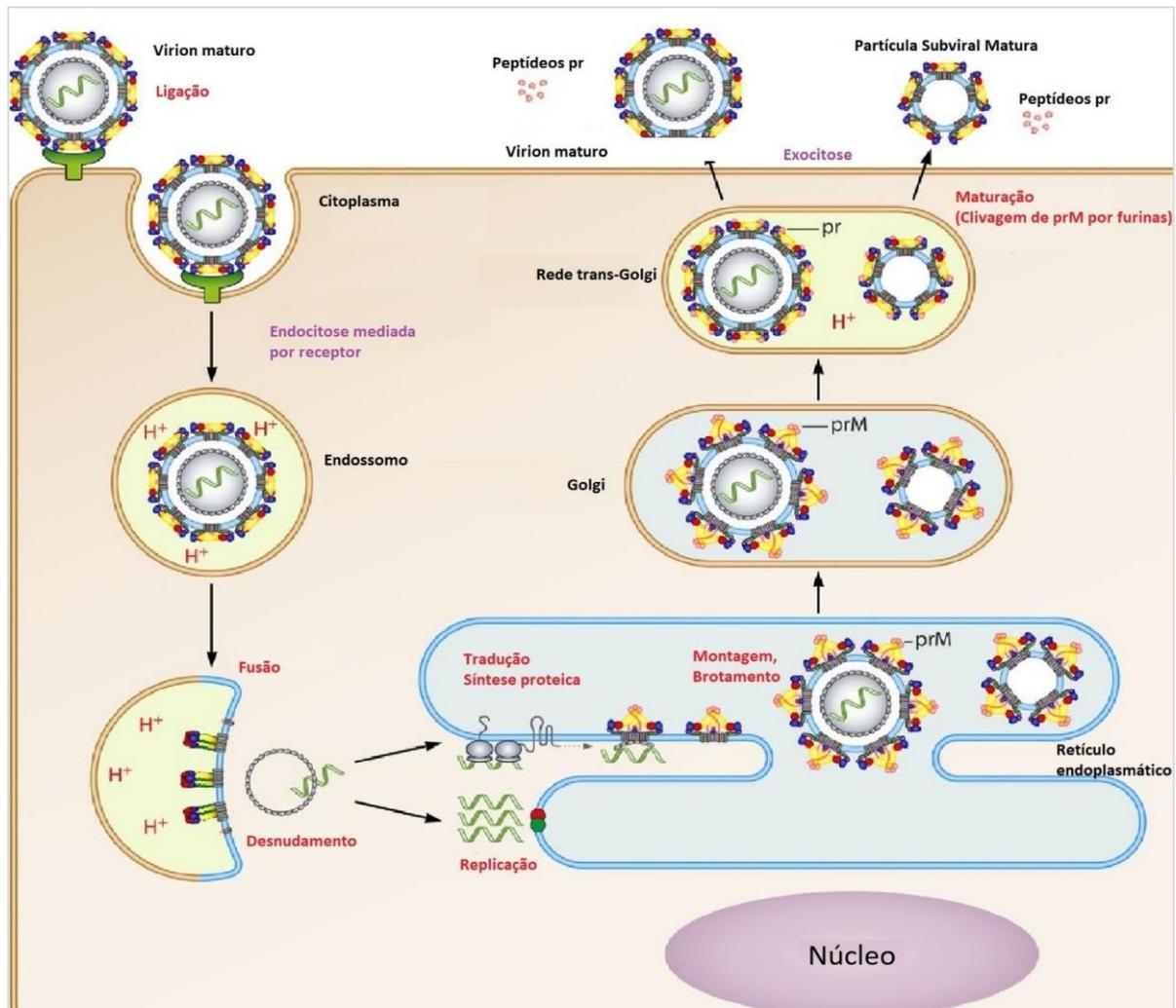


Figura 4. Resumo do ciclo viral dos Flavivírus. O esquema destaca os mecanismos de entrada e maturação das partículas virais. O pH ácido das vesículas endossômicas favorece a fusão da proteína do envelope viral com a membrana da vesícula. Após a liberação do genoma viral ocorre a replicação e tradução do material genético, tendo o mRNA viral como molde. A montagem e maturação da partícula viral ocorre no retículo endoplasmático e na rede Trans-Golgi. Fonte: Heinz e Stiasny, 2017 (adaptado).

Diversos receptores vêm sendo investigados quanto a possibilidade de servir como ponto de acesso do ZIKV ao interior da célula. No entanto, os receptores exatos aos quais o ZIKV se liga nas células do hospedeiro ainda não estão bem estabelecidos, contudo alguns vem sendo apontados como o TIM (*T cell immunoglobulin mucin domain*) e TAM (*Tyros3, Axl, e Mer*) (Heinz e Stiasny, 2017). O potencial de ligação e/ou internalização dos vírus pode diferir de acordo com o hospedeiro e com os tecidos a que os flavivírus têm acesso. Considerando o largo espectro de tipos celulares e tecidos em que o ZIKV tem sido detectado, diversos

possíveis receptores vêm sendo estudados e os mecanismos de ligação ainda estão sendo elucidados. Ademais, o grau de maturação da partícula viral também tem influência com relação aos receptores que intermedeiam a ligação e ao tipo celular suscetível (Agrelli et al. 2019).

O pH baixo encontrado nas vesículas endossômicas induz fusão do envelope viral com a membrana celular, levando a liberação do genoma viral no citoplasma. No citoplasma, ocorre a tradução do mRNA viral requerida para gerar a poliproteína que mediante clivagem, por proteases do hospedeiro e virais, dará origem as proteínas individuais, incluindo a polimerase necessária para subsequente replicação do genoma viral (Lindebach et al. 2007).

Uma vez que o genoma é replicado e as proteínas codificadas são produzidas, inicia-se a montagem das partículas virais. Esse processo ocorre no lúmen do retículo endoplasmático. A primeira etapa da montagem é a cobertura do RNA viral recém-sintetizado pela proteína do capsídeo. O C-terminal da proteína do capsídeo possui uma cauda hidrofóbica que atua como um peptídeo sinal para a translocação de prM para a rede trans-Golgi onde ocorrem as etapas necessárias a maturação da partícula viral (Hasan et al. 2018).

A proteína de pré-membrana atua como uma chaperona sendo importante para que a proteína do envelope alcance sua conformação ideal durante a montagem e maturação da partícula viral. A transição de prM para M ocorre através de clivagem mediada por furina, na rede trans-Golgi, e esse processo resulta na formação de vírions maduros. O peptídeo pr, enquanto ainda associado a M, previne a atividade fusiogênica prematura da proteína do envelope, antes da liberação da partícula viral (Heinz e Stiasny, 2017). Os processos que envolvem desde a maturação das partículas virais até a liberação no meio extracelular, são pH-dependentes e estão representados na Figura 5. Embora o processamento proteolítico de prM seja necessário para o ciclo viral, a completa maturação da partícula não é um requerimento para infectividade nem para atividade fusiogênica do vírion. Portanto, podem ser encontradas partículas heterogêneas contendo peptídeos *pr* residuais (Hasan et al. 2018).

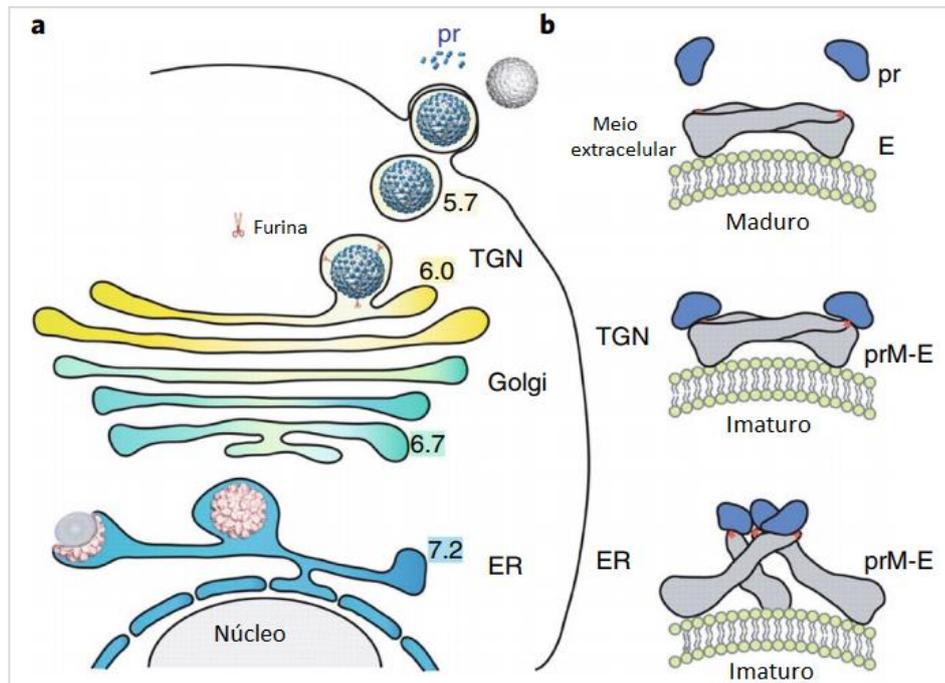


Figura 5. Maturação das partículas virais. a) As mudanças conformacionais necessárias para maturação dos vírions são dependentes das alterações de pH que ocorrem desde o retículo endoplasmático (ER) até a rede trans-Golgi (TGN). b) Arranjo das glicoproteínas (pr)M e E ao longo do processo de maturação. Adaptado de Hasan et al. 2018.

2.1.4 Tropismo viral e Patogênese

Além de entender os mecanismos envolvidos no controle da infecção quanto a resposta imune, é necessário também conhecer quais os principais sítios de infecção e as consequências da presença do ZIKV nos diferentes órgãos, procurando identificar quais tipos celulares são mais suscetíveis e podem sustentar a infecção viral.

A avaliação da permissividade celular à infecção utilizando amostras clínicas de humanos e células de primatas não-humanos e camundongos sugerem um caráter pantrópico para o ZIKV. Isso significa que diversos tipos celulares são permissivos a infecção incluindo células neurais progenitoras, células da glia, células do mesênquima fetal, células de Hofbauer, astrócitos, trofoblastos, células endoteliais, células mononucleares presentes no sangue periférico (PBMCs), células epiteliais e fibroblastos de origens diversas (placenta, útero, pulmão). A presença de proteínas virais em neurônios, pneumócitos, hepatócitos e células epiteliais renais, também já foi demonstrada através de imuno-histoquímica com Anti-E (clone 4G2) (Ngono e Shresta, 2018).

Estudos com modelos murinos têm sido bastante aplicados na investigação da diversidade no tropismo celular que o ZIKV apresenta. Camundongos C57BL/6 tratados com anticorpos contra o receptor para Interferon tipo I mostraram permissividade a infecção em células neuronais e no nervo óptico. Rossi et al. (2016) avaliaram a disseminação do vírus em diferentes órgãos como coração, pulmão, fígado, baço, rim, cérebro e testículos nas linhagens A129 e AG129. Embora o vírus tenha sido detectado em todos os órgãos mencionados, os principais sítios de replicação do ZIKV foram baço, testículos e cérebro. Vale destacar que, em camundongos A129, a presença de vírus no cérebro precedeu o aparecimento de sinais neurológicos em cerca de dois dias, cinética similar a que ocorre em outros flavivírus neurotrópicos (Lobigs et al. 2003).

A infecção de células de Leydig, em camundongos *lfnar1*^{-/-}, foi associada a diminuição na produção de testosterona e atrofia testicular (Uraki et al. 2017). A detecção viral recorrente no testículo de animais em diferentes modelos murinos representa outro achado importante que pode explicar ou fornecer bases para o entendimento acerca de uma possível transmissão sexual já apontada em casos de infecção em humanos (Rossi et al. 2016, Lazear et al. 2016). A caracterização de um modelo para esse parâmetro possibilitaria a pesquisa de pontos-chave como, por exemplo, a definição dos componentes celulares que suportam a persistência da infecção e fazem com que esses órgãos funcionem como sítios privilegiados para a replicação viral e para evasão da resposta imune.

Além da detecção nos órgãos do sistema reprodutor, tem sido estudada a presença do vírus no sêmen. Utilizando camundongos AG129, Duggal et al. (2017) observaram que as células testiculares contribuem como fonte de reserva viral a partir da qual o vírus pode se disseminar para o fluido seminal. Por meio de imunohistoquímica, foi possível detectar antígenos virais nos epitélios do epidídimo e testículo e em células germinativas, até 33 dias após a infecção, em camundongos não-vasectomizados. Recentes investigações revelaram que embora o ZIKV possa ser detectado no sêmen de homens infectados por até nove meses pós-infecção, a transmissão sexual do vírus geralmente ocorre dentro de 20 dias e a quantidade de vírus no sêmen reduz consideravelmente nos primeiros três meses (Mead et al. 2018).

Em consonância com o abrangente tropismo que o ZIKV possui, o RNA viral tem sido isolado a partir de diversos fluidos humanos incluindo saliva, urina,

lágrimas, humor aquoso, leite materno e fluidos vaginais, com níveis de expressão variáveis de acordo com o sítio de detecção (Lazear et al. 2016; Rossi et al. 2016).

Esse tropismo diverso é um fator de virulência importante visto que determina também a diversidade de formas de transmissão do ZIKV e pode gerar consequências graves a depender do órgão infectado. A capacidade de passar pela placenta, pela barreira hemato-encefálica e infectar o cérebro de fetos são aspectos relevantes para entender a patogênese da síndrome congênita do ZIKV que vem sendo diagnosticada em neonatos. Por outro lado, a permissividade da infecção viral na barreira hemato-testicular e a detecção nos tratos urogenitais masculino e feminino são relevantes para investigação sobre a transmissão sexual.

O conhecimento acerca da cinética, níveis de expressão, sítios de infecção e modos de transmissão viral é importante também para o desenvolvimento de antivirais e determinar a idade e o público-alvo das vacinas. Contudo, embora já se tenha informações sobre o tropismo celular, algumas questões ainda não estão bem elucidadas sobre como o vírus cruza o epitélio intacto, acessa fluidos corporais específicos alcançando sítios imuno-privilegiados e persiste nesses sítios específicos.

2.1.5 Aspectos imunológicos e estratégias vacinais anti-ZIKV

As graves consequências que podem advir da infecção pelo ZIKV bem como sua emergência e re-emergência em diversos países impulsionaram a busca por medidas de imunoprofilaxia, com destaque ao desenvolvimento de vacinas (Abbink et al. 2018). Diversos grupos de pesquisa vêm trabalhando nesse sentido, com abordagens vacinais que incluem vírus inativados purificados, partículas semelhantes a vírus (VLPs), vírus quiméricos e vacinas baseadas em ácidos nucleicos (Barret et al. 2018). Parte das principais vacinais em desenvolvimento está listada na Tabela 2. Algumas dessas vacinas já se encontram em fase de avaliação clínica, enquanto outras ainda estão sendo avaliadas em ensaios pré-clínicos.

Tabela 2. Principais estratégias de imunização profilática anti-ZIKV em fase de avaliação clínica (Adaptada de Abbink et al. 2018)

Vacina	Antígeno	Estágio da Vacina	Referências
ZPIV	Vírion	Fase I	Larocca et al. 2016; Abbink et al. 2017; Modjarrad et al. 2017
DNA	prM-ENV	Fase I/II	Dowd et al. 2016; Abbink et al. 2017; Gaudinski et al. 2017
Ad	prM-ENV	Fase I	López-Camacho et al. 2018; Xu et al. 2018
mRNA	prM-ENV	Fase I/II	Pardi et al. 2017; Richner et al. 2017
MVA	NS1	Fase I	Brault et al. 2017
MV	prM-ENV	Fase I	ZIKAVAX, 2018

ZPIV: *ZIKV purified inactivated virus vaccine*. Ad: *adenovirus-based vaccine*. MVA: *modified vaccinia virus Ankara*. MV: *measles virus-based vaccine*. LAV: *live attenuated virus*.

A rapidez no processo de desenvolvimento se deve, em parte, a experiência acumulada na geração de estratégias de sucesso contra outros Flavivírus. A existência de múltiplas vacinas em desenvolvimento fornece opções que sejam eficazes e seguras, e que tenham um custo de produção que viabilize sua ampla distribuição. Grande parte das atuais estratégias vacinais emprega as proteínas prM, E e NS1, raciocínio semelhante ao empregado para outros flavivírus com o DENV. Anticorpos específicos Anti-E estão relacionados a proteção imune como já demonstrado em experimentos de desafio pós-vacinação, e por isso, e dada as funções que a proteína E desempenha dentro do ciclo viral, essa proteína tem sido extensamente explorada como antígeno vacinal (Goo et al. 2018). A Figura 6 mostra a posição de parte dos epítomos-alvo de anticorpos presentes na estrutura da proteína do envelope. Diferentes estudos vêm destacando o papel desses anticorpos em neutralizar o ZIKV, proteger contra a infecção letal ou transmissão vertical, além de apresentar atividade terapêutica em primatas não-humanos (Dai et al. 2016; Fernandez et al. 2017; Abbink et al. 2018).

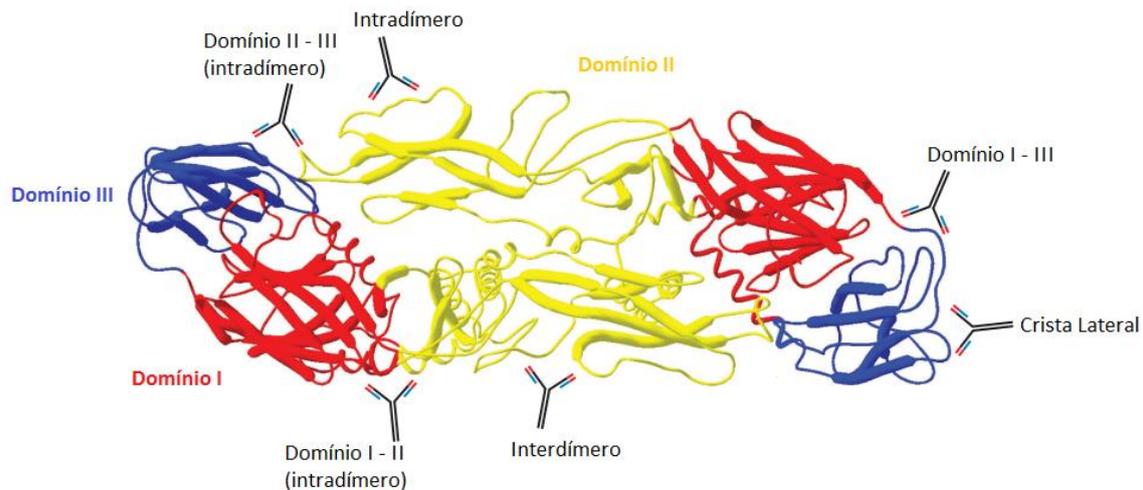


Figura 6. Dímero da proteína do envelope e epítomos-alvo de anticorpos neutralizantes monoclonais Anti-E. A figura evidencia os três domínios que compõem o envelope viral e mostra os diferentes pontos que são potenciais alvos de anticorpos que podem neutralizar a infecção pelo ZIKV e vem sendo exploradas no design de vacinas (Adaptado de Diamond et al. 2019).

Por outro lado, experimentos em animais modelo têm sugerido que a proteção a infecção por Flavivírus é mediada não só por anticorpos dirigidos contra a proteína do envelope como também para a proteína NS1, de modo que essa proteína não-estrutural também tem sido vista como um antígeno vacinal interessante (Heinz e Stiasny, 2012). NS1 pode ser encontrada em múltiplas formas oligoméricas e localizações celulares: associada a membranas, compartimentos vesiculares dentro das células e na superfície da célula hospedeira infectada (Muller e Young, 2013). Acredita-se que esse mecanismo de proteção seja dependente do reconhecimento e ligação de anticorpos a NS1 que pode se encontrar ligado a membrana de células infectadas. Essa ligação facilitaria a fagocitose e *clearance* das células infectadas (Muller e Young, 2013; Song et al. 2016).

Além da indução da produção de anticorpos específicos que é fundamental para neutralizar a infecção viral, respostas mediadas por anticorpos e por células T são determinantes para o controle do curso da infecção de flavivírus e, em conjunto, precisam ser bem caracterizadas e consideradas no desenvolvimento de abordagens antivirais (Ngono e Shresta, 2018). Respostas anti-ZIKV mediadas por células T têm sido caracterizadas em camundongos, primatas não-humanos e em humanos (Pardy et al. 2017; Grifoni et al. 2017; Dudley et al. 2016). Estudos com camundongos deficientes em células CD8 obtiveram resultados que mostram a importância dessas células em controlar o aumento da carga viral e da mortalidade

dos animais (Ngono et al. 2017). Experimentos com transferência adotiva têm apontado papéis críticos para o controle da infecção mediados não só por células T CD8+, como também por T CD4+ (Huang et al. 2017; Lucas et al. 2018). Vale ressaltar também o fato de que a maioria das respostas mediadas por anticorpos é timo-dependente, exigindo a presença de células T CD4+ para troca das classes de anticorpos bem como para a maturação da afinidade desses anticorpos pelos antígenos-alvo (Lima et al. 2017). Desse modo, o racional por trás do desenvolvimento de estratégias vacinais deve incluir não só a indução de anticorpos neutralizantes, como também o estímulo a ativação de células CD4+ e CD8+.

As diferentes plataformas vacinais que vem sendo testadas apresentam variações em relação ao padrão de resposta obtido, no que diz respeito a indução de resposta humoral ou celular, indução de proteção ou controle à infecção, inibição da replicação e disseminação viral, e minimização dos potenciais efeitos patogênicos que o ZIKV pode ocasionar. Essas variações ocorrem a depender do tipo de abordagem empregada e do antígeno vacinal, mas também são influenciadas pelo modo como são avaliadas. É importante pontuar que nem sempre as amostras clínicas são coletadas no mesmo período pós-vacinação e as análises das respostas mediadas por células B e T, e pelos anticorpos neutralizantes variam com relação ao ensaio imunológico utilizado, substratos celulares e técnicas escolhidas (Diamond et al. 2019).

Uma vez que se estabeleçam vacinas eficazes contra o ZIKV, outras questões precisarão ser respondidas antes da ampla distribuição dessas vacinas, como, por exemplo, a definição do público-alvo da vacina. Alguns grupos são considerados prioritários para imunização, entre eles estão mulheres em idade fértil, incluindo gestantes, como estratégia para prevenir infecções congênitas. Esse público levanta uma questão sobre a segurança das vacinas desenvolvidas e limita a aplicação de vacinas que utilizam vírus ainda que atenuados ou inativados. A longo prazo, a vacinação da população geral incluindo crianças e adultos é vista como uma medida efetiva para reduzir a circulação do vírus em regiões endêmicas, induzindo uma imunidade ampla e minimizando a disseminação do vírus (Heinz e Stiasny, 2017).

2.2 LEVEDURAS COMO HOSPEDEIRAS PARA EXPRESSÃO HETERÓLOGA

2.2.1 O modelo *Pichia pastoris*

A expressão heteróloga baseada em leveduras tem se estabelecido como sistema para produção e secreção de proteínas recombinantes de animais, plantas, bactérias, fungos e vírus, de modo que, atualmente, estima-se que cerca de 20% dos produtos biofarmacêuticos disponibilizados no mercado sejam produzidos em leveduras (Kim et al. 2010; Roohvand et al. 2017). Neste cenário, *Pichia pastoris* é uma das leveduras mais empregadas para expressão heteróloga cobrindo um amplo espectro de proteínas recombinantes (Tabela 3).

P. pastoris, atualmente re-classificada como *Komagataella phaffii*, pertence a um grupo de leveduras denominadas metilotróficas, o que significa que elas são capazes de crescer em metanol como única fonte de carbono. Essa espécie se destaca como um microorganismo interessante para produção de proteínas recombinantes exploradas tanto na pesquisa básica quanto em escala industrial (Weinacker et al. 2013). Esse destaque se deve a características como facilidade de manipulação genética e habilidade de crescer (e expressar genes heterólogos) em altas densidades celulares, em meios de cultura simples e baratos. O *status* GRAS (*Generally Recognized as Safe*) garante a segurança de manipulação desse organismo e na utilização dos produtos dele derivados (Kim et al. 2010).

Tabela 3. Produtos biofarmacêuticos comercializados produzidos em *P. pastoris* (Adaptado de Kim et al. 2015)

Proteína	Área terapêutica	Companhia
Ecallantide	Angioderma hereditário	Dyax (EUA)
Insulina	Diabetes tipo 2	Biocon (Índia)
Albumina sérica humana	Expansão do volume sanguíneo	Mitsubishi Tanabe Pharma (Japão)
Vacina anti-hepatite	Hepatite B	Shantha/Sanofi (Índia)
IFN-α 2b	Hepatite C	Shantha/Sanofi (Índia)
Ocriplasmin	Adesão vitreomacular	ThromboGenics (Bélgica)
Anti-IL-6R Ac	Artrite reumatóide	Ablynx (Bélgica)
Anti-RSV Ac	Infecção causada pelo vírus respiratório sincicial (RSV)	Ablynx (Bélgica)
HB – EGF	Tratamento de cistite intersticial	Trillium (Canadá)
Colágeno	Preenchimento dérmico	Fibrogen (EUA)

Os sistemas baseados em leveduras metilotróficas são vantajosos por evitar alguns obstáculos geralmente encontrados quando se utiliza leveduras como *S. cerevisiae* como sistema de expressão. Essas vantagens incluem estabilidade mitótica das linhagens recombinantes, padrões de modificações pós-traducionais, como glicosilações, mais semelhantes às realizadas por eucariotos superiores e possibilidade das proteínas produzidas em altos níveis (Daly e Hearn, 2005).

Várias linhagens de *P. pastoris* estão disponíveis para expressão, bem como diferentes linhas de vetores, os quais proporcionam tanto a expressão intra quanto extracelular (Ahmad et al. 2014). Esses diversos vetores também podem oferecer diferentes opções de promotores de expressão ativada a partir da adição de agentes indutores como metanol (promotor *AOX*), ou de expressão constitutiva (*GAP* e *PGK*) que geralmente são promotores de genes ativamente transcritos, podendo codificar proteínas-chave de vias metabólicas da levedura (Macauley-Patrick et al. 2005; Arruda et al. 2016).

Diante desses atributos, *P. pastoris* tem sido investigada para produção de antígenos vacinais de origem viral que compõem vacinas de subunidade, podendo ser proteínas purificadas ou VLPs (Mariz et al. 2015). A expressão em *P. pastoris* tem sido explorada para a produção de proteínas de diversos Flavivírus, grande parte deles tendo como alvo a proteína do envelope viral (E) visando desenvolver vacinas contra TBEV (Yun et al. 2014), Encefalite japonesa (Kwon et al. 2012) e Dengue (Mani et al. 2013; Bal et al. 2018).

2.2.2 Leveduras como vetores vacinais

Diversas espécies de leveduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Yarrowia lipolytica*, *Schizosaccharomyces pombe* e *Kluyveromyces lactis* vem sendo empregadas na síntese de produtos imunobiológicos (Kim et al. 2014). Todas essas espécies citadas apresentam status GRAS (*Generally Recognized as Safe*), garantindo segurança em sua aplicação com “biofábrica” para produtos de interesse farmacêutico (Vogl et al. 2013). Além disso, essas espécies já tiveram seu genoma sequenciado o que permite a manipulação de características que melhorem as condições de cultivo, seleção e rendimento (Rosales-Mendoza et al. 2016).

