



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE BIOCIÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**LARISSA SILVA DE MACÊDO**

**CONSTRUÇÃO DE *Pichia pastoris* RECOMBINANTE  
EXPRESSANDO O DOMÍNIO III DA PROTEÍNA DO ENVELOPE DO  
VÍRUS ZIKA**

**Recife  
2020**

LARISSA SILVA DE MACÊDO

**CONSTRUÇÃO DE *Pichia pastoris* RECOMBINANTE  
EXPRESSANDO O DOMÍNIO III DA PROTEÍNA DO ENVELOPE DO  
VÍRUS ZIKA**

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

Área de concentração: Microbiologia,  
bioprocessos e bioprodutos.

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Antonio Carlos de Freitas

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Anna Jéssica Duarte Silva

**Recife  
2020**

Catálogo na fonte  
Elaine C Barroso  
(CRB4 1728)

Macedo, Larissa Silva de

Construção de *Pichia pastoris* recombinante expressando o domínio III da proteína do envelope do vírus Zika / Larissa Silva de Macedo– 2020.

84 f.: il., fig., tab.

Orientador: Antonio Carlos de Freitas

Coorientadora: Anna Jéssica Duarte Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2020.

Inclui referências.

1. Vacina 2. Flavivírus 3. Expressão heteróloga I. Freitas, Antonio Carlos (orient.) II. Silva, Anna Jéssica Duarte (coorient.) III. Título.

615.372

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2020-099

LARISSA SILVA DE MACÊDO

**CONSTRUÇÃO DE *Pichia pastoris* RECOMBINANTE  
EXPRESSANDO O DOMÍNIO III DA PROTEÍNA DO ENVELOPE DO  
VÍRUS ZIKA**

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

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof.º Dr. Antonio Carlos de Freitas (Orientador)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof.º Dr. Antonio Roberto Lucena de Araújo (Examinador Externo)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof.º Dr. Fabrício Motteran (Examinador Externo)  
Universidade Federal de Pernambuco

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus, pois sem ele nada disso seria possível. Por me proporcionar tamanha felicidade, por ter iluminado meu caminho e abençoado minhas escolhas. Amém.

Aos meus pais, Maria de Lourdes e Romero Ferreira, que sempre me apoiaram e incentivaram a alcançar meus objetivos, sempre como exemplos de amor e afeto. Amo vocês infinitamente. A minha irmã Jéssica, que mesmo longe eu não tenho dúvidas de que tenho a melhor irmã do mundo; a Asher e Malu por serem a alegria da família e a Tj por ter me acolhido e já fazer parte da família. Teddy, por ser o cachorro mais treloso e me alegrar nos momentos difíceis.

Agradeço ao meu namorado, Tiago, pelo amor e carinho. Por todo apoio em todos os momentos difíceis e complicados pelos quais passei. Também pelos momentos de alegria, que foram muitos ao seu lado. Obrigada por ser meu companheiro na vida pessoal e profissional.

Agradeço aos meus amados familiares, que torceram pela minha conquista: Etiene, Bruna, Bia, Kelly, Etma, Gui, Marconi e Luciano.

Ao meu orientador, Dr. Antonio Carlos de Freitas, pela confiança e a oportunidade, pelos ensinamentos e experiências repassadas, e principalmente, pelo apoio nos momentos necessários.

Agradeço enormemente a melhor Orientadora/Co-orientadora do mundo e não estou exagerando. Obrigada por tudo, Anna Jéssica, por ser exemplo de pessoa e de profissional, por me acolher tão bem, por sempre estar disposta a ensinar e pela sua amizade, só tenho a desejar coisas boas a você.

A todos que me ajudaram e pelo vínculo de amizade distribuídos pela família LEMTE: Ana Paula, André, Alanne, Norma, Daffany, Lígia, Herbert, Elias. Ao ser mais louco do laboratório, Gabriel.

Agradeço a minha melhor amiga, Angélica, por sempre fazer parte da minha história e compartilhar momentos que jamais esquecerei. Uma amizade pra vida toda. Aos meus amigos dos tempos de colégio: Neemias, Levi e Erick.

Aos meus amigos: Lucas (luquiinhas), Christian, Analuíza, Iza, Tuanne, Abigail, Lucas (magro). Obrigada por todos os momentos juntos, por cada risada, cada sofrência e por cada gesto de amizade. Amo vocês.

Agradeço aos amigos que fiz na turma de mestrado, por toda união e aprendizado. Agradeço também, a Klayton e a Jaciana, que me acolheram tão bem na pós-graduação.

A todos aqueles que desejam o meu bem e a realização dessa conquista. Muito Obrigada.

## RESUMO

O vírus da Zika (ZIKV) é considerado um dos vírus emergentes mais importantes do mundo, podendo apresentar complicações em humanos associadas a quadros de malformações congênitas e anormalidades neurológicas, como a microcefalia e a síndrome de Guillain-Barré, respectivamente. Embora, até o momento, não exista vacina ou qualquer outra medida preventiva consolidada para uso em humanos contra essa infecção, abordagens utilizando a expressão heteróloga do fragmento do domínio III da proteína do envelope viral (EDIII) tem demonstrado seu potencial como antígeno vacinal. O fragmento EDIII é reconhecido como efetivo na indução da produção de anticorpos neutralizantes pelo hospedeiro atuando de maneira protetiva. Neste contexto, uma das principais leveduras utilizadas em estratégias vacinas é a *Pichia pastoris*, que permite a ancoragem e exposição de proteínas heterólogas em sua superfície. Além disso, *P. pastoris* possui atuação como adjuvante natural por apresentar propriedades imunoestimulatórias devido a sua estrutura celular, o que possibilita uma resposta imune potencializada ao antígeno-alvo apresentado. Desse modo, o presente estudo objetivou a elaboração de uma construção vacinal a partir da produção e ancoragem do Domínio III da proteína do Envelope (EDIII) do ZIKV na levedura *P. pastoris*. O fragmento EDIII foi amplificado por PCR e clonado no vetor de expressão pPICZA $\alpha$ <sub>AG</sub> (vetor modificado; Invitrogen). A inserção correta de EDIII foi confirmada por meio de PCR, análise de restrição e sequenciamento. As células de *Pichia pastoris* (GS115) foram transformadas com a construção pPICZA $\alpha$ EDIII $\alpha$ AG de modo integrativo no genoma da levedura. Os transformantes foram analisados quanto a expressão do fragmento EDIII por meio de SDS-PAGE, Western-blot e Dot-blot. A proteína recombinante foi detectada em células de levedura, demonstrando a transcrição do fragmento e consequente produção da proteína. Esse estudo fornece um caminho para uma estratégia vacinal por meio da abordagem de “*Yeast Surface Display*” contra o vírus Zika e apresenta um modelo experimental para estudos similares com a possibilidade de futuras aplicações profiláticas em humanos.

Palavras-chave: Flavivírus. Expressão heteróloga. Vacina. *Komagataella phaffii*.

## ABSTRACT

The Zika virus (ZIKV) is considered one of the most important emerging viruses in the world, and it can present complications in humans associated with congenital malformations and neurological abnormalities, such as microcephaly and Guillain-Barré syndrome, respectively. Although currently, there is no vaccine or any other consolidated preventive measure for use in humans against this infection, approaches using the heterologous expression of the fragment of domain III of the viral envelope protein (EDIII) has demonstrated its potential as a vaccine antigen. The EDIII fragment is recognized as effective in inducing the production of neutralizing antibodies by the host acting protectively. In this context, one of the main yeasts used in vaccine strategies is *Pichia pastoris*, which allows the anchoring and exposure of heterologous proteins on its surface. Besides, *P. pastoris* acts as a natural adjuvant because it has immunostimulatory properties due to its cellular structure, which enables an enhanced immune response to the target antigen presented. Thus, the present study aimed to develop a vaccine construction from the production and anchoring of Domain III of the Envelope protein (EDIII) of ZIKV in the yeast *P. pastoris*. The EDIII fragment was amplified by PCR and cloned into the expression vector pPICZA $\alpha$ \_ $\alpha$ AG (modified vector; Invitrogen). The correct insertion of EDIII was confirmed through PCR, restriction analysis and sequencing. *Pichia pastoris* cells (GS115) were transformed with the pPICZA $\alpha$ EDIII $\alpha$ AG construct in an integrative way in the yeast genome. The transformants were analyzed for the expression of the EDIII fragment using SDS-PAGE, Western-blot, and Dot-blot. The recombinant protein was detected in yeast cells, demonstrating the transcription of the fragment and the consequent production of the protein. This study provides a path to a vaccination strategy through the “Yeast Surface Display” approach against the Zika virus and presents an experimental model for similar studies with the possibility of future prophylactic applications in humans.

Keywords: Flavivirus. Heterologous expression. Vaccine. *Komagataella phaffii*.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Mapa mundial destacando as áreas com risco de infecção pelo vírus Zika.....	18
Figura 2 -	Distribuição de incidência de casos prováveis de Zika, até a semana epidemiológica 13, Brasil, 2019.....	19
Figura 3 -	Casos prováveis de Zika, por semana epidemiológica de início de sintomas, Brasil, 2018 e 2019.....	20
Figura 4 -	Representação ilustrativa da partícula viral do ZIKV.....	23
Figura 5 -	Genoma do vírus Zika e suas proteínas codificadas.....	25
Figura 6 -	Resumo do ciclo de replicação viral do ZIKV.....	26
Figura 7 -	Estrutura Dimerica da proteína E do ZIKV.....	27
Figura 8 -	Levedura metilotrófica <i>Pichia pastoris</i> .....	31
Figura 9 -	Via de utilização do metanol em <i>Pichia pastoris</i> .....	33
Figura 10 -	Comparação entre vacinas orais convencionais e baseadas na superfície de leveduras.....	36
Figura 11 -	Representação Esquemática do vetor <i>pBSKZIKV</i> (5316 pb).	40
Figura 12 -	Representação esquemática da sequencia utilizada para síntese e clonagem (EDIII).....	40
Figura 13 -	Esquema geral do cassete de expressão.....	41
Figura 14 -	Mapa do vetor <i>pPICZ<math>\alpha</math></i> – 3,6 Kb (vetor comercial, Invitrogen).....	42
Figura 15 -	Mapa representativo do vetor <i>pPICZ<math>\alpha</math>_AG<math>\alpha</math></i> com aproximadamente 4,6 Kb (vetor modificado, Invitrogen).....	43
Figura 16 -	Produto da amplificação do fragmento EDIII do vírus Zika com os Primers Forward e Reverse de EDIII.....	53
Figura 17 -	Padrão de extração da construção <i>pPICZ<math>\alpha</math>EDIIIAG<math>\alpha</math></i> .....	54
Figura 18 -	PCR das amostras contendo a construção <i>pPICZ<math>\alpha</math>EDIIIAG<math>\alpha</math></i> .....	54
Figura 19 -	Confirmação da obtenção da construção <i>pPICZ<math>\alpha</math>EDIIIAG<math>\alpha</math></i> por digestão enzimática (linearização).....	55

Figura 20 -	Confirmação da obtenção da construção pPICZA $\alpha$ EDIIIAG $\alpha$ por digestão enzimática (digestão dupla – <i>Pst</i> I e <i>Sma</i> I).....	55
Figura 21 -	Representação do mapa da construção pPICZA $\alpha$ EDIIIAG $\alpha$ (4935 pb).....	56
Figura 22 -	Confirmação da obtenção da construção pPICZA $\alpha$ EDIIIAG $\alpha$ por digestão enzimática (digestão dupla – <i>Pst</i> I e <i>Not</i> I).....	56
Figura 23 -	Digestão da construção pPICZA $\alpha$ EDIIIAG $\alpha$ com enzima <i>Sac</i> I para linearizar o cassete de expressão.....	57
Figura 24 -	Placas de transformação de pPICZA $\alpha$ EDIIIAG, por eletroporação, das colônias de <i>Pichia pastoris</i> GS115.....	58
Figura 25 -	Placas de repiques das colônias de <i>Pichia pastoris</i> GS115 eletroporadas com a construção pPICZA $\alpha$ EDIIIAG $\alpha$ .....	59
Figura 26 -	PCR de colônia para confirmação da integração do cassete expressão no genoma da levedura recombinante, utilizando <i>primers</i> para o fragmento EDIII ( <i>forward</i> e <i>reverse</i> ).....	59
Figura 27 -	Eletroforese em gel SDS-PAGE 12,5%:Material proveniente do extrato proteico solúvel dos recombinantes de <i>P. pastoris</i> após 96 horas de indução com metanol a 0,5%.....	60
Figura 28 -	Dot-blot usando anti-His (1:2500) conjugado a Fosfatase alcalina, com 10 $\mu$ L de sobrenadante de clones de pPICZA $\alpha$ EDIIIAG $\alpha$ induzidos durante 96 horas com metanol 0,5%.....	61
Figura 29 -	Imunofluorescência das leveduras recombinantes.....	62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Pesquisas de vacinas em estágios pré-clínicos.....	28
Tabela 2 -	Desenvolvimento de vacinas para ZIKV em triagem clínica.....	29
Tabela 3 -	Principais enzimas e condições de uso.....	45
Tabela 4 -	Digestão dupla do fragmento de EDIII para posterior clonagem em pPICZA $\alpha$ _ $\alpha$ AG.....	47
Tabela 5 -	Reação de Ligação (Insero: fragmento EDIII de ZIKV e vetor: pPICZA $\alpha$ _ $\alpha$ AG).....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLA

<b>aa</b>	Aminoácido
<b>ADE</b>	Aumento Dependente de Anticorpos
<b>AOX</b>	Gene que codifica a álcool oxidase
<b>APCs</b>	Células apresentadoras de antígenos
<b>CCMB</b>	Calcium Chloride Magnesium Buffer (Tampão - Cloreto de Cálcio-Magnésio)
<b>DENV</b>	<i>Dengue Virus</i> (Vírus da dengue)
<b>DH5<math>\alpha</math></b>	Linhagem de bactéria <i>Escherichia coli</i>
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic Acid (Ácido desoxirribonucléico)
<b>D.O.<sub>600</sub></b>	Densidade Óptica a 600 nm
<b>EDIII</b>	Domínio III da proteína do envelope do vírus zika (domain III of Zika virus envelope protein)
<b>EDTA</b>	Ethylenediaminetetraacetic acid (Ácido Tetracético Etilenodiamina)
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration (Administração de alimentos e medicamentos dos Estados Unidos)
<b>GRAS</b>	<i>Generally Reconized as Safe</i> (Geralmente reconhecido como seguro)
<b>GS115</b>	Linhagem de levedura <i>Pichia pastoris</i>
<b>His-tag</b>	Cauda (tag) de histidine
<b>His4</b>	Gene que codifica a enzima multifuncional que catalisa o segundo, terceiro, nono e décimo passos na biossíntese da histidina
<b>IPTG</b>	Isopropil- $\beta$ -D-galctosídeo
<b>JEV</b>	<i>Japanese Encephalitis Virus</i> (Vírus da encefalite japonesa)
<b>kb</b>	Kilobase
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>L2X</b>	Laemmli 2x
<b>LB</b>	Meio de cultura Luria-Bertani
<b>LB Low Salt</b>	Meio de cultura Luria-Bertani Low Salt
<b>MHC I</b>	Complexo maior de histocompatibilidade de classe I
<b>Mut</b>	Fenótipo quanto a utilização do metanol (Methanol utilization)
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucléico mensageiro

<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>P53</b>	Proteína p53 – Fator de transcrição regulador do ciclo celular
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>Pb</b>	Pares de base
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline (tampão fosfato salina )
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>SDS</b>	Sodium Dodecyl Sulfate (Dodecil sulfato de sódio)
<b>SDS-PAGE</b>	Eletroforese em gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio
<b>SGB</b>	Síndrome de Guillain-Barré
<b>Sh ble</b>	Gene que confere resistência a Zeocina relacionada à bleomicina
<b>TAE</b>	Tris-Acetato-EDTA
<b>TBEV</b>	<i>Tick-borne Encephalitis Virus</i> ( Vírus da encefalite transmitida por carrapatos)
<b>TBS</b>	Tris Buffered Saline (Tampão Tris-Salina)
<b>Tris</b>	Trisaminometano
<b>WHO</b>	<i>World Organization Health</i>
<b>YFV</b>	<i>Yellow Fever Virus</i> (Vírus da febre amarela)
<b>YPD</b>	<i>Yeast extract – Peptone – Dextrose</i> (Extrato de levedura-peptona-dextrose)
<b>YPDS</b>	<i>Yeast extract – Peptone – Dextrose – Sorbitol</i> (Extrato de levedura-Peptona-Dextrose-Sorbitol)

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1	O VÍRUS ZIKA.....	17
2.1.1	Histórico e dados epidemiológicos.....	17
2.1.2	Transmissão e manifestações clínicas.....	20
2.1.3	Organização genômica e ciclo viral.....	22
2.1.4	A proteína do envelope (E).....	27
2.1.5	Atualizações sobre vacinas para o ZIKV.....	28
2.2	A LEVEDURA <i>Pichia pastoris</i> .....	30
2.2.1	Metabolismo do metanol.....	32
2.2.2	Fenótipo de utilização do metanol.....	33
2.2.3	Produção de proteínas heterólogas em <i>P. pastoris</i> .....	34
2.3	EXPOSIÇÃO DE ANTÍGENOS NA SUPERFÍCIE DE LEVEDURAS ( <i>Yeast Surface Display</i> ).....	35
2.4	LEVEDURAS COMO VACINAS.....	37
3	OBJETIVOS.....	39
3.1	OBJETIVO GERAL.....	39
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
4.1	MATERIAIS.....	40
4.1.1	Fragmento EDIII do vírus Zika.....	40
4.1.2	Vetores e construção dos cassetes de expressão.....	41
4.1.3	Linhagens de micro-organismos e condições de cultivo.....	43
4.1.4	Soluções e tampões.....	44
4.1.5	Géis para eletroforese de DNA e de proteínas.....	44
4.1.6	Enzimas.....	45
4.2	MÉTODOS.....	46
4.2.1	Sequência dos <i>primers</i> e amplificação de EDIII de ZIKV.....	46
4.2.2	Construção do vetor de expressão pPICZA $\alpha$ EDIII $\alpha$ AG.....	46
4.2.3	Transformação da levedura <i>Pichia pastoris</i> .....	48
4.2.4	Análise dos recombinantes em <i>Pichia pastoris</i> .....	49
4.2.5	Cultivo e indução dos recombinantes em <i>Pichia pastoris</i> ....	50
4.2.6	Avaliação da produção da proteína EDIII.....	50

4.2.7	Imunofluorescência.....	51
5	<b>RESULTADOS</b> .....	53
5.1	AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO EDIII DO VÍRUS ZIKA.....	53
5.2	CONSTRUÇÃO DO CASSETE DE EXPRESSÃO pPICZA $\alpha$ EDIII $\alpha$ AG.....	53
5.3	ANÁLISE DOS CLONES pPICZA $\alpha$ EDIII $\alpha$ AG.....	54
5.4	ANÁLISE DOS CLONES POR DIGESTÕES DAS EXTRAÇÕES PLASMIDIAIS.....	55
5.5	TRANSFORMAÇÃO DE <i>Pichia pastoris</i> GS115 E OBTENÇÃO DOS RECOMBINANTES.....	57
5.6	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO FRAGMENTO EDIII DE ZIKA EM <i>Pichia pastoris</i> .....	60
5.7	ANÁLISE DE ANCORAGEM E EXPRESSÃO DA PROTEÍNA POR IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	61
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	63
7	<b>CONCLUSÃO</b> .....	68
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	69

## 1 INTRODUÇÃO

Os flavivírus representam um importante grupo de patógenos responsáveis por causar doenças infecciosas em humanos e chamam atenção por acarretarem surtos recorrentes e epidemias em todo o mundo. Pertencente a este grupo encontra-se o vírus Zika (ZIKV), além de outros micro-organismos de importância médica, como o vírus da dengue (DENV) e da febre amarela (YFV).

A infecção provocada pelo Zika é comprovadamente relacionada com casos de malformações congênitas e de transtornos neurológicos. Atualmente, a circulação do vírus é reconhecida e a obtenção de estratégias voltadas para prevenção da infecção causada pelo ZIKV é um dos grandes objetivos preconizados pela Organização Mundial de Saúde (OMS).

Devido à rápida disseminação e aos severos quadros clínicos associados à infecção pelo ZIKV, o desenvolvimento de uma método seguro e eficaz é fundamental. Pesquisas em curso têm demonstrado o uso do domínio III da proteína do Envelope (EDIII) do vírus Zika como um candidato principal na elaboração de vacina de subunidade efetiva, principalmente pela sua especificidade. O EDIII é descrito como principal alvo de anticorpos específicos contra o ZIKV com a capacidade de induzir potentes atividades de neutralização.