Nos últimos 20 anos, diversos estudos tem demonstrado as vantagens e desvantagens em se utilizar leveduras recombinantes não apenas como biofábricas,

mas também como vetores vacinais (Stubbs et al. 2001; Kumar e Kumar, 2019). Os aspectos mais atraentes desse tipo de abordagem são a habilidade de induzir respostas imune específicas contra o antígeno que está sendo carregado e as propriedades adjuvantes que as leveduras utilizadas apresentam (Ardiani et al. 2010). Estratégias vacinais nesse contexto vêm sendo testadas contra diferentes agentes infecciosos, incluindo vírus e fungos (Tabela 4). Essa abordagem tem sido aproveitada também em estratégias anti-câncer, utilizando leveduras recombinantes expressando antígenos tumorais. Trials de avaliação clínica em fase I/II tem exibido resultados promissores quanto a tolerância, segurança e imunogenicidade dessas vacinas terapêuticas (Franzuoff et al. 2005; Bilusic et al. 2014; Heery et al. 2015; Cohn et al. 2018).

Os antígenos recombinantes podem ser proteínas inteiras derivadas do patógeno – alvo ou epítomos dessas proteínas que são críticos para a indução da resposta imune requerida (Kim et al. 2010; King et al. 2014). Essas proteínas podem ser carregadas pelas leveduras estando presentes no compartimento intracelular ou expostas na superfície celular através de sistemas de ancoragem (Bazan et al. 2011). Além de antígenos protéicos, o transporte de ácidos nucleicos no contexto de vacinas de DNA ou mRNA também vem sendo explorado (Breinig et al. 2013; Walch-Rückheim et al. 2016).

Em relação ao antígeno vacinal, dois parâmetros são considerados determinantes: concentração e imunogenicidade. Podem ser feitas otimizações para ajustar a concentração do antígeno e o número de unidades de levedura suficientes para induzir proteção ou tratar doença pré-existente. Considerando as propriedades adjuvantes das leveduras, a depender da imunogenicidade do antígeno, uma resposta imune adequada pode ser obtida mesmo com uma baixa concentração da proteína recombinante, aumentando-se apenas o número de células de leveduras por dose. É válido enfatizar que devido a simplicidade no processo de cultivo das leveduras e as altas densidades celulares que podem ser alcançadas, milhares de doses podem ser produzidas por litro de cultura.

Tabela 4: Exemplos de estratégias vacinais baseadas na utilização de levedura como plataforma de *delivery* antigênico

Levedura	Agente Infeccioso	Rota	Modelo Animal	Ref.
<i>K. lactis</i>	Infectious bursal disease virus	Subcutânea e oral	Camundongo e galinha	Arnoud et al. 2012
	Influenza A vírus	Subcutânea	Camundongo	Gebauer et al. 2019
<i>H. polymorpha</i>	Hepatite B	Intramuscular	Camundongo	Bian et al. 2010
<i>P. pastoris</i>	<i>Plasmodium berghei</i>	Subcutânea	Camundongo	Jacob et al. 2014
	Papilomavírus humano	Subcutânea	Camundongo	Bolhassani et al. 2014
	Highly pathogenic avian influenza	Oral	Galinha	Wasilenko et al. 2009
<i>S. cerevisiae</i>	Dengue	Oral	Camundongo	Bal et al. 2018
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Oral	Camundongo	Kenngott et al. 2016
	H5N1 avian influenza virus	Intramuscular e Intraperitoneal	Camundongo	Lei et al. 2016
	Porcine circovirus tipo 2	Oral	Porco	Patterson et al. 2012
	Hepatite B	Subcutânea	Camundongo	King et al. 2014
	<i>Eimeria tenella</i>	Oral	Galinha	Sun et al. 2014
	<i>Candida albicans</i>	Oral	Camundongo	Shibasaki et al. 2013
	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Oral	Camundongo e porco	Shin et al. 2013
	<i>Vibrio harveyi</i>	Intraperitoneal	Peixe	Zhu et al. 2006

Algumas características-chave reforçam as vantagens de se utilizar leveduras como plataforma vacinal: dispensa purificação do antígeno recombinante, relativamente fácil obtenção de leveduras recombinantes em larga escala e, diferente de vetores virais, ausência de indução de resposta humoral neutralizante

voltada a levedura mesmo mediante repetidas imunizações, em estudos pré-clínicos (Shibasaki et al. 2013; King et al., 2014).

O incremento nos processos de entrega e apresentação de antígenos para células do sistema imune é um dos fundamentos na utilização de adjuvantes. A utilização de leveduras como carreadoras vacinais garante o *delivery* de antígenos para células efetoras do sistema imune ao mesmo tempo que dispensa a adição de adjuvantes devido a composição da parede celular que apresenta propriedades imunoestimulatórias (Ardani et al. 2010; Orlean, 2012; Sukhithasri et al. 2013; Bazan et al. 2014).

Embora todos os componentes da parede celular apresentem efeitos imunoestimulatórios, os β -(1 \rightarrow 3)-glucanos destacam-se como os principais *biological response mediators* (BRM) apresentando propriedades que incluem a capacidade de ativar componentes da imunidade inata como macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e células NK, além de estimular a produção de citocinas como TNF α , 1L- β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-23 e IL-27, induzir a fagocitose e a ativação da imunidade adaptativa (Mantovani et al. 2008; Goodridge et al. 2009; Ardiani et al. 2010; Vetvicka, 2011; Kanjan et al. 2017; Bazan et al. 2018).

De uma maneira geral, essas citocinas produzidas atuam no desenvolvimento de respostas imunes com perfil Th1 e Th17. Dentre as citocinas que tem seu aumento induzido pela administração de leveduras, destaca-se o aumento na expressão de IL-12, IL-23 e IL-27 que atuam como polarizadoras para diferenciação de células Th1, induzindo a expansão de células T CD8+ e a produção de IFN- γ , o que pode ser interessante em abordagens vacinais anti-virais e anti-câncer (Driscoll et al. 2009; Tamburini et al. 2013; Smet et al. 2014; Bazan et al. 2018).

β -glucanos podem ativar células apresentadoras de antígeno mediante a ligação a diferentes receptores envolvidos na imunidade inata como *Toll-like receptors* (TLR) -2, -4 e -6, Dectin-1, CR3 (*complement receptor*) (Novak e Vetvicka, 2008). Dentre esses receptores, Dectin-1 é considerado o mais importante para ligação de β -glucanos, sendo um dos principais receptores celulares da imunidade inata, expresso principalmente em macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e eosinófilos (Brown et al. 2003; Barreto-Bergter e Figueiredo, 2014). A ligação a esse receptor promove maturação e ativação de macrófagos e células dendríticas, levando a um aumento na expressão de marcadores como CD40, CD54 (ICAM),

CD80, CD83, CD86, além de moléculas de MHC classe I e MHC classe II (Barron et al. 2006).

Os níveis de expressão desses marcadores são comparáveis aos induzidos pela exposição ao lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano, classicamente utilizado para induzir a maturação de células dendríticas em ensaios *in vitro* (Stubbs et al. 2001; Bazan et al. 2018). As moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 (moléculas B7) são encontradas especificamente na superfície de células que são capazes de estimular a proliferação de células T, e o aumento na expressão desses marcadores de superfície estimulado por leveduras pode ser comparativamente superior aos níveis induzidos por outros adjuvantes (Bian et al. 2010; Berner et al. 2015; Bazan et al. 2018).

Os efeitos imunoestimulantes induzidos pelas leveduras podem ser superiores aos induzidos por outros adjuvantes classicamente utilizados. Estudos utilizando a levedura *Hansenula polymorpha*, como carreadora vacinal para o vírus da Hepatite B, reportaram um maior aumento na população de células dendríticas (CD11c⁺) e células T (CD3⁺), comparado ao induzido pela imunização do antígeno vacinal conjugado ao alum chegando a uma diferença de 2.2-vezes (Bian et al. 2010).

Além da composição da parede celular, o diâmetro das leveduras (2–5 µm) também representa uma vantagem por privilegiar o processo de fagocitose por células especializadas em apresentar antígenos que podem englobar antígenos particulados, resultando numa apresentação específica e eficiente para células T (Berner et al., 2008; Kim et al. 2014; Liu et al. 2018; Xiang et al. 2006). As leveduras recombinantes utilizadas como vacinas concentram os antígenos em “pacotes”, que são avidamente internalizados pelas APCs. Tal mecanismo é interessante por aumentar a quantidade de antígenos disponíveis para processamento e apresentação (Stubbs et al. 2001).

Quando as leveduras utilizadas como vacinas entram em contato com macrófagos ou células dendríticas e são fagocitadas, o antígeno recombinante que havia sido carreado pode ser degradado nos proteossomos e apresentado via MHC classe I, sendo reconhecido por células T CD8 citotóxicas; ou pode ser degradado nos endossomos e ser, neste caso, apresentado via MHC classe II, para posterior reconhecimento por células T CD4 auxiliares (Ardiani et al. 2010; Bazan et al. 2011). A capacidade de induzir respostas imunes tanto Th1 quanto Th2 já foi demonstrada

em estudos como o de Bian et al (2010), onde foi observado estímulo na secreção das citocinas IFN- γ e IL-4.

Vale pontuar que embora citocinas características de um perfil imune Th2 tenham sua secreção estimulada pela imunização com leveduras, há indícios de uma tendência para polarização de uma resposta Th1, que pode ser confirmada pelo aumento na taxa IgG2a/IgG1 induzida pela imunização com diferentes espécies de leveduras recombinantes, como *H. polymorpha* e *P. pastoris* (Bian et al. 2010; Bolhassani et al. 2014). A indução da produção de anticorpos IgG2a é associada com aumento da eficiência da vacinação contra o vírus da Influenza e já foi avaliada mediante imunização com *S. cerevisiae* recombinante expressando a hemaglutinina viral (EBY100/pYD1-HA) (Lei et al. 2016).

2.2.3 Ancoragem de proteínas na superfície de leveduras

Embora a ativação de mediadores do sistema imune associados a administração de leveduras recombinantes possa ocorrer independente da localização celular da proteína heteróloga na célula, a exposição de antígenos recombinantes na superfície de leveduras pode aumentar a eficiência desse processo (Bazan et al. 2011).

Experimentos conduzidos por Bazan et al. (2011), utilizando *P. pastoris*, mostraram uma resposta imune mediada por células T mais robusta em células com o antígeno recombinante exposto em sua superfície, mesmo com níveis protéicos reduzidos, comparado a células com o antígeno contido no citosol. Essa observação se relaciona com o fato de que a exposição de antígenos na superfície de leveduras facilita o reconhecimento desse antígeno pelo sistema imune, aumentando a capacidade de indução de proteção aos indivíduos vacinados (Lei et al. 2016).

O sistema de *yeast surface display* de proteínas heterólogas é explorado na biotecnologia aproveitando-se de mecanismos para transporte de proteínas intrínsecos da célula, e vem sendo utilizado para diversas aplicações incluindo a produção de biocatalisadores e vacinas, a partir da ancoragem de proteínas de heterólogas de diferentes origens e tamanhos variando de 0.93 KDa a 136 KDa (Kondo et al. 2004; Wasilenko et al. 2009).

No sistema de *yeast surface display*, a proteína-alvo é covalentemente ligada a uma proteína âncora com motivo de *glycosylphosphatidylinositol* (GPI) e ancorada na superfície celular, como exemplificado na Figura 7. As proteínas-âncora pertencem à classe das manoproteínas e incluem aglutininas (Aga1p, Aga1p e Aga2p), Flo1p, Sed1p, Cwp1p, Cwp2p, Tip1p e Tir1p/Srp1p, sendo a α -aglutinina a mais comumente utilizada tanto para *P. pastoris* quanto para *S. cerevisiae* (Wasilenko et al. 2009; Shibasaki et al. 2009; Kim et al. 2010; Ananphongmanee et al. 2015). Estima-se que a utilização de α -aglutinina como proteína âncora permita a disposição de 10^5 - 10^6 proteínas-alvo por célula (Kuroda e Ueda, 2011).

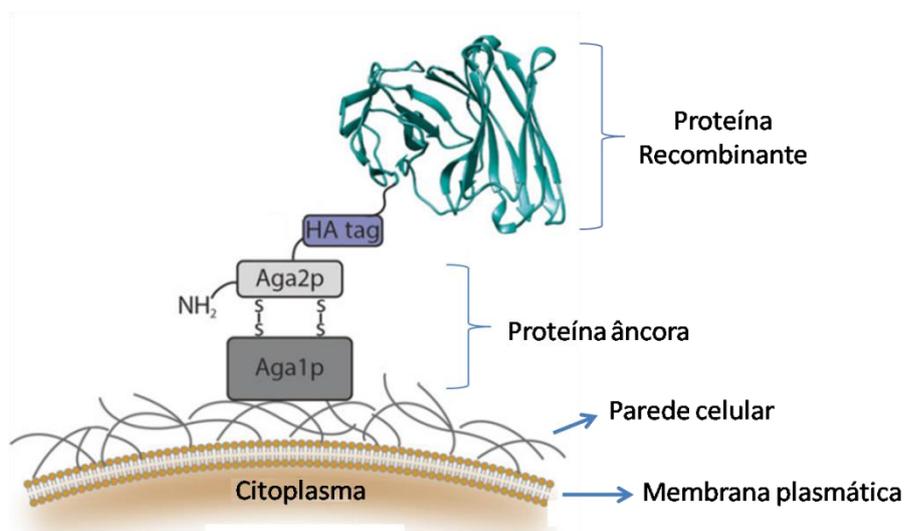


Figura 7. Representação esquemática da exposição de antígenos na superfície de células de levedura. Adaptado de Cherf e Cochran, 2015.

É importante pontuar também que o tratamento com calor utilizado para inativação das leveduras também parece não alterar o padrão de exposição das proteínas ancoradas, viabilizando a utilização dessas leveduras como vacinas (Patterson et al. 2012). Além disso, as proteínas recombinantes expostas têm sua estrutura conservada, com preservação de seus sítios antigênicos, o que é essencial para o reconhecimento específico dos antígenos vacinais (Kenngott et al. 2016; Lei et al. 2016). Desse modo, o sistema de exposição de proteínas na parede das leveduras se configura como um modelo interessante a ser testado como plataforma vacinal, como forma de melhorar a apresentação antigênica.

3 MÉTODO

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Linhagens de Microorganismos e condições de cultivo

Escherichia coli Top10 [(F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*ara leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (StrR) *endA1* *nupG*)] foi utilizada como organismo hospedeiro para os experimentos de clonagem. Nas etapas de transformação em *E. coli*, repique e inóculo foi utilizado o meio de cultura Luria-Bertani (LB) *low salt* que apresenta a seguinte composição: triptona 1%, extrato de levedura 0.5% e NaCl 0.5%, adicionando 25 μ g/mL de Zeocina (Invitrogen). Para meio sólido, foi acrescentado 1,5% de ágar. O cultivo das colônias foi realizado a 37°C, 16-18h. Para o cultivo de células transformadas com o vetor pClone, foi utilizado meio LB acrescido de ampicilina 100 μ g/mL.

Para produção das proteínas, a levedura *P. pastoris* GS115 (*his4*) foi empregada. O meio de cultura utilizado nas placas de transformação foi o YPDS composto por extrato de levedura 1%, peptona 2%, dextrose 2%, sorbitol 1M, ágar 1,5%. Para os ensaios de indução, as culturas foram feitas em YPD (extrato de levedura 1%, peptona 2%, dextrose 2%). Para seleção dos transformantes, foi utilizado Zeocina numa concentração de 100 μ g/mL. As culturas foram incubadas a 29°C.

As culturas com células imunológicas foram realizadas em meio RPMI completo (RPMI 1640 com HEPES e Soro Fetal Bovino; Sigma - Aldrich), à 37°C em estufa com 5% de CO₂.

3.1.2 Soluções e Tampões

Soluções para extração de DNA plasmidial, segundo protocolo descrito por SAMBROOK et al (1989): Solução I: Tris-HCl 25mM, EDTA (Ácido Tetracético Etilenodiamina) 10mM, glicose 50mM, água destilada estéril; Solução II: NaOH 0,4N, SDS 2%; Solução III: acetato de potássio 5M, ácido acético glacial, água destilada estéril.

Tampão de corrida para eletroforese de DNA: TAE 10x: Tris base 400mM, ácido acético 190mM, EDTA 10mM pH 7.6.

Tampão para lise das leveduras: 50mM NaH₂PO₄, 5% glicerol, PMSF 1mM.

Soluções para SDS-PAGE: Tampão de corrida (10x, pH 8.6): Tris 25mM, SDS 0,1%, glicina 192mM; Tampão de Amostra 2X (L2x): Tris-HCl (pH 6.8 - 0.5M), glicerol 100%, SDS 10%, Azul de bromofenol, 2-Mercaptoetanol; *Coomassie Brilliant Blue*: azul de Coomassie-blue G-250 0,05%, metanol 45%, ácido acético 10% e água destilada estéril 45%; Solução descorante: Ácido acético 7%, metanol 25% e água destilada estéril 68%.

Soluções para transferência e *Western blot*: Tampão de transferência: Tris 60mM, Glicina 48mM, SDS 10%, metanol 20%; Solução tampão TBS (Tris-Salina) 10x: Tris-HCl 0.5M, NaCl 1.5M pH 7.6 (para solução de lavagem com TBS-Tween, diluir 1:100 e acrescentar 100µL de Tween para 1L de TBS 1x); Solução de bloqueio: leite 5% diluído em TBS-Tween.

3.1.3 Géis para Eletroforese de DNA e de Proteínas

Para realização de eletroforese para DNA foram utilizados géis de agarose a 1% com o tampão TAE 1X. Foi adicionado ao gel solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) para promover visualização das bandas de DNA através de um transluminador de luz ultravioleta. O material foi aplicado junto com tampão de amostra (*Loading Dye* 6X), tendo como referencial o marcador de 1Kb (Gene Ruler DNA Ladder, *Loading Dye* e água milliQ).

Os géis de poliacrilamida para SDS-PAGE foram preparados com concentração de 12,5%. As amostras do extrato protéico foram ressuspendidas em tampão desnaturante (L2x) e aquecidas a 75°C (10 minutos). Foi empregado o tampão de corrida para SDS-PAGE 1X. As corridas de eletroforese foram realizadas com fonte de tensão constante e ajustável por cerca de 90 minutos, 35mA. Para visualização das bandas de proteínas, os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue*. Como referencial para análise das bandas de proteínas, foi utilizado marcador de peso molecular *Page Ruler Prestained Protein Ladder* (ThermoScientific).

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 *Design* dos Genes

Visando aperfeiçoar a resposta imune induzida pelas proteínas do Envelope e NS1, optou-se por selecionar epítomos imunogênicos específicos para cada proteína

(Tabela 5). A seleção se deu a partir da avaliação de estudos de predição de epítomos do ZIKV, publicados no ano de 2016 (Badawi et al., 2016; Dar et al., 2016; Dikhit et al., 2016). Para a proteína do envelope, foram selecionados oito epítomos tendo como alvo células B, moléculas de HLA-I e HLA-II. Em relação a NS1, foram selecionados seis epítomos com capacidade de interação com moléculas HLA-I e HLA-II (Figura 8). Foram selecionados epítomos com cobertura de, no mínimo, sete alelos visando abranger as diferentes variantes alélicas que as moléculas de HLA apresentam. O isolado viral utilizado como referência foi ZIKV/H.sapiens/Brazil/PE243/2015 (GenBank: KX197192.1).

Tabela 5. Sequências dos epítomos selecionados a partir da proteína Envelope e NS1

Peptide	Sequence	Target
E ₈₂₋₉₁	LDKQSDTQYV	B cell
E ₁₁₃₋₁₂₁	LVTCAKFAC	HLA-DR
E ₁₆₈₋₁₇₆	NSPRAEATL	HLA-A
E ₂₉₄₋₃₀₂	LRLKGVSY	HLA-A and DR
E ₃₂₅₋₃₃₆	EVQYAGTDGPCK	B cell
E ₃₅₃₋₃₆₁	RLITANPVI	HLA-A and DR
E ₄₇₁₋₄₇₉	LGLNTKNGS	HLA-DR
E ₄₈₃₋₄₉₁	MCLALGGVL	HLA-A
NS1 ₇₁₋₇₉	VREDYSLEC	HLA-DR
NS1 ₈₄₋₉₂	VQLTVVVG	HLA-DR
NS1 ₁₈₈₋₁₉₆	VKGREAAHS	HLA-DR
NS1 ₂₁₀₋₂₁₈	WRLKRAHLI	HLA-DR
NS1 ₂₆₅₋₂₇₃	KGPWHSEEL	HLA-A
NS1 ₃₃₀₋₃₃₈	WYGMEIRPR	HLA-DR

References: Badawi et al., 2016; Dikhit et al., 2016; Dar et al., 2016

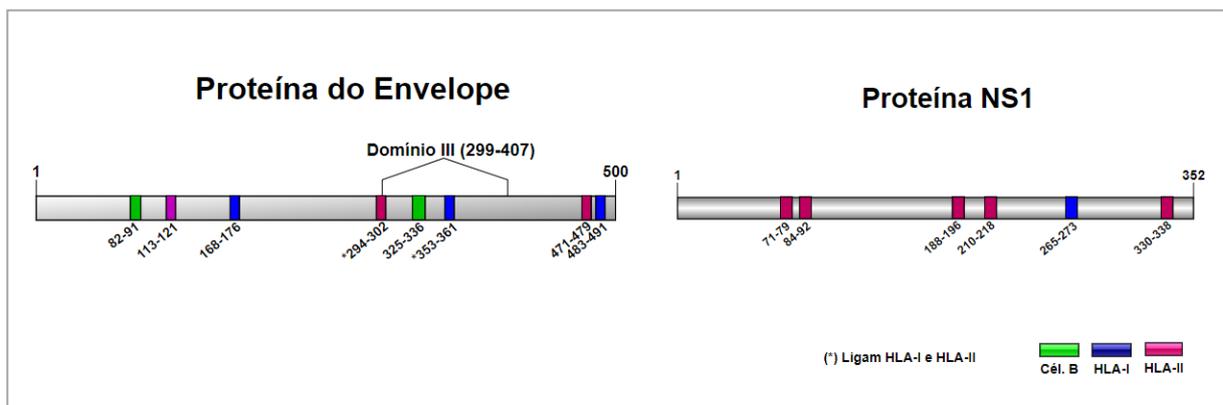


Figura 8. Disposição dos epítomos selecionados dentro das proteínas Envelope e NS1. Fonte: Autora.

3.2.2 Construção do Cassete de Expressão

O cassete, esquematizado na Figura 9, foi desenhado com sítios de restrição que permitem a clonagem no vetor pPGK Δ 3 α (de Almeida et al. 2005; vetor não-comercial cedido pelo Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres/ Universidade de Brasília). Esse vetor apresenta o gene do *PGK1* como promotor de indução constitutiva, e o peptídeo sinal MF- α (a-mating factor) para a secreção das proteínas produzidas. O MF- α presente no pPGK Δ 3 α é derivado de *S. cerevisiae* e teve sua sequência otimizada para expressão em *P. pastoris*. Além disso, a fusão da α -aglutinina ao C-terminal das proteínas de interesse permite a exposição destas na superfície da levedura.

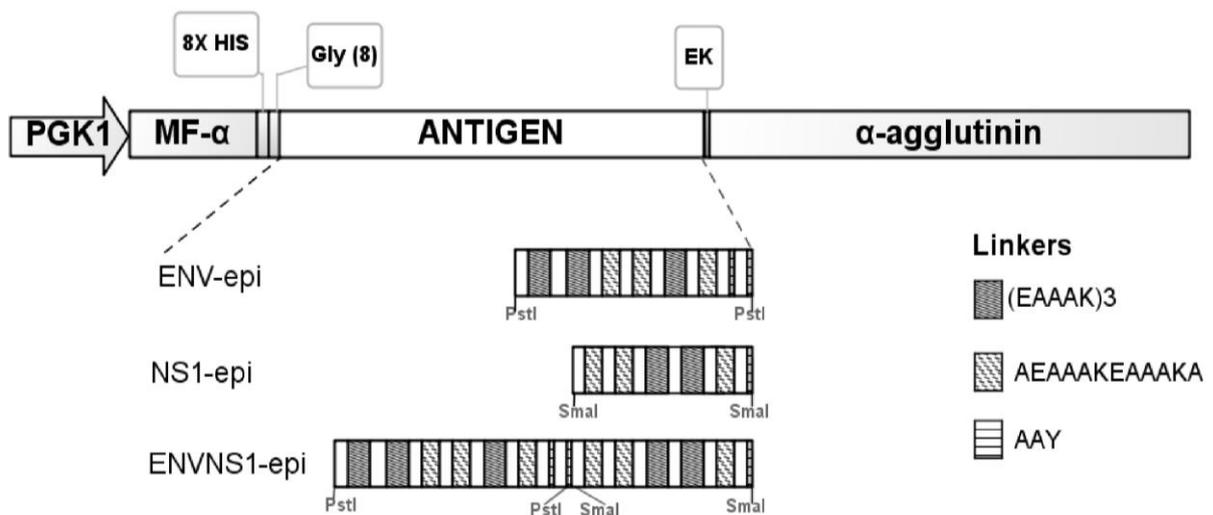


Figura 9. Esquema geral do cassete de expressão e disposição das sequências espaçadoras para cada construção vacinal. *PGK1*: promotor constitutivo; MF- α : peptídeo sinal para secreção proteica; 8x HIS: tag de histidina que permite a imunodeteção das proteínas recombinantes; Gly (8): *linker* para auxiliary no *fold*ing de peptídeos fusionados a HIS-tag (Chen et al., 2013); EK: sítio de enteroquinase que permite a clivagem entre o antígeno vacinal e a proteína âncora. Fonte: Autora.

A presença do sítio de clivagem para enteroquinase permite a liberação das proteínas ancoradas. Foram inseridos sítios de restrição flanqueando os epítomos selecionados, que permitem que a mesma construção seja tomada como base para formar diferentes cassetes de expressão: apenas com epítomos do envelope, apenas com os de NS1 e com ambos os conjuntos. O *linker* Gly(8) foi inserido no intuito de auxiliar no *fold*ing dos epítomos fusionados a *tag* de Histidina (Chen et al., 2013). A 8xHIS *tag* pode ser utilizada tanto para imunodeteção, utilizando Anti-HIS, quanto

para purificação das proteínas estudadas, através de cromatografia de afinidade utilizando resina carregada com níquel.

Entre cada epítipo, foram adicionados conectores com função de auxiliar na conformação e bioatividade, como as sequências EAAAK e AEAAAKEAACA (Chen et al., 2013). Esses conectores podem ser também sítios de clivagem proteossomal e/ou lisossomal, como no caso do AAY, contribuindo na indução da resposta imune celular (Dolencet al., 1998; Bergmann et al., 1996). A sequência, que compreende desde a *tag* de Histidina até a proteína âncora AG α 1 (α -aglutinina), foi sintetizada e clonada no vetor de passagem pClone, pela empresa GeneOne. O gene que codifica o C-terminal da α -aglutinina foi otimizado para expressão em *P. Pastoris*, porém a sequência de referência para sua síntese foi obtida a partir do genoma de *Saccharomyces cerevisiae*, de abordagem semelhante a desenvolvida por Wasilenko et al. (2009).

3.2.3 Subclonagem no Vetor de Expressão

A partir do vetor pCloneEnvNS1 α Ag (Figura 10) foi possível gerar mais dois plasmídeos diferentes: pCloneEnv α Ag, mediante digestão com a enzima *Sma*I e retirada dos epítipos de NS1, e pCloneNS1 α Ag após clivagem com *Pst*I e remoção dos epítipos do Envelope. Os genes contidos em cada um dos três vetores foram subclonados no vetor de expressão pPGK Δ 3 α , utilizando as enzimas *Xho*I e *Not*I gerando as três construções representadas na Figura 11A - C.

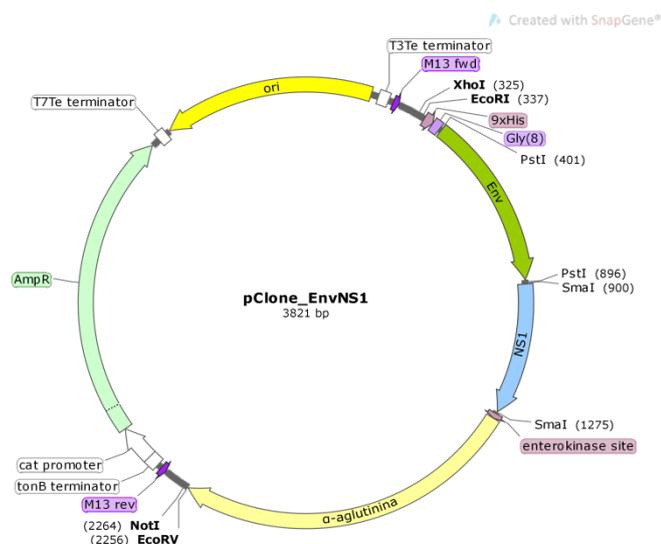


Figura 10. Representação do vetor de passagem pCloneEnvNS1 α Ag. Ilustração gerada a partir do software SnapGene Viewer. Fonte: Autora.

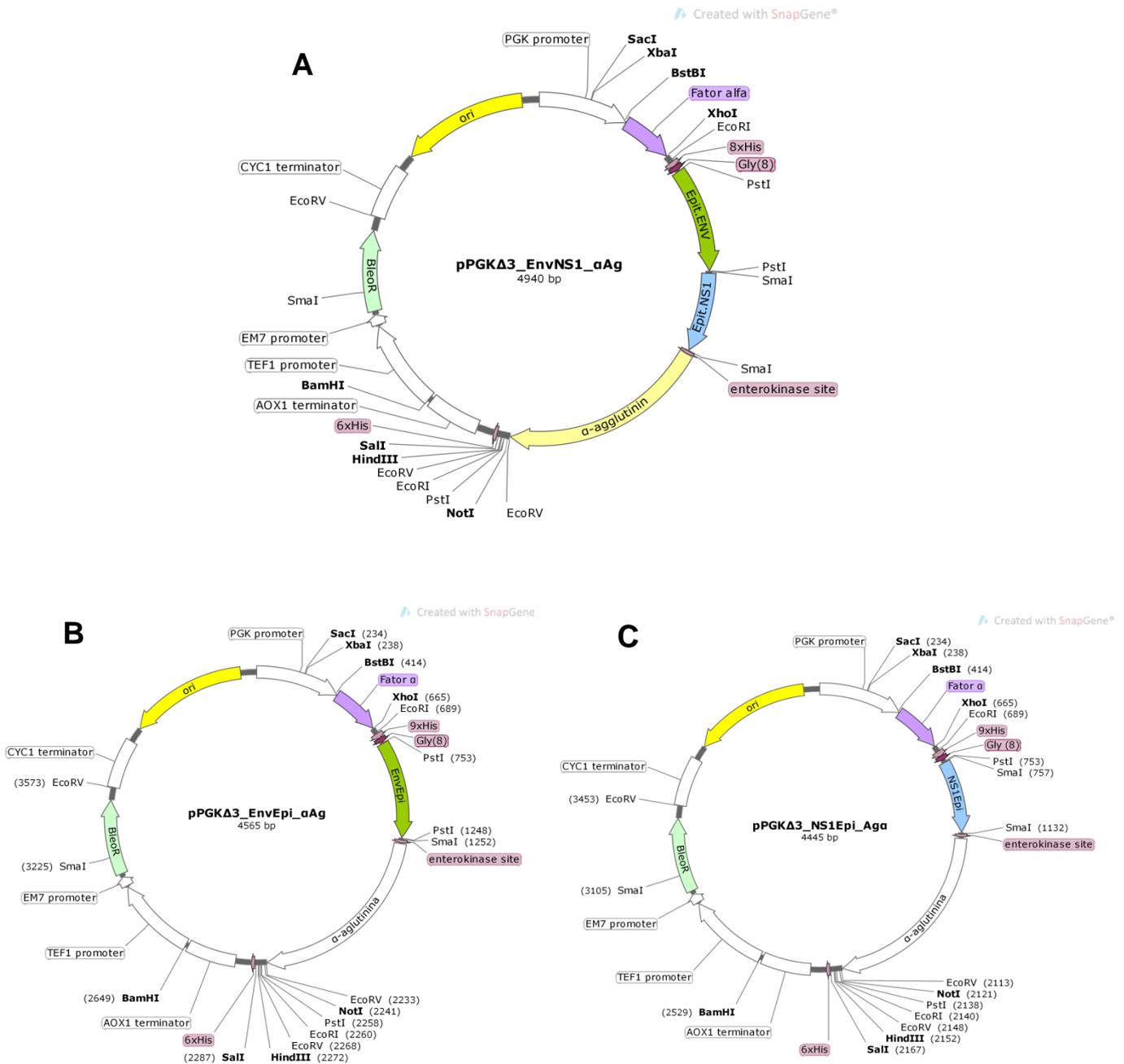


Figura 11. Mapas esquemáticos dos vetores. para expressão em *P. pastoris*. A) pPGKΔ3α_EnvNS1_αAG; B) pPGKΔ3α_Env_αAG; C) pPGKΔ3α_NS1_αAG. Ilustrações geradas a partir do software SnapGene Viewer. Fonte: Autora.

Os insertos e os vetores digeridos foram purificados a partir do gel de agarose utilizando o *kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). A partir de então, os insertos e o vetor foram submetidos à reação de ligação sob ação da enzima *T4 ligase*, seguindo orientações do fabricante (Promega), numa proporção de concentração 5:1 (inserto:vetor). Os plasmídeos resultantes das reações foram utilizados para transformação de *Escherichia coli* (Top10) quimiocompetente previamente tratada com CaCl_2 . O seguinte protocolo de transformação foi seguido:

homogeneização de 50 µL de células competentes com 10 µL da reação de ligação, incubação em gelo 15 – 20 minutos, choque térmico a 42 °C por 1 minuto, resfriamento em gelo por 1 – 5 minutos, adição de 800 µL de meio de cultura e incubação a 37 °C por 1 hora, centrifugação a 1200 rpm por 10 minutos, descarte de 600 µL do sobrenadante e semeio dos 200 µL restantes em placa com meio de cultura e antibiótico. As colônias obtidas foram repicadas em nova placa e a triagem dos clones se deu a partir de inóculo, extração do DNA plasmidial (protocolo Maniatis, Sambrook et al., 1989) e análise de restrição. Foram preparados preservados de todos os clones confirmados (500µL de Glicerol 100% + 500µL de cultura), com acondicionamento a -80°C.

3.2.4 Transformação e Análise dos Recombinantes em *P. Pastoris*

Após confirmação das clonagens, aproximadamente 5-10µg de cada vetor foi linearizado com a enzima *Xba*I, etapa necessária para permitir a integração do cassete de expressão no genoma da levedura, através de recombinação homóloga. Os vetores linearizados foram purificados através de processo de precipitação de DNA com etanol. Passo a passo do protocolo utilizado: 2,5 volumes de etanol absolute gelado e 0,3M de acetato de sódio foram adicionados proporcionalmente à cada reação, seguindo com incubação a -20 °C por 16 horas. Ao fim do período de incubação, o material foi centrifugado a 10000 x g por 10 minutos. Os precipitados foram, então, lavados duas vezes com 500 µL de etanol 70% e centrifugados a 10000 x g por 2 minutos. O DNA precipitado de cada construção foi ressuspendido em 10 µL de água ultra pura e utilizado para transformar *Pichia pastoris* (GS115). As leveduras foram preparadas para eletroporação como segue: uma colônia fresca foi inoculada em 5 mL de YPD e cultivada por 16h, a 28°C, sob agitação de 250rpm. A partir dessa pré-cultura, foi feito inóculo em 200 mL de meio, numa proporção de 1:500, cultivado até atingir D.O.₆₀₀ = 1.3 – 1.5. As células foram então centrifugadas a 1500g, por 5 minutos (4°C) e lavadas duas vezes com água estéril gelada. Após a lavagem, as células foram ressuspendidas em 10 mL de sorbitol 1M gelado, centrifugadas e ressuspendidas, por fim, com 0.5M de sorbitol 1M gelado. Para eletroporação, 80µL de células competentes foram misturados ao DNA linearizado, foi adicionado 320µL de sorbitol 1M gelado e esse material foi transferido para uma cubeta (0.4cm), colocado no eletroporador (ECM® 399 Electroporation System, BTX™) e submetido a um pulso elétrico de 1500V, 5ms. Imediatamente após o

pulso, foi adicionado 1 mL de sorbitol 1M. O conteúdo foi transferido para tubo novo e incubado a 29°C por 2h, antes de ser semeado em placas com YPD + Zeocina. Células GS115 eletroporadas sem DNA foram utilizadas como controle negativo. Os recombinantes resistentes ao antibiótico de seleção foram repicados em nova placa Agar YPD.

3.2.5 Indução da Expressão

Um clone de cada construção foi selecionado para os ensaios de indução. No início do experimento, foi realizado pré-inóculo de 5 mL em meio YPD (29°C/250 rpm); após cerca de 18h, foi feito inóculo com 1 mL da pré-cultura em 50 mL de YPD (frasco de 500 mL). A cada 24h foram coletadas alíquotas de 4 mL de cultura, até completar-se um tempo de 96h (T24 a T96). No T96, fim do período de cultivo, também foi coletado 30 mL de cultura. As alíquotas foram centrifugadas (3000 rpm, 5 minutos) e o sedimento celular foi armazenado. Considerando que as proteínas tenham sido corretamente ancoradas, o material a ser analisando em primeira instância foi o sedimento celular. Para obtenção dos extratos protéicos a partir das leveduras induzidas, optou-se pelo método de lise utilizando microesferas de vidro (425-600 µm; Sigma Aldrich). Os sedimentos celulares foram ressuspensos em tampão de lise (a cada 1 mL de cultura centrifugada, foi utilizado 100µL de tampão) com adição das microesferas (v:v), seguida por 5 ciclos de 45 segundos com agitação em vórtex e incubação em gelo. Ao fim do processo, os lisados foram centrifugados (12000 rpm, 10 minutos, 4°C) e o sobrenadante (extrato protéico) foi armazenado em -20°C.

A avaliação da expressão das proteínas recombinantes foi feita inicialmente por meio de análise de SDS-PAGE. Os géis de poliacrilamida (12,5%) foram corados com *Coomassie Brilliant Blue* para permitir a visualização das bandas. As amostras do extrato protéico foram misturadas ao tampão desnaturante (L2x) numa proporção de volume de 1:1, aquecidas a 75°C por 10 minutos e aplicadas nos géis de poliacrilamida num volume de 20µL.

3.2.6 Análise da Produção das Proteínas

3.2.6.1 *Western blot*

Após visualização do extrato protéico total das amostras induzidas, em SDS-PAGE, foram realizados ensaios de *Western blot* para confirmação da produção das proteínas. As amostras foram submetidas a eletroforese por 90 minutos, 35mA, seguida por transferência (25V, 35 minutos) para membrana de PVDF (Fluoreto de Polivinilideno) em cuba de transferência semi-seca. A eficiência da transferência foi checada através da coloração da membrana com *Ponceau-S*. A imunodeteção foi realizada após bloqueio da membrana com solução de leite 5% em TBS-Tween, hibridização com anticorpo monoclonal anti-HIS, conjugado a fosfatase alcalina (Sigma Aldrich), diluído em TBS-Tween numa concentração de 1:3000 (1h). A revelação foi feita pelo método colorimétrico, utilizando NBT/BCIP (Sigma Aldrich) como substrato. Lavagens com TBS-Tween 1x foram realizadas entre as incubações. A proteína NS3+GST (43Kda) produzida em *E. coli* foi utilizada como controle positivo da reação.

3.2.6.2 Imunofluorescência

Para a confirmação da exposição dos antígenos virais ancorados na parede celular da levedura, os recombinantes *P. pastoris* foram submetidos a ensaio de microscopia de imunofluorescência, conforme descrito por Wasilenko et al. (2010), com algumas modificações. Resumidamente, após identificar o melhor tempo de cultivo para produção das proteínas, as células foram coletadas, lavadas em PBS 1x e ajustadas para uma D.O.₆₀₀ 1 (aproximadamente $1 \cdot 10^7$ células). Em microtubo, 100 µl da suspensão de células foram incubadas com anti-HIS (Invitrogen), utilizado como anticorpo primário, numa proporção de 1:300, por 1h. Após o período de incubação, as células foram lavadas três vezes com PBS 1x, e incubadas com anti-IgG conjugado a isocinato de fluoresceína (Sigma) 1:500, por 45 minutos, no escuro. Por fim, as células foram lavadas novamente com PBS 1x, e 10 µl da suspensão foi aplicado nas lâminas que foram cobertas com lamínula (após secagem) e analisadas em microscópio de fluorescência (Leica DMLB). As imagens foram capturadas pela câmera Leica DFC 340FX utilizando o software Leica CW4000. *P.*

pastoris GS115 não transformada foi incubada sob as mesmas condições para comparação como controle negativo.

3.2.7 Análises imunológicas *in vitro*

3.2.7.1 Obtenção de esplenócitos de camundongos (adaptado a partir de da Cruz Filho et al. 2019)

Para este procedimento, sete camundongos da linhagem BALB/C foram utilizados, mediante aprovação pelo Comitê de Ética para Utilização de Animais da UFPE (CEUA UFPE 002/2019; Anexo A). Após anestesia com cloridrato de xilazina 10mg/Kg e cetamina 115mg/Kg, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical, o baço de cada camundongo foi removido assepticamente e colocado num tubo Falcon contendo RPMI 1640 com soro fetal bovino (meio completo). Num fluxo vertical, cada baço foi transferido para uma placa de Petri onde foram separados para maceração através de douncer de vidro. As suspensões celulares obtidas dos baços foram transferidas para tubos Falcon, sobrepostos numa camada de Ficoll-Paque™ PLUS, com a densidade ajustada para 1,077 g/mL e centrifugadas a 1000 x g em temperatura ambiente durante 25 min. A camada de células da interface contendo as células imunológicas mononucleares foram recuperadas por pipeta Pasteur, e lavadas duas vezes com PBS 1X, cada lavagem seguida por centrifugação a 500 x g, por 10 min. Após a última lavagem, as células foram ressuspensas em 2 mL de meio RPMI. Para contagem das células em câmara de Neubauer, 10 µL da suspensão foi colocado em um microtubo com adição de 90 µL. O cálculo para padronizar o volume de células a ser utilizada na cultura seguiu a fórmula descrita abaixo:

$$\frac{\text{N}^{\circ} \text{ de células contadas} \times 10^6}{10^6 \text{ (constante)}} = \frac{10^3(\text{volume total da cultura})}{x}$$

3.2.7.2 Cultura de células

As células mononucleares isoladas foram incubadas em meio RPMI numa concentração de 1×10^6 células/poço, em placas de 24 poços, a 37°C e CO₂ 5%. Seis grupos experimentais foram estabelecidos conforme esquematizado na Figura 12. As leveduras utilizadas nesse ensaio foram cultivadas por 96h conforme descrito no

experimento de indução, lavadas e ressuspendidas em PBS 1x. A suspensão celular foi ajustada para que as leveduras, partindo de uma D.O.₆₀₀ = 1 (aproximadamente 1×10^7 células), fossem incubadas em uma concentração de 1×10^6 células/poço. Cada poço da placa conteve o total de 1 mL de cultura. Para sensibilização das células mononucleares com o vírus, foi adotada uma concentração de 10^5 /mL de cultura. Todas as culturas foram feitas em triplicata. Três placas de 24 poços foram utilizadas, uma para cada período de cultura (24h, 48h, 72h). O conteúdo coletado dos poços após os períodos estabelecidos foi centrifugado a $2500 \times g$ por 5 minutos. Os sobrenadantes foram mantidos a -20°C até o momento da análise por citometria de fluxo.

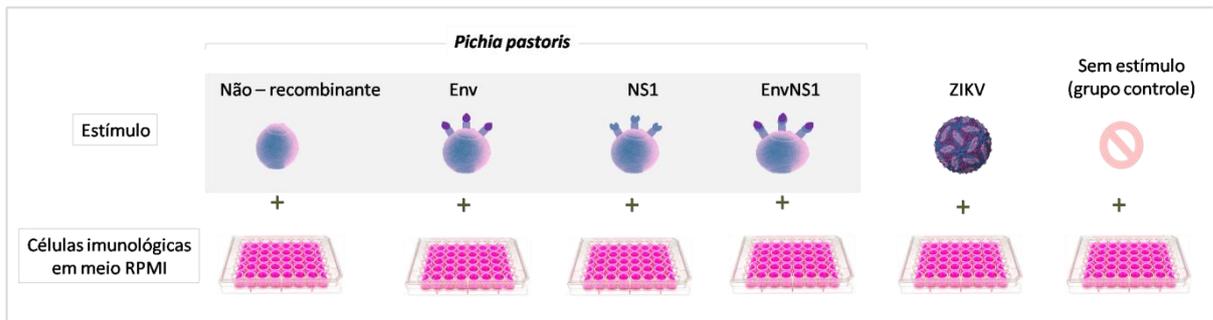


Figura 12. Representação dos grupos experimentais adotados para estimulação *in vitro*. Fonte: Autora.

3.2.7.3 Desafio imunológico das células tratadas com as leveduras e re-estimuladas com o vírus

Neste ensaio, cada levedura recombinante foi utilizada para estimular as células mononucleares, formando três grupos experimentais diferentes. A concentração celular, volume e parâmetros de cultura seguiram a metodologia descrita no tópico anterior. Após 24h do estímulo inicial, as células foram re-estimuladas com o ZIKV. A produção de citocinas mediante os estímulos foi avaliada 24h e 48h após a adição do vírus.

3.2.7.4 Dosagem de citocinas

A partir do sobrenadante das culturas, foi possível dosar as citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-4, IL-10 e IL-17 liberadas pelas células mononucleares tratadas com as leveduras-teste e com o ZIKV. A técnica Cytometric Bead Array (CBA) foi empregada para determinar os níveis das citocinas, utilizando o *Kit CBA*

Th1/Th2/Th17 Mouse seguindo as instruções do fabricante (BD™ Bioscience). Resumidamente, esta técnica emprega uma mistura de microesferas de poliestireno, com tamanhos e intensidades de fluorescência diferentes, conjugadas a anticorpos específicos para cada citocina. O reagente de detecção empregado pelo kit é uma mistura de anticorpos conjugados a ficoeritrina (PE) que fornece sinais de fluorescência proporcionais a concentração de analito ligado aos anticorpos presentes nas microesferas. Os complexos formados pelas microesferas de captura, analitos das amostras-teste e pelo reagente de detecção foram mensurados por citometria de fluxo (BD FACSCalibur™). As citocinas detectadas foram mensuradas em pg/mL.

3.2.7.5 Imunofenotipagem

As células imunológicas isoladas do baço e re-estimuladas *in vitro* foram caracterizadas quanto à presença dos marcadores de superfície CD4, CD8, CD16/32 e CD80. Para tanto, as células foram coletadas das placas de cultura e colocadas em tubo tipo Falcon (15 mL), o conteúdo foi completado para um volume de 10 mL com PBS wash (suplementado com BSA 0,5% e azida 0,1%), vortexado por três minutos e centrifugado a 400 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e as células foram transferidas para tubos de ensaio apropriados para o citômetro de fluxo BD FACSCalibur™. Em cada tubo, foi adicionado 1 mL de PBS-wash, seguido por centrifugação (400 x g, por 5 minutos). Os tubos foram cuidadosamente emborcados para retirada do sobrenadante, as células remanescentes foram vortexadas e foram adicionados os anticorpos correspondentes a cada marcador de superfície (anti-CD4-FITC, anti-CD8-PE e anti-CD16/32-FITC; BD Bioscience), seguindo orientações do fabricante. Para marcação das células foi feita incubação por 30 minutos, no escuro. Após esse período, foi adicionado 1 mL de PBS wash, seguido por vórtex – centrifugação – retirada do sobrenadante – vórtex. Foram então acrescentados 150 µL da solução fixadora *Cytofix*™, e o conteúdo foi incubado por 20 minutos, na ausência de luz (2 – 8°C). O processo de adição de 1 mL de PBS wash – vortex – centrifugação, foi repetido e seguido por remoção do sobrenadante, adição de 300 µL de PBS wash e vórtex. Os tubos foram armazenados a 2 – 8°C, ao abrigo de luz, até o momento da leitura. Todas as aquisições foram feitas por citometria de fluxo utilizando o BD FACSCalibur™.

3.2.8 Ensaios imunológicos *in vivo*

3.2.8.1 Preparação das leveduras

Duas linhagens recombinantes de *P. pastoris* recombinantes foram testadas nesta fase do estudo: *P. pastoris_Env* e *P. pastoris_EnvNS1*. *P. pastoris* não-recombinante também utilizada para administração, constituindo um grupo controle. Após 72h de cultivo em meio YPD (28 – 30°C; 150 rpm), as leveduras foram coletadas após centrifugação (4500 rpm; 10 minutos) e lavadas com PBS para remoção do meio residual. As células foram ressuspensas em PBS e a concentração final das vacinas foi ajustada para DO₆₀₀ 10, em 50 µL. As leveduras passaram por processo de atenuação, mediante incubação a 60°C por 1h. Uma alíquota de cada preparação de leveduras foi semeada em placas de YPD, para verificar a capacidade reprodutiva pós-tratamento (Figura 13). As preparações foram armazenadas a 4°C até o momento de uso.



Figura 13: Placas YPD semeadas com as leveduras após o tratamento térmico. As leveduras – teste tiveram sua concentração ajustada para uma DO₆₀₀ 10 em 50µL, foram incubadas a 60°C por 1 hora e semeadas em placas com meio YPD, sem antibiótico. Tempo de cultivo: 72h (28 – 29°C).

3.2.8.2 Camundongos, parâmetros éticos e protocolo de imunização

Camundongos imunocompetentes fêmeas da linhagem BALB/c, 6 – 8 semanas de idade, foram utilizados como modelo animal no presente estudo. Esses animais foram criados e mantidos no biotério do Instituto Aggeu Magalhães (IAM; Fundação Oswaldo Cruz – PE, Brasil), sob condições estéreis, livres de patógenos. Todos os experimentos envolvendo camundongos foram executados estritamente de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética para Utilização de Animais pertencente à instituição (Protocolo 110/2017; Anexo B). O cronograma de imunização foi realizado através de inoculação intramuscular no muscular tibial anterior esquerdo, em duas doses com intervalo de uma semana (Figura 14).

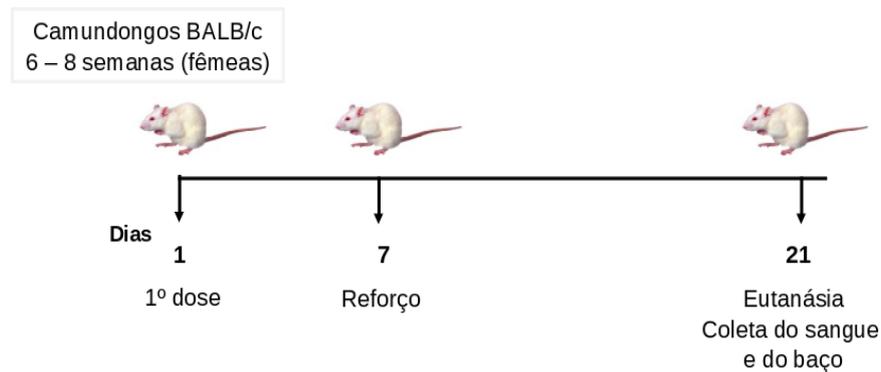


Figura 14: Esquema de imunização. Os camundongos receberam duas doses de cada preparação de leveduras (na mesma concentração). Os animais foram monitorados quanto ao peso e atividade ao longo dos 21 dias de experimento.

Os camundongos foram divididos em quatro grupos, cada um com cinco animais. Antes de cada imunização, todos os camundongos foram anestesiados com cloridrato de xilazina 10 mg/Kg e cetamina 115 mg/Kg. Cada grupo recebeu doses de 50 μ L de PBS (grupo controle), *P. pastoris* não – recombinante, *P. pastoris* expressando os epítomos de Env ou *P. pastoris* expressando epítomos EnvNS1. Depois de 21 dias da primeira dose, todos os animais foram anestesiados, tiveram o sangue coletado e, logo em seguida, foram eutanasiados. O baço de cada camundongo foi removido para subsequente isolamento e cultura das células imunológicas.

3.2.8.3 Estimulação *in vitro* das células mononucleares esplênicas

Os esplenócitos dos animais vacinados (e do grupo inoculado com PBS) foram isolados conforme descrito por da Cruz Filho et al. (2019). As células mononucleares isoladas através de separação com Ficoll- Paque PLUS 1.077 g/mL (GE Healthcare Life Sciences) foram distribuídas em placas de 48 poços, 10^6 células/poço. Os grupos experimentais foram definidos como: G1 (células dos camundongos inoculados como PBS), G2 (células dos camundongos vacinados com *P. pastoris*), G3 (células dos camundongos vacinados com *P. pastoris*_Env) e G4 (células dos camundongos vacinados com *P. pastoris*_EnvNS1). As células dos animais dos grupos G3 e G4 foram re-estimuladas *in vitro* com três tipos de estímulo: *P. pastoris* não-recombinante, *P.pastoris* expressando Env (para G3) ou EnvNS1 (para G4), e o vírus (ZIKV-PE243, cedido pelo Dr. Lindomar Pena, LaViTe, Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ – PE, Brasil). As leveduras e o vírus foram

utilizados numa concentração de 10^5 /poço. O grupo G1 não recebeu estímulo, compondo, desta forma, o grupo controle. Os cultivos foram feitos em meio RPMI (Sigma-Aldrich), a 37°C com 5% de CO₂.

3.2.8.4 Avaliação imunológica após a cultura

Os linfócitos isolados do baço e re-estimulados *in vitro* foram caracterizados quanto à presença dos marcadores de superfície CD4, CD8 e CD16. Para tanto, as culturas foram centrifugadas, as células foram lavadas com PBS (suplementado com BSA 0,5% e azida 0,1%), e incubadas com os anticorpos correspondentes a cada marcador de superfície (anti-CD4-FITC, anti-CD8-PE e anti-CD16/32-FITC; BD Bioscience). Todas as aquisições foram feitas por citometria de fluxo utilizando o BD FACSCalibur™.