Alguns estudos com anticorpos neutralizantes foram considerados correlatos com a proteção para aprovação de vacinas contra a DENV (Vírus da dengue), YFV (Vírus da febre amarela) e TBEV (Vírus da encefalite – transmitida por carrapato), além de terem sido demonstrados papéis importantes na proteção contra a infecção por flavivírus.

Dentre as possibilidades para imunização, a implantação de sistemas de ancoragem e exposição de proteínas heterólogas na superfície de leveduras tem sido largamente utilizada em diversas áreas médicas, como por exemplo, na microbiologia e na biologia molecular.

De maneira geral, as principais leveduras utilizadas para o emprego de vacinas são *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*, que apresentam uma série de vantagens, como: são considerados organismos seguros para uso em humanos possuindo certificado *GRAS* (*Generally Regarded as Safe*), seu metabolismo e genética são bem estabelecidos, são usualmente requeridas para produção de proteínas recombinantes para diversos fins biotecnológicos e dispõe de facilidade de



manipulação e crescimento relativamente rápido. Além disso, possuem potencial atividade adjuvante, melhorando a apresentação do antígeno carregado.

Sendo assim, o presente estudo propõe a obtenção de uma linhagem recombinante de *Pichia pastoris* expondo o antígeno EDIII em sua superfície com o intuito de ser um candidato a vacina profilática contra o vírus Zika.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. O VÍRUS ZIKA

#### 2.1.1. Histórico e dados epidemiológicos

Em 1947, os primeiros isolados do vírus Zika foram descritos na floresta Zika, localizada na Uganda – África, a partir de macacos sentinela *Rhesus* infectados. No ano seguinte, foi verificado em amostras de mosquitos selvagens (*Aedes africanus*) na mesma região o que contribuiu para a suspeita de sua transmissão vetorial (DICK et al., 1952). As primeiras evidências sorológicas da infecção por ZIKV em humanos foram demonstradas em estudos realizados entre 1951 e 1981 em alguns países, como: Uganda, Tanzânia, Nigéria, Egito, República Centro Africana, e demais países africanos como Serra Leoa e países do Sudeste Asiático como Índia, Malásia, Filipinas, Tailândia, Vietnã e Indonésia (HAYES, 2009).

Ao longo dos últimos 60 anos, o vírus foi observado circulando entre as populações africanas e asiáticas de forma silenciosa, com relatos de casos geograficamente isolados, de curta duração e sintomatologia branda (FAUCI et al., 2016). Em 2007, o primeiro grande surto do vírus foi constatado na ilha Yap nos Estados Federados da Micronésia e estima-se que aproximadamente 73% da população foram infectados, apresentando sintomas leves e de curta duração (DUFFY et al., 2009). O segundo surto significativo ocorreu na Polinésia Francesa entre os anos de 2013 e 2014, com uma taxa de infecção geral de 66% e paralelamente foi observado aumento significativo de doenças de caráter neurológico na população acometida (MALLET et al., 2015; CAO-LORMEAU et al., 2016).

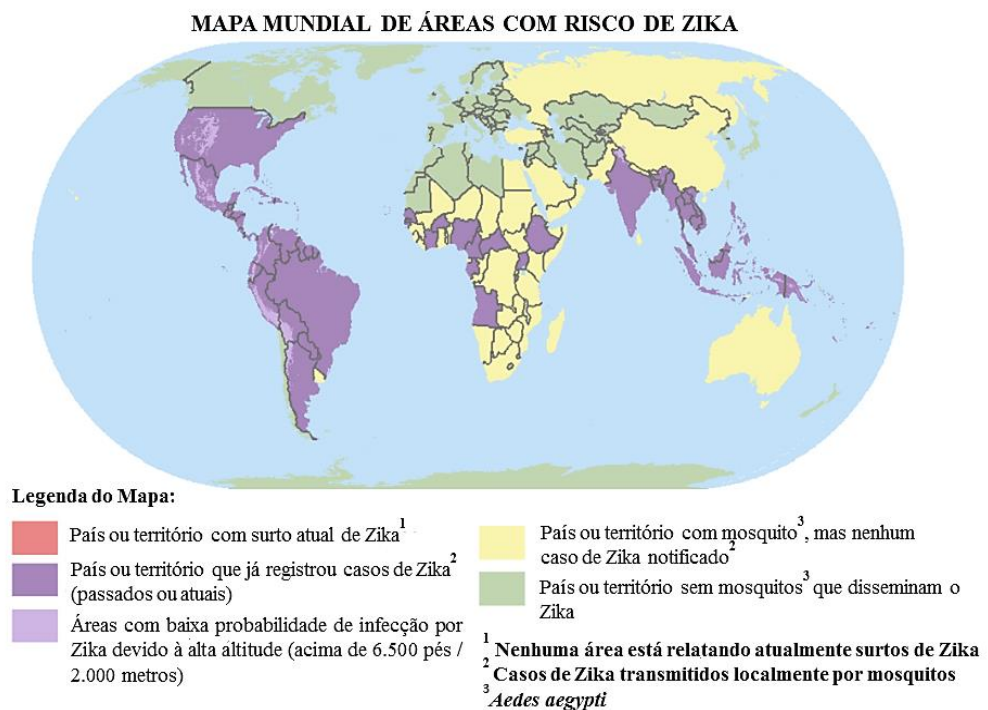
Embora estudos filogenéticos indiquem a introdução do vírus desde 2013, apenas em maio de 2015 o primeiro caso confirmado de infecção pelo Zika vírus foi relatado nas Américas. Acredita-se que os registros de co-circulação do vírus ZIKV com outras endemias infecciosas, como o vírus da Dengue (DENV) e Chikungunya (CHIKV) favoreceram a limitação em suas notificações ao longo dos anos, em decorrência das semelhanças sintomatológicas apresentadas (WEAVER et al., 2016).

Notavelmente, entre os anos de 2015 e 2016, o vírus ganhou ainda mais repercussão quando se espalhou pelas Américas Central e Sul, especialmente no Brasil, onde se estima um total de 216.207 casos prováveis da infecção (SVS,

2015). Acompanhando os caminhos de disseminação do Zika foi percebido um aumento significativo de novos casos de microcefalia e de indivíduos afetados pela Síndrome de Guillain-Barré, que após investigações levaram a confirmação da associação do Zika com estes quadros graves (WHO, 2017).

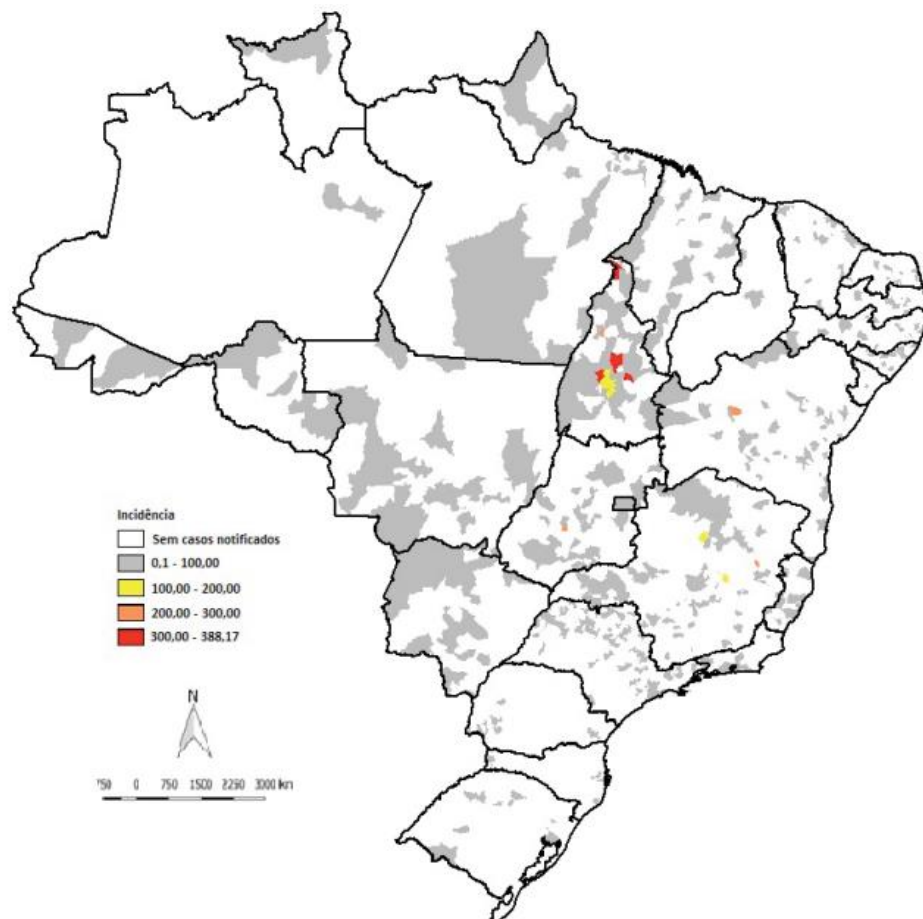
Fatores como a ampla distribuição geográfica de infecções do Zika, a falta de comercialização específica de testes sorológicos, falta de tratamento específico ou preventivo e a ausência de imunidade populacional em países recém-afetados, bem como a ligação com o crescente número de transtornos de caráter neurológico fizeram da infecção pelo vírus Zika uma ameaça eminente à saúde global (BRASIL et al., 2016; MLAKAR et al., 2016; RASMUSSEN et al., 2016).

Em 1 de fevereiro de 2016, o Zika foi declarado como emergência de saúde pública internacional pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2016). De acordo com as estimativas da OMS, o vírus foi responsável pela infecção de 1,5 milhões de pessoas, devido ao aumento no fluxo de pessoas entre regiões aliado as diversas formas de transmissão (WHO, 2017). Em dezembro de 2019, 89 países e territórios relataram transmissão local, atual ou passada do Zika, com maior distribuição do vírus no continente americano (Figura 1).

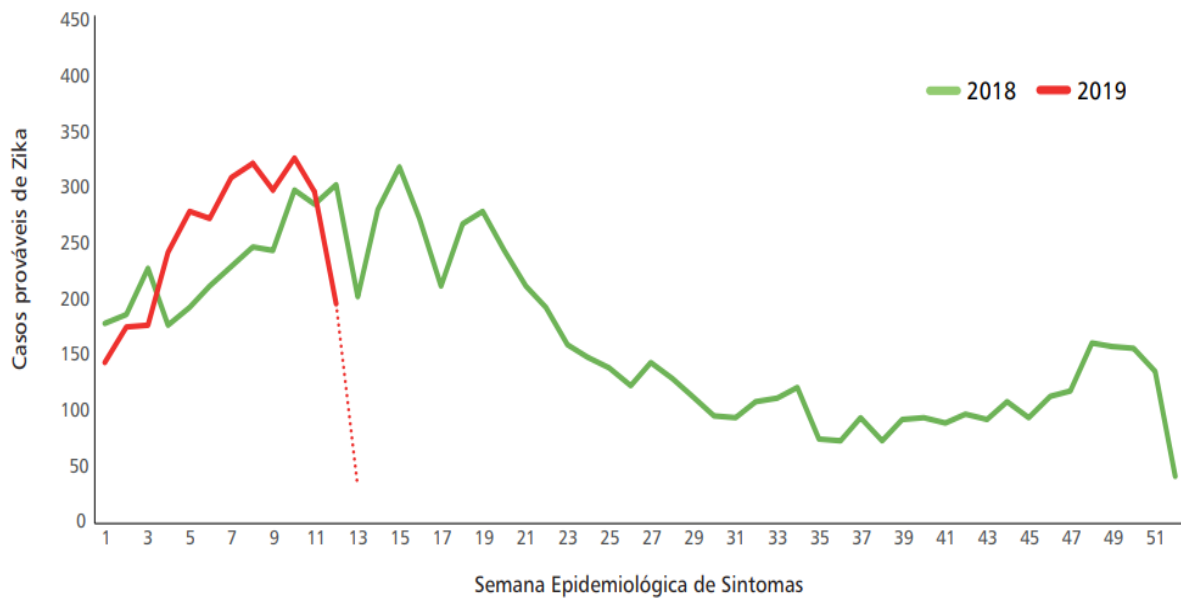


**Figura 1.** Mapa mundial destacando as áreas com risco de infecção pelo vírus Zika. Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Dezembro/2019 (adaptado).

O Brasil foi o país mais afetado das Américas, sendo confirmados desde 2015 pelo Ministério da Saúde, 3.332 casos de microcefalia e/ou malformações do Sistema Nervoso Central (SNC) associado à infecção por ZIKV. No geral, o número de casos registrados de ZIKV no Brasil diminuiu significativamente de 205.578 casos em 2016 para 13.353 em 2017 (até a semana epidemiológica 25) (SVS, 2017). No entanto, os dados mais recentes apontam que o vírus continua em circulação, o que é demonstrado nos dados de 2018, até 04 de abril, sendo registrados 3.001 casos de Zika, enquanto que no mesmo período em 2019, foram registrados 3.085 casos prováveis, com incidência de 1,5 caso/100 mil hab. Entre as Unidades da Federação, destacam-se Tocantins (45,5 casos/100 mil hab.) e Acre (10,4 casos/100 mil hab.). Em 2019, não foram registrados óbitos devido à infecção por Zika (SVS, 2019).



**Figura 2.** Distribuição de incidência de casos prováveis de Zika, até a Semana Epidemiológica 13, Brasil, 2019. Fonte: Sinan NET (banco de dados de 2019 atualizado em 04/04/2019). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (população estimada em 01/07/2018).



**Figura 3.** Casos prováveis de Zika, por semana epidemiológica de início de sintomas. Brasil: 2018 e 2019. Fonte: Sinan NET (banco de dados de 2018 atualizado em 09/01/2019 e de 2019, em 04/04/2019).

Entre 2015 e 2019 (até a Semana epidemiológica N°52) o Ministério da Saúde do Brasil foi notificado sobre 18.578 casos suspeitos de alterações no crescimento e desenvolvimento possivelmente relacionadas à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas, dos quais 2.265 (12,2%) foram excluídos, após criteriosa investigação, por não atenderem às definições de casos vigentes. Do total de casos notificados, 2.665 (14,3%) permaneceram em investigação. Dentre os casos com investigação concluída, 3.496 (18,8%) foram confirmados (Figura 1A); 8.752 (47,1%) foram descartados; 763 (4,1%) foram classificados como prováveis e 638 (3,4%) foram classificados como inconclusivos. Considerando apenas o ano epidemiológico de 2019, foram notificados 1.462 casos com uma média mensal de 122 casos, dos quais 1.138 nasceram em 2019. Do total de casos notificados, 72 (4,9%) foram confirmados (42 nascidos). Os casos confirmados em 2019 ocorreram em 50 municípios de 18 Unidades Federadas.

### 2.1.2. Transmissão e manifestações clínicas

O vírus Zika possui múltiplas formas de disseminação, sendo a via mais comum por meio dos seus principais vetores, mosquitos do gênero *Aedes*, que

durante o processo de repasto sanguíneo podem inocular (infectar) ou ingerir (captar) partículas virais (VASILAKIS; WEAVER, 2017).

Acredita-se que a transmissão do ZIKV seja mediada predominantemente por dois mosquitos, *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, pois mantem um ciclo urbano de transmissão “humano-mosquito-humano” e estão amplamente distribuídos em várias regiões tropicais e subtropicais do mundo (KRAEMER et al., 2015 ; PAUPY et al., 2009 ; THOMAS et al., 2012 ). Ambos, *A. aegypti* e *A. albopictus*, são geralmente ativos durante o dia (PONLAWAT; HARRINGTON, 2005; SCOTT; TAKKEN, 2012) e são as únicas espécies de *Aedes* (*Stegomyia*) conhecidas e endêmicas nas Américas (GREGORY et al., 2017). Destas duas espécies, *A. aegypti* é considerado o vetor primário associado aos surtos de ZIKV (DIALLO et al., 2014).

Outras possibilidades de transmissão também são relatadas, como: materno-fetal, durante a amamentação, por transfusão sanguínea e também através de relações sexuais (SONG et al., 2017)

A transmissão perinatal pode ocorrer por via transplacentária ou durante o parto quando a mãe está infectada. Estudos demonstraram a presença do ZIKV na placenta, líquido amniótico e tecidos cerebrais de fetos e recém-nascidos (HAYES, 2009; ECDC, 2016). Em mulheres grávidas, tem sido associada a complicações fetais e infantis que incluem danos cerebrais, microcefalia e déficits auditivos e visuais (MARTINES et al., 2015; MOORE et al., 2017; VENTURA et al., 2017; BHATNAGAR et al., 2017).

O distúrbio do desenvolvimento neurológico devido à infecção pelo feto por ZIKV é caracterizado principalmente por microcefalia. A microcefalia é descrita pela redução no tamanho do cérebro e comprometimento da proliferação celular e morte de células progenitoras corticais (DEVHARE et al., 2017). Bebês com microcefalia desenvolvem uma cabeça menor em comparação com bebês saudáveis da mesma idade e sexo (SILVA et al., 2017).

Algumas anormalidades neurológicas importantes, com infecção pelo ZIKV como vírus neurotrópico, incluem meningoencefalite, mielite aguda, paralisia facial, parestesia, fotofobia e características auditivas (ARAUJO et al., 2016; OZKURT; TANRIVERDI, 2017). Vários estudos mostraram que a infecção é um gatilho notável da síndrome de Guillain-Barré (SGB), que pode ser definida como um distúrbio neurológico de caráter autoimune, caracterizada pela deteriorização da bainha e

mielina (revestimento dos nervos periféricos) e dos reflexos tendinosos. Em geral, o quadro evolui rapidamente, atingindo o ponto máximo de gravidade por volta da segunda ou terceira semana podendo ocorrer paralisia. Em alguns casos, a doença pode tornar-se crônica ou recidivar (AHMAD et al, 2018).

Alguns estudos verificaram que o risco de SGB foi estimado em 24 casos por 100.000 infecções por ZIKV, particularmente em áreas onde a infecção é epidêmica. Alguns países como Brasil e Venezuela registraram um aumento significativo no SGB durante a epidemia de infecção por ZIKV (MASSAD et al., 2016).

Uma alta carga de RNA viral e de replicação do ZIKV foi encontrada no sêmen e urina de pacientes apoiando a hipótese de que ela pode ser transmitida por meio de fluidos corporais como também pela relação sexual. O vírus Zika já foi identificado em secreções vaginais (PENOT et al., 2017) e a transmissão sexual foi relatada evidenciando casos de transmissão entre indivíduos do mesmo sexo, masculino para masculino (DECKARD et al., 2016) e também feminino para masculino (DAVIDSON et al., 2016). Prováveis casos de infecção por transfusão sanguínea também já foram descritos na Polinésia Francesa e no Brasil (BARJAS-CASTRO et al., 2016; MUSSO et al., 2014).

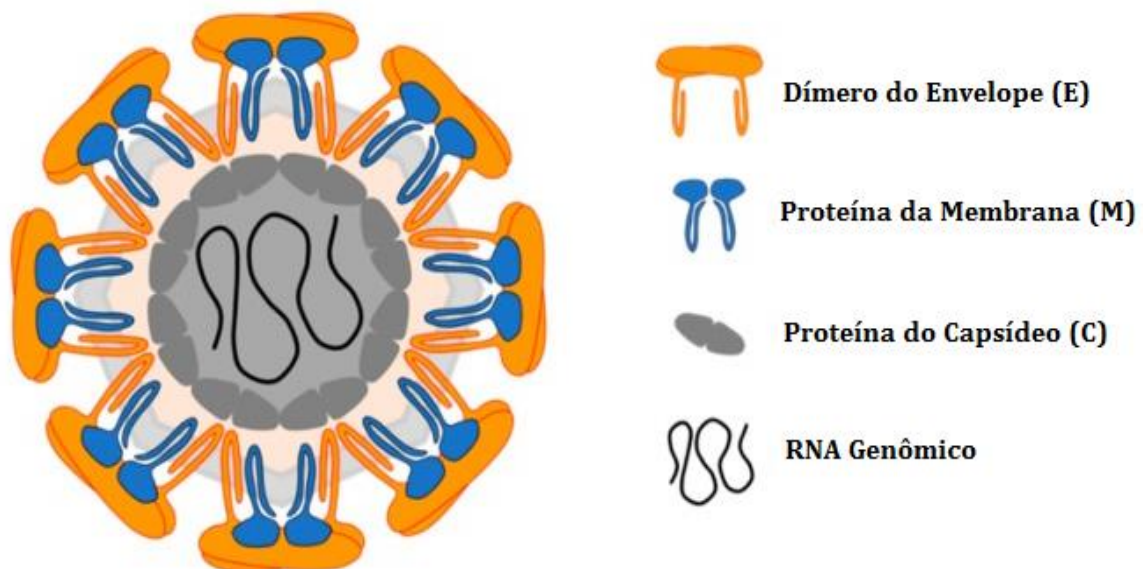
O período de incubação do Zika varia entre aproximadamente 3-12 dias (FAUCI, 2016). A doença geralmente é de caráter leve ou assintomático em aproximadamente 80% dos casos, e configura-se como uma doença febril auto-limitante de curta duração (4-7 dias) (HAYES, 2009; ECDC, 2016). Nos casos sintomáticos, a maioria dos pacientes apresenta febre leve, artralgia (dor nas pequenas articulações das mãos e dos pés), dores musculares, dor de cabeça, dor abdominal, dor retro-orbital, prostração, edema, linfadenopatia, conjuntivite não purulenta ou hiperemia conjuntival e erupções cutâneas maculopapulares ou papulares que começa no rosto e depois se espalham por todo o corpo; menos frequentemente, sinais gastrointestinais podem estar presentes (SIMPSON, 1964; OLAGNIER et al., 2016).