3.2.8.5 Avaliação imunológica do sangue dos camundongos

O soro e as células circulantes no sangue dos animais vacinados foram avaliados. A partir do soro foi possível avaliar os níveis das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17 (Kit BD CBA Mouse Th1/Th2/Th17, BD™ Bioscience), seguindo as instruções do fabricante. O perfil de linfócitos, quanto às subpopulações CD4, CD8 e CD16, também foi analisado, conforme realizado com os linfócitos isolados do baço dos animais.

3.2.8.6 Análises hematológicas e bioquímicas

As amostras de sangue foram coletadas por meio de punção cardíaca nos camundongos anestesiados. O sangue colhido foi depositado em microtubo contendo EDTA K2 (Hemstab), e centrifugado a 3600 rpm por 10 minutos para separação do plasma. A avaliação hematológica incluiu contagens globais de hemácias, leucócitos, plaquetas, determinação do hematócrito (Ht) e da concentração de hemoglobina. Os valores obtidos para hemácias, hematócrito e hemoglobina permitiram o cálculo dos índices hematimétricos: volume corpuscular médio ($VCM = Ht/n^{\circ}$ de hemácias \times 10) e concentração de hemoglobina corpuscular média ($CHCM = \text{hemoglobina} / Ht$). Para determinação do hemograma, foi realizada contagem em câmara de Neubauer e contagem diferencial em lâminas coradas pelo método Panótico Rápido (Horobin et al. 2011). O número de plaquetas foi determinado empregando-se o método de Fonio (Comar et al. 2009). A hemoglobina

foi mensurada por meio de colorimetria utilizando espectrofotômetro. A determinação dos níveis de glicose, uréia e creatinina se deram através de ensaio enzimático colorimétrico de ponto final. A fosfatase alcalina foi detectada pelo método cinético – colorimétrico Roy modificado, e as transaminases hepáticas por meio do Reitman - Frankel.

3.2.9 Análise estatística

Os gráficos e a análise estatística foram gerados pelo GraphPad Prism versão 7.04. O teste de análise de variância (ANOVA) foi aplicado para avaliar diferenças estatísticas entre os grupos. Resultados com valor de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISES DE RESTRIÇÃO E CONFIRMAÇÃO DA SUBCLONAGEM

A sequência codificante do cassete de expressão desenhado para o presente estudo foi sintetizado e clonado no vetor pClone. Para confirmar a presença dos genes, foram feitas digestões com as enzimas *Pst*I (liberando os epítomos da proteína do Envelope) e *Sma*I (liberação de epítomos de NS1). A partir disso foi possível analisar a inserção dos sítios de restrição na sequência desenhada para síntese e o tamanho dos genes de interesse (Figura 15A). As três possibilidades de cassetes de expressão foram subclonadas no vetor de expressão pPGK Δ 3 α , utilizando as enzimas *Xho*I e *Not*I. A confirmação foi feita por análise de restrição como mostrado na Figura 15B. Os vetores obtidos foram linearizados por meio de clivagem com *Xba*I (Figura 15C), etapa que facilita a integração do cassete no genoma da levedura através de recombinação homóloga após o processo de eletroporação das células de *P. pastoris* GS115.

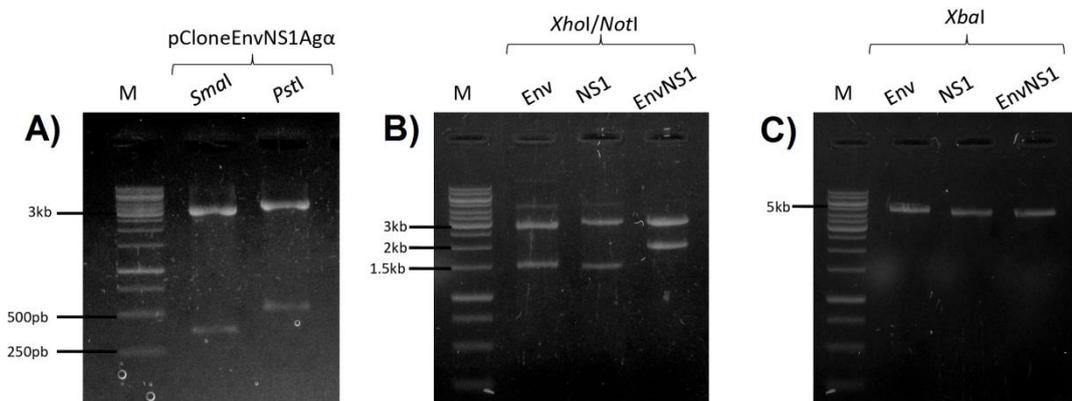


Figure 15. Verificação dos plasmídeos recombinantes por análise de restrição. A) Digestões do vetor de passagem pCloneEnvNS1A α com *Pst*I liberando epítomos do Envelope (495 pb), e com *Sma*I liberando epítomos de NS1 (375 pb). B) Confirmações das subclonagens a partir de digestões com *Xho*I e *Not*I dos vetores pPGKEnvA α , pPGKNS1A α e pPGKEnvNS1A α . O vetor de expressão pPGK Δ 3 α apresenta 3kb; EnvA α : 1.4kb; NS1A α : 1.3Kb e EnvNS1A α : 1.8Kb. C) Linearização dos cassetes de expressão com *Xba*I, para posterior eletroporação. M: Marcador de peso molecular Gene Ruler 1Kb (Thermo Scientific).

4.2 CONFIRMAÇÃO DA PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

A partir da obtenção das linhagens de *P. pastoris* recombinantes, foi selecionado um clone de cada gene para avaliação da produção das proteínas de interesse. Após 72h de cultivo, as células foram centrifugadas e o sedimento celular foi lisado

para obtenção dos extratos protéicos. Esses extratos foram analisados por SDS-PAGE seguido por *Western blot* para confirmação da produção das proteínas, utilizando o anticorpo monoclonal Anti-HIS conjugado a fosfatase alcalina (Figura 16).

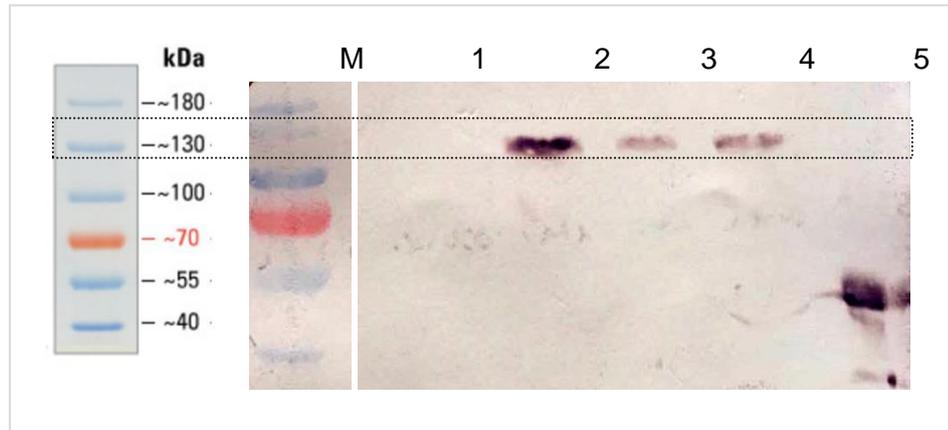


Figura 16. Confirmação da produção das proteínas de interesse por *western blot*. Após SDS-PAGE e transferência das proteínas para membrana de PVDF, os extratos proteicos foram incubados com Anti-HIS (1:3000) e revelados com NBT/BCIP. M- Marcador de peso molecular pré-corado PageRuler™ (Thermo Scientific). 1- Controle Negativo: extrato proteico total *P. pastoris* GS115 não-recombinante. 2 a 4: Extratos proteicos das proteínas recombinantes. 2 – EnvEpiA α ; 3 - NS1EpiA α . 4- EnvEpiNS1EpiA α . 5- controle positivo (NS3 ZIKV produzido em *E. coli*).

4.3 VERIFICAÇÃO DA ANCORAGEM DAS PROTEÍNAS NA SUPERFÍCIE DE *P. pastoris*

Análises por microscopia de imunofluorescência foram utilizadas tanto como uma ferramenta adicional para confirmação da produção das proteínas, quanto para verificar a ancoragem. As células foram incubadas com Anti-HIS, anticorpo primário, e Anti-IgG/FITC, anticorpo secundário. Apenas as leveduras recombinantes exibiram fluorescência (Figura 17).

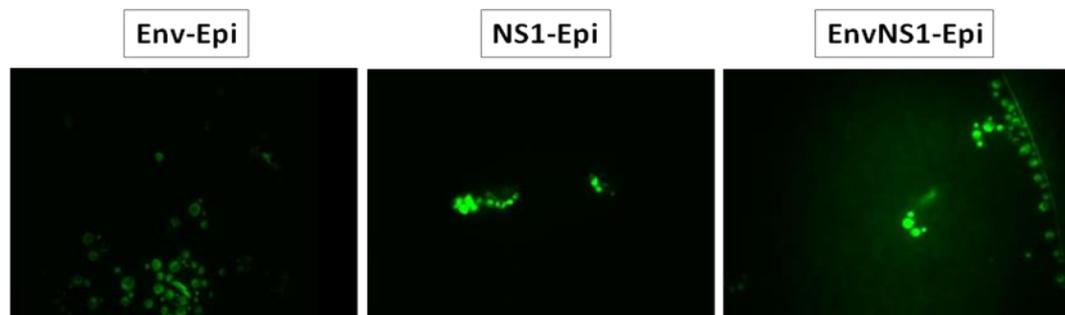


Figure 17: Imunofluorescência das leveduras recombinantes, observação das fusões antígeno/ α -aglutinina. As leveduras foram cultivadas por 72h, lavadas com PBS 1x, ajustadas para uma D.O.₆₀₀ =1. Anti-HIS monoclonal (1:300) foi utilizado como anticorpo primário e Anti-IgG conjugado a isocinato de fluoresceína (1:500), como anticorpo secundário.

4.4 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL IMUNOLÓGICO DAS LEVEDURAS

4.4.1 Produção de citocinas

Foram avaliados os estímulos induzidos por *P. pastoris* GS115 tanto selvagem quanto recombinantes, assim como pelo ZIKV. O estudo relacionado à levedura permite conhecer o perfil de resposta promovido por este microorganismo e comparar com as leveduras recombinantes, a fim de distinguir possíveis efeitos adjuvantes. Por outro lado, é importante conhecer também o tipo de resposta imune que o vírus da Zika é capaz de induzir, configurando um parâmetro de comparação para as leveduras recombinantes que estão sendo avaliadas como potenciais candidatas vacinais.

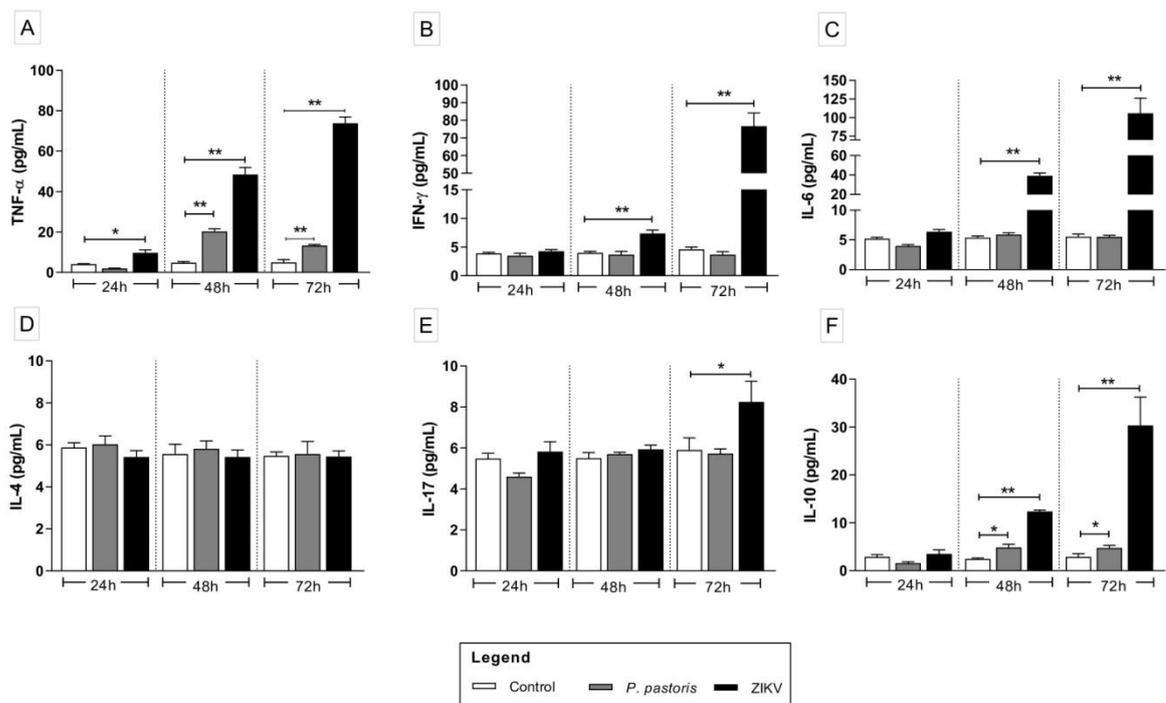


Figure 18: Secreção de citocinas a partir das células imunológicas após estímulo com *P. pastoris* e ZIKV. A) TNF- α ; B) IFN- γ ; C) IL-6; D) IL-4; E) IL-17A; F) IL-10. Concentração das citocinas expressa em pg/mL. Asterisco representa significâncias estatísticas (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

As células estimuladas pelo vírus induziram aumento de IL-10, IL-6, TNF- α e IFN- γ , de forma tempo-dependente, especialmente após 48h de incubação. Adicionalmente, após 72h, houve um aumento em IL-17A (Figura 18). Considerando a resposta induzida por *P. pastoris* GS115, em 24h de cultura, não houve produção significativa de nenhuma das citocinas analisadas. Contudo, depois de 48h e 72h de incubação, um estímulo evidente foi observado para produção de IL-10 e TNF- α , seguindo um padrão similar ao induzido pelo ZIV, ainda que em níveis menores

(Figura 18). É interessante notar que ainda que *P. pastoris* estimule a produção de IL-10 e TNF- α , a análise da cultura de 24h indica uma regulação negativa dessas citocinas.

P. pastoris expressando Env-Epi induziram produção efetiva de IL-10 nos três tempos experimentais (Figura 19A). Interessantemente, essa construção vacinal também provocou aumento de TNF- α , porém os níveis diminuíram de maneira tempo dependente (Figura 19C). O candidato vacinal NS1-Epi destacou-se apenas no estímulo a produção de TNF- α após 48h, e especialmente em 72h de cultura (Figura 19C). *P. pastoris_EnvNS1*, assim como as outras leveduras recombinantes, estimulou a produção de TNF- α , mas também induziu IL-10 e IL-6 (Figura 19A-C). Considerando o estímulo na produção das citocinas analisadas, a combinação de epítopos do Envelope e de NS1 não só se mostraram mais imunogênicas, como também exibiram padrão de resposta mais similar ao induzido pelo ZIKV. Nenhum dos candidatos vacinais se mostrou ábil a promover aumento de IL-4, IL-17A ou IFN- γ (Tabela 6).

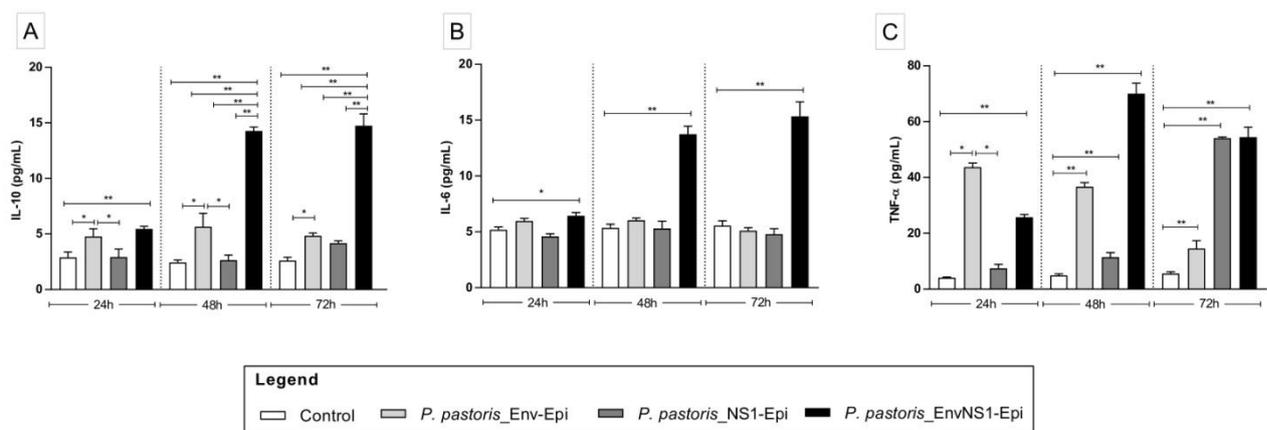


Figura 19: Perfil de estímulo para produção das citocinas induzidas pelas células imunológicas após incubação com as leveduras recombinantes. A) IL-10; B) IL-6; C) TNF- α . Concentração das citocinas expressa em pg/mL. Asterisco representa significâncias estatísticas (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Tabela 6: Citocinas que não tiveram aumentos significativo induzido pelos grupos experimentais.

Grupos	IL-17A			IL-4			IFN- γ		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
Controle	5.48 \pm 0.25	5.54 \pm 0.32	5.10 \pm 0.24	5.80 \pm 0.16	5.56 \pm 0.46	5.47 \pm 0.18	3.82 \pm 0.10	4.01 \pm 0.18	4.63 \pm 0.21
<i>P. pastoris_Env</i>	5.57 \pm 0.32	5.94 \pm 0.11	5.60 \pm 0.22	6.06 \pm 0.33	5.14 \pm 0.36	5.79 \pm 0.23	4.06 \pm 0.22	4.40 \pm 0.34	3.66 \pm 0.21
<i>P. pastoris_NS1</i>	5.57 \pm 0.30	5.24 \pm 0.42	5.41 \pm 0.11	6.08 \pm 0.09	5.67 \pm 0.33	5.29 \pm 0.12	4.44 \pm 0.26	4.26 \pm 0.23	3.40 \pm 0.43
<i>P. pastoris_EnvNS1</i>	5.57 \pm 0.21	5.27 \pm 0.29	5.52 \pm 0.25	5.59 \pm 0.19	5.44 \pm 0.39	5.72 \pm 0.19	4.26 \pm 0.20	4.34 \pm 0.26	3.78 \pm 0.20

4.4.2 Imunofenotipagem

Além da dosagem de citocinas, os tipos celulares presentes na cultura (linfócitos e monócitos) foram avaliados quanto aos marcadores de superfície CD4, CD8, CD16/32 e CD80. Os tempos experimentais adotados foram 24h para a avaliação dos monócitos (imunidade inata) e 24 – 48h para os linfócitos (imunidade adaptativa). Tendo em vista os resultados obtidos a partir da dosagem das citocinas, a levedura recombinante escolhida para as análises de imunofenotipagem foi *P. pastoris* expressando EnvNS1. A levedura não recombinante e o ZIKV foram utilizados como estímulos – controle.

O estímulo frente aos monócitos foi avaliada a partir da marcação com os anticorpos anti-CD16/32 e anti-CD80. Ambas as leveduras levaram a um aumento significativo aumento na expressão desses marcadores comparado tanto ao controle negativo (células não estimuladas), quanto em relação ao vírus (Figura 20A-B). Quanto aos linfócitos, após 24h de cultura, ao contrário de *P. pastoris_EnvNS1*, tanto *P. pastoris* não-recombinante quanto o ZIKV induziram a um aumento de células T CD4+ (Figura 20C). No entanto, observando os resultados para 48h de incubação, um substancial aumento de células T CD4+ ocorreu em todos os grupos experimentais. É importante notar que após 48h, o estímulo induzido pela levedura expressando o antígeno vacinal de sobrepôs a levedura não recombinante e foi equivalente à elicitada pelo vírus (Figura 20C). A diferença entre as respostas promovidas pelas leveduras sugere que a ativação de células T CD4+ no grupo EnvNS1 foi antígeno-específica.

Após 24h, apenas a levedura não-recombinante induziu aumento no número de células TCD8+. Contudo, em 48h, *P. pastoris_EnvNS1* e o ZIKV induziram estímulos significantes também, enquanto a levedura não-recombinante não induziu aumento (Figura 20D). Em relação aos linfócitos CD16+, embora um aumento tenha sido elicitado em 24h, um processo de regulação negativa foi observado tanto para *P. pastoris_EnvNS1* quanto para o vírus em 48h de cultura. Em oposição, *P. pastoris* não recombinante mostrou um padrão diferente, promovendo um estímulo significativo (Figura 20E).

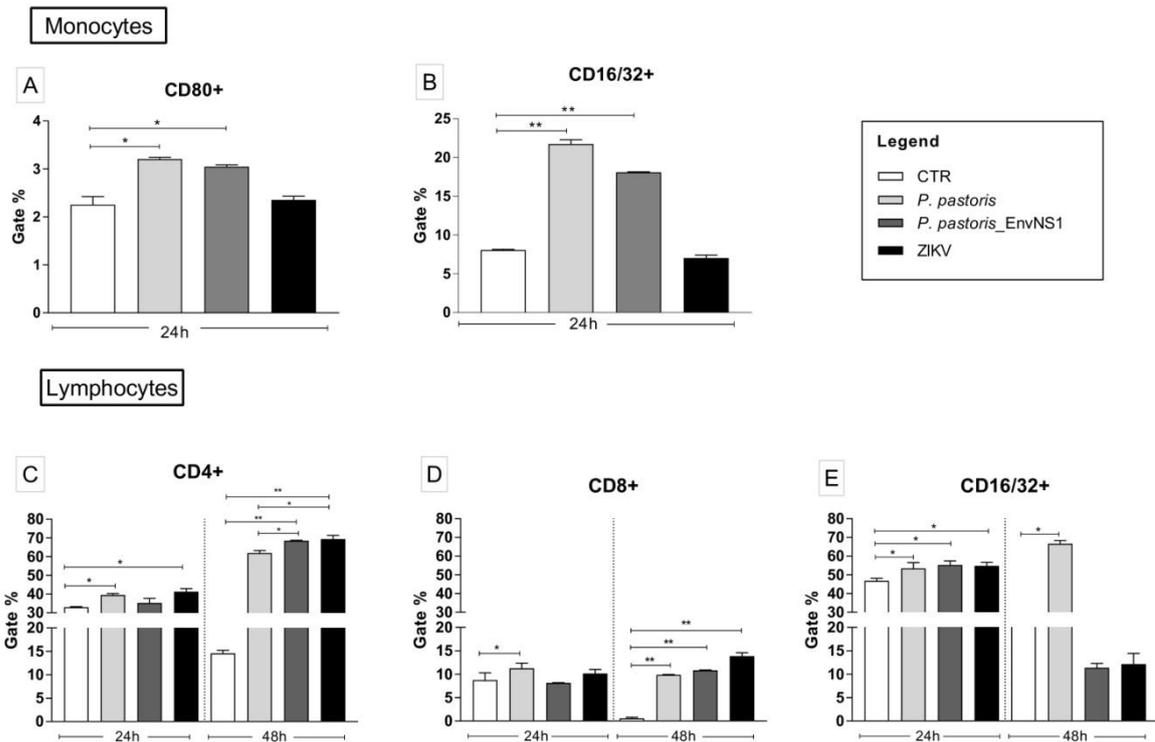


Figura 20: Expressão de marcadores de superfície presentes em células imunológicas incubadas com diferentes estímulos: *P. pastoris* não-recombinante, *P. pastoris_EnvNS1* e Zika virus. Células não tratadas foram utilizadas como grupo controle. Asterisco representa significâncias estatísticas (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

4.4.3 Dosagem de citocinas a partir células imunológicas tratadas com as leveduras e re-estimuladas com o vírus

Células primadas com *P. pastoris_Env* e desafiadas, após 24h, com o vírus exibiram aumento na produção de IL-10 e TNF- α , comparado tanto com o controle sem estímulo quanto com as células estimuladas apenas com o vírus (Figura 21A e C). Embora IL-10 tenha apresentado o mesmo padrão visto nos experimentos sem o re-estímulo com o ZIKV, para TNF- α houve um aumento na produção após a adição do vírus. Houve aumento nos níveis de IL-6 nos dois tempos experimentais estudados (Figura 21B), especialmente em 48h, o que é interessante observar levando em consideração o destaque dessa citocina dentre as induzidas pelo vírus e pela vacinas que se destacou nos ensaios anteriores (*P. pastoris_EnvNS1*). O estímulo para IL-17A ocorreu apenas nas primeiras 24h, e provavelmente ocorreu em resposta ao estímulo viral (Figura 21E).

No grupo onde o estímulo inicial foi feito com *P. pastoris_NS1*, o padrão de citocinas foi similar ao grupo Env em relação a IL-10, TNF- α e IL-6 (Figura 21A-C). A

citocina mais proeminente foi TNF- α , destacando-se frente aos demais grupos experimentais.

A resposta observada para as células primadas com *P. pastoris_EnvNS1* destacou-se novamente comparada às outras vacinas estudadas no presente trabalho. Houve estímulo para elevação na produção de IL-10, IL-17A, TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-4 (Figura 21). Entre elas, apenas TNF- α não se destacou frente aos outros grupos experimentais, com níveis inferiores também quando comparados aos níveis observados nos experimentos sem desafio com o vírus. Interessantemente, o padrão de IFN- γ e IL-6 observado no ensaio com duplo estímulo (levedura e vírus) foi oposto ao promovido pelo vírus sozinho. Enquanto a vacina induz aumento apenas nas primeiras 24h, a resposta para o ZIKV é observada a partir do tempo de 48h de cultura.

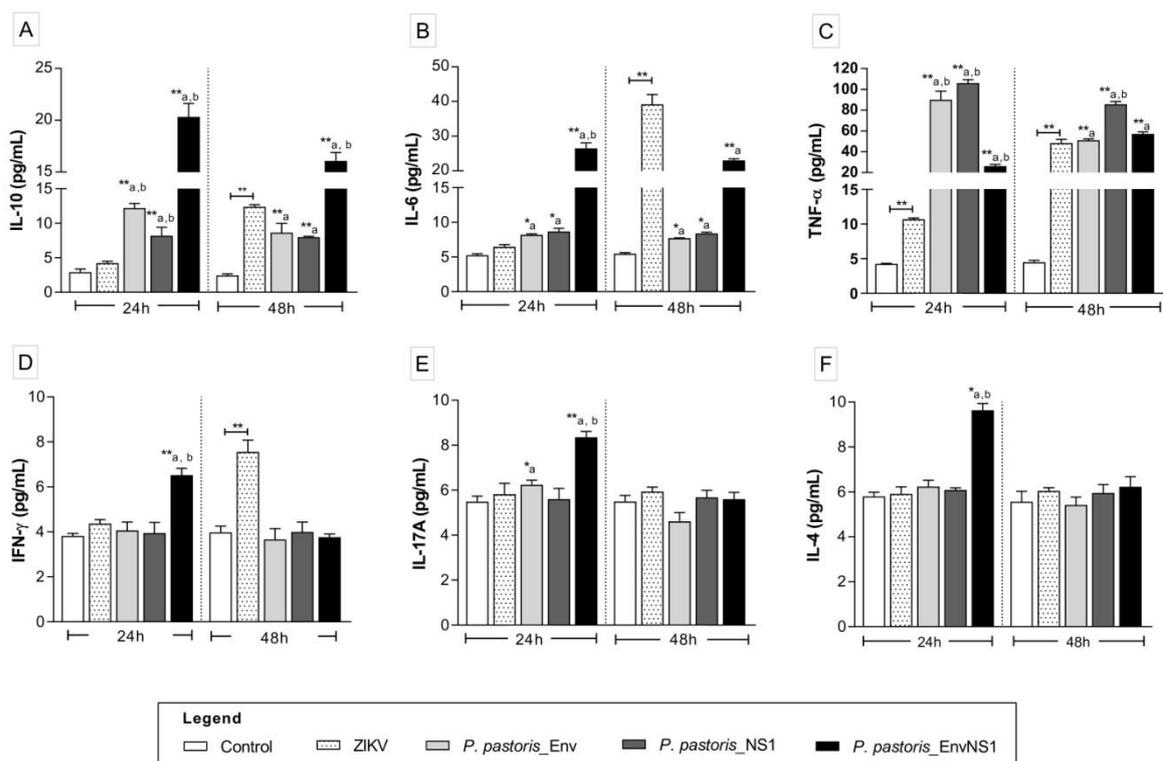


Figura 21: Perfil das citocinas liberadas pelas células imunológicas primadas com as leveduras recombinantes e desafiadas com o ZIKV, após 24h. A) IL-10, B) IL-6; C) TNF- α ; D) IFN- γ ; E) IL-17A; F) IL-4. *a*: comparação *versus* grupo controle sem estímulo. *b*: comparação *versus* grupo estimulado apenas com o ZIKV. Concentração das citocinas expressa em pg/mL. Asterisco representa significâncias estatísticas (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

4.5 ENSAIOS IMUNOLÓGICOS PÓS-IMUNIZAÇÃO

4.5.1 Análises das citocinas presentes no sangue e imunofenotipagem dos linfócitos circulantes

Não houve detecção significativa das citocinas dosadas a partir do sangue dos animais inoculados com *P. pastoris* não-recombinante, pelo menos na análise 14 dias após a dose de reforço (Figura 22). Em relação ao efeito da vacinação com as leveduras recombinantes, as construções vacinais promoveram padrões de citocinas marcadamente diferentes. *P. pastoris_Env* provocou aumento apenas nos níveis de TNF- α e IL-17A, tendo como referência o grupo controle inoculado com PBS. A levedura expressando Env destacou-se em relação a levedura não-recombinante apenas em relação a produção de IL-2, porém não foi significativa quando comparada ao grupo controle. Em contrapartida, *P. pastoris_EnvNS1* promoveu elevação nos níveis de IL-2, IL-4, IFN- γ , TNF- α e IL-17A, sobrepondo-se tanto à levedura não-recombinante quanto à *P. pastoris_Env*.

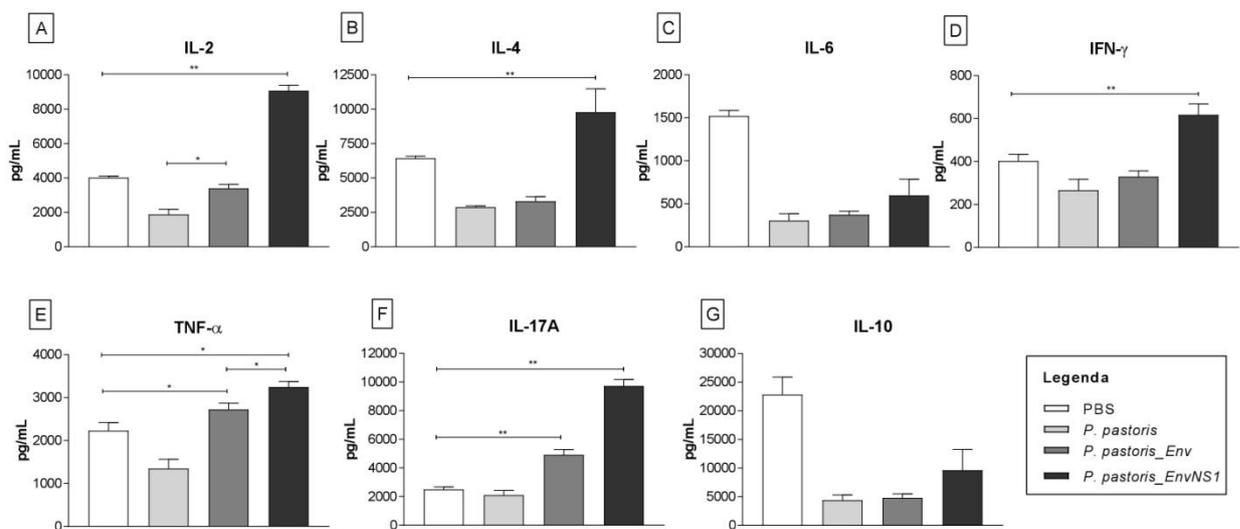


Figura 22: Perfil de citocinas dosadas a partir do sangue dos camundongos vacinados. A coleta foi realizada 14 dias após a última dose de reforço. **A)** IL-2, **B)** IL-4, **C)** IL-6, **D)** IFN- γ , **E)** TNF- α , **F)** IL-17A, **G)** IL-10. Os valores das citocinas foram mensurados em pg/mL. Asterisco representa significâncias estatísticas (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

A presença de linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e CD16⁺ no sangue dos camundongos após a imunização também foi avaliada através de citometria de fluxo. Não houve aumento expressivo no número de células T CD4⁺, embora os animais imunizados com *P. pastoris* não-recombinante e *P. pastoris_Env* tenham

apresentado uma discreta elevação no número de células, frente ao controle (Figura 23A). Em contrapartida, houve estímulo para células T CD8+ significativo induzido pelos três grupos experimentais, com maior destaque para *P. Pastoris* não-recombinante e expressando EnvNS1 (Figura 23B). Em relação aos linfócitos *Natural Killer* (CD16+), nenhuma das leveduras testadas induziu aumento significativo, porém *P. pastoris_EnvNS1* promoveu uma elevação maior no número de células em relação às demais (Figura 23C). Embora a levedura não-recombinante seja capaz de promover o aumento no percentual de linfócitos, a resposta e a proporção de células são moduladas quando há expressão de proteínas recombinantes, principalmente no que diz respeito aos estímulos para geração de linfócitos CD8+ e CD16+.

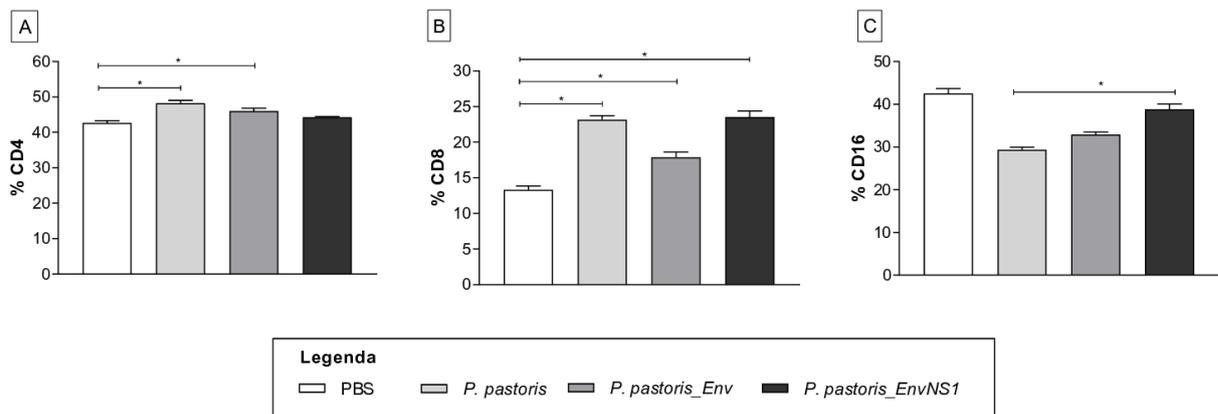


Figura 23: Análises das subpopulações dos linfócitos circulantes no sangue dos camundongos após a imunização (14 dias após a dose de reforço). **A)** %CD4, **B)** %CD8, **C)** %CD16. Asterisco representa significâncias estatísticas (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

4.5.2 Avaliação do estímulo aos linfócitos isolados do baço dos animais vacinados

Os linfócitos presentes no baço dos animais imunizados foram co-cultivados com três estímulos diferentes, correspondentes à (I) *P. pastoris* (não-recombinante), (II) *P. pastoris_Env* ou *P. pastoris_EnvNS1* e (III) ZIKV. O objetivo desse ensaio foi avaliar se haveria diferença na resposta produzida frente a cada estímulo, considerando a contagem de linfócitos CD4+, CD8+ e CD16+, nos períodos de 24h, 48h e 72h de cultura. Além disso, também seria possível analisar se a vacinação dos camundongos com as diferentes leveduras recombinantes influenciaria na modulação dessas respostas.

4.5.2.1 Cultura com células dos animais vacinados com *P. pastoris_Env*

A Figura 24A traz o perfil de resposta CD4+ induzido por cada estímulo. A levedura *P. pastoris* não-recombinante promoveu aumento no percentual de células T CD4+ em 24h e 48h de cultura, tendo como referência o grupo controle. O pico no quantitativo de células ativadas foi observado na cultura de 48h, onde permaneceu superior ao vírus, embora tenha sido superado pela levedura recombinante. Analisando o perfil de células CD8+, observa-se que *P. pastoris* promove um aumento significativo nas primeiras 24h, se destacando tanto em relação ao controle, quanto aos demais grupos experimentais (Figura 24B). No entanto, ocorreu uma redução progressiva no número de células nos demais tempos analisados, onde o percentual de CD8+ passou a ser significativamente menor do que o dos grupos controle, levedura recombinante e vírus.

Analisando o efeito da co-cultura dos linfócitos com *P. pastoris_Env*, pode ser observado um aumento no estímulo ao longo do período de cultura. Embora em 24h o perfil tenha sido similar ao induzido pelo vírus e pela levedura não-recombinante, esse padrão é revertido a partir das 48h de cultura, com aumento significativo no número de células T CD4+, frente aos demais grupos experimentais. Comparando o estímulo promovido pelas duas leveduras é possível notar que há diferenças no perfil de ativação e que a levedura recombinante promove uma elevação no percentual de células T CD4+ mais acentuada. O mesmo processo de decréscimo no número de células T CD8+ observado na cultura com a levedura não-recombinante ocorreu nas culturas estimuladas com *P. pastoris_Env*, que se mostrou superior ao vírus apenas no tempo de 24h, embora não tenha induzido estímulo significativo em relação ao grupo controle em nenhum dos tempos experimentais estudados.

Quando se avalia o estímulo promovido pelo vírus, nota-se um aumento no número de células TCD4+ ao longo dos períodos de cultura, atingindo pico em 72h. Ainda que esse aumento tenha sido significante, o estímulo não se destacou frente às leveduras, exceto em 72h onde se mostrou superior ao induzido pela levedura não recombinante. Com relação às células T CD8+, o nível de estímulo promovido pelo vírus foi o mais estável ao longo dos três tempos de cultura, e se mostrou mais imunogênico, sobretudo após 48h e 72h contrastando fortemente com a redução promovida pelas leveduras.

A influência das leveduras e do vírus na proporção de linfócitos CD16+ também foi avaliada (Figura 24C). Os três padrões de estímulo foram similares, com diminuição no número de células ao longo das 72h de cultura, e níveis não significantes comparados ao grupo controle. Enquanto *P. pastoris* induziu o menor estímulo em relação aos demais grupos em 24h e 72h, o vírus promoveu maior ativação em relação às leveduras, ao longo de todo o período de cultura.

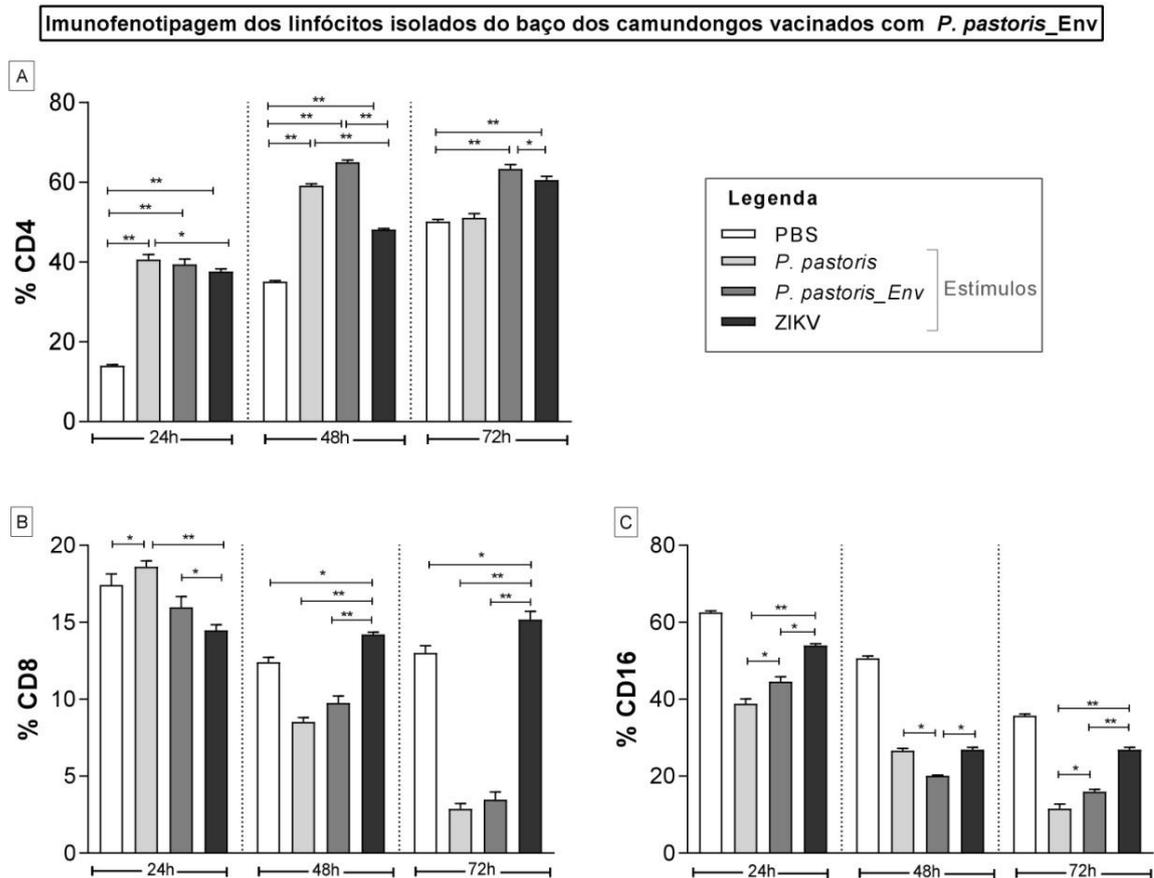


Figura 24: Perfil dos linfócitos isolados do baço dos animais imunizados com *P. pastoris_Env*, re-estimulados *in vitro* com as leveduras e com o ZIKV. Dados correspondem ao percentual de linfócitos presente no *gate* correspondente à marcação de cada tipo celular. **A)** %CD4, **B)** %CD8, **C)** %CD16. Asterisco representa significâncias estatísticas (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

4.5.2.2 Cultura com células dos animais vacinados com *P. pastoris_EnvNS1*

P. pastoris não-recombinante promoveu estímulo significativo de células CD4+ nos três tempos avaliados, com um aumento no número de células tempo-dependente, superior ao induzido pelo ZIKV. Por outro lado, a levedura expressando EnvNS1 também se mostrou mais imunogênica do que o vírus e promoveu um pico de ativação no tempo de 72h, onde se mostrou superior também a levedura sem o

antígeno vacinal. O vírus induziu estímulo significativo apenas nas primeiras 48h, porém menor do que o causado pelas leveduras (Figura 25A).

Em relação aos linfócitos T CD8+, as leveduras induziram padrões de resposta similares, não induzindo estímulo suficiente para se sobressair nem ao grupo controle nem ao vírus, em nenhum dos tempos de cultura avaliados. Assim como observado nas culturas com as células dos camundongos imunizados com *P. pastoris_Env*, houve um decréscimo substancial no número de células CD8+ entre 24h e 72h. Embora o ZIKV também tenha seguido a tendência de redução no estímulo ao longo do tempo de incubação, o vírus induziu aumento significativo no quantitativo de células nos três períodos avaliados (Figura 25B).

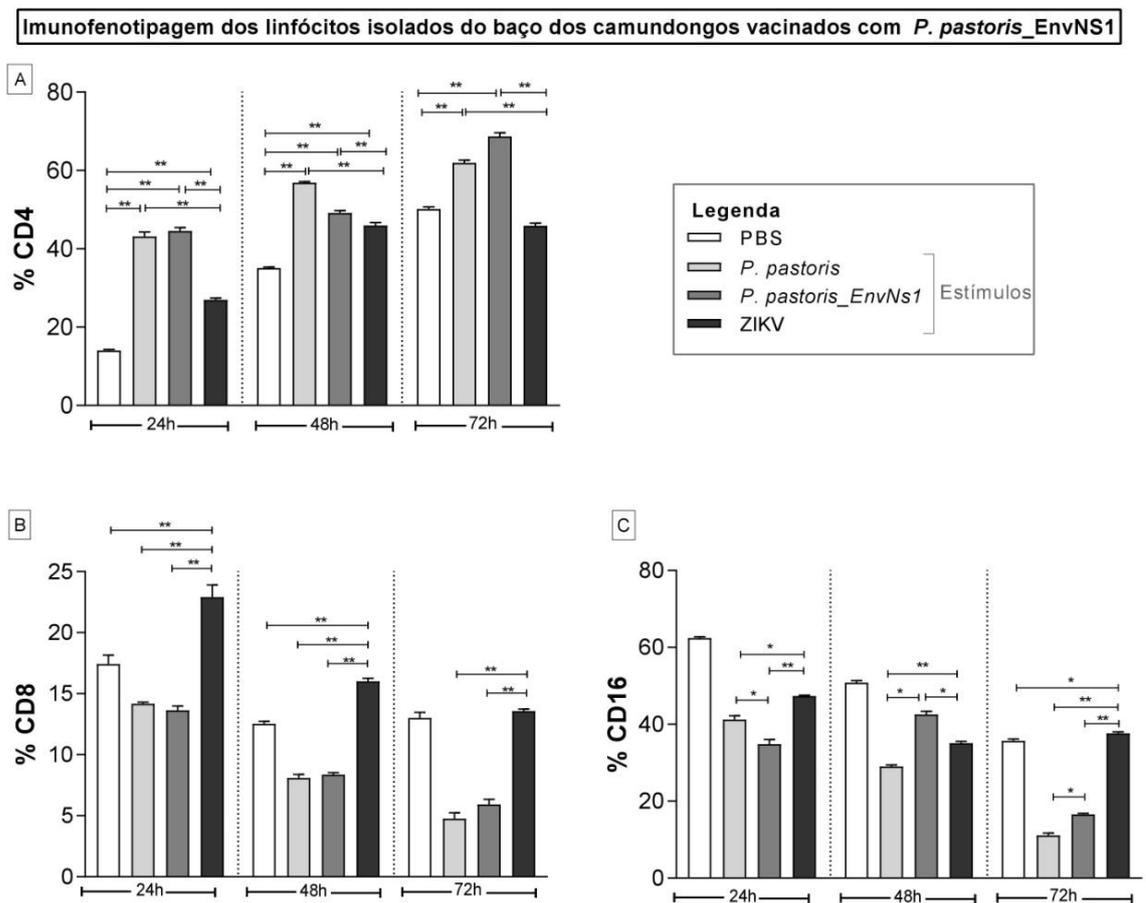


Figura 25: Perfil dos linfócitos isolados do baço dos animais imunizados com *P. pastoris_EnvNS1*, re-estimulados *in vitro* com as leveduras e com o ZIKV. Dados correspondem ao percentual de linfócitos presente no *gate* correspondente à marcação de cada tipo celular. **A)** %CD4, **B)** %CD8, **C)** %CD16. Asterisco representa significâncias estatísticas (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

A resposta quanto ao estímulo para linfócitos CD16+ também foi semelhante entre as células dos animais inoculados com ambas as vacinas. O número de células estimuladas com *P. pastoris* diminuiu progressivamente durante as culturas,

e foi o mais baixo nos tempos de 48h e 72h. O estímulo produzido pela levedura expressando EnvNS1 obteve um pico em 48h, onde superou a levedura selvagem e o vírus, porém em 72h houve uma redução considerável. Apenas o vírus induziu aumento com significância estatística em relação ao grupo controle, no tempo de 72h, destacando-se expressivamente do estímulo induzido pelas leveduras (Figura 25C).

4.5.3 Avaliação dos efeitos colaterais das vacinas

Alguns parâmetros foram analisados durante o experimento de imunização a fim de avaliar possíveis reações adversas induzidas pelas leveduras. Dentre as análises, peso e atividade dos animais imunizados foram monitorados ao longo do cronograma vacinal. Os animais foram pesados, antes da inoculação, no primeiro dia do regime de imunização, no dia da dose de reforço (sete dias após a primeira) e 21 dias após a dose inicial (Tabela 7). Não houve modificações comportamentais significativas perceptíveis ao longo do período de observação, nem alterações de peso. Durante o monitoramento pós-imunização, não foram observados pontos de inflamação, inchaço ou outros efeitos adversos no sítio de injeção.

Tabela 7: Média do peso dos grupos dos camundongos ao longo do ensaio pré-clínico

GRUPOS	PESO (g)		
	Dia 1	Dia 7	Dia 21
PBS	21,40	22,17	23,26
<i>P. pastoris</i>	21,66	22,74	23,27
<i>P.pastoris_Env</i>	20,86	22,03	23,71
<i>P.pastoris_EnvNS1</i>	22,14	22,63	22,74

Análises hematológicas e bioquímicas dos camundongos imunizados foram realizadas no intuito de atestar se a administração das leveduras promoveu alterações clínicas. Como disposto na Tabela 8, comparando-se o grupo que foi inoculado com PBS e os grupos que foram vacinados com as leveduras, não houve alterações bioquímicas significativas que qualifiquem agravos clínicos hepáticos ou renais. De maneira geral, os parâmetros hematológicos também se mostraram similares entre grupo controle que recebeu inoculação de PBS e os grupos com a levedura recombinante e expressando os antígenos vacinais (Tabela 9).

Tabela 8: Parâmetros bioquímicos dos camundongos no final do experimento de imunização (média por grupo)

Análises	PBS	<i>P. pastoris</i>	<i>P.p_Env</i>	<i>P.p_EnvNS1</i>	V.R.
Glicose	81	71,9	85,84	80,57	80,75 ± 20,25
Uréia (mg/dL)	67,9	67,22	70,08	65,12	51,2 ± 15,92
Creatinina (mg/dL)	0,47	0,58	0,61	0,56	0.48 ± 0.04
TGO (UI/L)	87,9	133,52	143,8	103,02	215.50 ± 14.85
TGP (UI/L)	142,7	154,4	145,32	145,67	110.00 ± 5.66
FAL (UI/L)	189,1	216	218,16	202,6	267 ± 84,21

Siglas: *P.p.*: *Pichia pastoris*; VR: Valor de Referência; TGO: Transaminase Glutâmico-Oxalacética; TGP: Transaminase Glutâmico-Pirúvica; FAL: Fosfatase Alcalina. Referência dos VR: Almeida et al. 2008; Lu et al. 2012.

Tabela 9: Parâmetros hematológicos dos camundongos no final do experimento de imunização (média por grupo)

Análises	PBS	<i>P. pastoris</i>	<i>P.p_Env</i>	<i>P.p_EnvNS1</i>	V.R.
Hemácias (10⁶/mm³)	4,63	5,27	5,32	4,73	7,3 ± 2,01
Hemoglobina (g/dL)	14	15,78	16,04	14,05	13.3± 1.0
Hematócrito (%)	42	47,4	48,2	42,25	39 ± 2
VCM (fL)	91,56	92,9	91,84	89,37	60.26 ± 18.25
CHCM (%)	33,13	33,2	33,16	33,02	31.88 ± 0.99
Leucócitos totais (10³/mm³)	10,2	9,38	9,16	9,2	6.7± 1.4
Neutrófilos (%)	44,66	38,8	41	44,25	22.96 ± 5.54
Linfócitos (%)	52,33	56	56,6	53,5	71.76 ± 5.9
Eosinófilos (%)	1	1,6	1,2	1	2.16 ± 1.71
Monócitos (%)	2	1,6	1,2	1,25	2.68 ± 1
Plaquetas (10³/mm³)	460	386	459,2	434	782± 230

Siglas: *P.p.*: *Pichia pastoris*; VR: Valor de Referência; VCM: Volume Corpuscular Médio; HCM: Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média. Referência dos VR: Barrios et al. 2009; Barbosa et al. 2017.

5 DISCUSSÃO

Embora já existam vacinas em fases adiantadas de avaliação, é importante ponderar que além dos critérios comuns que envolvem imunogenicidade, eficácia e segurança, existem algumas peculiaridades e nuances a se considerar no desenvolvimento de uma vacina para o ZIKV. As particularidades quanto às diferentes subpopulações, faixas-etárias e situações implicam que possivelmente mais de um produto vacinal precise ser desenvolvido para atender as necessidades vigentes (Kennedy et al. 2020).

Vacinas baseadas em epítomos tem sido desenvolvidas para prevenção e terapia contra vários agentes infecciosos e constituem uma interessante alternativa para imunização contra doenças infecciosas emergentes (Mirza et al. 2016). A disponibilidade de informação e conhecimento sobre o genoma do ZIKV e as funções das proteínas virais tem permitido o desenvolvimento de estratégias vacinais utilizando epítomos preditos como imunogênicos e capazes de induzir respostas imunes vírus-específicas mediadas por células B e T (Dikhit et al. 2016; Mirza et al. 2016; Koblichke et al. 2018). Nesse sentido, o presente estudo teve como ponto de partida a construção de cassetes de expressão compostos por epítomos presentes nas proteínas do Envelope e NS1 do ZIKV.

Dos epítomos da proteína do envelope que foram selecionados para as construções vacinais, três estão inseridos dentro da região do domínio III que é o principal alvo para anticorpos neutralizantes. Estudos prévios têm indicado a importância de incluir epítomos para células CD4+, presentes dentro de regiões como essa, no contexto do design de vacinas (Pardy et al. 2017). Em relação a NS1, quatro dos epítomos presentes na construção estão na porção C – terminal da proteína (aa 172 – 352) que vem sendo apontada como uma região imunodominante importante para a indução de respostas efetoras mediadas por células CD4+ e CD8+ (Grubor-Bauk et al. 2019).

O tamanho desses segmentos imunodominantes variam de 9 a 12 aminoácidos, que é o comprimento típico de peptídeos que interagem com moléculas de HLA, fortalecendo respostas mediadas por linfócitos citotóxicos (CTLs) (Khan et al. 2006). Além disso, epítomos promíscuos foram selecionados considerando a natureza polimórfica das moléculas de HLA levando a variações na especificidade de ligação dessas moléculas aos epítomos. A utilização de múltiplos epítomos com diferentes

especificidades de ligação a HLA representam uma abordagem interessante no desenvolvimento de vacinas, aumentando a cobertura sob a população alvo (Dikhit et al. 2016). O cassete de expressão construído permitiu que três diferentes antígenos vacinais pudessem ser estudados: I) Env-Epi, II) NS1-Epi e III) EnvNS1-Epi.