### **2.1.3. Organização genômica e ciclo viral**

Dentro da família *Flaviviridae*, o vírus Zika é membro do gênero *Flavivirus* que contempla aproximadamente 73 espécies de patógenos humanos e animais de importância clínica, incluindo o vírus da encefalite japonesa (JEV), vírus do Oeste do

Nilo (WNV), vírus da dengue (DENV) e vírus da febre amarela (YFV) (SIMMONDS et al., 2017).

O Zika consiste em um vírus envelopado (Figura 4) com cerca de 50 nm de diâmetro e seu material genético é formado por uma molécula de RNA de cadeia simples e polaridade positiva (+ssRNA) (HAMEL et al., 2015; BARRETO-VIEIRA et al., 2016).



**Figura 4.** Representação ilustrativa da partícula viral do ZIKV. A superfície do virion do ZIKV é arranjada com as proteínas do Envelope e da Membrana, ancoradas em uma bicamada lipídica com uma simetria icosaédrica. Sob a bicamada lipídica viral está o nucleocapsídeo composto pelo genoma de RNA associado à proteína do Capsídeo. Fonte: Ávila-Pérez et al., 2018 (Adaptado).

O genoma do vírus Zika possui aproximadamente 10,8 Kb contendo um único fragmento aberto de leitura (ORF) flanqueado pelas regiões não-traduzidas (UTRs) em ambas as extremidades 5' e 3', que são importantes para o processo de replicação e tradução do vírus. O ORF codifica uma única poliproteína que é clivada por proteases do vírus e da célula hospedeira dando origem a três proteínas estruturais (*Capsídeo*, *Membrana/Pré-membrana* e *Envelope*) e sete proteínas não estruturais (*NS1*, *NS2A*, *NS2B*, *NS3*, *NS4A*, *NS4B* e *NS5*) (Figura 5) (LINDENBACH, 2007).

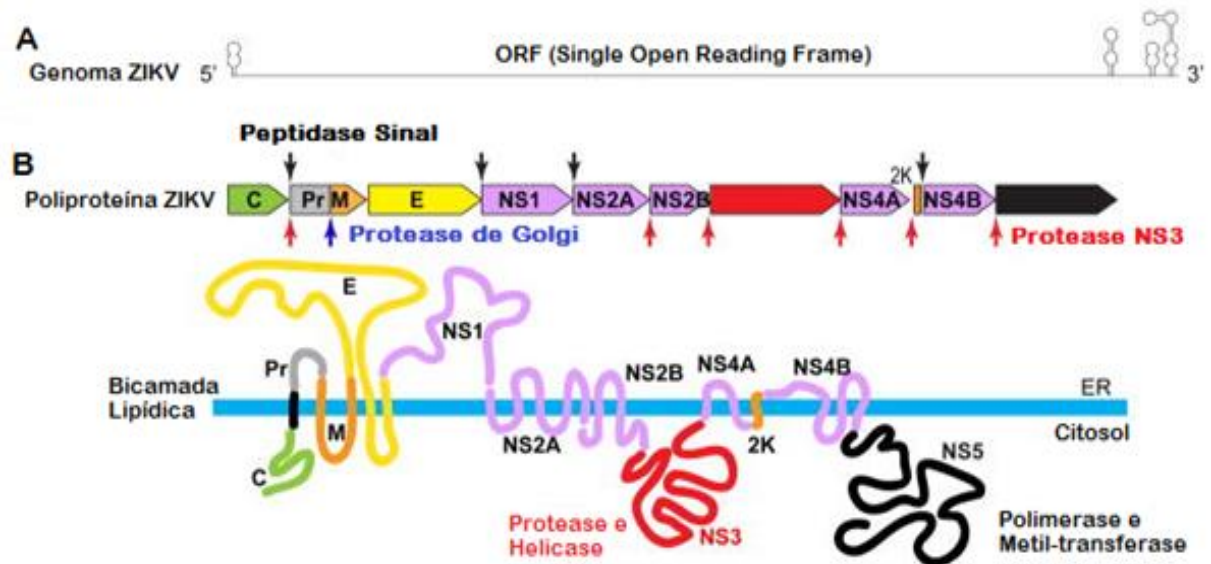
A proteína do capsídeo (C) é um componente estrutural básico do vírus que se liga ao genoma viral formando o nucleocapsídeo, enquanto a membrana externa do virion é uma bicamada lipídica contendo a proteína da Membrana (M) e a



proteína do Envelope (E) (JONES et al., 2003). As duas glicoproteínas virais, prM/M e E, desempenham papéis importantes durante o processo de entrada viral ( REY et al., 1995 ). A proteína E é responsável pela ligação e fusão aos receptores celulares e consequente entrada do vírus na célula, enquanto a prM funciona principalmente como uma chaperona da proteína E prevenindo-a da degradação e da fusão prematura à membranas celulares (GUIRAKHOO et al., 1992 ; KUHN et al., 2002 ).

Acerca das proteínas não-estruturais, NS1 é uma proteína extremamente conservada associando-se à evasão do sistema imunológico do hospedeiro, sendo sua glicosilação significativa para emissão efetiva, virulência e replicação do vírus (PRYOR; WRIGHT, 1994; CRABTREE et al., 2005). A NS2A está envolvida na montagem do vírus e desempenha um papel no controle do interferon antiviral da resposta do hospedeiro e na secreção de partículas virais da célula (LIU et al., 2005/2006), enquanto NS2B atua como cofator para o domínio da protease da NS3 produzindo um complexo de serina protease que está envolvido na clivagem da poliproteína viral (MILLER et al.,2006). A NS3 está envolvida na replicação do vírus e no processamento da poliproteína viral, respectivamente. A proteína NS4A do vírus Zika serve como fator determinante para a patogênese do vírus e mecanismo de reconhecimento de ação de seus efeitos. Já NS4B forma os constituintes da membrana do complexo de replicação viral (LIANG et al.,2016). A NS5 parece estar envolvida na supressão da sinalização do interferon (IFN), que é mediada via degradação dependente de proteassoma do Transdutor de Sinal e do Ativador da Transcrição 2 (STAT2) (MISHRA et al., 2017).

A proteína NS5 é composta compreende dois domínios um é a RNA polimerase dependente de RNA C-terminal (NS5 RdRp) enquanto a segunda é a metiltransferase N-terminal (NS5MTase). O genoma viral serve como modelo para a síntese da cadeia intermediária ssRNA (-) pela RdRp da NS5, que atua como molde apenas para a síntese do RNA genômico de (+) ssRNA e síntese da poliproteína viral (BUGL et al., 2000; BUTCHER et al., 2001). O papel dos outros 3 ' região NCR do genoma viral tem sido sugerido no reconhecimento de fatores virais e celulares, na estabilização do genoma, no processo de tradução e no acondicionamento do RNA (CHAMBERS et al., 1990).

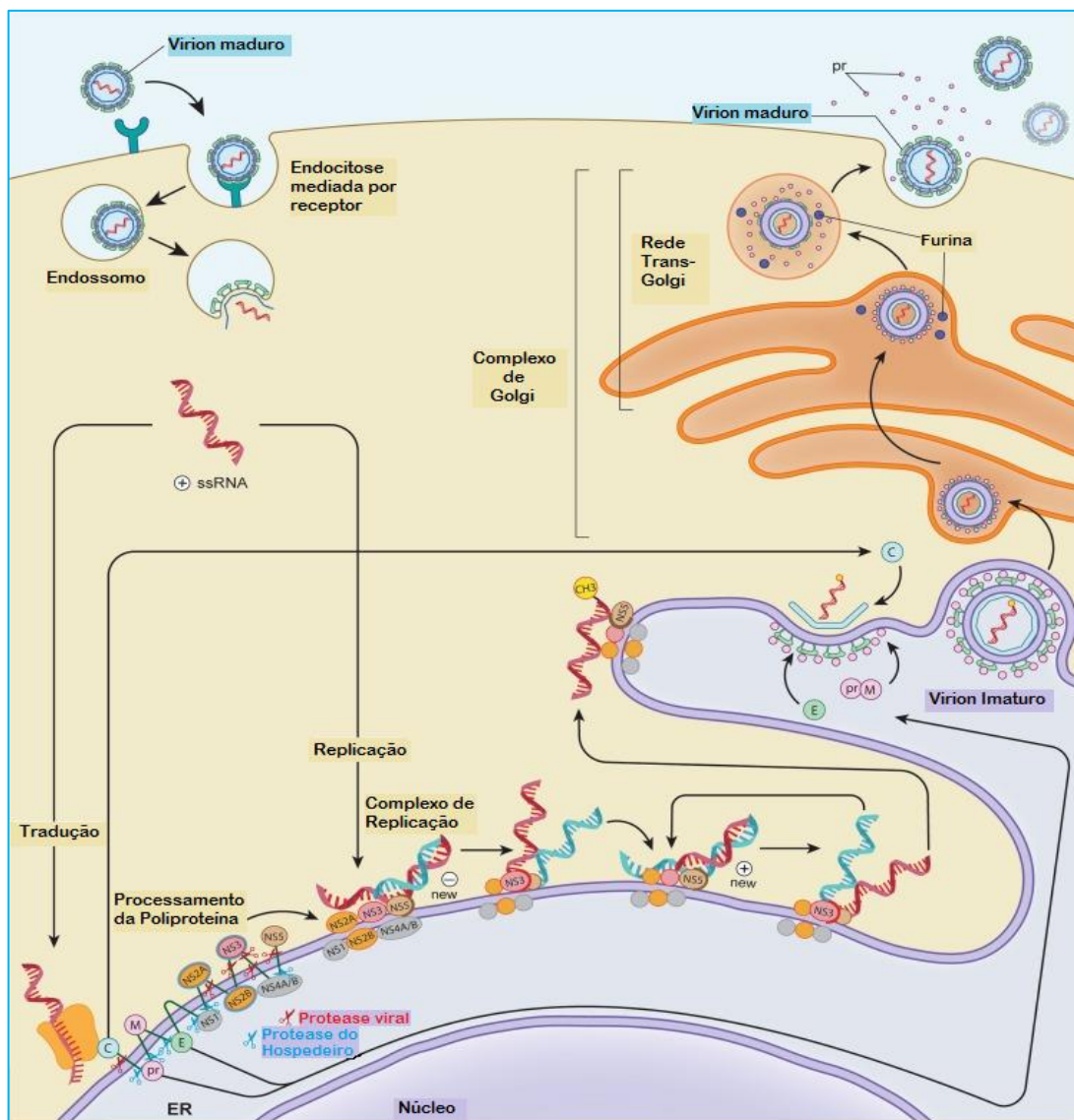


**Figura 5.** Genoma do vírus Zika e suas proteínas codificadas. (A) Um diagrama de um RNA genômico de flavivírus que codifica um único quadro de leitura aberto (ORF). (B) Estratégia de processamento e produtos proteicos. A poliproteína é processada em vários locais por proteases hospedeiras (setas vermelhas) e virais (setas pretas). A topologia da membrana e a função das principais proteínas do ZIKV também são ilustradas. O arranjo das proteínas estruturais permite que a bicamada lipídica se envolva em torno da estrutura do nucleocapsídeo e exiba as proteínas do envelope na superfície externa da membrana viral. Fonte: Ming et al., 2016 (Adaptado).

Semelhante a outros flavivírus, o ciclo de infecção do ZIKV (Figura 6) inicia-se através da ligação das partículas virais à superfície da célula mediada por fatores de adesão como a lectina DCSIGN e diversos membros da família de receptores de fosfatidilserina que estão presentes na glicoproteína do Envelope (HAMEL et al., 2015; PIERSON; KIELIAN, 2013). O acesso do vírus ao interior da célula ocorre por endocitose mediada por receptores e Clatrina (CHU; NG, 2004; CHU et al., 2006; VAN DER SCHAAR et al., 2007,2008; ACOSTA et al., 2008; MOSSO et al., 2008). Após a internalização do vírus, o ambiente apresentando pH ácido dentro do endossomo induz mudanças conformacionais na proteína E que promovem a fusão das membranas do vírus e do endossomo e a subsequente liberação do genoma viral no citoplasma da célula infectada. Conforme o genoma viral é liberado, ele é traduzido por meio do aparelho transcricional da célula hospedeira origina uma única poliproteína viral que mediante clivagem, por proteases do hospedeiro e do vírus, resultará nas proteínas individuais estruturais e não-estruturais do vírus.

A replicação do material genético viral ocorre em membranas de células hospedeiras, caracterizada principalmente por invaginações da membrana do

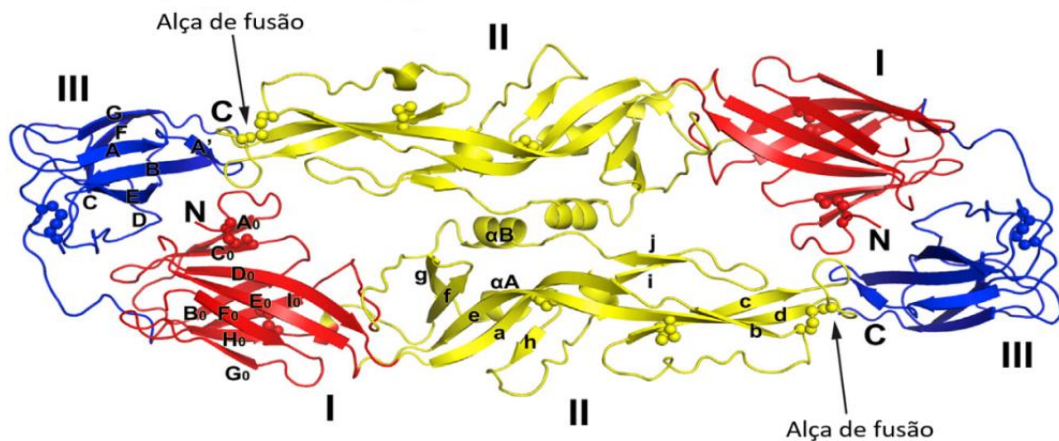
retículo endoplasmático (RE) denominada pacotes de vesículas, que servem como suporte para ancorar os complexos de replicação viral (HAMEL et al., 2015). As partículas virais imaturas são montadas dentro do RE, onde o RNA genômico viral é associado com a proteína C e é empacotado junto com as proteínas prM e E. A maturação do virion ocorre na rede trans-Golgi durante seu trânsito pela via secretora celular. A protease celular Furina media a clivagem da prM, resultando na liberação do peptídeo pr e na formação de vírions maduros contendo a proteína M que será liberada das células infectadas por exocitose (LINDENBACH; RICE, 2003 ; ROBY et al., 2015).



**Figura 6.** Resumo do ciclo de replicação viral do ZIKV. Representação esquemática dos estágios de entrada até a maturação do vírus na célula hospedeira. Fonte: ABRAMS et al., 2017 (Adaptado)

#### 2.1.4. A Proteína do Envelope (E)

A proteína do Envelope (aproximadamente 53 kDa) é a principal proteína de superfície que atua em diversos aspectos de ligação, fusão de membrana e ciclo de replicação (FAYE et al., 2014). Além disso, a proteína E representa um dos principais alvos da resposta humoral do hospedeiro (LAZEAR, 2016). Com cerca de 500 aminoácidos, a proteína E tem um ectodomínio composto por cerca de 400 aminoácidos localizados em sua região N-terminal (KOSTYUCHENKO et al., 2016). Este ectodomínio é dividido em três domínios estruturais (Como apresentado na Figura 7), ditos Domínios I (E-DI), II (E-DII) e III (E-DIII) (MUKHOPADHYAY et al., 2005).



**Figura 7.** Estrutura dimérica da proteína E do ZIKV. Os três domínios estão representados em: (I) em vermelho, (II) em amarelo e (III) em azul. A Alça de fusão está exemplificada pelas setas pretas. Fonte: DAI et al., 2016 (Adaptado).

O domínio I é responsável pelas mudanças conformacionais necessárias à entrada do vírus na célula (MODIS et al., 2003). O domínio II, que se apresenta como uma longa estrutura em forma de dedo (DAI et al., 2016) é responsável pela dimerização da proteína E, e contém a Alça de Fusão (FL) região extremamente conservada em todos os flavivírus, motivo pelo qual está diretamente envolvida nas reações cruzadas e reações de aumento dependente de anticorpos (ADE) observadas entre os flavivírus (DENG et al., 2011).

O domínio III da proteína E (EDIII) contém os motivos de ligação ao receptor celular e a maioria dos epítopos neutralizantes que promovem respostas fortes por meio de anticorpos do hospedeiro e imunidade protetora que são mapeados para este domínio (OLIPHANT et al., 2005; SUKUPOLVI-PETTY et al., 2010).

Recentemente, o EDIII do ZIKV foi encontrado como alvo de vários anticorpos específicos para o ZIKV com distintas atividades potentes de neutralização (ZHAO et al., 2016). Esses anticorpos neutralizantes foram considerados correlacionados com a proteção para vacinas contra YFV e TBEV, além de ter sido demonstrada desempenhar papéis importantes na proteção contra a infecção por muitos flavivírus (BELMUSTO-WORN et al., 2005; HEINZ et al., 2007). Sendo assim, o potencial do EDIII em induzir uma resposta imunológica eficiente e direcionada tornam-no um excelente candidato como vacina subunidade eficaz contra ZIKV.

### 2.1.5. Atualizações de vacinas para o ZIKV

A utilização de vacinas constitui um método efetivo e econômico para a prevenção de várias doenças infecciosas (LEVINE et al., 2004). Atualmente, não há vacina contra o ZIKV, mas a OMS tornou a elaboração de uma vacina eficaz e segura uma prioridade diante dos desfechos associados à infecção.

A existência de vacinas licenciadas contra doenças flavivirais, como YFV, JEV, DENV e TBEV (VERMA et al., 2014; JARMER et al., 2014; MCARTHUR e HOLBROOK, 2011; TORRESI et al., 2017), fornece experiências para possíveis estratégias contra o ZIKV. Cerca de 50 candidatos que consistem em múltiplas plataformas de vacina, estão atualmente sendo consideradas em estágio pré-clínico de desenvolvimento por diferentes grupos de pesquisa, alguns foram resumidos na tabela 1. (PIERSON e GRAHAM, 2016; TRIPP e ROSS, 2016).

**Tabela 1.** Pesquisas de vacinas em estágios pré-clínicos.

<b>Tipo de vacina</b>	<b>Antígeno</b>	<b>Estágio</b>	<b>Desenvolvedor/ Colaborador</b>
Inativada	Vírus inteiro	Pré-clínico	Bharat Biotech
Vetor recombinante	prM-E e prM-E/NS1	Pré-clínico	Bio-Manguinhos
Subunidade	Proteína E	Pré-clínico	Hawaii Biotech
VLP	E/NS1	Pré-clínico	VBI Vaccines
Organismo alvo atenuado, vivo	prM-E	Pré-clínico	NIAID
Células Sf9/Baculo	Hemodímero da proteína E	Pré-clínico	Novavax, Inc.
mRNA (SAM)	prM-E	Pré-clínico	GSK-NIH

Fonte: Lin et al., 2018 (Adaptado)

Diversas abordagens se mostram atraentes, todas contendo ou expressando proteínas estruturais do ZIKV. As vacinas candidatas ao ZIKV que estão atualmente integradas ao “*WHO Vaccine Pipeline Tracker*” em fase I / II de ensaios clínicos incluem vírus inteiros inativados, vacinas recombinantes, vacinas de DNA e mRNA e vacina contra o peptídeo salivar do mosquito (Tabela 2).

**Tabela 2.** Desenvolvimento de vacinas para ZIKV em triagem clínica segundo o rastreador da Organização Mundial de Saúde.

<b>Tipo de vacina</b>	<b>Antígeno</b>	<b>Estágio</b>	<b>Desenvolvedor/ Colaborador</b>
DNA	prM-E	Fase I	GeneOne/InOvio
DNA	prM-E e E	Fase I/II	VRC/NIAID
Inativada	Vírus inteiro	Fase I	WRAIR/BIDMC/Sanofi Pasteur
Peptídeo	Proteínas salivares do Mosquito	Fase I	NIH
Vetor recombinante viral	prM-E	Fase I	Themis Bioscience
mRNA	prM-E	Fase I/II	Moderna Therapeutics

Fonte: WHO, 2017.

Dados de estudos de vacinas de DNA do ZIKV indicam diferenças antigênicas de sequência na imunidade anti-ZIKV através do gene prME de tamanho completo, gene E completo e de epítomos específicos (LAROCCA et al., 2016). Demonstrou-se que uma vacina de DNA que codifica o ZIKV prM-E fornece proteção a infecção em camundongos (GRIFFIN et al., 2017). Algumas Vacinas Inativadas purificadas (PIV) e as de vetores de DNA ou adenovírus que codificam o gene prM-E de ZIKV de comprimento total foram relatadas como induzindo anticorpos neutralizantes de alto título e proteção em macacos (ABBINK et al., 2016). Outra vacina com vetor de adenovírus expressando a proteína ZIKV E, foi verificada promovendo altos títulos de anticorpos neutralizantes em camundongos C57BL / 6, e demonstrou fornecer

completa proteção em filhotes (KIM et al., 2016). De acordo com outro relatório recente, anticorpos neutralizantes que reconhecem epítomos de dímeros do Envelope podem fornecer importantes determinantes para os esforços de tratamento e vacinação (BORDON, 2016; HASAN et al., 2017).

Os dados de segurança e imunogenicidade dos ensaios clínicos de fase 1 em andamento são esperados para breve. Dados os cronogramas e as incertezas inerentes ao processo de desenvolvimento clínico, é importante desenvolver uma variedade de plataformas de vacina para o ZIKV. Além das vacinas contra ZPIV e DNA, vacinas baseadas em RNA, vacinas recombinantes baseadas em vetores e vacinas de subunidades proteicas purificadas também estão atualmente em desenvolvimento, com avaliação pré-clínica planejada e avanço potencial nos ensaios clínicos de fase 1 (LIN et al., 2018).

Apesar do ritmo de estudos pré-clínicos e clínicos iniciais, ainda existem desafios importantes para o desenvolvimento das vacinas contra o ZIKV. Caminhos de desenvolvimento e desafios para as vacinas ZIKV foram recentemente revisados (MARSTON et al., 2016 ; THOMAS et al., 2016 ). A experiência com outras vacinas contra flavivírus combinadas com dados pré-clínicos atualmente disponíveis para vacinas com ZIKV sugere que os anticorpos neutralizantes provavelmente serão importantes na proteção contra o ZIKV (ABBINK et al., 2016).

A segurança da vacina é fundamental para qualquer vacina profilática e outros fatores também devem ser considerados importantes como, a faixa etária, tipos de contra indicações, população alvo, tipo de resposta imune gerada, abordagem e aplicação da vacina (ABBINK et al., 2016). Demonstrar a eficácia da vacina pode ser um desafio e soluções técnicas estão sendo buscadas para melhorar as definições de infecção por ZIKV no contexto do desenvolvimento de vacinas (BAROUCH et al., 2017).

## 2.2. A LEVEDURA *Pichia pastoris*

A levedura *Pichia pastoris* teve seu primeiro isolado em 1950 na França e foi descrita como *Zygosaccharomyces pastori* por A. Guilliermond (GUILLIERMOND, 1920). Após seis anos desde o primeiro relato, outras linhagens foram isoladas de

árvores na Califórnia por H. Phaff, que nomeou a espécie como *Pichia pastoris* (PHAFF et al., 1956). Em 1995, após análises filogenéticas, *P. pastoris* foi reclassificada no gênero *Komagataella* que posteriormente foi dividida em várias espécies (YAMADA et al., 1995). Atualmente, seis membros do gênero *Komagataella* são descritos (*K. pastoris*, *K. phaffii*, *K. pseudopastoris*, *K. poluli*, *K. ulmi* e *K. kurtzmanii*), sendo as cepas de *K. phaffii* ou *K. pastoris* destinadas a produção de proteínas (KURTZMAN et al., 2005; NAUMOV et al., 2013).

*P. pastoris* (Figura 8) é uma levedura metilotrófica, ou seja, tem a capacidade de crescer em meios contendo metanol como exclusiva fonte de carbono (KURTZMAN, 2009). Além disso, é caracterizada como anaeróbia facultativa sendo também considerado um ser homotálico, porque as células da mesma estirpe podem acasalar umas com as outras (CEREGHINO E CREGG, 2000).



**Figura 8.** Levedura metilotrófica *Pichia pastoris*. (Fonte: Dennis Kunkel - Microscopy/Science Photo Library)

Por volta dos anos 70, *P. pastoris* foi introduzida pela *Phillips Petroleum* para produção comercial de proteínas unicelulares (SCP – *Single cell protein*) como aditivo para ração animal utilizando a capacidade dessa levedura de consumir o metanol. No entanto, no mesmo período, houve aumento dos custos do metanol devido à crise do petróleo tornando inviável a produção de proteínas. Uma década após o ocorrido, a *Phillips Petroleum*, juntamente com o *Salk Institute Biotechnology / Industrial Associates Inc.* (SIBIA, La Jolla, CA, EUA), estudou *P. pastoris* como um sistema para expressão heteróloga de proteínas (CREGG et al. 1985). O sistema foi



então aprimorado e disponibilizado a comunidade científica gerando contribuições por ser um modelo eucarioto usado na pesquisa de biologia celular e um sistema de produção de proteína recombinante.

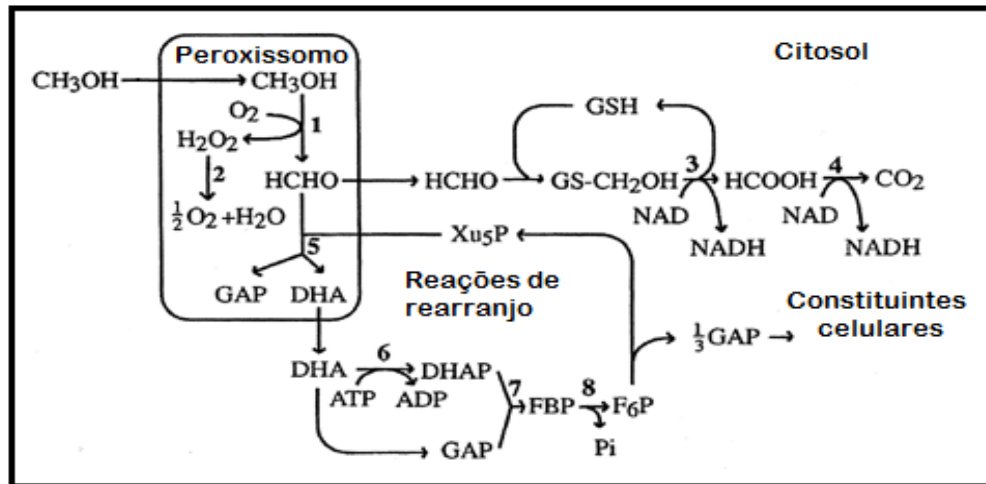
Grandes avanços a cerca das pesquisas sobre *Pichia pastoris* foram revisados, tornando-o um organismo substancial para a biotecnologia (CEREGHINO E CREGG 2000; DALY; HEARN, 2005; GASSER et al. 2013; MACAULEY-PATRICK et al. 2005). Avanços importantes para a aplicação comercial de *P. pastoris* foram o status de *Generally reconized as safe* (GRAS - Geralmente reconhecido como seguro) designado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para uma proteína usada na alimentação animal, a fosfolipase C (CIOFALO et al. 2006) e a aprovação do FDA de um produto biofarmacêutico recombinante, Kalbitor®, um inibidor de calcitreína (THOMPSON, 2010). O sistema de expressão clássico de *P. pastoris* foi extensivamente desenvolvido ao logo dos anos.

### **2.2.1. Metabolismo do metanol**

*P. pastoris* tem a capacidade de crescer em meios contendo metanol como exclusiva fonte de carbono (KURTZMAN, 2009). Isso ocorre devido à hiperexpressão da enzima peroxissomal Álcool Oxidase (AOX) que pode atingir cerca de 30% das proteínas intracelulares na presença de metanol (COUDERC; BARATTI, 1980). Essa levedura possui duas cópias endógenas do gene AOX, onde a expressão AOX1 é responsável por mais de 90% da enzima na célula enquanto a expressão AOX2 constitui menos de 10%. São estes genes que permitem a utilização do metanol como fonte de carbono e por meio do uso do Promotor AOX1 torna-se viável controlar a expressão gênica heteróloga, que é induzida na presença de metanol e reprimida pela glicose ou glicerol (CREGG et al., 2000).

O sistema metabólico do metanol no interior de *P. pastoris* (Figura 9) possui etapas que ocorrem tanto no peroxissomo quanto no citosol. A etapa inicial do ciclo acontece pela ação da enzima álcool oxidase (AOX) que catalisa por meio da via de utilização do metanol, a oxidação do metanol em dois produtos, o formaldeído e o peróxido de hidrogênio. Subsequente, a AOX juntamente com a catalase é encaminhada para dentro do peroxissomo, degradando o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. Uma porção do formaldeído, gerado pela AOX, é transportado para o citoplasma sendo oxidada a ácido fórmico e dióxido de carbono por duas

desidrogenases citoplasmáticas (formaldeído desidrogenase e ácido fórmico desidrogenase), liberando energia na forma de NADH, necessária para o crescimento celular em metanol) (CEREGHINO; CREGG, 2000).



**Figura 9.** Via de utilização do metanol em *Pichia pastoris*. 1- Álcool oxidase (AOX); 2- Catalase; 3- Formaldeído desidrogenase; 4- Formato desidrogenase; 5- Di-hidroxiacetona sintase; 6- Di-hidroxiacetona-quinase; 7- Frutose 1,6-bifosfato aldose; 8- Frutose 1,6 bifosfato (Adaptado: Cereghino e Cregg, 2000).

A porção do formaldeído que permanece no peroxissomo é assimilada em constituintes celulares por uma via cíclica com a condensação com xilulose-5-fosfato na presença da enzima peroxissômica di-hidroxiacetona sintase (DAS) para produzir di-hidroxiacetona (DHA) e gliceraldeído-3-fosfato (GAP). DHA E GAP deixam o peroxissomo e inicia em uma via citoplasmática (via da pentose fosfato) que regenera o 5-monofosfato de xilulose e, a cada três ciclos, uma molécula líquida de gliceraldeído 3-fosfato. Duas enzimas, AOX e DAS, são produzidas em altos níveis nas células quando são expostas ao metanol como fonte de carbono, mas não são tão expressivas quando cultivadas em outras fontes de carbono (por exemplo, glicose, glicerol ou etanol) (CEREGHINO; CREGG, 2000; HARTNER; GLIEDER, 2006).

### 2.2.2. Fenótipos de utilização do metanol

O conhecimento a cerca dos fenótipos quanto à utilização do metanol para linhagens de *P. pastoris* é muito importante para decidir sobre as condições de

cultura a serem usadas e compreender a capacidade metabólica de cada cepa. É reconhecida a existência de três fenótipos: Mut<sup>+</sup>, Mut<sup>S</sup> e Mut<sup>-</sup> (CEREGHINO; CREGG, 2000).

O Mut<sup>+</sup> (*Methanol utilization plus*) possui velocidade de crescimento similar ao fenótipo selvagem e suporta altas taxas de metanol para cultivos em larga escala. Esse fenótipo possui ambos os genes AOXs intactos, conservando sua habilidade de crescer em meio contendo metanol como única fonte de carbono. O Mut<sup>S</sup> (*Methanol utilization slow*) causa diminuição na capacidade de metabolizar metanol pela célula, devido a perda da atividade de álcool oxidase, codificada pelo gene AOX1. Apesar disso, o gene AOX2 se mantém em sua forma selvagem, com a levedura apresentando menor crescimento em meio contendo metanol, já que AOX2 é normalmente menos expresso que AOX1. O Mut<sup>-</sup> (*Methanol utilization minus*) possui os dois genes AOX (AOX1 e AOX2) deletados o que leva a incapacidade do crescimento em metanol (MACAULEY-PATRICK et al., 2005).

### **2.2.3. Produção de proteínas heterólogas em *P. pastoris***

Particularmente, *Pichia pastoris* é um hospedeiro de expressão de proteínas estabelecido e constitui um sistema capaz de produzir elevados níveis de proteínas recombinantes (CEREGHINO; CREGG, 2000). Diferentes proteínas de importância industrial já foram produzidas em *Pichia pastoris*, seja de forma intracelular ou secretadas, como hormônios, anticorpos, citocinas, enzimas e vacinas, sendo ao todo mais de 5000 diferentes polipeptídeos. Dentre as vacinas, já foram produzidos antígenos de diferentes vírus humanos, incluindo: proteína maior do capsídeo (L1) do Papilomavírus Humano Tipo 16; domínio-III do envelope (EDIII) do vírus Dengue (DENV-3); neuraminidase (NA) do vírus Influenza Aviário (H5N1); antígeno da superfície do vírus da Hepatite B (HbsAg) e proteína do capsídeo do Enterovírus (VP1) (WANG et al. 2016).

A produção de proteína funcional está intimamente relacionada com a maquinaria celular do organismo que produz a proteína. A levedura *P. pastoris* é um sistema útil e apresenta uma série de vantagens, como a ausência de partículas pirogênicas e sua capacidade de realizar modificações pós-traducionais, tais como processamento proteolítico, glicosilação e formação de ponte dissulfureto (CREGG et al., 2000; GASSER et al., 2013). Além disso, muitas proteínas que formam corpos

de inclusão inativos em outros sistemas de expressão (exemplo: *Escherichia coli*), são expressas em seu estado biologicamente ativo em *P. pastoris* (ÇELIK; ÇALĐK, 2012).

O fato de possuírem genomas de pequeno tamanho também é de extrema utilidade, já que isto simplifica análises moleculares e genéticas. Adicionalmente combinam a facilidade de manipulação genética e crescimento relativamente rápido a altas densidades em meios relativamente simples, o que proporciona a melhor relação custo-benefício (GELLISSEN, 2005). Outra característica interessante é a purificação a partir do cultivo de *P. pastoris* que ocorre facilmente, pois a levedura fornece vias por meio de peptídeos sinais que direcionam as proteínas para o meio extracelular simplificando os processos de purificação (POTVIN; AHMAD; ZHANG, 2012).

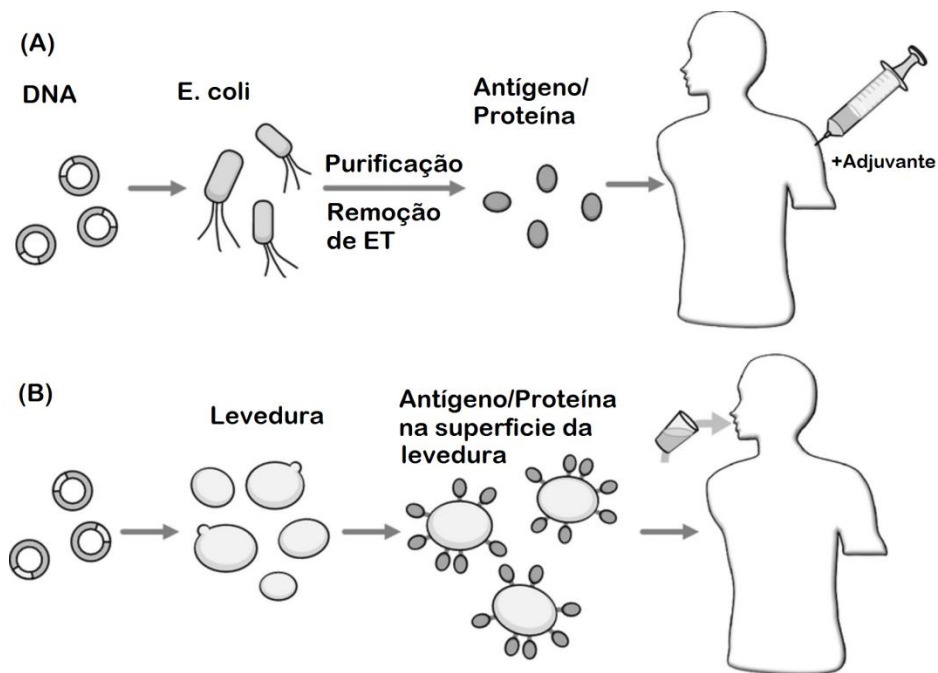
### 2.3. A EXPOSIÇÃO DE ANTÍGENOS NA SUPERFÍCIE DE LEVEDURAS (*Yeast Surface Display*)

A tecnologia de exposição de proteínas surgiu em 1990, quando se descobriu que peptídeos curtos poderiam ser fusionados a proteínas âncoras de fagos filamentosos sem afetar sua infectividade. Porém, devido o tamanho pequeno dos fagos, houve restrições em relação ao tamanho e variedade de peptídeos a serem ancorados. Para contornar esse problema, surgiram novas formas de exposição em células de bactérias, leveduras, insetos e mamíferos (MEI et al., 2017).

As leveduras permitem a exposição de proteínas longas, de uma ou múltiplas subunidades, podem expor diferentes tipos de proteínas na mesma superfície celular, além de promover as modificações necessárias para o funcionamento das proteínas eucarióticas (KONDO; UEDA, 2004). Esse tipo de abordagem tem revelado um sucesso significativo com inúmeras aplicações em biotecnologia, incluindo bioconversão, vacinas comestíveis, biorremediação e bioseparação (SCHREUDER et al., 1996; TANAKA et al., 2012; LEI et al., 2016).

Além da conveniência da produção, que não possui processos de purificação caros e cansativos, os componentes da parede celular de levedura conhecidos por possuírem atividade adjuvante natural atuam sinergicamente como um veículo de entrega e permitem que as proteínas recombinantes sejam mais imunogênicas (Figura 10) (PAVOT et al., 2012). Ademais, os antígenos expressos e exibidos na superfície da levedura possuem vantagens duais quando usado como vacinas orais,

que inclui o acesso fácil aos anticorpos e o antígeno alvo a ser apresentada sobre uma superfície grande na proximidade do tecido da mucosa para a melhoria da adsorção (SMET et al., 2014; SCHREUDER et al., 1996) .



**Figura 10.** Comparação entre vacinas orais convencionais e baseadas na superfície de leveduras. (a) A vacinação convencional utilizando proteína recombinante requer procedimento de purificação do antígeno, remoção da endotoxina (ET) , preparação e entrega de um adjuvante. (b) A vacina oral evita as etapas complicadas para produzir proteína antigênica recombinante em *Escherichia coli*. Além disso, a superfície celular da levedura atua como um adjuvante para promover uma resposta imune. Fonte: Shibasaki et al., 2013 (Adaptado).

A exposição na superfície de levedura é caracterizada pela fusão de uma proteína a um polipeptídeo presente na parede celular, e pode ser utilizada para uma variedade de aplicações biotecnológicas (CHERF; COCHRAN, 2015). Por meio dessa estratégia, peptídeos e proteínas de diversos tipos podem ser expostos na superfície de uma célula, pela transformação de um vetor codificando uma proteína de interesse fusionada ao sistema de ancoragem GPI (Glicosilfosfatidilinositol) (CHEN, 2017).

Âncoras GPI estão presentes na membrana plasmática de diversos organismos eucarióticos e é essencial para a viabilidade das leveduras. Esses glucofosfolipídios permitem a associação de proteínas com a membrana através de ligações covalentes com sua região N-terminal, além de possuir uma sequência sinal

que permite o transporte eficiente da proteína de fusão para a superfície (SHIBASAKI, 2009). Alfa-aglutinina é a âncora mais utilizada nesse tipo de exposição, na qual a região N-terminal da proteína âncora é geneticamente fundida a região C-terminal da proteína alvo (CHEN, 2017).