A ideia central do presente estudo foi utilizar a levedura *P. pastoris* como carreadora de antígenos, os expondo na sua superfície celular, uma vez que essa exposição representa uma forma alternativa de apresentar esses antígenos ao sistema imune. Por meio dessa abordagem, a proteína alvo é covalentemente ligada a uma proteína âncora com um motive de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) e exibida na superfície celular (Chen et al. 2017). As proteínas âncoras pertencem a classe das manoproteínas e a α -aglutinina, utilizada no presente estudo, é a mais comumente empregada tanto para *P. pastoris* e *S. cerevisiae* (Shibasaki et al. 2009; Wasilenko et al. 2009). Experimentos conduzidos por Bazan et al. (2011) mostraram uma robusta resposta imune mediada por células T induzida por *P. pastoris* expressando um antígeno recombinante em sua superfície, ainda que em níveis proteicos reduzidos comparados a quando a levedura-teste possuía o antígeno contido no citosol. Essa observação reforça a proposta de que a exposição de antígenos na superfície de leveduras facilita o reconhecimento antigenic pelo sistema imune e aumenta a indução de proteção em indivíduos vacinados (Lei et al. 2016).

As leveduras recombinantes obtidas e avaliadas quanto a produção e exposição dos epítomos do ZIKV na superfície. As proteínas-alvo foram detectadas por *Western blot* após 72h de cultura (Figura 14), similar ao observado por Mariz et al. (2015) que utilizou o mesmo vetor de expressão para a produção da proteína L1 do HPV-16 em *P. pastoris*. Microscopia de imunofluorescência tem sido largamente empregada para indicar se as proteínas de interesse estão eficientemente ancoradas na superfície das leveduras (Wasilenko et al. 2009; Kim et al. 2010; Ananphongmanee et al. 2015). Uma vez que não foram utilizados reagents para permeabilizar as células, sugere-se que o reconhecimento dos anticorpos tenha ocorrido na face externa das leveduras (Figura 15).

Ensaio imunológicos *in vitro* foram realizados para avaliar a potencialidade das vacinas baseadas em leveduras em interagir e ativar células imunológicas, além de traçar o padrão de resposta imune. As análises quanto ao perfil de citocinas induzidas por *P. pastoris* GS115 não-recombinante foi importante para o

reconhecimento e distinção da resposta inerentemente associada a administração de *P.pastoris* da induzida pela levedura carregando os antígenos.

O aumento nos níveis de TNF- α induzida por *P. pastoris*, aqui reportada, pode ser atribuída a composição de sua parede celular, mais especificamente os β -glucanos que estimulam a produção de citocinas pro-inflamatórias secretadas por macrófagos incluindo TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Vetvicka et al. 2011). O papel do TNF- α como adjuvante em estratégias contra infecções virais tem sido reportado devido a sua atuação como mediador em diversos processos da imunidade inata, maturação e recrutamento de células dendríticas e ativação de células T (Kayamuro et al. 2009). Além disso, ainda com diferenças em níveis de magnitude, *P. pastoris* seguiu o padrão do ZIKV na produção de IL-10 e TNF- α .

O contato entre as células imunológicas com o ZIKV resultou no aumento de algumas citocinas como IFN- γ , IL-10 e IL-6 (Figura 16). O mesmo padrão também foi observado a partir de análises do sangue de pacientes na fase aguda da infecção pelo vírus Zika (Lum et al. 2018). O aumento na produção de IFN- γ é associada com a ativação de células T CD4+ e CD8+ que mediam respostas imunológicas direcionadas contra células infectadas pelo ZIKV (Huang et al. 2017). O papel das células T contra o ZIKV é crítico para fornecer suporte à imunidade adaptativa contra o vírus, sendo um importante aspecto para ser considerado no design de vacinas (Lima et al. 2017).

Em relação as leveduras recombinantes, *P. pastoris_EnvNS1* promoveu aumento nos níveis de TNF- α e IL-10, e induziu a produção de IL-6 (culturas de 48h e 72h). Esse achado é interessante considerando que IL-6, também induzida pelo ZIKV, é uma das citocinas produzidas por células dendríticas em resposta a ligação via TLR-4, que bloqueia o efeito regulatório de células T supressivas que permite a ativação respostas imunes específicas contra vírus (Daudelin et al. 2013). Quanto aos resultados para TNF- α e IL-6, é importante notar que essas citocinas são produzidas pela ativação de células apresentadoras de antígenos, incluindo respostas Th1 que estimulam a proliferação e maturação de células T citotóxicas (Barron et al. 2006; Remondo et al. 2009).

A resposta induzida por *P. pastoris* expressando os epítopos EnvNS1 produziu níveis mais elevados de determinadas citocinas e apresentou um padrão mais próximo ao ZIKV, comparado aos demais candidatos vacinais. Esse efeito pode ser resultado da união dos epítopos derivados do Envelope (uma proteína estrutural) e

de NS1 (não-estrutural) que aumenta o potencial da construção vacinal, como também observado por Liu et al. (2018). Embora a proteína do Envelope seja considerada o principal alvo da resposta imune contra o ZIKV, a construção vacinal portando apenas os epítomos Env mostrou menor potencial imunogênico comparado a EnvNS1. Por outro lado, a inclusão de epítomos de células T derivados de proteínas não-estruturais, tais como NS1, parece relevante para o controle da replicação viral e pode aumentar a robustez tanto da resposta imune humoral quanto celular (Lima et al. 2017; Koblischke et al. 2018)

A citocina IL-10 teve uma produção significativa induzida por *P.pastoris* não-recombinante, expressando Env, EnvNS1 e pelo ZIKV (Figura 16 – 17). Essa citocina tem sido apontada como importante para a maturação de células T CD8+ e é requerida durante a fase de resolução de infecções (Laidlaw et al. 2015; Nizzoli et al. 2016). Além disso, tem sido reportado a importância da produção de IL-10 induzida por adjuvantes vacinais com um grande potencial para eliciar respostas protetivas mediadas por células T CD8+ (Laidlaw et al. 2015).

A ativação de linfócitos T CD4+ e CD8+ também foi avaliada após estímulo com a levedura recombinante, *P. pastoris_EnvNS1* e com o ZIKV após 24h e 48h (Figura 18 C – D). A indução de respostas medias por células T é crítica tanto para imunizações profiláticas quanto terapêuticas. Processos de imunização de sucesso requerem a geração e manutenção células T CD4+ antígeno – específicas, que também atuam suportando a resposta imune estimulando a expansão clonal de células B, prolongando a atividade dos anticorpos produzidas (Bolhassani et al. 2014). Ainda que a levedura recombinante não tenha exibido resultados significativos após 24h, um padrão de estímulo tempo-dependente foi observado em 48h e a resposta elicitada sobrepôs a promovida pela levedura selvagem e se equiparou a do vírus.

O papel das células T no contexto da infecção pelo ZIKV tem apontado como necessário para o controle da doença e pode, ainda, limitar a replicação viral no sistema nervoso (Hassert et al. 2018). Células T CD8+ também desempenham funções importantes dentro deste contexto (Lima et al. 2017). O aumento no número de linfócitos T CD8+ que o ZIKV é capaz de eliciar, *in vitro*, também foi avaliado no presente estudo. Mesmo em níveis mais baixos, *P.pastoris_EnvNS1* seguiu o padrão induzido pelo vírus, que é uma característica interessante para um candidato vacinal.

A marcação dos linfócitos com anti-CD16 permite a identificação de células *natural killer* (NK) que participam da resposta imune inata contra infecções causadas por arbovírus (Maucourant et al. 2019). Os grupos experimentais induziram aumento significativo nos níveis de células CD16+ comparados ao grupo controle, no tempo de 24h. Interessantemente, em contraste à levedura selvagem, *P. pastoris* recombinante e o ZIKV levaram a uma regulação negativa para os linfócitos CD16+ após 48h de cultura (Figura 18 E). Esse perfil é corroborado por observações sobre a infecção causada pelo ZIKV, onde não foi observado aumento na ativação da expressão de ligantes de células NK (Glasner et al. 2017). Embora *P.pastoris* leve a um aumento no número de linfócitos CD16+ nos dois tempos experimentais, aparentemente o antígeno vacinal modulou o perfil de resposta induzido pela levedura.

A expressão dos marcadores CD16/32 e CD80 para monócitos também foi avaliada (Figura 18 A – B). A população de monócitos marcados mostrou um aumento na expressão de células CD80+ mediante estímulo com ambas as leveduras. Esse resultado é interessante uma vez que a ativação e regulação positiva de receptores e moléculas co-estimulatórias, como CD80, em APCs é crítica para ativação de respostas desencadeadas por células T (Mir et al. 2015). Esses resultados também estão em acordo com estudos conduzidos por Bazan et al. (2018). Os autores avaliaram a expressão de marcadores de superfície em células dendríticas e observaram a habilidade de *P. pastoris* provocar ativação e aumento no número de células CD80+ e CD83+ (Bazan et al. 2018).

A expressão do CD16/32 nos monócitos foi similar ao padrão observado para CD80, porém um quantitativo maior de células foi detectado. Para essa marcação, a levedura não-recombinante se destacou sob os demais grupos. Monócitos CD16+ são classificados como não-clássicos (CD14+CD16+) e são mais responsivos a infecções virais do que monócitos clássicos (CD14+CD16-) (Boyette et al. 2017). No presente estudo, não foi observado estímulo significativo causado pelo vírus, embora essa subclasse de monócitos seja considerado o principal alvo na infecção pelo ZIKV em células de sangue periférico (Michlmayr et al. 2017).

Adicionalmente, uma espécie de experimentação vacinal *in vitro* foi realizado para avaliação da resposta imune das células imunológicas primadas com as leveduras recombinantes e desafiadas com o vírus. A dosagem de citocinas foi utilizada como parâmetro de resposta e foi similar entre as três leveduras

recombinantes (Env, NS1 e EnvNS1), tendo em comum a indução de IL-6, IL-10 e TNF- α . O aumento nos níveis de tais citocinas já havia sido observado nas culturas onde apenas o ZIKV havia sido utilizado como estímulo. Esse resultado sugere a participação dessas citocinas como mediadoras da resposta voltada para o vírus. Além disso, este experimento confirmou *P. pastoris_EnvNS1* como o candidato vacinal mais interessante, visto que as células imunológicas primadas com essa levedura recombinante foram mais responsivas e mostraram uma resposta similar à observada para indivíduos infectados pelo ZIKV (Tappe et al. 2016).

Os resultados obtidos a partir dos experimentos *in vitro* serviram como base e triagem inicial para avaliar o potencial imunestimulatório das leveduras – teste, porém a validação dessas leveduras como vacinas depende de ensaios mais aprofundados e de testes de inoculação *in vivo*. Deste modo, *P. pastoris* não-recombinante, *P. pastoris_Env* e *P.pastoris_EnvNS1* foram utilizadas para administração intramuscular em camundongos BALB/c. Este modelo animal vem sendo empregado para avaliação de vacinas anti-ZIKV e permite que seja traçado o perfil de resposta induzido mediante a imunização (Sumathy et al. 2017; Wang et al. 2018; Grubor-Bauk et al. 2019). As análises realizadas até o presente momento envolveram a dosagem de citocinas e imunofenotipagem dos linfócitos presentes no sangue e no baço dos animais imunizados.

Respostas mediadas por células T CD4+ têm sido detectadas em primatas não-humanos infectados pelo ZIKV e caracterizadas em camundongos imunocompetentes da linhagem C57BL/6. Nesses estudos, os linfócitos T CD4+ exibiram um padrão de resposta Th1 caracterizado pela produção de altos níveis de IFN- γ , TNF- α e IL-2, além de potente resposta efetora mediada por linfócitos T CD8+ (Lima et al. 2017; Pardy et al. 2017). O presente estudo apresentou resultados semelhantes, porém dentro de um contexto de avaliação vacinal, onde camundongos BALB/c imunizados com *P. pastoris* expressando EnvNS1 apresentaram o referido padrão de elevação de citocinas circulantes no sangue, embora não tenha sido observado aumento significativo no número de células T CD4+.

Apesar desse típico padrão Th1, a vacina *P. pastoris_EnvNS1* também induziu aumento sérico de IL-4. Essa citocina pode ser resultado da ativação de células Tfh (células T foliculares) que induzem aumento nos níveis de citocinas como IL-4 e IL-21. No contexto da infecção pelo vírus da Zika, essas células Tfh atuam de maneira

Th1-like, produzindo inclusive IFN- γ , e têm sido apontadas como importantes para o desenvolvimento de anticorpos neutralizantes contra o ZIKV (Liang et al. 2019). Níveis elevados de IL-4 já foram reportados em outro ensaio pré-clínico de uma vacina anti-ZIKV utilizando o domínio III da proteína do Envelope (EDIII) como antígeno (Yang et al 2017).

A construção vacinal com os epítomos do envelope induziu apenas a produção de TNF- α e IL-17A, mostrando uma resposta mais limitada, comparada a *P.pastoris_EnvNS1*. Ambas as vacinas induziram aumento de IL-17A, que além do papel regulatório pode ter funções pró-inflamatórias no contexto de algumas infecções virais, fúngicas e em cânceres (Reynolds et al 2010). Níveis elevados na concentração de citocinas como IL-2, IL-4 e IL-17 também já foram detectados em indivíduos na fase aguda da infecção pelo ZIKV, como reportado por Tappe et al. (2016), que apontou um perfil de resposta poli-funcional uma vez que foram detectadas citocinas características de respostas Th1, Th2 e Th17 (Tappe et al. 2016). É importante destacar que não houve alteração significativa nos níveis de citocinas no sangue dos animais que receberam *P. pastoris* não-recombinante. Isso sugere que a resposta imune que induziu ao aumento das citocinas promovida pelas construções vacinais foi antígeno-específica.

As subpopulações de linfócitos CD4+, CD8+ e CD16+ foram avaliadas tanto no sangue dos camundongos 14 dias após a última dose, quanto no baço dos animais mediante re – estímulo *in vitro*. Quanto aos linfócitos circulantes, o maior estímulo foi para células T CD8+, onde *P. pastoris* por si só é capaz de elevar o número de células, assim como as leveduras recombinantes. Observa-se uma modulação induzida pelo antígeno recombinante, uma vez que *P. pastoris_Env* induz menor estímulo comparada a não-recombinante e a expressando EnvNS1. Provavelmente, os epítomos NS1 influenciaram na ativação dos linfócitos CD8+, o que reforça a importância da inclusão de epítomos imunodominantes presentes em proteínas não – estruturais no design de vacinas para flavivírus (Li et al. 2018).

Células imunológicas mononucleares foram isoladas do baço dos animais, e foram re-estimuladas com a levedura não-recombinante, *P. pastoris_Env* e EnvNS1, e com o vírus. De modo geral, as leveduras promovem um aumento no número de células CD4+, enquanto o vírus induz maior estímulo para CD8+ e CD16+, independente da preparação vacinal que o camundongo recebeu. As vacinas testadas no presente estudo promovem respostas que estão em consonância com

outros estudos acerca da importância das células T no contexto do desenvolvimento vacinal, que indicam que a resposta produzida deve ser um balanço coordenado da ação de anticorpos, células Tfh CD4+, e células Th1 CD4+ e CD8+ a fim de conferir controle da infecção viral e proteção à longo prazo (Elong Ngonu et al. 2019; Grubor-Bauk et al. 2019).

Embora os dados sobre respostas a epítopos para células T CD4+ e CD8+ no contexto da infecção pelo ZIKV ainda sejam limitados, respostas mediadas por células T CD4+ específicas para as proteínas Env e NS1 já foram reportadas em indivíduos infectados pelo vírus, e mostraram baixos níveis de reatividade cruzada com o vírus da Dengue (Lima et al. 2017). Esse tipo de observação reforça a ideia de se utilizar epítopos imunodominantes das proteínas Env e NS1 como antígenos vacinais.

P. pastoris expressando epítopos da proteína do envelope e de NS1 mostrou maior potencial em induzir respostas celulares tanto *in vitro*, quanto *in vivo*. Análises adicionais precisam ser feitas para validar essa levedura como vacina profilática para o ZIKV. Dentre essas análises, a capacidade de induzir a produção de anticorpos neutralizantes e fornecer proteção contra a infecção viral são fundamentais. É importante avaliar o quanto *P. pastoris*_EnvNS1 é capaz de induzir proteção *in vivo*, mediante desafios imunológicos com cepas virais. Para tanto, linhagens de camundongos imunossuprimidos, como o A129 e o AG129, são necessárias uma vez que elas são permissivas à infecção e possibilitam o acompanhamento de manifestações clínicas causadas pelo ZIKV (Pena et al. 2018). Desse modo, seria possível avaliar se a imunização com a vacina proposta é capaz de proteger e/ou limitar a infecção viral.

6 CONCLUSÕES

Os dados apresentados neste estudo demonstram, de forma inédita, o desenvolvimento de uma estratégia vacinal contra o ZIKV baseada na utilização de *P. pastoris* como carreadora de antígenos virais. O presente trabalho contribui com informações tanto no campo de desenvolvimento de vacinas para o ZIKV, quanto no estabelecimento de leveduras como vetores vacinais. O potencial biotecnológico de *P. pastoris* foi explorado de diferentes formas: como biofábrica, como carreadora de antígenos e como adjuvante vacinal, mostrando sua versatilidade. Inclusive, o vetor de expressão construído permite a clonagem de outros genes que possam ser explorados em outras estratégias vacinais.

Como principal produto, *P. pastoris_EnvNS1* mostrou-se um interessante candidato dentro das análises imunológicas realizadas, induzindo a ativação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ e a produção de citocinas efetoras, consideradas chave para a geração de respostas imunes protetivas para a infecção pelo vírus da Zika. Tal vacina poderá ser avaliada em estudos futuros para caracterizações mais detalhadas quanto ao seu potencial para imunização contra o ZIKV.

REFERÊNCIAS

ABBINK, Peter; LAROCCA, Rafael A.; DEJNIRATTISAI, Wanwisa; PETERSON, Rebecca; NKOLOLA, Joseph P.; BORDUCCHI, Erica N.; SUPASA, Piyada; MONGKOLSAPAYA, Juthathip; SCREATON, Gavin R.; BAROUCH, Dan H.. Therapeutic and protective efficacy of a dengue antibody against Zika infection in rhesus monkeys. **Nature Medicine**, v. 24, n. 6, p. 721-723, jun. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41591-018-0056-0>.

ABBINK, Peter; STEPHENSON, Kathryn E.; BAROUCH, Dan H.. Zika virus vaccines. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 10, p. 594-600, 19 jun. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-018-0039-7>.

AGRELLI, Almerinda; MOURA, Ronald Rodrigues de; CROVELLA, Sergio; BRANDÃO, Lucas André Cavalcanti. ZIKA virus entry mechanisms in human cells. **Infection, Genetics And Evolution**, v. 69, p. 22-29, abr. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2019.01.018>.

AHMAD, Mudassar; HIRZ, Melanie; PICHLER, Harald; SCHWAB, Helmut. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. : recent achievements and perspectives for heterologous protein production. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 98, n. 12, p. 5301-5317, 18 abr. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-014-5732-5>.

ALMEIDA, João Ricardo Moreira de; MORAES, Lídia Maria Pepe de; TORRES, Fernando Araripe Gonçalves. Molecular characterization of the 3-phosphoglycerate kinase gene (PGK1) from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Yeast**, v. 22, n. 9, p. 725-737, 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/yea.1243>.

ANANPHONGMANEE, Vorawit; SRISALA, Jiraporn; SRITUNYALUCKSANA, Kallaya; BOONCHIRD, Chuenchit. Yeast Surface Display of Two Proteins Previously Shown to Be Protective Against White Spot Syndrome Virus (WSSV) in Shrimp. **Plos One**, v. 10, n. 6, p. 128764-0, 17 jun. 2015. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0128764>.

ARDIANI, Andressa; HIGGINS, Jack P.; HODGE, James W.. Vaccines based on whole recombinant *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Fems Yeast Research**, v. 10, n. 8, p. 1060-1069, 5 nov. 2010. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00665.x>.

ARNOLD, Marina; DURAIRAJ, Vijay; MUNDT, Egbert; SCHULZE, Katja; BREUNIG, Karin D.; BEHRENS, Sven-erik. Protective Vaccination against Infectious Bursal Disease Virus with Whole Recombinant *Kluyveromyces lactis* Yeast Expressing the Viral VP2 Subunit. **Plos One**, v. 7, n. 9, p. 42870-0, 14 set. 2012. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0042870>.

ARRUDA, Andreilisse; REIS, Viviane Castelo Branco; BATISTA, Vinícius Daniel Ferreira; DAHER, Bruno Sahim; PIVA, Luiza Cesca; MARCO, Janice Lisboa de; MORAES, Lidia Maria Pepe de; TORRES, Fernando Araripe Gonçalves. A constitutive expression system for *Pichia pastoris* based on the PGK1 promoter. **Biotechnology Letters**, v. 38, n. 3, p. 509-517, 19 nov. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10529-015-2002-2>.

BAL, Jyotiranjana; LUONG, Nguyen Ngoc; PARK, Jisang; SONG, Ki-duk; JANG, Yong-suk; KIM, Dae-hyuk. Comparative immunogenicity of preparations of yeast-derived dengue oral vaccine candidate. **Microbial Cell Factories**, v. 17, n. 1, 16 fev. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12934-018-0876-0>.

BARRETO-BERGTER, Eliana; FIGUEIREDO, Rodrigo T.. Fungal glycans and the innate immune recognition. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, v. 4, 14 out. 2014. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2014.00145>.

BARRETT, Alan D. T.. Current status of Zika vaccine development: zika vaccines advance into clinical evaluation. : Zika vaccines advance into clinical evaluation. **Npj Vaccines**, v. 3, n. 1, 11 jun. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41541-018-0061-9>.

BARRON, Michelle A.; BLYVEIS, Naomi; PAN, Samuel C.; WILSON, Cara C.. Human Dendritic Cell Interactions with Whole Recombinant Yeast: implications for hiv-1 vaccine development. : Implications for HIV-1 Vaccine Development. **Journal Of Clinical Immunology**, v. 26, n. 3, p. 251-264, maio 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10875-006-9020-8>.

BAZAN, Silvia Boschi; BREINIG, Tanja; SCHMITT, Manfred J.; BREINIG, Frank. Heat treatment improves antigen-specific T cell activation after protein delivery by several but not all yeast genera. **Vaccine**, v. 32, n. 22, p. 2591-2598, maio 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.03.043>.

BAZAN, Silvia Boschi; GEGINAT, Gernot; BREINIG, Tanja; SCHMITT, Manfred J.; BREINIG, Frank. Uptake of various yeast genera by antigen-presenting cells and influence of subcellular antigen localization on the activation of ovalbumin-specific CD8 T lymphocytes. **Vaccine**, v. 29, n. 45, p. 8165-8173, out. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.07.141>.

BAZAN, Silvia Boschi; WALCH-RÜCKHEIM, Barbara; SCHMITT, Manfred J.; BREINIG, Frank. Maturation and cytokine pattern of human dendritic cells in response to different yeasts. **Medical Microbiology And Immunology**, v. 207, n. 1, p. 75-81, 21 nov. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00430-017-0528-8>.

BEAVER, Jacob T.; LELUTIU, Nadia; HABIB, Rumi; SKOUNTZOU, Ioanna. Evolution of Two Major Zika Virus Lineages: implications for pathology, immune response, and vaccine development. : Implications for Pathology, Immune Response, and Vaccine Development. **Frontiers In Immunology**, v. 9, , 18 jul. 2018. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2018.01640>.

BERNER, Vanessa K.; DUPRE, Sally A.; REDELMAN, Doug; HUNTER, Kenneth W.. Microparticulate β -glucan vaccine conjugates phagocytized by dendritic cells activate both naïve CD4 and CD8 T cells in vitro. **Cellular Immunology**, v. 298, n. 1-2, p. 104-114, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2015.10.007>.

BERNER, Vanessa K.; SURA, Michael E.; HUNTER, Kenneth W.. Conjugation of protein antigen to microparticulate β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae*: a new adjuvant for intradermal and oral immunizations. : a new adjuvant for intradermal and oral immunizations. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 80, n. 6, p. 1053-1061, out. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-008-1618-8>.

BIAN, Guanglin; CHENG, Yuming; WANG, Zekun; HU, Yunwen; ZHANG, Xiaonan; WU, Min; CHEN, Zhiao; SHI, Bisheng; SUN, Shuhui; SHEN, Yan. Whole recombinant *Hansenula polymorpha* expressing hepatitis B virus surface antigen (yeast-HBsAg) induces potent HBsAg-specific Th1 and Th2 immune responses. **Vaccine**, v. 28, n. 1, p. 187-194, dez. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.09.101>.

BILUSIC, Marijo; HEERY, Christopher R.; ARLEN, Philip M.; RAUCKHORST, Myrna; APELIAN, David; TSANG, Kwong Y.; TUCKER, Jo A.; JOCHEMS, Caroline; SCHLOM, Jeffrey; GULLEY, James L.. Phase I trial of a recombinant yeast-CEA vaccine (GI-6207) in adults with metastatic CEA-expressing carcinoma. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 63, n. 3, p. 225-234, 7 dez. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00262-013-1505-8>.

BOLHASSANI, Azam; MULLER, Martin; ROOHVAND, Farzin; MOTEVALLI, Fatemeh; AGI, Elnaz; SHOKRI, Mehdi; RAD, Mahdiah Motamedi; HOSSEINZADEH, Sahar. Whole recombinant *Pichia pastoris* expressing HPV16 L1 antigen is superior in inducing protection against tumor growth as compared to killed transgenic *Leishmania*. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 10, n. 12, p. 3499-3508, 2 dez. 2014. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4161/21645515.2014.979606>.

BOLLATI, Michela; ALVAREZ, Karin; ASSENBERG, René; BARONTI, Cécile; CANARD, Bruno; COOK, Shelley; COUTARD, Bruno; DECROLY, Etienne; LAMBALLERIE, Xavier de; GOULD, Ernest A.. Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: perspectives for drug design. : Perspectives for drug design. **Antiviral Research**, v. 87, n. 2, p. 125-148, ago. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.11.009>.

BOYETTE, Lisa B.; MACEDO, Camila; HADI, Kevin; ELINOFF, Beth D.; WALTERS, John T.; RAMASWAMI, Bala; CHALASANI, Geetha; TABOAS, Juan M.; LAKKIS, Fadi G.; METES, Diana M.. Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets. **Plos One**, v. 12, n. 4, p. 0176460-0, 26 abr. 2017. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0176460>.

BRASIL, Patrícia; SEQUEIRA, Patricia Carvalho; FREITAS, Andrea D'avila; ZOGBI, Heruza Einfeld; CALVET, Guilherme Amaral; SOUZA, Rogerio Valls de; SIQUEIRA, André Machado; MENDONCA, Marcos Cesar Lima de; NOGUEIRA, Rita Maria Ribeiro; FILIPPIS, Ana Maria Bispo de. Guillain-Barré syndrome associated with Zika

virus infection. **The Lancet**, v. 387, n. 10026, p. 1482-1482, abr. 2016. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(16\)30058-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(16)30058-7).