O processo de secreção de proteínas em leveduras ocorre por meio de diferentes compartimentos celulares. As etapas são iniciadas pela maquinaria proteica da célula que direciona as proteínas do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi onde irão ser deslocadas através de vesículas membranares em direção à membrana plasmática, sendo então fundidas e conseqüentemente promovendo a exocitose. Saindo da célula, a ancoragem na superfície da levedura é ocasionada pela fusão de regiões C- ou N-terminal presentes na proteína âncora e na proteína alvo (CHEN, 2017).

Outro fato importante é capacidade de resistir à desnaturação térmica e química e à degradação proteolítica que em vacinas orais é essencial. A exibição da superfície da proteína alvo aumenta a estabilidade estrutural, induzindo estabilidade térmica da proteína alvo (WANG et al., 2008). O sistema de exibição de superfície de levedura também é vantajoso, pois fornece proteínas antigênicas mais rapidamente e convenientemente do que as abordagens convencionais de produção de vacina.

Vários estudos têm proposto a adequação da levedura antígeno para vacinas orais preventivas ou terapêuticas (WADLE et al., 2006; ZHU et al., 2006). Dentre os polipeptídeos que podem ser expostos estão antígenos, anticorpos, enzimas e receptores. Essas proteínas podem ser empregadas para diferentes propósitos, como vacinas, reconhecimento molecular, bioconversão e adesão celular (KONDO; UEDA, 2004).

#### 2.4. LEVEDURAS COMO VACINAS

Leveduras podem ser usadas como vacinas vivas para administração de antígenos recombinantes (BARRON et al., 2006). A utilização de vacinas baseadas em leveduras recombinantes pode representar alternativa interessante em abordagens vacinais contra o ZIKV, visando prevenir a infecção por meio da geração de anticorpos, como as testadas para agentes infecciosos, como Papilomavírus Humano (HPV) e o vírus da Hepatite B (BIAN et al., 2009). Essas vacinas são capazes de induzir resposta imune tanto humoral quanto celular, apresentando vantagem adicional por dispensar o uso de adjuvantes em sua formulação, além de

serem estáveis, e de fácil estocagem, transporte e administração (STUBBS et al., 2001).

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 certificadas em segurança para uso humano como organismos GRAS (*Generally Regarded as Safe*) e são largamente utilizadas na produção de proteínas recombinantes com aplicações biotecnológicas diversas (GALAO et al., 2007; VOGL et al., 2013).

Ambas as leveduras são capazes de ativar células dendríticas (DCs) mediante a interação com receptores de Manose e Dectin-1 (BAZAN et al., 2011). Uma vez ativadas, essas células podem apresentar os antígenos expressos nas leveduras recombinantes tanto através das vias de processamento MHC classe I, quanto classe II. Essa interação levedura – DC gera um efeito adjuvante, potencializando a imunogenicidade do antígeno (STUBBS et al., 2001). O ponto-chave dessa contribuição como adjuvante está na composição da parede celular das leveduras, uma vez que componentes como o 1,3- $\beta$ -D-glucano, manana são reconhecidos por receptores presentes nas DCs, induzindo a fagocitose das leveduras (ARDIANI et al., 2010).

Uma vez inserida no hospedeiro, a levedura é fagocitada e o antígeno recombinante que ela carregava pode ser degradado nos proteossomos e apresentado via MHC classe I, sendo reconhecido por células T CD8 citotóxicas; ou também pode ser degradado nos endossomos e ser, neste caso, apresentado via MHC classe II e reconhecido por células T helper CD4 (ARDIANI et al., 2010).

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 TBE (*Tick-borne encephalitis*) (YUN et al., 2009), Encefalite japonesa (KWON et al., 2012) e Dengue (BAL et al., 2018). Sendo assim, o padrão de resposta gerado nesse tipo de abordagem vacinal fornece a possibilidade de explorar alvos tanto terapêuticos, quanto profiláticos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Produzir e ancorar a proteína EDIII do vírus Zika em superfície extracelular de *Pichia pastoris* como estratégia para o desenvolvimento de uma construção vacinal.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Obter construção contendo o fragmento do domínio III da proteína do envelope do vírus zika (EDIII) no vetor de expressão pPICZA $\alpha$ \_ $\alpha$ AG;
- Integrar o cassete de expressão (pPICZA $\alpha$ EDIII $\alpha$ AG) no genoma da levedura *Pichia pastoris*;
- Avaliar a produção da proteína recombinante (EDIII) a partir da levedura;
- Verificar a ancoragem de EDIII na superfície da levedura recombinante;

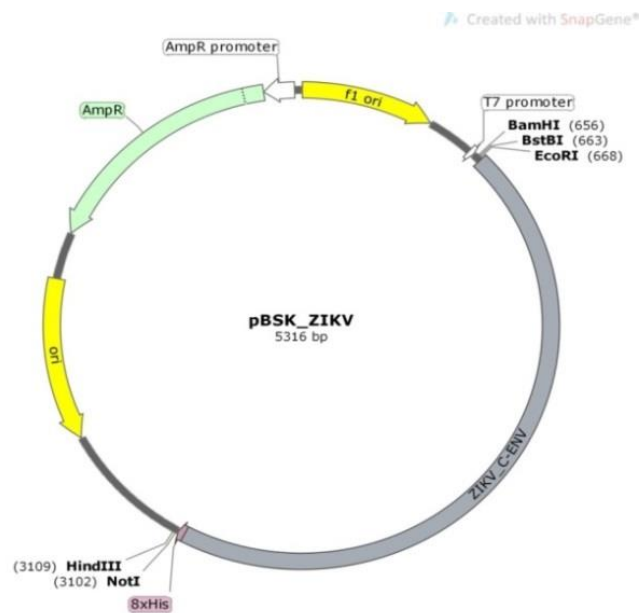


## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. MATERIAIS

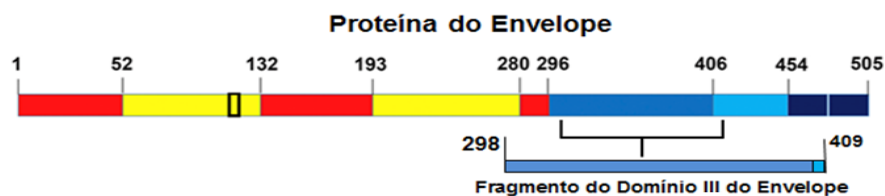
#### 4.1.1. Fragmento EDIII do vírus Zika

A sequência codificante do domínio III do Envelope do ZIKV, de 333 pb, foi obtido por meio de PCR a partir da sequência da cepa ZIKV/*H.sapiens*/Brazil/PE243/2015 (GenBank: KX197192.1), utilizando o vetor pBSK como template, uma vez que este apresenta os três genes estruturais do vírus Zika (Figura 11), previamente sintetizados pela empresa *GenOne Biotechnologies* (Brasil).



**Figura 11.** Representação esquemática do vetor pBSKZIKV (5316 pb).

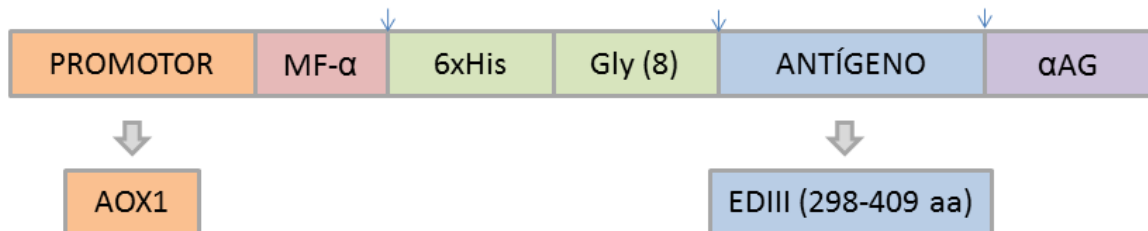
Visando uma resposta imune induzida pelo fragmento EDIII, optou-se por selecionar a região que compreende a porção de 298-409 aminoácidos da proteína do envelope (Figura 12). A seleção se deu a partir da avaliação de estudos de predição de epítomos de EDIII de ZIKV, publicado por Tai et al. (2018).



**Figura 12.** Representação esquemática da sequência utilizada para síntese e clonagem. Diagrama da organização da proteína do envelope do vírus Zika, onde apresenta em azul a região de Domínio III a ser amplificada e utilizada como antígeno (298 – 409 aminoácidos).

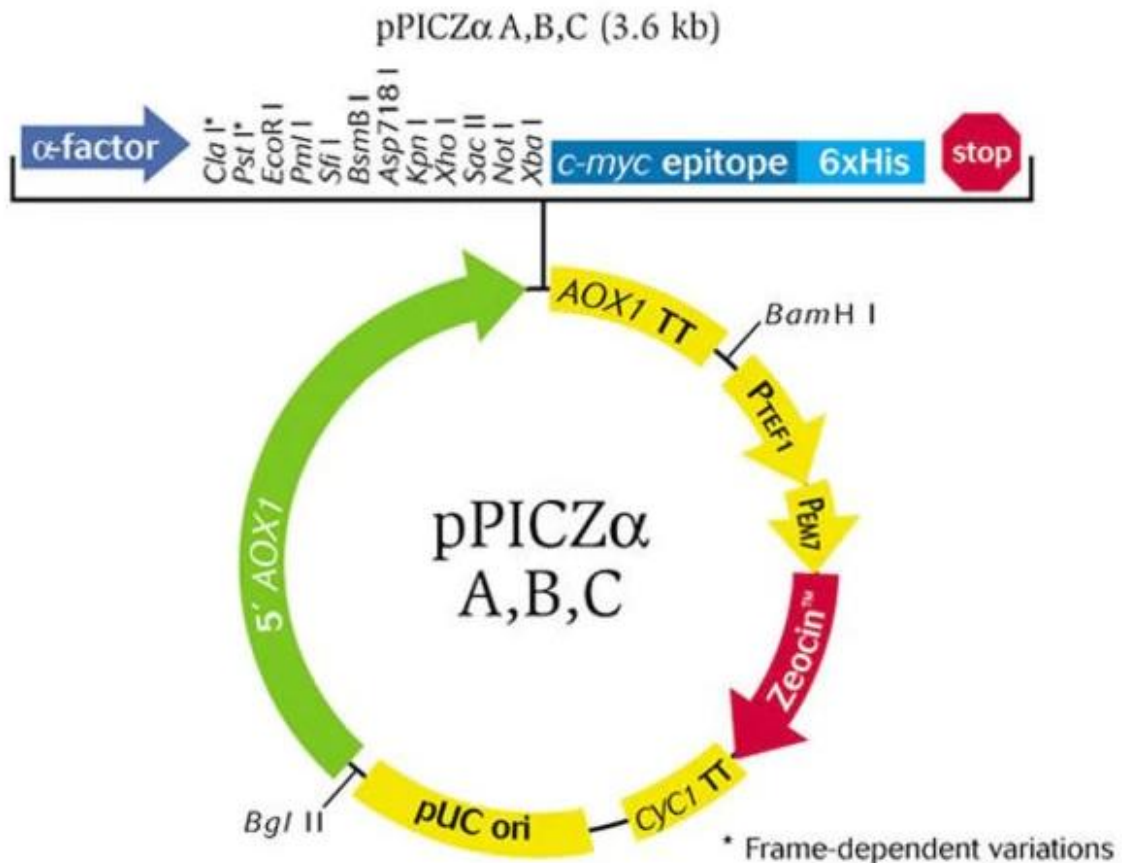
#### 4.1.2. Vetores e construção dos cassetes de expressão

O cassete contendo a porção de interesse EDIII, esquematizado na Figura 13, foi desenhado com sítios de restrição que permitem a subclonagem no vetor de expressão pPICZA $\alpha$  (Invitrogen). Esse vetor se baseia no promotor AOX1, induzido por metanol, possuindo um alto nível de expressão gênica em *Pichia pastoris* (CREGG et al., 2000).



**Figura 13.** Esquema geral do cassete de expressão. Apresentando o promotor AOX1 (expressão forte e indutível por metanol), o sinal de secreção fator-alfa (MF- $\alpha$ ) para a secreção das proteínas produzidas; a 6xHIS *tag* que pode ser utilizada tanto para imunodetecção, utilizando Anti-HIS, quanto para purificação das proteínas estudadas, por meio de cromatografia de afinidade utilizando resina carregada com níquel; o *linker* Gly(8) inserido no intuito de auxiliar no *folding* dos epítomos fusionados a *tag* de Histidina (CHEN et al., 2017); composição do antígeno EDIII (compreendendo a porção de 298 a 409 aminoácidos). Além disso, a presença da  $\alpha$ -aglutinina ( $\alpha$ AG) que fusionada ao C-terminal das proteínas de interesse permite a exposição destas na superfície da levedura. As setas em azul indicam a presença de múltiplos sítios de clivagem.

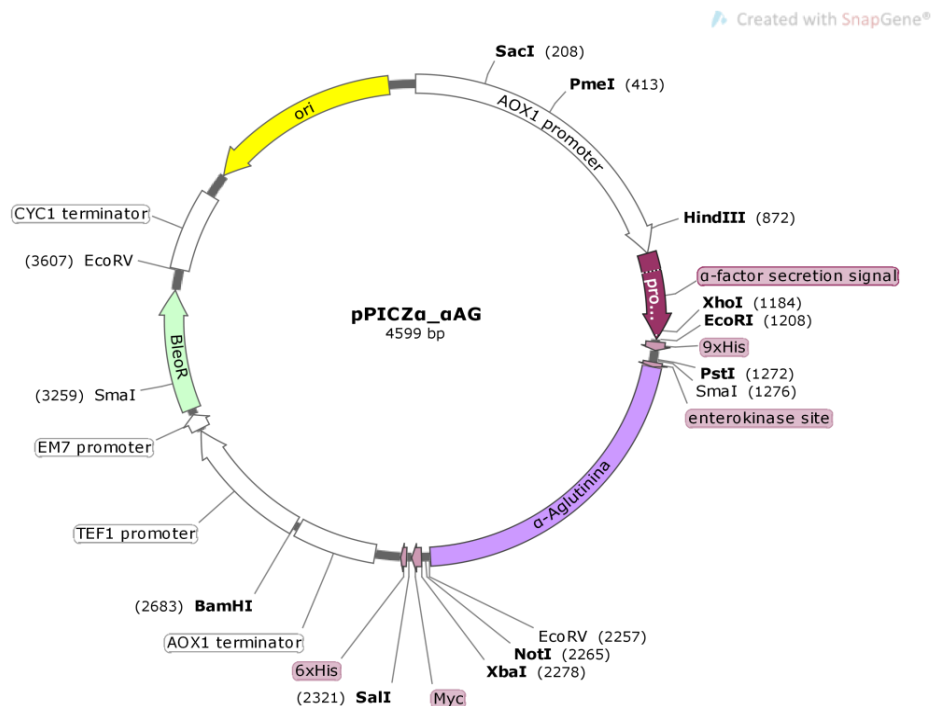
O vetor pPICZA $\alpha$  (Invitrogen) (Figura 14) é do tipo *shuttle vector*, ou seja, pode ser manipulado em duas espécies hospedeiras diferentes. Para isso, apresenta uma origem de replicação e uma marca de seleção para *Escherichia coli* e para *Pichia pastoris*. A marca de seleção da construção é representada pelo gene *Sh ble* de *Streptoalloteichus hindustanus* que confere resistência ao antibiótico Zeocina (Invitrogen) e pode ser usada tanto para a seleção da bactéria quanto da levedura (HIGGINS; CREGG, 1998).



**Figura 14.** Mapa do vetor pPICZ $\alpha$  – 3,6 Kb (vetor comercial, Invitrogen). Fonte: Invitrogen (2000).

Outra característica que pode ser encontrada no vetor é o peptídeo sinal MF- $\alpha$  ( *$\alpha$ -mating\_factor*) que permite a secreção e exportação da proteína recombinante produzida através da membrana da levedura. O gene que codifica o C-terminal da  $\alpha$ -aglutinina ( $\alpha$ AG) foi otimizado para expressão em *P. Pastoris*, porém a sequência de referência para sua síntese foi obtida a partir do genoma de *Saccharomyces cerevisiae*, abordagem semelhante a desenvolvida por Wasilenko et al. (2009).

Além disso, Para permitir a exposição da proteína de interesse na superfície celular da levedura *Pichia pastoris* foi adicionado o gene da proteína de ancoragem alfa-aglutinina no vetor pPICZ $\alpha$ \_ $\alpha$ AG (Figura 15), que será produzida adjacente a proteína. A tag de histidina (6xHis) na região C-terminal será utilizada para facilitar a detecção ou purificação da proteína expressa. Essa tag permite a detecção da proteína expressa usando anticorpo anti-His específico para a sequência (LUEKING et al., 2003).



**Figura 15.** Mapa representativo do vetor pPICZ $\alpha$ \_AG $\alpha$  com aproximadamente 4,6 Kb (vetor modificado, Invitrogen).

#### 4.1.3. Linhagens de micro-organismos e condições de cultivo

Para a realização dos experimentos de clonagem, foi utilizada como organismo hospedeiro a bactéria *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , que possibilita a realização de manipulações genética, como a propagação e amplificação de DNAs plasmidiais e clonagens do gene heterólogo no vetor de expressão. Nas etapas de preparação das células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ , foram utilizados o meio de cultura SOC (Super Optimal Broth) que apresenta a seguinte composição: 0,5% de extrato de levedura, 2% de triptona, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de MgSO<sub>4</sub> e 20 mM de glicose; e o meio CCMB, composto por: 17,8 g/L de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 4 g/L de MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 2 g/L de MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 10% de glicerol e acetato de potássio a 1 M.

Para as 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  $\mu$ g/mL de Zeocina (Invitrogen). Para meio sólido, foi acrescentado 1,5% de ágar. O cultivo dos clones foi realizado a 37°C, 16 horas em agitador orbital (100 rpm).

A levedura *P. pastoris* GS115 (genótipo: *His4<sup>-</sup>* Fenótipo: *Mut<sup>+</sup>* e *His<sup>-</sup>*) foi empregada para a produção da proteína e expressão dos recombinantes, dirigida

pelo promotor induzível AOX1. O meio de cultura utilizado nas placas de transformação foi o YPDS (Yeast extract – Peptone – Dextrose - Sorbitol) composto por extrato de levedura 1%, peptona 2%, dextrose 2%, sorbitol 1M e ágar 1,5%. Para os ensaios de indução, as culturas foram feitas em YPD (Yeast extract – Peptone – Dextrose) composto por extrato de levedura 1%, peptona 2% e dextrose 2%. Para seleção dos transformantes, foi utilizado Zeocina numa concentração de 100 µg/mL. As culturas foram incubadas a 28°C e quando necessário sob agitação orbital (110 rpm). O meio mínimo também foi utilizado na etapa de indução sendo composto por 1,34% YNB, 4x10<sup>-5</sup>% Biotina e 0,5% de metanol.

#### 4.1.4. Soluções e tampões

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

O tampão de corrida para eletroforese de DNA contém: TAE 10x -Tris base 400 mM, ácido acético 190 mM e EDTA 10 mM com pH 7.6. A composição do Tampão de lise corresponde: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5% glicerol, PMSF 1 mM.

Soluções para SDS-PAGE: Tampão de corrida (10x, pH 8.6): Tris 25 mM, SDS 0,1%, glicina 192 mM; 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 60 mM, Glicina 48 mM, 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.

#### 4.1.5. 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 adicionada ao gel uma solução de brometo de etídeo

(0,5 µg/mL) para promover a visualização das bandas de DNA por meio de um transluminador de luz ultravioleta. O material foi aplicado junto com o tampão de amostra (*Loading Dye 6X*), tendo como referencial o marcador de 1 Kb (*Gene Ruler DNA Ladder*, *Loading Dye* e água milliQ). As corridas de eletroforese foram realizadas com fonte de tensão constante e ajustável (entre 0-500 V).

Os géis de poliacrilamida para SDS-PAGE foram preparados com concentração de 12,5% e utilizando detergente iônico dodecil sulfato de sódio (SDS). Para aplicação no gel, as amostras do extrato protéico total foram ressuspendidas em tampão desnaturante (L2x) e aquecidas a 75°C por 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 em 35 mA. 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* (Thermo Fisher Scientific).

#### 4.1.6. Enzimas

As enzimas e as condições das reações enzimáticas utilizadas ao longo do estudo estão relacionadas na **tabela 3**.