BRAULT, Aaron C.; DOMI, Arban; MCDONALD, Erin M.; TALMI-FRANK, Dalit; MCCURLEY, Nathanael; BASU, Rahul; ROBINSON, Harriet L.; HELLERSTEIN, Michael; DUGGAL, Nisha K.; BOWEN, Richard A.. A Zika Vaccine Targeting NS1 Protein Protects Immunocompetent Adult Mice in a Lethal Challenge Model. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, , 7 nov. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-15039-8>.

BREINIG, Frank; BREINIG, Tanja; SCHMITT, Manfred J.. MRNA Delivery to Human Dendritic Cells by Recombinant Yeast and Activation of Antigen-Specific Memory T Cells. **Methods In Molecular Biology**, p. 163-184, 8 nov. 2012. Humana Press. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-62703-260-5_11.

BROWN, Gordon D.; HERRE, Jurgen; WILLIAMS, David L.; WILLMENT, Janet A.; MARSHALL, Andrew S. J.; GORDON, Siamon. Dectin-1 Mediates the Biological Effects of β -Glucans. **Journal Of Experimental Medicine**, v. 197, n. 9, p. 1119-1124, 28 abr. 2003. Rockefeller University Press. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20021890>.

CAMPOS, Túlio de Lima; DURÃES-CARVALHO, Ricardo; REZENDE, Antonio Mauro; CARVALHO, Otávio Valério de; KOHL, Alain; WALLAU, Gabriel Luz; PENA, Lindomar José. Revisiting Key Entry Routes of Human Epidemic Arboviruses into the Mainland Americas through Large-Scale Phylogenomics. **International Journal Of Genomics**, v. 2018, p. 1-9, 8 out. 2018. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2018/6941735>.

CAO-LORMEAU, Van-mai; ROCHE, Claudine; TEISSIER, Anita; ROBIN, Emilie; BERRY, Anne-laure; MALLETT, Henri-pierre; SALL, Amadou Alpha; MUSSO, Didier. Zika Virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 6, p. 1084-1086, jun. 2014. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). <http://dx.doi.org/10.3201/eid2006.140138>.

CHARREL, Rémi N; LEPARC-GOFFART, Isabelle; PAS, Suzan; LAMBALLERIE, Xavier de; KOOPMANS, Marion; REUSKEN, Chantal. Background review for diagnostic test development for Zika virus infection. **Bulletin Of The World Health Organization**, v. 94, n. 8, p. 574-584, 1 ago. 2016. WHO Press. <http://dx.doi.org/10.2471/blt.16.171207>.

CHÁVEZ, Juliana Helena; SILVA, Jaqueline Raymondi; AMARILLA, Alberto Anastacio; FIGUEIREDO, Luiz Tadeu Moraes. Domain III peptides from flavivirus envelope protein are useful antigens for serologic diagnosis and targets for immunization. **Biologicals**, v. 38, n. 6, p. 613-618, nov. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biologicals.2010.07.004>.

CHEN, Xianzhong. Yeast cell surface display: an efficient strategy for improvement of bioethanol fermentation performance. : An efficient strategy for improvement of bioethanol fermentation performance. **Bioengineered**, v. 8, n. 2, p. 115-119, 26 jul. 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/21655979.2016.1212135>.

CHERF, Gerald M.. **Applications of Yeast Surface Display for Protein Engineering**. New York, Ny: Springer New York, 2015.

COHN, Allen; MORSE, Michael A.; O'NEIL, Bert; WHITING, Samuel; COESHOTT, Claire; FERRARO, John; BELLGRAU, Donald; APELIAN, David; RODELL, Timothy C.. Whole Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Expressing Ras Mutations as Treatment for Patients With Solid Tumors Bearing Ras Mutations. **Journal Of Immunotherapy**, v. 41, n. 3, p. 141-150, abr. 2018. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/cji.0000000000000219>.

COMAR, Samuel R.; DANCHURA, Heloísa S. M.; SILVA, Paulo H.. Contagem de plaquetas: avaliação de metodologias manuais e aplicação na rotina laboratorial. : avaliação de metodologias manuais e aplicação na rotina laboratorial. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 6, p. 431-436, 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-84842009005000087>.

COSTA, Hicham El; GOUILLY, Jordi; MANSUY, Jean-michel; CHEN, Qian; LEVY, Claude; CARTRON, Géraldine; VEAS, Francisco; AL-DACCAK, Reem; IZOPET, Jacques; JABRANE-FERRAT, Nabila. ZIKA virus reveals broad tissue and cell tropism during the first trimester of pregnancy. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, 19 out. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep35296>.

DALY, Rachel; HEARN, Milton T. W.. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. : a useful experimental tool in protein engineering and production. **Journal Of Molecular Recognition**, v. 18, n. 2, p. 119-138, 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jmr.687>.

DAUDELIN, Jean-françois; MATHIEU, Mélissa; BOULET, Salix; LABRECQUE, Nathalie. IL-6 Production by Dendritic Cells Is Dispensable for CD8+Memory T-Cell Generation. **Biomed Research International**, v. 2013, p. 1-12, 2013. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/126189>.

DEY, Sumanta; NANDY, Ashesh; BASAK, Subhash C.; NANDY, Papiya; DAS, Sukhen. A Bioinformatics approach to designing a Zika virus vaccine. **Computational Biology And Chemistry**, v. 68, p. 143-152, jun. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2017.03.002>.

DIAMOND, Michael S.; LEDGERWOOD, Julie E.; PIERSON, Theodore C.. Zika Virus Vaccine Development: progress in the face of new challenges. : Progress in the Face of New Challenges. **Annual Review Of Medicine**, v. 70, n. 1, p. 121-135, 27 jan. 2019. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-med-040717-051127>.

DICK, G.w.a; KITCHEN, S.f; HADDOW, A.j. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509-520, set. 1952. Oxford University Press (OUP). [http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(52\)90042-4](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(52)90042-4).

DIKHIT, Manas R.; ANSARI, Md. Yousuf; VIJAYMAHANTESH; KALYANI; MANSURI, Rani; SAHOO, Bikash R.; DEHURY, Budheswar; AMIT, Ajay; TOPNO,

- Roshan K.; SAHOO, Ganesh C.. Computational prediction and analysis of potential antigenic CTL epitopes in Zika virus: a first step towards vaccine development. : A first step towards vaccine development. **Infection, Genetics And Evolution**, v. 45, , p. 187-197, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2016.08.037>.
- DOWD, K. A.; KO, S.-y.; MORABITO, K. M.; YANG, E. S.; PELC, R. S.; DEMASO, C. R.; CASTILHO, L. R.; ABBINK, P.; BOYD, M.; NITYANANDAM, R.. Rapid development of a DNA vaccine for Zika virus. **Science**, v. 354, n. 6309, p. 237-240, 22 set. 2016. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.aai9137>.
- DRISCOLL, Michael; HANSEN, Richard; DING, Chuanlin; CRAMER, Daniel E.; YAN, Jun. Therapeutic potential of various β -glucan sources in conjunction with anti-tumor monoclonal antibody in cancer therapy. **Cancer Biology & Therapy**, v. 8, n. 3, p. 218-225, fev. 2009. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4161/cbt.8.3.7337>.
- DUDLEY, Dawn M.; ALIOTA, Matthew T.; MOHR, Emma L.; WEILER, Andrea M.; LEHRER-BREY, Gabrielle; WEISGRAU, Kim L.; MOHNS, Mariel S.; BREITBACH, Meghan E.; RASHEED, Mustafa N.; NEWMAN, Christina M.. A rhesus macaque model of Asian-lineage Zika virus infection. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, 28 jun. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms12204>.
- DUFFY, Mark R.; CHEN, Tai-ho; HANCOCK, W. Thane; POWERS, Ann M.; KOOL, Jacob L.; LANCIOTTI, Robert S.; PRETRICK, Moses; MARFEL, Maria; HOLZBAUER, Stacey; DUBRAY, Christine. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal Of Medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536-2543, 11 jun. 2009. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa0805715>.
- DUGGAL, Nisha K.; RITTER, Jana M.; PESTORIUS, Samuel E.; ZAKI, Sherif R.; DAVIS, Brent S.; CHANG, Gwong-jen J.; BOWEN, Richard A.; BRAULT, Aaron C.. Frequent Zika Virus Sexual Transmission and Prolonged Viral RNA Shedding in an Immunodeficient Mouse Model. **Cell Reports**, v. 18, n. 7, p. 1751-1760, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.056>.
- FERNANDEZ, Estefania; DEJNIRATTISAI, Wanwisa; CAO, Bin; SCHEAFFER, Suzanne M; SUPASA, Piyada; WONGWIWAT, Wiyada; ESAKKY, Prabagaran; DRURY, Andrea; MONGKOLSAPAYA, Juthathip; MOLEY, Kelle H. Human antibodies to the dengue virus E-dimer epitope have therapeutic activity against Zika virus infection. **Nature Immunology**, v. 18, n. 11, p. 1261-1269, 25 set. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/ni.3849>.
- FRANZUSOFF, Alex; DUKE, Richard C; KING, Thomas H; LU, Yingnian; RODELL, Timothy C. Yeasts encoding tumour antigens in cancer immunotherapy. **Expert Opinion On Biological Therapy**, v. 5, n. 4, p. 565-575, abr. 2005. Informa Healthcare. <http://dx.doi.org/10.1517/14712598.5.4.565>.
- FREIRE, Marjorie C. L. C.; POL-FACHIN, Laércio; COÊLHO, Danilo F.; VIANA, Isabelle F. T.; MAGALHÃES, Tereza; CORDEIRO, Marli T.; FISCHER, Nico;

LOEFFLER, Felix F.; JAENISCH, Thomas; FRANCA, Rafael F.. Mapping Putative B-Cell Zika Virus NS1 Epitopes Provides Molecular Basis for Anti-NS1 Antibody Discrimination between Zika and Dengue Viruses. **Acs Omega**, v. 2, n. 7, p. 3913-3920, 25 jul. 2017. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acsomega.7b00608>.

FREITAS, Bruno de Paula; DIAS, João Rafael de Oliveira; PRAZERES, Juliana; SACRAMENTO, Gielson Almeida; KO, Albert Icksang; MAIA, Maurício; BELFORT, Rubens. Ocular Findings in Infants With Microcephaly Associated With Presumed Zika Virus Congenital Infection in Salvador, Brazil. **Jama Ophthalmology**, v. 134, n. 5, p. 529-529, 1 maio 2016. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2016.0267>.

GAUDINSKI, Martin R; HOUSER, Katherine V; MORABITO, Kaitlyn M; HU, Zonghui; YAMSHCHIKOV, Galina; ROTHWELL, Ro Shauna; BERKOWITZ, Nina; MENDOZA, Floreliz; SAUNDERS, Jamie G; NOVIK, Laura. Safety, tolerability, and immunogenicity of two Zika virus DNA vaccine candidates in healthy adults: randomised, open-label, phase 1 clinical trials. : randomised, open-label, phase 1 clinical trials. **The Lancet**, v. 391, n. 10120, p. 552-562, fev. 2018. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(17\)33105-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(17)33105-7).

GEBAUER, Mandy; HÜRLIMANN, Hans C.; BEHRENS, Martina; WOLFF, Thorsten; BEHRENS, Sven-erik. Subunit vaccines based on recombinant yeast protect against influenza A virus in a one-shot vaccination scheme. **Vaccine**, v. 37, n. 37, p. 5578-5587, set. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.07.094>.

GLASNER, Ariella; OIKNINE-DJIAN, Esther; WEISBLUM, Yiska; DIAB, Mohammad; PANET, Amos; WOLF, Dana G.; MANDELBOIM, Ofer. Zika Virus Escapes NK Cell Detection by Upregulating Major Histocompatibility Complex Class I Molecules. **Journal Of Virology**, v. 91, n. 22, , 6 set. 2017. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.00785-17>.

GLEISER, Marcelo. **Cartas a um jovem cientista: o universo, a vida e outras paixões**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 160 p.

GOO, Leslie; DEMASO, Christina R.; PELC, Rebecca S.; LEDGERWOOD, Julie E.; GRAHAM, Barney S.; KUHN, Richard J.; PIERSON, Theodore C.. The Zika virus envelope protein glycan loop regulates virion antigenicity. **Virology**, v. 515, p. 191-202, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2017.12.032>.

GOODRIDGE, Helen S.; WOLF, Andrea J.; UNDERHILL, David M.. α -glucan recognition by the innate immune system. **Immunological Reviews**, v. 230, n. 1, p. 38-50, jul. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-065x.2009.00793.x>.

GRIFONI, Alba; PHAM, John; SIDNEY, John; O'ROURKE, Patrick H.; PAUL, Sinu; PETERS, Bjoern; MARTINI, Sheridan R.; SILVA, Aruna D. de; RICCIARDI, Michael J.; MAGNANI, Diogo M.. Prior Dengue Virus Exposure Shapes T Cell Immunity to Zika Virus in Humans. **Journal Of Virology**, v. 91, n. 24, , 4 out. 2017. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.01469-17>.

GRUBOR-BAUK, B.; WIJESUNDARA, D. K.; MASAVULI, M.; ABBINK, P.; PETERSON, R. L.; PROW, N. A.; LAROCCA, R. A.; MEKONNEN, Z. A.; SHRESTHA, A.; EYRE, N. S.. NS1 DNA vaccination protects against Zika infection through T cell-mediated immunity in immunocompetent mice. **Science Advances**, v. 5, n. 12, p. 2388-0, dez. 2019. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/sciadv.aax2388>.

HADDOW, Andrew D.; NASAR, Farooq; GUZMAN, Hilda; PONLAWAT, Alongkot; JARMAN, Richard G.; TESH, Robert B.; WEAVER, Scott C.. 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. : Culicidae) to Spondweni Virus. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 10, p. 0005083-0, 26 out. 2016. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0005083>.

HASAN, S. Saif; SEVVANA, Madhumati; KUHN, Richard J.; ROSSMANN, Michael G.. Structural biology of Zika virus and other flaviviruses. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 25, n. 1, p. 13-20, jan. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41594-017-0010-8>.

HASSERT, Mariah; WOLF, Kyle J.; SCHWETYE, Katherine E.; DIPAOLO, Richard J.; BRIEN, James D.; PINTO, Amelia K.. CD4+T cells mediate protection against Zika associated severe disease in a mouse model of infection. **Plos Pathogens**, v. 14, n. 9, p. 1007237-0, 13 set. 2018. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1007237>.

HEERY, C. R.; SINGH, B. H.; RAUCKHORST, M.; MARTE, J. L.; DONAHUE, R. N.; GRENGA, I.; RODELL, T. C.; DAHUT, W.; ARLEN, P. M.; MADAN, R. A.. Phase I Trial of a Yeast-Based Therapeutic Cancer Vaccine (GI-6301) Targeting the Transcription Factor Brachyury. **Cancer Immunology Research**, v. 3, n. 11, p. 1248-1256, 30 jun. 2015. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/2326-6066.cir-15-0119>.

HEINZ, Franz X.; STIASNY, Karin. Flaviviruses and flavivirus vaccines. **Vaccine**, v. 30, n. 29, p. 4301-4306, jun. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.114>.

HEINZ, Franz X.; STIASNY, Karin. The Antigenic Structure of Zika Virus and Its Relation to Other Flaviviruses: implications for infection and immunoprophylaxis. : Implications for Infection and Immunoprophylaxis. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, v. 81, n. 1, , 8 fev. 2017. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/mubr.00055-16>.

HOROBIN, Rw. How Romanowsky stains work and why they remain valuable — including a proposed universal Romanowsky staining mechanism and a rational troubleshooting scheme. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 86, n. 1, p. 36-51, 14 jan. 2011. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/10520295.2010.515491>.

HUANG, Huarong; LI, Shihua; ZHANG, Yongli; HAN, Xiaojuan; JIA, Baoqian; LIU, Hongtao; LIU, Dandan; TAN, Shuguang; WANG, Qihui; BI, Yuhai. CD8+ T Cell

Immune Response in Immunocompetent Mice during Zika Virus Infection. **Journal Of Virology**, v. 91, n. 22, , 23 ago. 2017. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.00900-17>.

JACOB, Daria; RUFFIE, Claude; DUBOIS, Myriam; COMBREDT, Chantal; AMINO, Rogerio; FORMAGLIO, Pauline; GORGETTE, Olivier; PEHAU-ARNAUDET, Gérard; GUERY, Charline; PUIJALON, Odile. Whole Pichia pastoris Yeast Expressing Measles Virus Nucleoprotein as a Production and Delivery System to Multimerize Plasmodium Antigens. **Plos One**, v. 9, n. 1, p. 86658-86658, 27 jan. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0086658>.

KANJAN, Pochanart; SAHASRABUDHE, Neha M.; HAAN, Bart J. de; VOS, Paul de. Immune effects of β -glucan are determined by combined effects on Dectin-1, TLR2, 4 and 5. **Journal Of Functional Foods**, v. 37, p. 433-440, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2017.07.061>.

KAYAMURO, Hiroyuki; ABE, Yasuhiro; YOSHIOKA, Yasuo; KATAYAMA, Kazufumi; NOMURA, Tetsuya; YOSHIDA, Tokuyuki; YAMASHITA, Kohei; YOSHIKAWA, Tomoaki; KAWAI, Yuichi; MAYUMI, Tadanori. The use of a mutant TNF- α as a vaccine adjuvant for the induction of mucosal immune responses. **Biomaterials**, v. 30, n. 29, p. 5869-5876, out. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.009>.

KENNEDY, Richard B.; OVSYANNIKOVA, Inna G.; TOSH, Pritish K.; POLAND, Gregory A.. Zika Vaccines. **Vaccinations**, p. 75-88, 2019. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-323-55435-0.00005-7>.

KENNGOTT, Elisabeth E.; KIEFER, Ruth; SCHNEIDER-DAUM, Nicole; HAMANN, Alf; SCHNEIDER, Marc; SCHMITT, Manfred J.; BREINIG, Frank. Surface-modified yeast cells: a novel eukaryotic carrier for oral application. : A novel eukaryotic carrier for oral application. **Journal Of Controlled Release**, v. 224, p. 1-7, fev. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.12.054>.

KHAN, Asif M.; MIOTTO, Olivo; HEINY, A.t.; SALMON, Jerome; SRINIVASAN, K.n.; NASCIMENTO, Eduardo J.m.; MARQUES, Ernesto T.a.; BRUSIC, Vladimir; TAN, Tin Wee; AUGUST, J. Thomas. A systematic bioinformatics approach for selection of epitope-based vaccine targets. **Cellular Immunology**, v. 244, n. 2, p. 141-147, dez. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2007.02.005>.

KIM, Hyunah; YOO, Su Jin; KANG, Hyun Ah. Yeast synthetic biology for the production of recombinant therapeutic proteins. **Fems Yeast Research**, , ago. 2014. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/1567-1364.12195>.

KIM, Jung-mi; JUNG, Dea-im; EOM, Yoo Jeong; PARK, Seung-moon; YOO, Han-sang; JANG, Yong-suk; YANG, Moon-sik; KIM, Dae-hyuk. Surface-Displayed Expression of a Neutralizing Epitope of ApxIIA Exotoxin in *Saccharomyces cerevisiae* and Oral Administration of It for Protective Immune Responses against Challenge by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry**, v. 74, n. 7, p. 1362-1367, 23 jul. 2010. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.90941>.

KING, Thomas H.; KEMMLER, Charles B.; GUO, Zhimin; MANN, Derrick; LU, Yingnian; COESHOTT, Claire; GEHRING, Adam J.; BERTOLETTI, Antonio; HO, Zi Z.; DELANEY, William. A Whole Recombinant Yeast-Based Therapeutic Vaccine Elicits HBV X, S and Core Specific T Cells in Mice and Activates Human T Cells Recognizing Epitopes Linked to Viral Clearance. **Plos One**, v. 9, n. 7, p. 101904-101904, 22 jul. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0101904>.

KOBLISCHKE, Maximilian; STIASNY, Karin; ABERLE, Stephan W.; MALAFA, Stefan; TSOUCHNIKAS, Georgios; SCHWAIGER, Julia; KUNDI, Michael; HEINZ, Franz X.; ABERLE, Judith H.. Structural Influence on the Dominance of Virus-Specific CD4 T Cell Epitopes in Zika Virus Infection. **Frontiers In Immunology**, v. 9, 30 maio 2018. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2018.01196>.

KONDO, A.; UEDA, M.. Yeast cell-surface display?applications of molecular display. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 64, n. 1, p. 28-40, 1 mar. 2004. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-003-1492-3>.

KRAUER, Fabienne; RIESEN, Maurane; REVEIZ, Ludovic; OLADAPO, Olufemi T.; MARTÍNEZ-VEGA, Ruth; PORGO, Teegwendé V.; HAEFLIGER, Anina; BROUTET, Nathalie J.; LOW, Nicola. Zika Virus Infection as a Cause of Congenital Brain Abnormalities and Guillain–Barré Syndrome: systematic review. : Systematic Review. **Plos Medicine**, v. 14, n. 1, p. 1002203-1002203, 3 jan. 2017. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.1002203>.

KROW-LUCAL, Elisabeth R.; BIGGERSTAFF, Brad J.; STAPLES, J. Erin. Estimated Incubation Period for Zika Virus Disease. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 5, p. 841-845, maio 2017. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). <http://dx.doi.org/10.3201/eid2305.161715>.

KUMAR, Ravinder; KUMAR, Piyush. Yeast-based vaccines: new perspective in vaccine development and application. : New perspective in vaccine development and application. **Fems Yeast Research**, v. 19, n. 2, , 21 jan. 2019. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/femsyr/foz007>.

KURODA, Kouichi; UEDA, Mitsuyoshi. Cell surface engineering of yeast for applications in white biotechnology. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 1, p. 1-9, 25 set. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10529-010-0403-9>.

KWEK, Swee Sen; WATANABE, Satoru; CHAN, Kuan Rong; ONG, Eugenia Z.; TAN, Hwee Cheng; NG, Wy Ching; NGUYEN, Mien T. X.; GAN, Esther S.; ZHANG, Summer L.; CHAN, Kitti W. K.. A systematic approach to the development of a safe live attenuated Zika vaccine. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 12 mar. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-03337-2>.

KWON, Woo-taeg. Protective Immunity of *Pichia pastoris*-Expressed Recombinant Envelope Protein of Japanese Encephalitis Virus. **Journal Of Microbiology And**

Biotechnology, v. 22, n. 11, p. 1580-1587, 28 nov. 2012. Korean Society for Microbiology and Biotechnology. <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1205.05047>.

LAILAW, Brian J; CUI, Weiguo; AMEZQUITA, Robert; GRAY, Simon M; GUAN, Tianxia; LU, Yisi; KOBAYASHI, Yasushi; FLAVELL, Richard; KLEINSTEIN, Steven H; CRAFT, Joe. Production of IL-10 by CD4+ regulatory T cells during the resolution of infection promotes the maturation of memory CD8+ T cells. **Nature Immunology**, v. 16, n. 8, p. 871-879, 6 jul. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/ni.3224>.

LAROCCA, Rafael A.; ABBINK, Peter; PERON, Jean Pierre S.; ZANOTTO, Paolo M. de A.; IAMPIETRO, M. Justin; BADAMCHI-ZADEH, Alexander; BOYD, Michael; NG'ANG'A, David; KIRILOVA, Marinela; NITYANANDAM, Ramya. Vaccine protection against Zika virus from Brazil. **Nature**, v. 536, n. 7617, p. 474-478, 28 jun. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature18952>.

LAZEAR, Helen m.; GOVERO, Jennifer; SMITH, Amber m.; PLATT, Derek j.; FERNANDEZ, Estefania; MINER, Jonathan j.; DIAMOND, Michael s.. A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis. **Cell Host & Microbe**, v. 19, n. 5, p. 720-730, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2016.03.010>.

LEI, Han; JIN, Sha; KARLSSON, Erik; SCHULTZ-CHERRY, Stacey; YE, Kaiming. Yeast Surface-Displayed H5N1 Avian Influenza Vaccines. **Journal Of Immunology Research**, v. 2016, p. 1-12, 2016. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/4131324>.

LI, Guangyu; TELEKI, Cody; WANG, Tian. Memory T Cells in Flavivirus Vaccination. **Vaccines**, v. 6, n. 4, p. 73-73, 18 out. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/vaccines6040073>.

LI, Xiao-feng; DONG, Hao-long; WANG, Hong-jiang; HUANG, Xing-yao; QIU, Ye-feng; JI, Xue; YE, Qing; LI, Chunfeng; LIU, Yang; DENG, Yong-qiang. Development of a chimeric Zika vaccine using a licensed live-attenuated flavivirus vaccine as backbone. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, , 14 fev. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-02975-w>.

LIANG, Huabin; TANG, Jinyi; LIU, Zhihua; LIU, Yuanhua; HUANG, Yuanyuan; XU, Yongfen; HAO, Pei; YIN, Zhinan; ZHONG, Jin; YE, Lilin. ZIKV infection induces robust Th1-like Tfh cell and long-term protective antibody responses in immunocompetent mice. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, , 27 ago. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-11754-0>.

LIMA, Noemia S.; ROLLAND, Morgane; MODJARRAD, Kayvon; TRAUTMANN, Lydie. T Cell Immunity and Zika Virus Vaccine Development. **Trends In Immunology**, v. 38, n. 8, p. 594-605, ago. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2017.05.004>.

LINDENBACH, B.D. & RICE, C.M. in *Fields Virology* (eds. Knipe, D. M. & Howley, P. M.) 1101–1152 (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2007).

LIU, Dong-qun; LU, Shuai; ZHANG, Ling-xiao; JI, Mei; LIU, Shu-ying; WANG, Shao-wei; LIU, Rui-tian. An indoleamine 2, 3-dioxygenase siRNA nanoparticle-coated and Trp2-displayed recombinant yeast vaccine inhibits melanoma tumor growth in mice. **Journal Of Controlled Release**, v. 273, p. 1-12, mar. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.01.013>.

LIU, Xinglong; QU, Linbing; YE, Xianmiao; YI, Changhua; ZHENG, Xuehua; HAO, Mingli; SU, Wan; YAO, Zhipeng; CHEN, Peihai; ZHANG, Shengnan. Incorporation of NS1 and prM/M are important to confer effective protection of adenovirus-vectored Zika virus vaccine carrying E protein. **Npj Vaccines**, v. 3, n. 1, , 24 jul. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41541-018-0072-6>.

LOBIGS, Mario; MÜLLBACHER, Arno; WANG, Yang; PAVY, Megan; LEE, Eva. Role of type I and type II interferon responses in recovery from infection with an encephalitic flavivirus. **Journal Of General Virology**, v. 84, n. 3, p. 567-572, 1 mar. 2003. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.18654-0>.

LÓPEZ-CAMACHO, César; ABBINK, Peter; LAROCCA, Rafael A.; DEJNIRATTISAI, Wanwisa; BOYD, Michael; BADAMCHI-ZADEH, Alex; WALLACE, Zoë R.; DOIG, Jennifer; VELAZQUEZ, Ricardo Sanchez; LINS NETO, Roberto Dias. Rational Zika vaccine design via the modulation of antigen membrane anchors in chimpanzee adenoviral vectors. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, , 22 jun. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-04859-5>.

LUCAS, Carolina G. O.; KITOKO, Jamil Z.; FERREIRA, Fabricio M.; SUZART, Vinicius G.; PAPA, Michelle P.; COELHO, Sharton V. A.; CAVAZZONI, Cecilia B.; PAULA-NETO, Heitor A.; OLSEN, Priscilla C.; IWASAKI, Akiko. Critical role of CD4+ T cells and IFN γ signaling in antibody-mediated resistance to Zika virus infection. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 7 ago. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-05519-4>.