**Tabela 3.** Principais enzimas e condições de uso.

Reação	Enzima	Procedência	Sítio de Clivagem	Temperatura (°C)	Volume	Duração
Digestão	<i>Bam</i> HI	Thermo Fisher Scientific	G▼GATCC	37°C	20µL	3 horas ou overnight
	<i>Xho</i> I	Thermo Fisher Scientific	C▼TCGAG			
	<i>Pst</i> I	Promega	CTGCA▼G			
	<i>Sma</i> I	Thermo Fisher Scientific	CCC▼GGG	30°C		
Ligação	T4 DNA ligase	Promega	-	4°C ou temperatura ambiente	10µL	3 horas ou overnight
Linearização do DNA	<i>Sac</i> I	Thermo Fisher Scientific	GAGCT▼C	37°C	50µL	3 horas ou overnight

## 4.2. MÉTODOS

### 4.2.1. Sequência dos *primers* e amplificação de EDIII do ZIKV

O fragmento EDIII foi inicialmente amplificado por PCR (*Polymerase Chain Reaction* – Reação em cadeia da polimerase) a partir da proteína do Envelope, clonada no vetor pBSKZIKV, com o uso de oligonucleotídeos específicos para amplificação, desenhados nos seguintes moldes:

#### **Oligonucleotídeos - EDIII**

*Forward* EDIII (*Pst*I):

5' CTCGAG**CTGCAG**ACGATGGCAAGATTGAAGGGCGTGTC 3'

---

*Reverse* EDIII (*Sma*I):

5' AAGCTTATT**CCCGGGA**ATGGTGCTGCCACTCCTGTGC 3'

---

Obs.: Em negrito, sítios de restrição utilizados na clonagem.

Os oligonucleotídeos acima inserem sítios para as enzimas de restrição na sequência de EDIII, que facilitam a clonagem no vetor pPICZA $\alpha$ AG, assim como as análises seguintes dos clones por restrição.

A reação para amplificação do EDIII seguiu a seguinte ciclagem térmica: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 30 segundos, terminando com uma etapa final de extensão a 72°C por 5 minutos. O produto de PCR foi analisado mediante corrida eletroforética (gel de agarose 1% em tampão TAE 1x, a 8 V por 35 minutos). As etapas de purificação do fragmento EDIII sucederam-se de acordo com as instruções do fabricante do o *kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega).

### 4.2.2. Construção do vetor de expressão pPICZA $\alpha$ EDIII $\alpha$ AG

Durante a amplificação do fragmento EDIII foram adicionados sítios de restrição para as enzimas *Pst*I e *Sma*I, os quais também estão presentes no vetor pPICZA $\alpha$ AG. Ambos foram submetidos a digestão com as referidas enzimas e, posteriormente, purificados com *kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). Dessa forma, o fragmento de interesse e o vetor passaram a apresentar terminais coesivos,

possibilitando assim a inserção do gene e a obtenção da construção pPICZA $\alpha$ EDIII $\alpha$ AG, por meio de reação de ligação com a enzima T4 ligase, seguindo orientações do fabricante, numa proporção 3:1 (inserto:vetor). Ambas as reações estão evidenciadas nas tabelas 4 e 5 apresentadas abaixo:

**Tabela 4.** Digestão dupla do fragmento de EDIII para posterior clonagem em pPICZA $\alpha$ \_ $\alpha$ AG.

Reagentes	Volume
Fragmento EDIII (94.6 ng)	5 $\mu$ L
Enzima <i>Pst</i> I (20u/ $\mu$ L)	0.5 $\mu$ L
Enzima <i>Sma</i> I (20u/ $\mu$ L)	0.5 $\mu$ L
Tampão 10x	2.0 $\mu$ L
BSA	0.2 $\mu$ L
Água	11.8 $\mu$ L
<b>Total</b>	<b>20 <math>\mu</math>L</b>

**Tabela 5.** Reação de Ligação (Inserto: fragmento EDIII de ZIKV e vetor: pPICZA $\alpha$ \_ $\alpha$ AG).

Reagentes	Volume
Fragmento EDIII (48.5 ng)	4.5 $\mu$ L
Vetor pPICZA $\alpha$ _ $\alpha$ AG (96.1 ng)	1.0 $\mu$ L
Enzima T4 ligase (10u/ $\mu$ L)	1.0 $\mu$ L
Tampão 10x	1.0 $\mu$ L
Água	2.5 $\mu$ L
<b>Total</b>	<b>10 <math>\mu</math>L</b>

Após a incubação de 16 horas em temperatura de -20°C, o plasmídeo resultante da reação de ligação foi usado como agente transformante para *Escherichia coli* (DH5 $\alpha$ ), previamente tratadas segundo protocolo para preparo de células competente descrito a seguir.

A linhagem DH5 $\alpha$  a ser transformada foi pré-inoculada em 5 mL de meio SOC para crescimento por 16 horas a 37°C, com agitação. Após esse período, realizou-se o Inóculo com 3 mL da cultura anterior em novo Erlenmeyer contendo 100 mL de meio SOC para crescimento a 37°C, com agitação até atingir um D.O.<sub>600</sub> de 0,5. Após a D.O.<sub>600</sub> alcançada, a cultura foi incubada no gelo por 30 minutos para interromper o crescimento seguida de centrifugação a 4000 G por 5 minutos a temperatura de 4°C. O pellet obtido foi ressuspendido em 30 mL de solução gelada de CCMB e incubado no gelo por 30 minutos. Novamente foi centrifugado a 4000 G



por 5 minutos a 4°C para ressuspensão das células em 4 mL de solução gelada de CCMB. Alíquotas de 200 µL de células competentes foram armazenadas em -80°C.

Subsequente, realizaram-se etapas referentes à transformação bacteriana seguindo protocolo já pré-estabelecido, que consiste sucintamente das seguintes etapas: os produtos da reação de ligação (10 µL) foram adicionados a 50 µL de células quimiocompetentes (previamente tratadas com CCMB), homogeneizados e mantidos no gelo por 15 minutos; passado esse período de incubação, as células foram submetidas a um choque térmico (42°C) por 1 minuto. Após o choque, as células foram mantidas no gelo por mais 2 minutos e então foi adicionado 800 µL de meio LB sem antibiótico, com posterior incubação a 37°C por 45 minutos. As células foram então centrifugadas a 1200 rpm e alíquotas de 200 µL foram semeadas em placas de LB *low salt* com antibiótico Zeocina (25 µg/mL) e incubadas por 16 horas a 37°C.

As colônias resistentes a Zeocina selecionadas foram repicadas para triagem das colônias com os recombinantes com posterior inoculação e extração do DNA plasmidial (segundo protocolo descrito por Sambrook et al., 1989). A confirmação da clonagem foi comprovada por análise dos fragmentos obtidos após o tratamento das moléculas de DNA resultantes com enzimas de restrição e análise dos insertos gerados por meio de PCR e sequenciamento, utilizando *Primers* internos ao fragmento EDIII e *primers* específicos para região AOX1 do vetor pPICZA $\alpha$ , respectivamente. Foram preparados preservados de todos os clones confirmados (500µL de Glicerol 100% + 500 µL de cultura), com acondicionamento a -80°C.

#### **4.2.3. Transformação da levedura *Pichia pastoris***

Uma vez confirmada à obtenção dos clones, foi feita a linearização por digestão (com enzima *SacI* – tamanho da construção: 4,9 Kb) do cassete de expressão promovendo uma reação final de 50 µL, procedimento necessário para que ocorra a clivagem do plasmídeo em uma única posição melhorando a eficiência da integração do plasmídeo no genoma da levedura. Após a digestão, o DNA foi precipitado seguindo as etapas a seguir: Foram adicionadas 2,5 (µL) vezes de etanol absoluto gelado em relação à quantidade da amostra e 0,3M de acetato de sódio à solução, em seguida a amostra foi incubada a -20°C por 16 horas e centrifugada a 10000 G por 10 minutos, com posterior descarte do sobrenadante e lavagem do

precipitado duas vezes com 500 µL de etanol 70% e centrifugado a 10000 G por 2 minutos por fim, o sobrenadante foi descartado, o precipitado foi seco e ressuspendido em 10 µL de água ultra pura na qual foi utilizado para transformar *Pichia pastoris*, da linhagem GS115.

As leveduras foram previamente preparadas como a seguir: uma colônia fresca foi inoculada em 5 mL de YPD e cultivada por 16 horas, a 28°C, sob agitação de 250 rpm. A partir dessa pré-cultura, foi feito inóculo em 200 mL de meio, numa proporção de 1:500, cultivado até atingir D.O.<sub>600</sub> = 1.3 – 1.5. As células foram então centrifugadas a 1500 G, 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 1 M gelado, centrifugadas e ressuspendidas, por fim, com 0.5 M de sorbitol 1 M gelado. Para eletroporação, 80 µL de células competentes foram misturados ao DNA linearizado, foi adicionado 320 µL de sorbitol 1 M gelado e esse material foi transferido para uma cubeta (0.4 cm), colocado no eletroporador (ECM® 399 Electroporation System, BTX™) e submetido ao pulso elétrico de 1500 V, 5 ms. Imediatamente após o pulso, foi adicionado 1 mL de sorbitol 1 M. O conteúdo foi transferido para tubo novo e incubado a 29°C por 2 horas, antes de ser semeado em placas com YPD + Zeocina (100 µg/mL). Células GS115 eletroporadas sem DNA foram utilizadas como controle negativo. Os recombinantes resistentes ao antibiótico de seleção foram repicados em nova placa Ágar YPD e incubados por 24-48 horas a 28°C.

#### **4.2.4. Análise dos recombinantes em *Pichia pastoris***

Após o período de incubação referido, os recombinantes obtidos por meio da seleção por Zeocina foram analisados quanto a integração do cassete de expressão no genoma das leveduras. A metodologia empregada foi a PCR de colônia (Linder et al., 1996). De forma sucinta, cada colônia foi ressuspendida isoladamente em 15 µL de NaOH 20 mM e incubadas por 15 minutos a 96°C. Em seguida, foram ressuspendidas com auxílio do vortex por 1 minuto. Essa etapa preliminar é fundamental para a lise da parede celular das leveduras. Uma alíquota de 5 µL deste lisado foi coletada como DNA *template* para o mix da reação contendo os *primers Forward* e *Reverse* de EDIII (já citados em reações anteriores; item 4.2.1), tampão, MgCl<sub>2</sub>, Taq polimerase, dNTPs e água estéril. Após montagem da reação o mix foi submetido a seguinte ciclagem térmica: uma etapa inicial de aquecimento a 95°C

por 5 minutos, seguido de 35 ciclos com desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 30 segundo; uma etapa de extensão final a 72°C por 5 minutos foi realizada. Para a constituição do controle negativo da reação foi utilizado os demais componentes da reação de PCR sem a adição do DNA *template*.

Alíquotas de 10 µL das amostras submetidas à amplificação foram aplicadas em gel de agarose para análise das bandas mediante corrida eletroforética. As amostras das colônias que se mostraram positivas a amplificação com os *primers* EDIII foram sinalizadas para seguirem nas próximas etapas correspondentes a indução e análise de expressão. Paralelamente, foram feitos preservados em glicerol dos referidos clones para estocagem a -80°C.

#### **4.2.5. Cultivo e indução dos recombinantes em *Pichia pastoris***

Os clones de *Pichia pastoris* contendo as construções de interesse foram selecionados para os ensaios de crescimento e indução da proteína juntamente com a linhagem GS115 (controle negativo). Inicialmente, foi realizado pré-inóculo de 5 mL em meio YPD (29°C/250 rpm); após cerca de 18 horas, foi feito inóculo com 1 mL da pré-cultura em 50 mL de YNB (frasco de 500 mL). A cada 24 horas foram coletadas alíquotas de 2 mL de cultura e adicionado metanol ao meio para concentração final de 0.5%, até completar-se o tempo de 96 horas (T<sub>0</sub>, T<sub>24</sub>, T<sub>48</sub>, T<sub>72</sub> e T<sub>96</sub>). As alíquotas foram centrifugadas (3000 rpm, 5 minutos) e o sedimento celular armazenado. Considerando que as proteínas tenham sido corretamente ancoradas, o material a ser analisando em primeira instância é 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). Os sedimentos celulares foram ressuspensos em tampão de lise (a cada 1 mL de cultura centrifugada, utilizando 100 µL 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.

#### **4.2.6. Avaliação da produção da proteína EDIII**

A avaliação da expressão das proteínas recombinantes foi feita inicialmente por meio de análise de SDS-PAGE. Os géis de poliacrilamida (12,5%) são 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 poli(acrilamida) num volume de 20 µL.

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 à eletroforese por 90 minutos a 25 mA, seguida por transferência (25 V, 35 minutos) para membrana de PVDF (Fluoreto de Polivinilideno) em cuba de transferência semi-seca. A eficiência da transferência foi checada por meio 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), diluído em TBS-Tween numa concentração de 1:3000 por 1 hora. A revelação foi feita pelo método colorimétrico, utilizando NBT/BCIP (*Nitro blue tetrazolium chloride/ 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phodphate, toluidine salt*) (Sigma) como substrato. Lavagens com TBS-Tween 1x foram realizadas entre as incubações. A proteína NS3+GST (43 Kda) produzida em *E. coli* foi utilizada como controle positivo da reação. A presença da proteína EDIII também foi detectada mediante *Dot Blot*, o qual se empregou o mesmo anticorpo anti-His conjugado à fosfatase alcalina. O protocolo seguido foi o mesmo descrito acima (considerando as devidas proporções de reagentes e tempos de incubação), utilizando 8 µL da amostra aplicadas na membrana de PVDF, utilizando placa de 96 poços como suporte para o experimento. A revelação também foi realizada com NBT/BCIP (entre 5 a 10 minutos) no escuro, sendo a reação interrompida por lavagem da membrana com água destilada. O material foi seco a temperatura ambiente e analisado quanto a presença de regiões escurecidas correspondendo a expressão proteica na amostra.

#### **4.2.7. Imunofluorescencia**

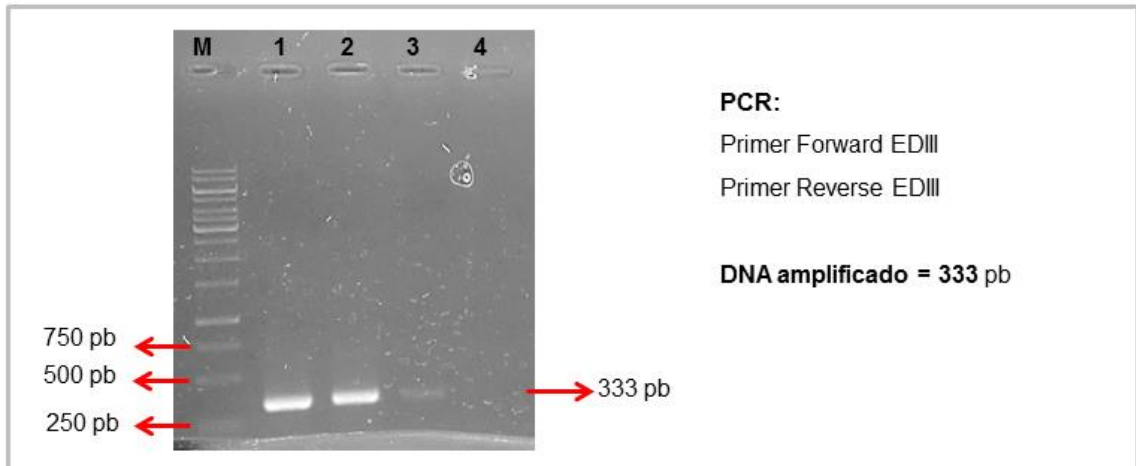
Para a confirmação da exposição do antígeno viral ancorado na parede celular da levedura, os recombinantes *P. pastoris* foram submetidos a ensaio de microscopia de imunofluorescência, conforme descrito por Wasilenko et al. (2010), com algumas modificações. Resumidamente, após identificar o melhor tempo de cultivo para produção da proteína, as células foram coletadas, lavadas em PBS 1x e

ajustadas para uma  $D.O_{600}=1$  (aproximadamente  $1 \times 10^7$  células) em solução de 200  $\mu$ L. Em seguida, a solução foi centrifugada (5000 G por 5 minutos) e incubada com anti-HIS (Sigma), utilizado como anticorpo primário, numa proporção de 1:200, a 25°C por 1 hora e 30 minutos (sob agitação). Terminado o período de incubação, as amostras foram centrifugadas novamente e lavadas com PBS 1x. Uma nova incubação foi realizada utilizando anti-IgG conjugado a isocinato de fluoresceína – FITC (Sigma) 1:200, por 45 minutos, no escuro. Novamente, as amostras foram centrifugadas e lavadas com PBS 1x. Por fim, as amostras preparadas em tubo foram ressuspensas com PBS 1x, aplicando o volume de 10  $\mu$ l sobre lâmina com adição de 5  $\mu$ L de 4',6'-diamino-2-fenil-indol – DAPI (Sigma), colocada a lamínula e analisadas em microscópio de fluorescência (Leica DMLB). As imagens foram capturadas pela câmera Leica DFC 340FX utilizando o software Leica CW4000. A levedura *P. pastoris* GS115 não transformada foi incubada sob as mesmas condições para comparação como controle negativo.

## 5 RESULTADOS

### 5.1. AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO EDIII DO VÍRUS ZIKA

O fragmento EDIII foi amplificado por PCR utilizando os *primers* específicos de EDIII. A análise dos fragmentos por meio de corrida eletroforética em gel de agarose possibilita a visualização da banda de 333 pb, referente a EDIII (Figura 16).



**Figura 16.** Produto da amplificação do fragmento EDIII do vírus Zika com os *Primers Forward* e *Reverse* de EDIII. Eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TAE; Voltagem aplicada de 80 V por 35 minutos. **M** - Marcador *Ladder Gene Ruler* 1Kb (Thermo Scientific); **1, 2 e 3** – Fragmento de 333 pb correspondendo a EDIII de ZIKV; **4** - Controle negativo (reagente e água).

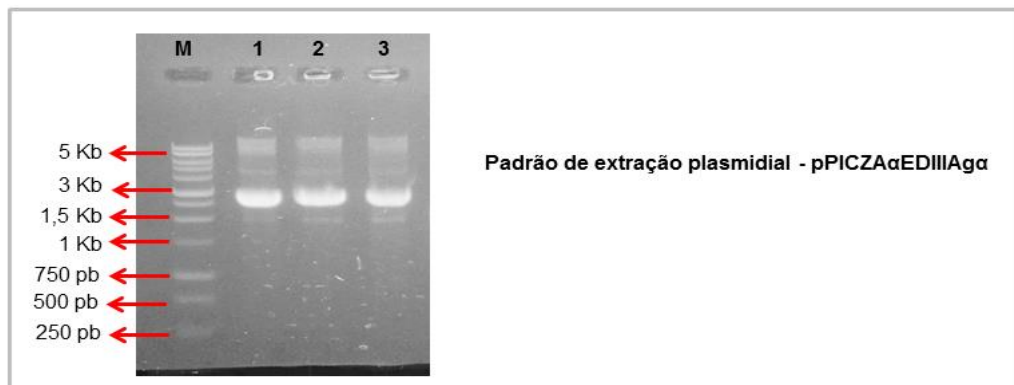
### 5.2. CONSTRUÇÃO DO CASSETE DE EXPRESSÃO pPICZA $\alpha$ EDIII $\alpha$ AG

Resumidamente, após as digestões com as enzimas apropriadas, o vetor pPICZA $\alpha$  e o inserto EDIII foram purificados, em seguida ligados e usado para transformação em *Escherichia coli* da linhagem DH5 $\alpha$ , que evidenciou os seguintes resultados:

- Placas (Meio LB *Low Salt* + Zeocina):
- ✓ Controle Negativo (Apenas as células de *E. coli* DH5 $\alpha$ ) = Não houve crescimento.
- ✓ Amostra da ligação (Células *E. coli* DH5 $\alpha$  + pPICZA $\alpha$ EDIII $\alpha$ AG) = Houve crescimento.

Em seguida, foram feito repiques a partir da placa de transformação com subsequente inóculo das colônias. Os inóculos que se apresentaram turvos

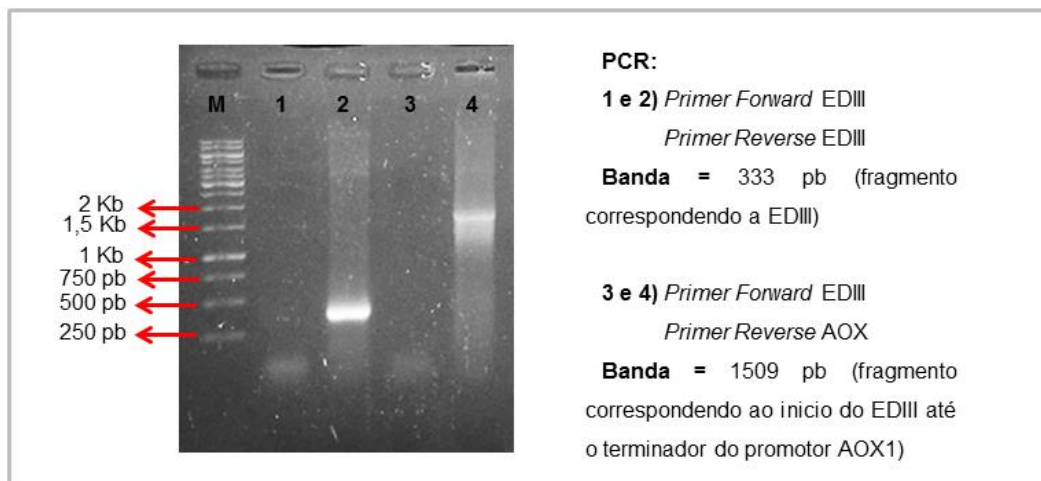
(indicativo de crescimento bacteriano) foram extraídos e analisados por meio de corrida eletroforética (Figura 17).



**Figura 17.** Padrão de extração da construção pPICZAαEDIIIαAgα. Eletroforese em gel de Agarose 1%, em tampão TAE; Voltagem aplicada de 80V por 35 minutos. **M** - Marcador - *Ladder Gene Ruler* 1 Kb (*Thermo Scientific*); **1, 2 e 3** – Extração das colônias de *E. coli DH5α* recombinantes portadoras do plasmídeo pPICZAαEDIIIαAgα.

### 5.3. ANÁLISE DOS CLONES pPICZAαEDIIIαAG

A PCR das amostras extraídas revelou a amplificação da região corresponde ao fragmento EDIII com primers específicos e da região que compreende o início de EDIII até o terminador AOX1, fornecendo indícios de sucesso da clonagem (Figura 18).

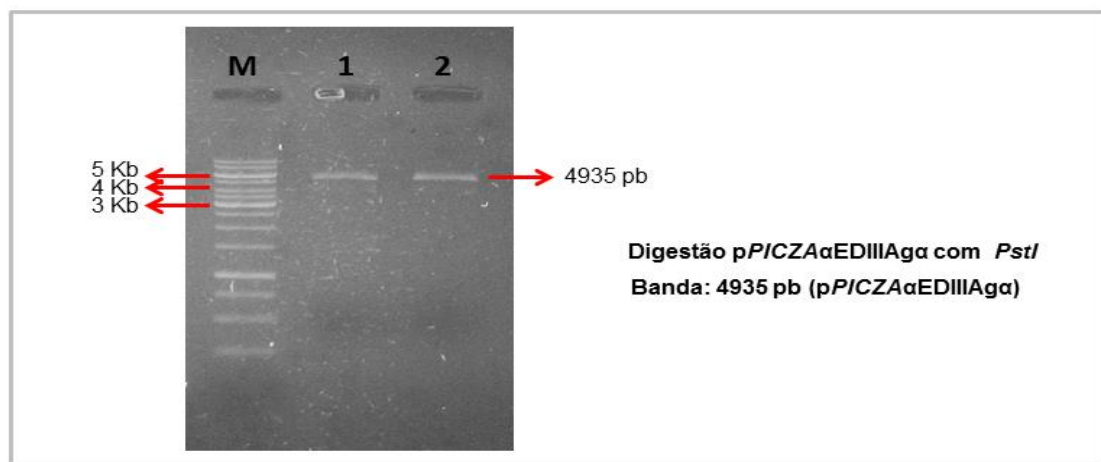


**Figura 18.** PCR das amostras contendo a construção pPICZAαEDIIIαAgα. Eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TAE; Voltagem aplicada de 80 V por 35 minutos. **M** - Marcador *Ladder Gene Ruler* 1 Kb (*Thermo Scientific*); **1** – Controle negativo (reagentes + água) usando os *primers Forward* e *Reverse* específicos para EDIII; **2** – Amostra contendo a construção pPICZAαEDIIIαAgα usando os *Primers Forward* e *Reverse* específicos para EDIII, na qual é possível visualizar a banda referente ao inserto EDIII (333 pb); **3** – Controle negativo (reagentes + água) usando os *primers Forward* específico para EDIII e *Reverse* para o promotor AOX1; **4** - Amostra contendo a construção

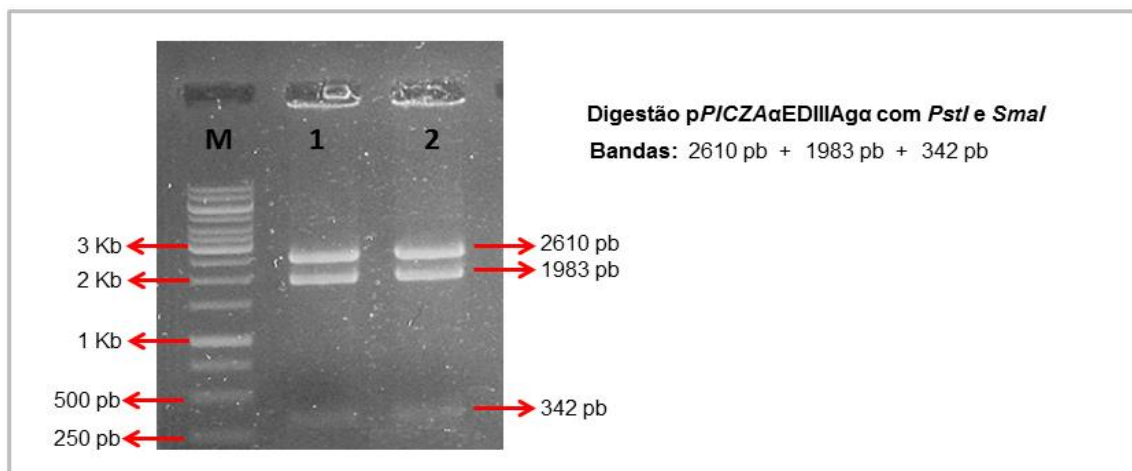
pPICZA $\alpha$ EDIII $\alpha$  usando os *primers Forward* específico para EDIII e *Reverse* para o promotor AOX1, na qual é possível visualizar a amplificação da banda de aproximadamente 1509 pb correspondendo a região esperada para a reação.

#### 5.4. ANÁLISE DOS CLONES POR DIGESTÕES DAS EXTRAÇÕES PLASMIDIAIS

As digestões com enzimas previamente utilizadas na clonagem linearizaram e liberaram o fragmento correspondente a EDIII, confirmando a construção do vetor pPICZA $\alpha$ EDIII $\alpha$  (Figuras 19, 20, 21 e 22).



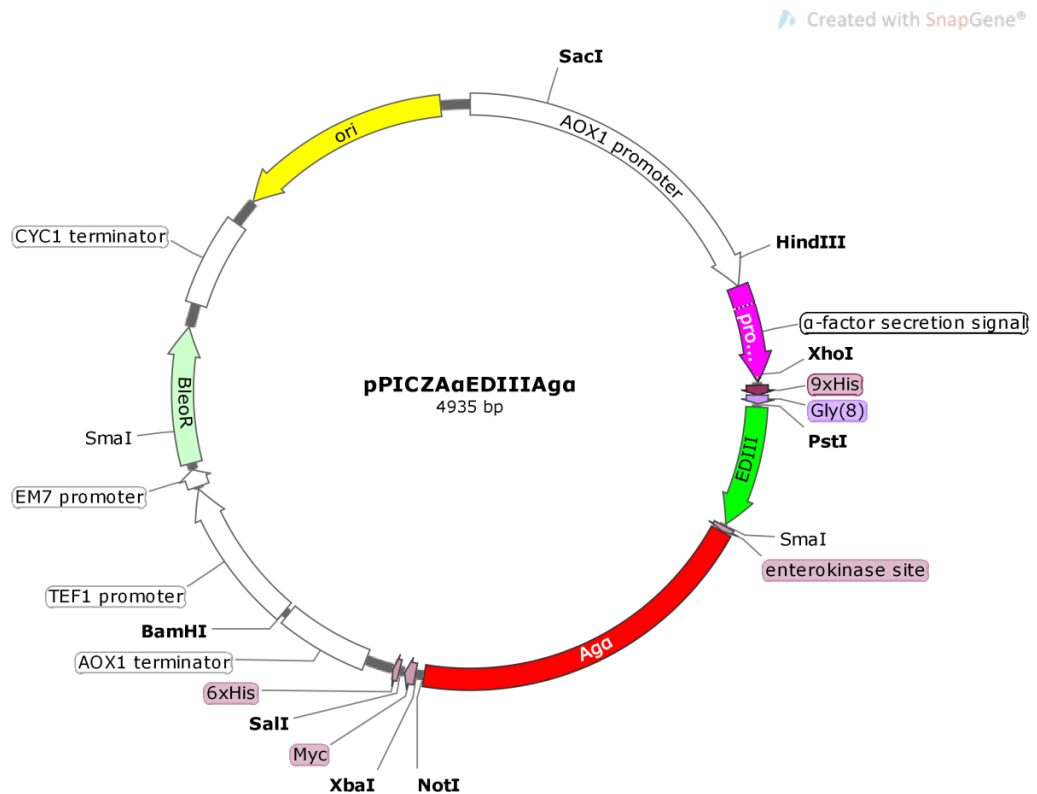
**Figura 19.** Confirmação da obtenção da construção pPICZA $\alpha$ EDIII $\alpha$  por digestão enzimática (linearização). Eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TAE; Voltagem aplicada de 80 V por 35 minutos. **M** - Marcador *Ladder Gene Ruler* 1 Kb (*Thermo Scientific*); **1 e 2** - Digestão a partir da extração plasmidial contendo a construção pPICZA $\alpha$ EDIII $\alpha$ , com a enzima *Pst*I, na qual é possível visualizar uma única banda de aproximadamente 4935 pb correspondendo a construção linearizada.



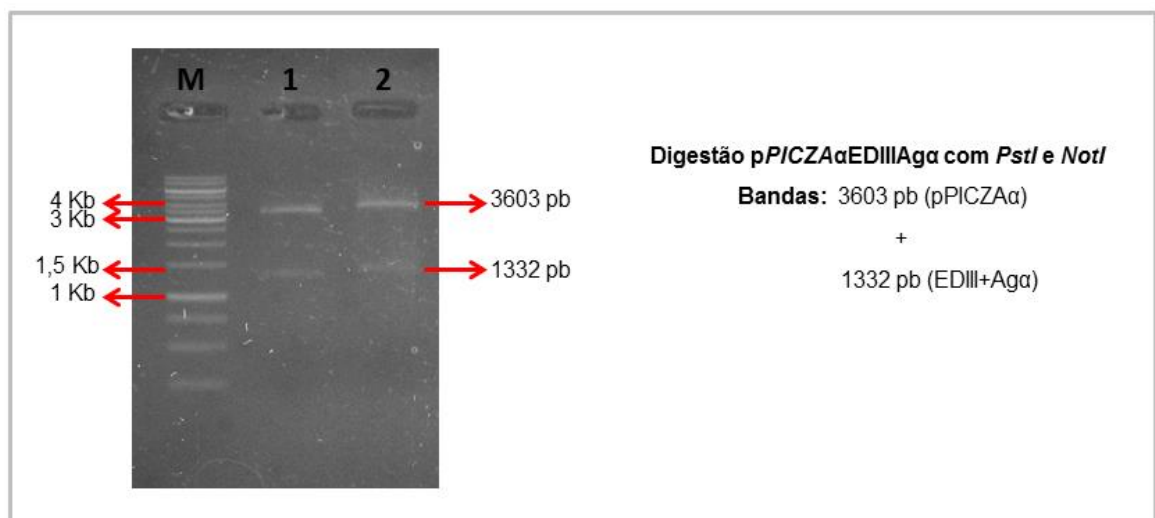
**Figura 20.** Confirmação da obtenção da construção pPICZA $\alpha$ EDIII $\alpha$  por digestão enzimática (digestão dupla – *Pst*I e *Sma*I). Eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TAE; Voltagem aplicada de 80 V por 35 minutos. **M** - Marcador *Ladder Gene Ruler* 1 Kb (*Thermo Scientific*); **1 e 2** -



Digestão a partir da extração plasmidial contendo a construção *pPICZA $\alpha$ EDIII $\alpha$* , com as enzimas *PstI* (um sítio de restrição) e *SmaI* (dois sítios de restrição), na qual é possível visualizar três bandas de 2610 pb, 1983 pb e 342 pb (correspondendo a liberação do fragmento EDIII), respectivamente.



**Figura 21.** Representação do mapa da construção *pPICZA $\alpha$ EDIII $\alpha$*  (4935 pb).

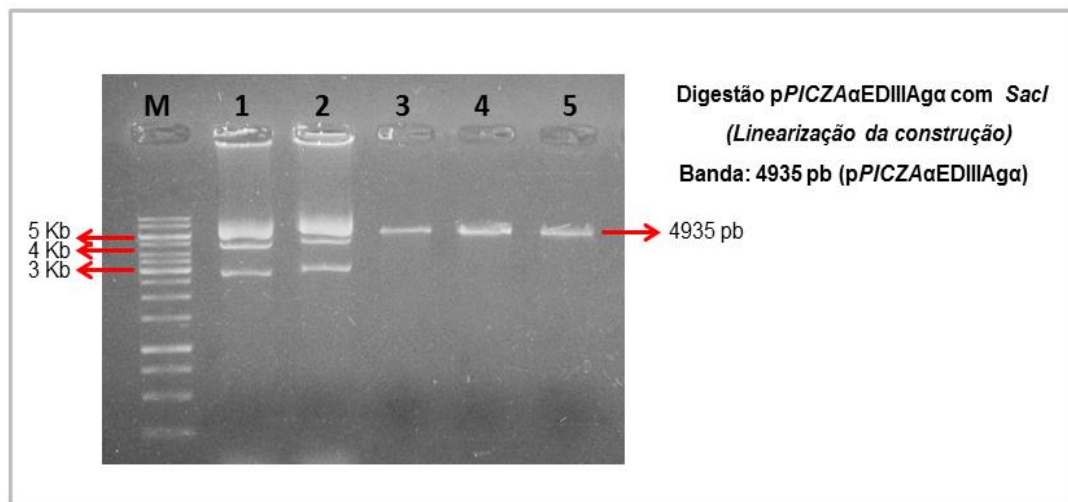


**Figura 22.** Confirmação da obtenção da construção *pPICZA $\alpha$ EDIII $\alpha$*  por digestão enzimática (digestão dupla – *PstI* e *NotI*). Eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TAE; Voltagem aplicada de 80 V por 35 minutos. **M** - Marcador *Ladder Gene Ruler 1 Kb* (*Thermo Scientific*); **1 e 2** - Digestão a partir da extração plasmidial contendo a construção *pPICZA $\alpha$ EDIII $\alpha$* , com as enzimas *PstI* (um sítio de restrição) e *NotI* (um sítio de restrição), na qual é possível visualizar duas bandas,

sendo a banda de 3603 pb referente ao vetor pPICZA $\alpha$  e a de 1332 pb correspondendo a sequência EDIII e a proteína âncora Aga ( $\alpha$ -aglutinina).

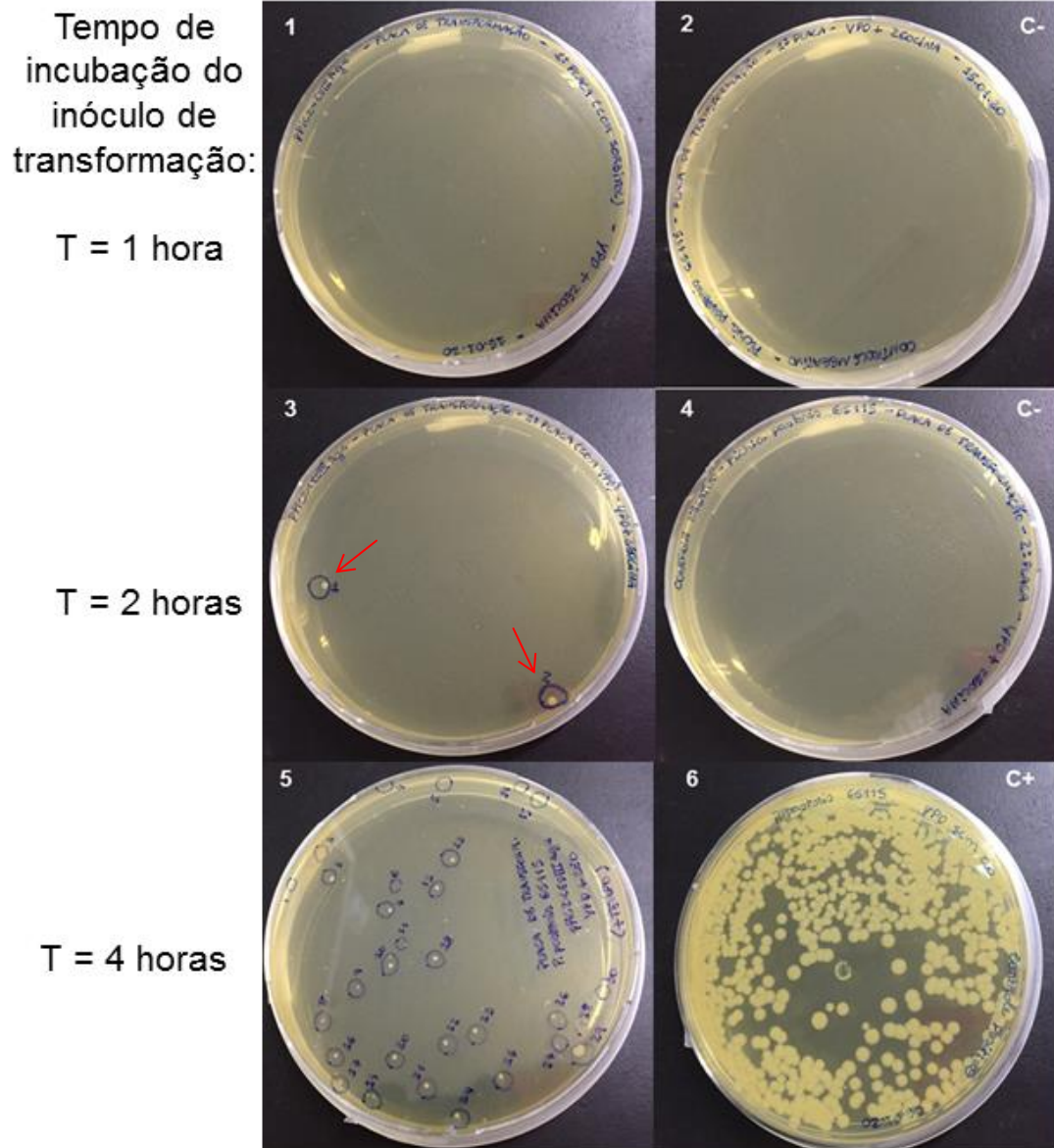
### 5.5. TRANSFORMAÇÃO DE *Pichia pastoris* GS115 E OBTENÇÃO DE RECOMBINANTES

A digestão dos clones com a enzima *SacI* resultou na linearização das construções, ou seja, na clivagem do plasmídeo em uma única posição (Figura 23).

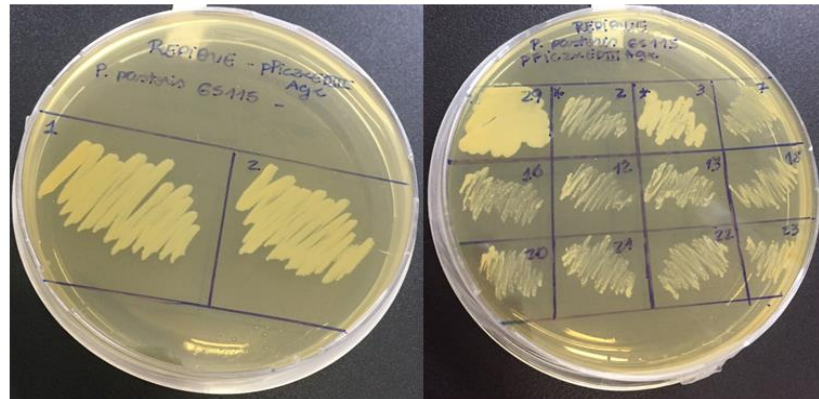


**Figura 23.** Digestão da construção pPICZA $\alpha$ EDIIIAg $\alpha$  com enzima *SacI* para linearizar o cassete de expressão. Eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TAE; Voltagem aplicada de 80 V por 35 minutos. **M** - Marcador *Ladder Gene Ruler 1 Kb* (*Thermo Scientific*); **1 e 2** - Amostras de extração contendo a construção pPICZA $\alpha$ EDIIIAg $\alpha$  digeridas parcialmente (não linearizada); **3, 4 e 5** - Fragmento de 4935 pb referente a construção pPICZA $\alpha$ EDIIIAg $\alpha$  linearizadas por digestão enzimática com a enzima *SacI*.