LUM, Fok-moon; LYE, David C B; TAN, Jeslin J L; LEE, Bernett; CHIA, Po-ying; CHUA, Tze-kwang; AMRUN, Siti N; KAM, Yiu-wing; YEE, Wearn-xin; LING, Wei-ping. Longitudinal Study of Cellular and Systemic Cytokine Signatures to Define the Dynamics of a Balanced Immune Environment During Disease Manifestation in Zika Virus–Infected Patients. **The Journal Of Infectious Diseases**, v. 218, n. 5, p. 814-824, 16 abr. 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiy225>.

MACAULEY-PATRICK, Sue; FAZENDA, Mariana L.; MCNEIL, Brian; HARVEY, Linda M.. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, v. 22, n. 4, p. 249-270, 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/yea.1208>.

MACNAMARA, F.n. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in nigeria. : A report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 48, n. 2, p. 139-145, mar. 1954. Oxford University Press (OUP). [http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(54\)90006-1](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(54)90006-1).

MANI, Shailendra; TRIPATHI, Lav; RAUT, Rajendra; TYAGI, Poornima; ARORA, Upasana; BARMAN, Tarani; SOOD, Ruchi; GALAV, Aika; WAHALA, Wahala; SILVA, Aravinda de. Pichia pastoris-Expressed Dengue 2 Envelope Forms Virus-Like Particles without Pre-Membrane Protein and Induces High Titer Neutralizing Antibodies. **Plos One**, v. 8, n. 5, p. 1-9, 23 maio 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0064595>.

MANTOVANI, Mário S.; BELLINI, Marilanda F.; ANGELI, José Pedro F.; OLIVEIRA, Rodrigo J.; SILVA, Ariane F.; RIBEIRO, Lúcia R.. β -Glucans in promoting health: prevention against mutation and cancer. : Prevention against mutation and cancer. **Mutation Research/reviews In Mutation Research**, v. 658, n. 3, p. 154-161, mar. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2007.07.002>.

MARIZ, F. C.; COIMBRA, E. C.; JESUS, A. L. S.; NASCIMENTO, L. M.; TORRES, F. A. G.; FREITAS, A. C.. Development of an IP-Free Biotechnology Platform for Constitutive Production of HPV16 L1 Capsid Protein Using the Pichia pastoris PGK1 Promoter. **Biomed Research International**, v. 2015, p. 1-11, 2015. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/594120>.

MAUCOURANT, Christopher; PETITDEMANGE, Caroline; YSSEL, Hans; VIEILLARD, Vincent. Control of Acute Arboviral Infection by Natural Killer Cells. **Viruses**, v. 11, n. 2, p. 131-146, 31 jan. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/v11020131>.

MEAD, Paul S.; DUGGAL, Nisha K.; HOOK, Sarah A.; DELOREY, Mark; FISCHER, Marc; MCGUIRE, Dana Olzenak; BECKSTED, Heidi; MAX, Ryan J.; ANISHCHENKO, Michael; SCHWARTZ, Amy M.. Zika Virus Shedding in Semen of Symptomatic Infected Men. **New England Journal Of Medicine**, v. 378, n. 15, p. 1377-1385, 12 abr. 2018. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa1711038>.

MELO, Adriana Suely de Oliveira; AGUIAR, Renato Santana; AMORIM, Melania Maria Ramos; ARRUDA, Monica B.; MELO, Fabiana de Oliveira; RIBEIRO, Suelem Taís Clementino; BATISTA, Alba Gean Medeiros; FERREIRA, Thales; SANTOS, Mayra Pereira dos; SAMPAIO, Virgínia Vilar. Congenital Zika Virus Infection. **Jama Neurology**, v. 73, n. 12, p. 1407-1417, 1 dez. 2016. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jamaneurol.2016.3720>.

MICHLMAYR, Daniela; ANDRADE, Paulina; GONZALEZ, Karla; BALMASEDA, Angel; HARRIS, Eva. CD14+CD16+ monocytes are the main target of Zika virus infection in peripheral blood mononuclear cells in a paediatric study in Nicaragua. **Nature Microbiology**, v. 2, n. 11, p. 1462-1470, 2 out. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41564-017-0035-0>.

MIR, Manzoor Ahmad. Introduction to Costimulation and Costimulatory Molecules. **Developing Costimulatory Molecules For Immunotherapy Of Diseases**, p. 1-43, 2015. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-802585-7.00001-7>.

MIRZA, Muhammad Usman; RAFIQUE, Shazia; ALI, Amjad; MUNIR, Mobeen; IKRAM, Nazia; MANAN, Abdul; SALO-AHEN, Outi M. H.; IDREES, Muhammad. Towards peptide vaccines against Zika virus: immunoinformatics combined with molecular dynamics simulations to predict antigenic epitopes of zika viral proteins. : Immunoinformatics combined with molecular dynamics simulations to predict antigenic epitopes of Zika viral proteins. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1-17, dez. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep37313>.

MLAKAR, Jernej; KORVA, Misa; TUL, Nataša; POPOVI?, Mara; POLJ?AK-PRIJATELJ, Mateja; MRAZ, Jerica; KOLENC, Marko; RUS, Katarina Resman; VIPOTNIK, Tina Vesnaver; VODU?EK, Vesna Fabjan. Zika Virus Associated with Microcephaly. **New England Journal Of Medicine**, v. 374, n. 10, p. 951-958, 10 mar. 2016. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa1600651>.

MODJARRAD, Kayvon; LIN, Leyi; GEORGE, Sarah L; STEPHENSON, Kathryn e; ECKELS, Kenneth H; LABARRERA, Rafael A de; JARMAN, Richard G; SONDERGAARD, Erica; TENNANT, Janice; ANSEL, Jessica L. Preliminary aggregate safety and immunogenicity results from three trials of a purified inactivated Zika virus vaccine candidate: phase 1, randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trials. : phase 1, randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trials. **The Lancet**, v. 391, n. 10120, p. 563-571, fev. 2018. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(17\)33106-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(17)33106-9).

MOTTA, Iara J.f.; SPENCER, Bryan R.; SILVA, Suely G. Cordeiro da; ARRUDA, Monica B.; DOBBIN, Jane A.; GONZAGA, Yung B.m.; ARCURI, Ingrid P.; TAVARES, Rita C.b.s.; ATTA, Elias H.; FERNANDES, Regina F.m.. Evidence for Transmission of Zika Virus by Platelet Transfusion. **New England Journal Of Medicine**, v. 375, n. 11, p. 1101-1103, 15 set. 2016. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmc1607262>.

MULLER, David A.; YOUNG, Paul R.. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. : Molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. **Antiviral Research**, v. 98, n. 2, p. 192-208, maio 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.03.008>.

MUSSO, Didier; ROCHE, Claudine; ROBIN, Emilie; NHAN, Tuxuan; TEISSIER, Anita; CAO-LORMEAU, Van-mai. Potential Sexual Transmission of Zika Virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 359-361, fev. 2015. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). <http://dx.doi.org/10.3201/eid2102.141363>.

NGONO, Annie Elong; SHRESTA, Sujan. Cross-Reactive T Cell Immunity to Dengue and Zika Viruses: new insights into vaccine development. : New Insights Into Vaccine Development. **Frontiers In Immunology**, v. 10, , 11 jun. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2019.01316>.

NGONO, Annie Elong; SHRESTA, Sujan. Immune Response to Dengue and Zika. **Annual Review Of Immunology**, v. 36, n. 1, p. 279-308, 26 abr. 2018. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053142>.

NGONO, Annie Elong; VIZCARRA, Edward A.; TANG, William W.; SHEETS, Nicholas; JOO, Yunichel; KIM, Kenneth; GORMAN, Matthew J.; DIAMOND, Michael S.; SHRESTA, Sujan. Mapping and Role of the CD8 + T Cell Response During Primary Zika Virus Infection in Mice. **Cell Host & Microbe**, v. 21, n. 1, p. 35-46, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2016.12.010>.

NIZZOLI, Giulia; LARGHI, Paola; PARONI, Moira; CROSTI, Maria Cristina; MORO, Monica; NEDDERMANN, Petra; CAPRIOLI, Flavio; PAGANI, Massimiliano; FRANCESCO, Raffaele de; ABRIGNANI, Sergio. IL-10 promotes homeostatic proliferation of human CD8+memory T cells and, when produced by CD1c+DCs, shapes naive CD8+T-cell priming. **European Journal Of Immunology**, v. 46, n. 7, p. 1622-1632, 17 maio 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/eji.201546136>.

NOVAK, M.; VETVICKA, V.. β -Glucans, History, and the Present: immunomodulatory aspects and mechanisms of action. : Immunomodulatory Aspects and Mechanisms of Action. **Journal Of Immunotoxicology**, v. 5, n. 1, p. 47-57, jan. 2008. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/15476910802019045>.

ORLEAN, Peter. Architecture and Biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall. **Genetics**, v. 192, n. 3, p. 775-818, nov. 2012. Genetics Society of America. <http://dx.doi.org/10.1534/genetics.112.144485>.

OYARZÖN, Patricio; KOBE, Bostjan. Recombinant and epitope-based vaccines on the road to the market and implications for vaccine design and production. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 12, n. 3, p. 763-767, 2 out. 2015. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/21645515.2015.1094595>.

PARDI, Norbert; HOGAN, Michael J.; PELC, Rebecca S.; MURAMATSU, Hiromi; ANDERSEN, Hanne; DEMASO, Christina R.; DOWD, Kimberly A.; SUTHERLAND, Laura L.; SCEARCE, Richard M.; PARKS, Robert. Zika virus protection by a single low-dose nucleoside-modified mRNA vaccination. **Nature**, v. 543, n. 7644, p. 248-251, 2 fev. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature21428>.

PARDY, Ryan D.; RAJAH, Maaran M.; CONDOTTA, Stephanie A.; TAYLOR, Nathan G.; SAGAN, Selena M.; RICHER, Martin J.. Analysis of the T Cell Response to Zika Virus and Identification of a Novel CD8+ T Cell Epitope in Immunocompetent Mice. **Plos Pathogens**, v. 13, n. 2, p. 1-26, 23 fev. 2017. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1006184>.

PATTERSON, Robert; NERREN, Jessica; KOGUT, Michael; COURT, Pinar; VILLARREAL-RAMOS, Bernardo; SEYFERT, Hans-martin; DALBY, Paul; WERLING, Dirk. Yeast-surface expressed BVDV E2 protein induces a Th1/Th2 response in naïve T cells. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 37, n. 1, p. 107-114, maio 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2011.10.009>.

PENA, Lindomar José; GUARINES, Klarissa Miranda; SILVA, Anna Jéssica Duarte; LEAL, Lígia Rosa Sales; FÉLIX, Daniele Mendes; SILVA, Adalúcia; OLIVEIRA, Sheilla Andrade de; AYRES, Constância Flávia Junqueira; SILVA JÚNIOR, Abelardo; FREITAS, Antonio Carlos de. In vitro and in vivo models for studying Zika virus biology. **Journal Of General Virology**, v. 99, n. 12, p. 1529-1550, 1 dez. 2018. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/jgv.0.001153>.

RASMUSSEN, Sonja A.; JAMIESON, Denise J.; HONEIN, Margaret A.; PETERSEN, Lyle R.. Zika Virus and Birth Defects — Reviewing the Evidence for Causality. **New England Journal Of Medicine**, v. 374, n. 20, p. 1981-1987, 19 maio 2016. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmsr1604338>.

REMONDO, Cinzia; CEREDA, Vittore; MOSTBÖCK, Sven; SABZEVARI, Helen; FRANZUSOFF, Alex; SCHLOM, Jeffrey; TSANG, Kwong-y.. Human dendritic cell maturation and activation by a heat-killed recombinant yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) vector encoding carcinoembryonic antigen. **Vaccine**, v. 27, n. 7, p. 987-994, fev. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.12.002>.

REYNOLDS, Joseph M.; ANGKASEKWINAI, Pornpimon; DONG, Chen. IL-17 family member cytokines: regulation and function in innate immunity. : Regulation and function in innate immunity. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 21, n. 6, p. 413-423, dez. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2010.10.002>.

RICE, Marion E.; GALANG, Romeo R.; ROTH, Nicole M.; ELLINGTON, Sascha R.; MOORE, Cynthia A.; VALENCIA-PRADO, Miguel; ELLIS, Esther M.; TUFA, Aifili John; TAULUNG, Livinson A.; ALFRED, Julia M.. Vital Signs: zika-associated birth defects and neurodevelopmental abnormalities possibly associated with congenital zika virus infection ? u.s. territories and freely associated states, 2018. : Zika-Associated Birth Defects and Neurodevelopmental Abnormalities Possibly Associated with Congenital Zika Virus Infection — U.S. Territories and Freely Associated States, 2018. **Mmwr. Morbidity And Morta**

RICHNER, Justin M.; HIMANSU, Sunny; DOWD, Kimberly A.; BUTLER, Scott L.; SALAZAR, Vanessa; FOX, Julie M.; JULANDER, Justin G.; TANG, William W.; SHRESTA, Sujan; PIERSON, Theodore C.. Modified mRNA Vaccines Protect against Zika Virus Infection. **Cell**, v. 168, n. 6, p. 1114-1125, mar. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.017>.

ROOHVAND, Farzin; SHOKRI, Mehdi; ABDOLLAHPOUR-ALITAPPEH, Meghdad; EHSANI, Parastoo. Biomedical applications of yeast- a patent view, part one: yeasts as workhorses for the production of therapeutics and vaccines. : yeasts as workhorses for the production of therapeutics and vaccines. **Expert Opinion On Therapeutic Patents**, v. 27, n. 8, p. 929-951, 22 jun. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/13543776.2017.1339789>.

ROSALES-MENDOZA, Sergio; ANGULO, Carlos; MEZA, Beatriz. Food-Grade Organisms as Vaccine Biofactories and Oral Delivery Vehicles. **Trends In Biotechnology**, v. 34, n. 2, p. 124-136, fev. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.11.007>.

ROSSI, Shannan L.; TESH, Robert B.; AZAR, Sasha R.; MURUATO, Antonio E.; HANLEY, Kathryn A.; AUGUSTE, Albert J.; LANGSJOEN, Rose M.; PAESSLER, Slobodan; VASILAKIS, Nikos; WEAVER, Scott C.. Characterization of a Novel Murine Model to Study Zika Virus. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 94, n. 6, p. 1362-1369, 1 jun. 2016. American Society of Tropical Medicine and Hygiene. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.16-0111>.

SAMBROOK, Joseph. **Molecular cloning. A laboratory manual**. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SAMPATH, Aruna; PADMANABHAN, R.. Molecular targets for flavivirus drug discovery. **Antiviral Research**, v. 81, n. 1, p. 6-15, jan. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.08.004>.

SHAN, Chao; MURUATO, Antonio e; NUNES, Bruno T D; LUO, Huanle; XIE, Xuping; A MEDEIROS, Daniele B; WAKAMIYA, Maki; TESH, Robert B; BARRETT, Alan D; WANG, Tian. A live-attenuated Zika virus vaccine candidate induces sterilizing immunity in mouse models. **Nature Medicine**, v. 23, n. 6, p. 763-767, 10 abr. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.4322>.

SHARMA, Anshika; LAL, Sunil K.. Zika Virus: transmission, detection, control, and prevention. : Transmission, Detection, Control, and Prevention. **Frontiers In Microbiology**, v. 8, n. 110, p. 1-14, 3 fev. 2017. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.00110>.

SHI, Yi; GAO, George F.. Structural Biology of the Zika Virus. **Trends In Biochemical Sciences**, v. 42, n. 6, p. 443-456, jun. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2017.02.009>.

SHIBASAKI, Seiji; MAEDA, Hatsuo; UEDA, Mitsuyoshi. Molecular Display Technology Using Yeast—Arming Technology—. **Analytical Sciences**, v. 25, n. 1, p. 41-49, 2009. Japan Society for Analytical Chemistry. <http://dx.doi.org/10.2116/analsci.25.41>.

SHIN, Min-kyoung; KANG, Mi Lan; JUNG, Myung Hwan; CHA, Seung-bin; LEE, Won-jung; KIM, Jung-mi; KIM, Dae-hyuk; YOO, Han Sang. Induction of protective immune responses against challenge of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by oral administration with *Saccharomyces cerevisiae* expressing Apx toxins in pigs. **Veterinary Immunology And Immunopathology**, v. 151, n. 1-2, p. 132-139, jan. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.11.003>.

SMET, Rebecca de; ALLAIS, Liesbeth; A CUVELIER, Claude. Recent advances in oral vaccine development. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 10, n. 5, p. 1309-1318, 19 fev. 2014. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4161/hv.28166>.

SONG, Hao; QI, Jianxun; HAYWOOD, Joel; SHI, Yi; GAO, George F. Zika virus NS1 structure reveals diversity of electrostatic surfaces among flaviviruses. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 23, n. 5, p. 456-458, 18 abr. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.3213>.

STUBBS, Andrew C.; MARTIN, Kathleen S.; COESHOTT, Claire; SKAATES, Serena V.; KURITZKES, Daniel R.; BELLGRAU, Donald; FRANZUSOFF, Alex; DUKE, Richard C.; WILSON, Cara C.. Whole recombinant yeast vaccine activates dendritic cells and elicits protective cell-mediated immunity. **Nature Medicine**, v. 7, n. 5, p. 625-629, maio 2001. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/87974>.

SUKHITHASRI, V.; NISHA, N.; BISWAS, Lalitha; KUMAR, V. Anil; BISWAS, Raja. Innate immune recognition of microbial cell wall components and microbial strategies to evade such recognitions. **Microbiological Research**, v. 168, n. 7, p. 396-406, ago. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2013.02.005>.

SUMATHY, K.; KULKARNI, Bharathi; GONDU, Ravi Kumar; PONNURU, Sampath Kumar; BONGURAM, Nagaraju; ELIGETI, Rakesh; GADIYARAM, Sindhuja; PRATURI, Usha; CHOUGULE, Bhushan; KARUNAKARAN, Latha. Protective efficacy of Zika vaccine in AG129 mouse model. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 12 abr. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/srep46375>.

SUN, Hui; WANG, Longjiang; WANG, Tiantian; ZHANG, Jie; LIU, Qing; CHEN, Peipei; CHEN, Zhengtao; WANG, Fangkun; LI, Hongmei; XIAO, Yihong. Display of Eimeria tenella EtMic2 protein on the surface of Saccharomyces cerevisiae as a potential oral vaccine against chicken coccidiosis. **Vaccine**, v. 32, n. 16, p. 1869-1876, abr. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.01.068>.

TAMBURINI, Beth A.; KEDL, Ross M.; BELLGRAU, Donald. IL-6-inducing Whole Yeast-based Immunotherapy Directly Controls IL-12-dependent CD8 T-cell Responses. **Journal Of Immunotherapy**, v. 35, n. 1, p. 14-22, jan. 2012. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/cji.0b013e3182356888>.

TAPPE, Dennis; PÉREZ-GIRÓN, José Vicente; ZAMMARCHI, Lorenzo; RISSLAND, Jürgen; FERREIRA, Davis F.; JAENISCH, Thomas; GÓMEZ-MEDINA, Sergio; GÜNTHER, Stephan; BARTOLONI, Alessandro; MUÑOZ-FONTELA, César. Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to convalescent phase. **Medical Microbiology And Immunology**, v. 205, n. 3, p. 269-273, 24 dez. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00430-015-0445-7>.

URAKI, Ryuta; HWANG, Jesse; JURADO, Kellie Ann; HOUSEHOLDER, Sarah; YOCKEY, Laura J.; HASTINGS, Andrew K.; HOMER, Robert J.; IWASAKI, Akiko; FIKRIG, Erol. Zika virus causes testicular atrophy. **Science Advances**, v. 3, n. 2, p. 1-6, fev. 2017. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/sciadv.1602899>.

VETVICKA, Vaclav. Glucan-immunostimulant, adjuvant, potential drug. **World Journal Of Clinical Oncology**, v. 2, n. 2, p. 115-119, 2011. Baishideng Publishing Group Inc.. <http://dx.doi.org/10.5306/wjco.v2.i2.115>.

VOGL, Thomas; HARTNER, Franz S; GLIEDER, Anton. New opportunities by synthetic biology for biopharmaceutical production in *Pichia pastoris*. **Current Opinion In Biotechnology**, v. 24, n. 6, p. 1094-1101, dez. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2013.02.024>.

WALCH-RÜCKHEIM, B; KIEFER, R; GEGINAT, G; SCHMITT, M J; BREINIG, F. Coexpression of human perforin improves yeast-mediated delivery of DNA and mRNA to mammalian antigen-presenting cells. **Gene Therapy**, v. 23, n. 1, p. 103-107, 20 ago. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/gt.2015.77>.

WANG, Ran; LIAO, Xianzheng; FAN, Dongying; WANG, Lei; SONG, Ji; FENG, Kaihao; LI, Mingyuan; WANG, Peigang; CHEN, Hui; AN, Jing. Maternal immunization with a DNA vaccine candidate elicits specific passive protection against post-natal Zika virus infection in immunocompetent BALB/c mice. **Vaccine**, v. 36, n. 24, p. 3522-3532, jun. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.04.051>.

WASILENKO, Jamie L.; SARMENTO, Luciana; SPATZ, Stephen; PANTIN-JACKWOOD, Mary. Cell surface display of highly pathogenic avian influenza virus hemagglutinin on the surface of *Pichia pastoris* cells using $\hat{\pm}$ -agglutinin for production of oral vaccines. **Biotechnology Progress**, v. 26, n. 2, p. 542-547, 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/btpr.343>.

WEAVER, Scott C.; COSTA, Federico; GARCIA-BLANCO, Mariano A.; KO, Albert I.; RIBEIRO, Guilherme S.; SAADE, George; SHI, Pei-yong; VASILAKIS, Nikos. Zika virus: history, emergence, biology, and prospects for control. : History, emergence, biology, and prospects for control. **Antiviral Research**, v. 130, , p. 69-80, jun. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.03.010>.

WEINACKER, Daniel; RABERT, Claudia; ZEPEDA, Andrea B.; FIGUEROA, Carolina A.; PESSOA, Adalberto; FARÍAS, Jorge G.. Applications of recombinant *Pichia pastoris* in the healthcare industry. **Brazilian Journal Of Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1043-1048, dez. 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1517-83822013000400004>.

WEN, Jinsheng; TANG, William Weihao; SHEETS, Nicholas; ELLISON, Julia; SETTE, Alessandro; KIM, Kenneth; SHRESTA, Sujan. Identification of Zika virus epitopes reveals immunodominant and protective roles for dengue virus cross-reactive CD8+ T cells. **Nature Microbiology**, v. 2, n. 6, p. 1-25, 13 mar. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.36>.

XIANG, Sue D.; SCHOLZEN, Anja; MINIGO, Gabriela; DAVID, Cassandra; APOSTOLOPOULOS, Vasso; MOTTRAM, Patricia L.; PLEBANSKI, Magdalena. Pathogen recognition and development of particulate vaccines: does size matter?. : Does size matter?. **Methods**, v. 40, n. 1, p. 1-9, set. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2006.05.016>.

XU, Kun; SONG, Yufeng; DAI, Lianpan; ZHANG, Yongli; LU, Xuancheng; XIE, Yijia; ZHANG, Hangjie; CHENG, Tao; WANG, Qihui; HUANG, Qingrui. Recombinant

Chimpanzee Adenovirus Vaccine AdC7-M/E Protects against Zika Virus Infection and Testis Damage. **Journal Of Virology**, v. 92, n. 6, p. 1-16, 3 jan. 2018. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.01722-17>.

YANG, Ming; DENT, Matthew; LAI, Huafang; SUN, Haiyan; CHEN, Qiang. Immunization of Zika virus envelope protein domain III induces specific and neutralizing immune responses against Zika virus. **Vaccine**, v. 35, n. 33, p. 4287-4294, jul. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.04.052>.

YUN, Seok-min; JEONG, Young Eui; WANG, Eunbyeol; LEE, Ye-ji; HAN, Myung Guk; PARK, Chan; LEE, Won-ja; CHOI, Wooyoung. Cloning and Expression of Recombinant Tick-Borne Encephalitis Virus-like Particles in *Pichia pastoris*. **Osong Public Health And Research Perspectives**, v. 5, n. 5, p. 274-278, out. 2014. E-Tree Publishing. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrp.2014.08.005>.

ZHU, Kailing; CHI, Zhenming; LI, Jing; ZHANG, Fengli; LI, Meiju; YASODA, Hirimuthugoda Nalini; WU, Longfei. The surface display of haemolysin from *Vibrio harveyi* on yeast cells and their potential applications as live vaccine in marine fish. **Vaccine**, v. 24, n. 35-36, p. 6046-6052, ago. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.05.043>.

ANEXO A - Carta de aprovação pela CEUA UFPE (para viabilização dos experimentos *in vitro*)



Universidade Federal de Pernambuco
 Centro de Biociências
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife - PE - Brasil
 Fones: 2126 8842
 ceua@ufpe.br

Recife, 28 de maio de 2019

Ofício nº 29/19

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof. Cristiane Moutinho Lagos de Melo**

Departamento de Antibióticos

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº 0002/2019

Certificamos que a proposta intitulada “**Investigação imunomoestimulatória de microrganismos utilizados como carreadores e adjuvantes vacinais.**” registrado com o nº 0002/2019 sob a responsabilidade de **Prof. Cristiane Moutinho Lagos de Melo** o que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 28/05/2019.

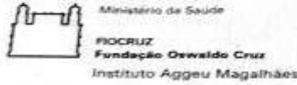
Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Maio 2019 a agosto 2021
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogenico
Nº de animais	30
Peso/Idade	35g/6-8 semanas
Sexo	Macho (30)
Origem: Biotério de Criação	Biotério Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA)
Destino: Biotério de Experimentação	Biotério Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA)

Atenciosamente,

Prof. Sebastião R. F. Silva
 Vice-Presidente CEUA/UFPE
 SIAPE 2345691



ANEXO B - Carta de aprovação da CEUA do Instituto Aggeu Magalhães (para execução dos ensaios *in vivo*)



INSTITUTIONAL ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE (IACUC)

Letter of IACUC Approval

We certify that the project entitled "DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIAS PROFILÁTICAS APLICADAS AO CONTROLE DO ZIKA VÍRUS" (IACUC protocol number nº 110/2017), coordinated by Lindomar José Pena follows strictly the ethical principles in animal research and is in accordance with the Brazilian federal law 11.794/2008. The project was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of the Aggeu Magalhães Institute/Oswaldo Cruz Foundation and is valid until January, 2022. It is the responsibility of the Principal Investigator to notify the IACUC of any proposed changes regarding the work described within this project. The Principal Investigator agrees that no such changes will be implemented until approved by the IACUC/IAM.

Number of animals approved	
Species/Strain/Breed	Number of animals/Weight/Age/Sex
Balb/C Mice	130(20-25gr/06-08 weeks/females)
Total	130

Recife (PE, Brazil), January, 17, 2018

Maria Edileuza Felinto de Brito
 Dra Maria Edileuza Felinto de Brito
 IACUC Vice Chair/IAM

Maria Edileuza Felinto de Brito
 Vice-Coordenadora de Comissão de Ética no
 Uso de Animais do IAM/Fiocruz-PE
 Mat. Stage 0464741
 E-mail: britomel@cpqam.fiocruz.br