Após linearização, o DNA foi precipitado correspondendo a aproximadamente 10  $\mu$ g de DNA necessário à transformação das leveduras durante o processo de eletroporação. Apenas as células de *P. pastoris* GS115 (sem o vetor recombinante) constituíram o controle negativo da transformação. As análises para confirmação da integração do cassete de expressão no genoma das leveduras eletroporadas foram feitas mediante crescimento em placas contendo meio YPD acrescido de 100  $\mu$ g/mL do antibiótico Zeocina. Além disso, a incubação dos transformantes foi realizada nos tempos 1, 2 e 4 horas de incubação sem agitação, com acréscimo de 1 mL de YPD ao inóculo, visando alternativamente aumentar o número de transformantes semeados na placa após a incubação por 16 horas (Figuras 24 e 25).

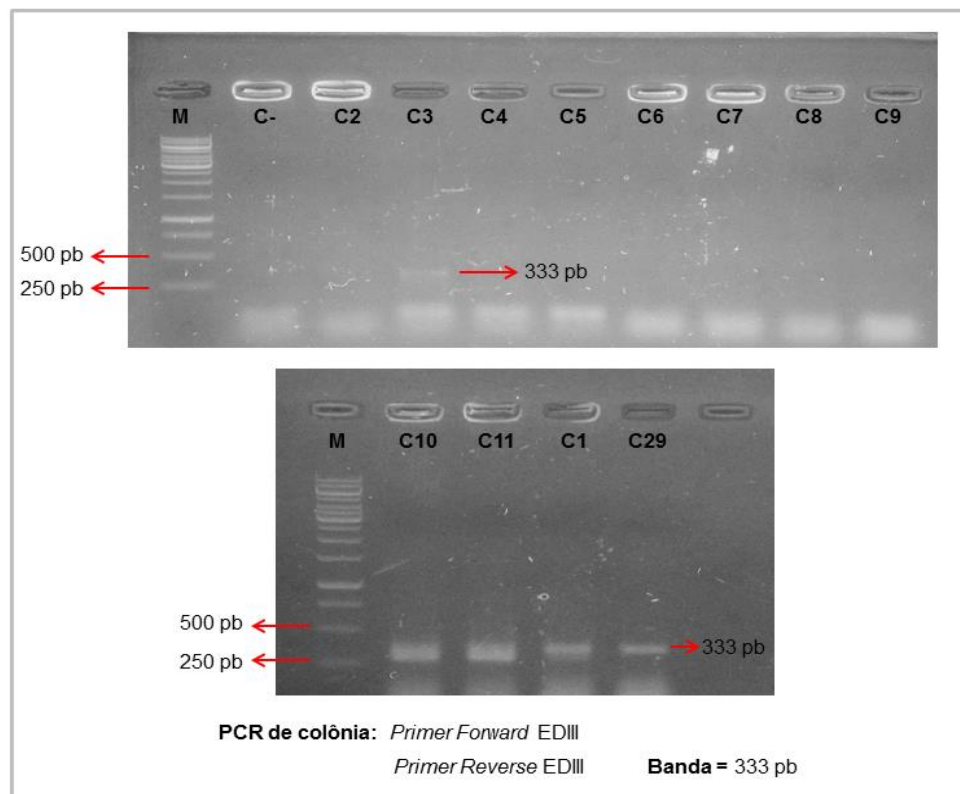


**Figura 24.** Placas de transformação de pPICZA $\alpha$ EDIII $\alpha$ AG, por eletroporação, das colônias de *Pichia pastoris* GS115. Meio YPD sólido contendo 100  $\mu$ g/mL de Zeocina; Incubação das placas a 28°C por 16 horas. **1** – Placa de transformação contendo a construção pPICZA $\alpha$ EDIII $\alpha$ AG com tempo de inóculo de 1 hora, observasse ausência de colônias; **2** – Controle negativo (ausência de colônia) do Tempo de 1 hora de incubação do inóculo; **3** - Placa de transformação contendo a construção pPICZA $\alpha$ EDIII $\alpha$ AG com tempo de inóculo de 2 horas, no qual foi observado a presença de duas colônias na placa (setas vermelhas); **4** - Controle negativo (ausência de colônia) do Tempo de 2 horas de incubação do inóculo; **5** - Placa de transformação contendo a construção pPICZA $\alpha$ EDIII $\alpha$ AG com tempo de inóculo de 4 horas, no qual foi observado a presença de > 20 colônias na placa (circuladas em azul); **6** – Controle positivo (viabilidade celular), meio YPD sem a adição de antibiótico em placa, no qual é observado crescimento intenso das colônias de *Pichia pastoris* indicando o uso de células viáveis no experimento.



**Figura 25.** Placas de repiques das colônias de *Pichia pastoris* GS115 eletroporadas com a construção pPICZA $\alpha$ EDIII $\alpha$  em meio YPD sólido contendo 100  $\mu$ g/mL de Zeocina; Incubação das placas a 28°C por 16-48 horas.

No intuito de verificar a integração do cassete de expressão ao genoma da *P. pastoris*, foi realizado PCR de colônias com oligonucleotídeos específicos do fragmento EDIII (*forward* e *reverse*), demonstrando indícios de não haver perda da sequência por ocasião da transformação e caracterizando colônias detentoras da construção pPICZA $\alpha$ EDIII $\alpha$  (Figura 26).

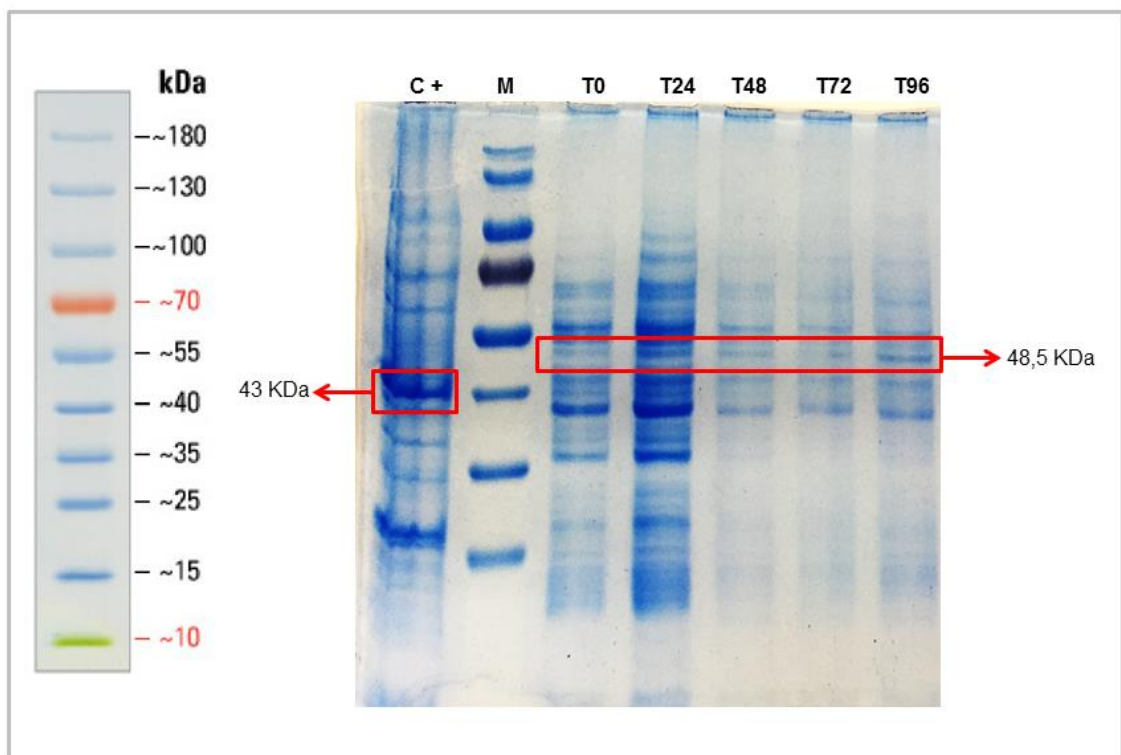


**Figura 26.** PCR de colônia para confirmação da integração do cassete expressão no genoma da levedura recombinante, utilizando *primers* para o fragmento EDIII (*forward* e *reverse*). Eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TAE; Voltagem aplicada de 80 V por 35 minutos. **M** - Marcador

*Ladder Gene Ruler 1 Kb (Thermo Scientific)*; **C-** (Controle negativo) – reagentes e água, evidenciando ausência de amplificação; **Colônias 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9** – amostra a partir do repique das leveduras transformadas para verificar a presença do fragmento EDIII, no qual é possível identificar que não houve amplificação, ou seja, não possuem o cassete de expressão integrado ao genoma da levedura; **Colônias 1, 3, 10, 11 e 29** - amostra a partir do repique das leveduras transformadas para verificar a presença do fragmento EDIII, no qual identificasse a amplificação da região de EDIII (333 pb) e comprovação da integração do cassete de expressão ao genoma da levedura.

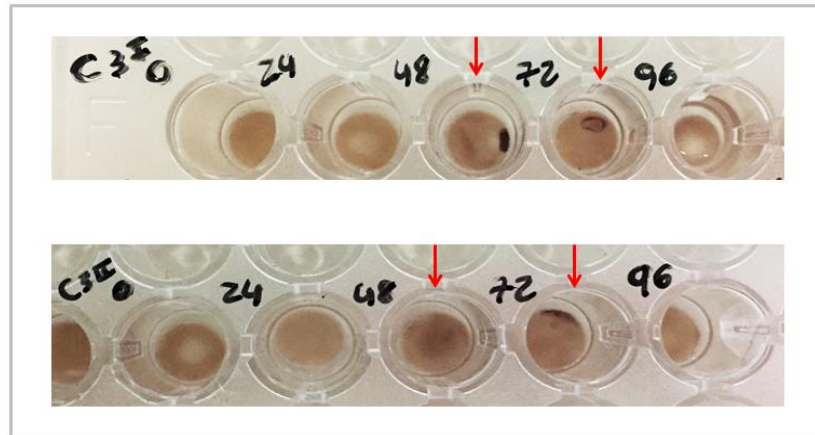
## 5.6. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO FRAGMENTO EDIII DE ZIKV EM *Pichia pastoris*

O extrato protéico total das leveduras submetidas à indução com metanol foram analisados em gel SDS-PAGE sob condições desnaturantes, resultando na visualização da banda de aproximadamente 48,5 kDa que corresponde a proteína EDIII mais  $\alpha$ -Aglutinina ( $\alpha$ AG) (Figura 27).



**Figura 27.** Eletroforese em gel SDS-PAGE 12,5%: Material proveniente do extrato proteico solúvel dos recombinantes de *P. pastoris* após 96 horas de indução com metanol a 0,5%. **M** - Marcador de peso molecular pré-corado PageRuler™ (Thermo Scientific); **C+ (Controle positivo)** – Amostra contendo a proteína NS3 de ZIKV produzida em *E. coli*, apresentando uma banda de aproximadamente 43 kDa referente a proteína NS3; **T0, T24, T48, T72 e T96 (horas)** – Alíquotas dos extratos proteicos (sobrenadante) em diferentes períodos correspondente aos transformantes de *P. pastoris* induzidos, onde é possível visualizar bandas de aproximadamente 48,5 kDa referentes a proteína EDIII + Ag $\alpha$ .

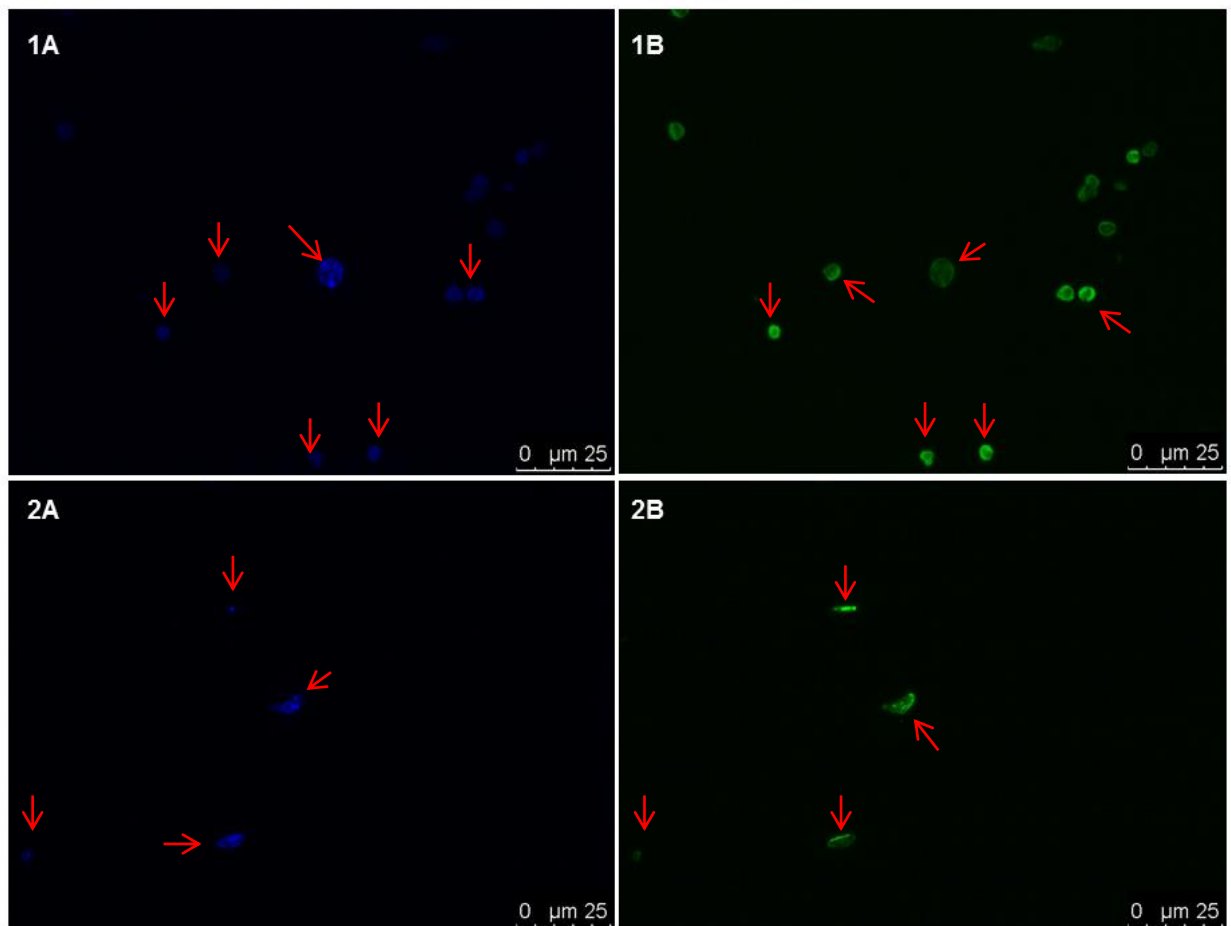
O Dot-blot, possibilitou a detecção da proteína de interesse sendo possível verificar quais tempos de indução apresentaram uma expressão pronunciada da proteína. Na figura 28 é possível identificar que as alíquotas nos tempos de 48 e 72 horas possuem uma expressão evidente em relação aos os outros tempos de indução (0, 24 e 96 horas), mesmo com baixas concentrações do extrato proteico.



**Figura 28.** Dot-blot usando anti-His (1:2500) conjugado a Fosfatase alcalina, com 10  $\mu$ L de sobrenadante de clones de pPICZA $\alpha$ EDIII $\alpha$  induzidos durante 96 horas com metanol 0,5%. Destaque com setas vermelhas para os tempos de 48 e 72 horas de indução, indicando expressão da proteína recombinante.

### 5.7. ANÁLISE DE ANCORAGEM E EXPRESSÃO DA PROTEÍNA POR IMUNOFLOURESCÊNCIA

A produção das proteínas de interesse também foi confirmada por meio de análise das leveduras recombinantes em microscopia de fluorescência. As leveduras foram cultivadas por 48 horas e após esse período foram preparadas para análise como descrito no item 4.2.7 do método. A fluorescência foi detectada apenas nas lâminas incubadas com as leveduras recombinantes, não tendo sido observado sinal quando *P. pastoris* não-transformada foi analisada. As células não foram tratadas com nenhuma solução fixadora indicando que, a marcação com os anticorpos utilizados ocorreram apenas no exterior da célula, o que representa a ancoragem da proteína na superfície celular (Figura 29).



**Figura 29.** Imunofluorescência das leveduras recombinantes. As leveduras foram cultivadas por 48 horas, 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 FITC (isocinato de fluoresceína) (1:500), como anticorpo secundário. Além disso, foi adicionada junto com a amostra em lamina uma solução do marcador DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol). **1A e 2A** – Marcação e uso do filtro para DAPI (em azul), evidenciando regiões de ácidos nucleicos (setas vermelhas) nas amostras induzidas por 48 horas; **1B e 2B** – Marcação e uso do filtro para FITC (em verde), evidenciando regiões de expressão da proteína (setas vermelhas) na amostra induzida por 48 horas, no qual pode-se validar a ancoragem e confirmar a construção da levedura recombinante.

## 6 DISCUSSÃO

Desde o último surto ocorrido nas Américas foi observado um decréscimo no registro de casos de infecção por Zika, entretanto, o vírus continua em circulação sendo uma grave ameaça à saúde mundial e não está claro se a transmissão permanecerá epidêmica, eventualmente com períodos intermediários de inatividade, ou se tornará endêmica com padrões de transmissão sazonais (BAROUCH et al., 2017). Ademais, dada a rápida disseminação e os severos desfechos associados à infecção por ZIKV em paralelo a ausência de tratamento específico aprovado, torna-se de caráter urgente à busca por potenciais terapias e vacinas (LEVINE et al., 2004; ABBASI et al., 2016; ALAM et al., 2017).

Atualmente, existem vacinas bem-sucedidas licenciadas para algumas infecções flavivirais, como: YFV (Yellow Fever Virus), TBEV (*Tick-Borne Encephalitis Virus*), JEV (*Japanese Encephalitis Virus*) e DENV (*Dengue Virus*) (VERMA et al., 2014; JARMER et al., 2014; TORRESI et al., 2017). Assim, essa vasta experiência no desenvolvimento de vacinas contra flavivírus, fornece direcionamento para a busca de compostos anti-ZIKV.

A região correspondente ao domínio III do ZIKV escolhida para o presente estudo foi baseado nos resultados demonstrados por Tai et al. (2018), que construíram proteínas recombinantes, compreendendo três fragmentos distintos do zEDIII, e verificou que a porção de 298-409 aa induziu o maior título de anticorpos neutralizantes contra infecção com nove cepas de ZIKV isoladas de diferentes hospedeiros, países e períodos de tempo, e manteve a imunogenicidade anti-ZIKV em longo prazo para induzir anticorpos neutralizantes. Além disso, foram feitos testes em filhotes neonatos de camundongos imunizados com E298-409 e foi relatado proteção total após o desafio com duas cepas de ZIKV humanas epidêmicas. Esses dados sugerem que o fragmento crítico neutralizante é um bom candidato para o desenvolvimento como uma vacina eficaz e segura de subunidade para proteger mães grávidas e seus fetos contra Infecção pelo vírus Zika.

Nesse contexto, o presente estudo visa a exposição do antígeno EDIII do ZIKV na superfície de *Pichia pastoris*, como uma construção de “*yeast surface display*” para estudos futuros sobre a utilização da levedura recombinante como vacina profilática oral contra o vírus Zika. Por meio dessa estratégia espera-se que os componentes da parede celular da levedura conhecidos por possuírem atividade



adjuvante natural atuem sinergicamente como veículo de entrega e contribuam para que a proteína recombinante seja mais imunogênica (PAVOT et al., 2012).

Em relação a produção da proteína de interesse, as análises por eletroforese em gel SDS-PAGE evidenciaram a presença de uma banda de aproximadamente 48,5 KDa que correlaciona-se ao tamanho de EDIII +  $\alpha$ AG no extrato proteico total das amostras contendo a levedura recombinante. Apesar disso, os extratos se apresentaram fracos nas amostras que correspondiam a um maior tempo de indução (48, 72 e 96 horas), esse resultado pode estar relacionado à oxidação do metanol levando a formação de peróxido de hidrogênio como um subproduto conhecido por causar estresse e induzir a morte celular (Kern et al., 2007)

Na detecção por *Dot blot*, foi visível a expressão em 48 e 72 horas de indução, no entanto, nos pontos iniciais (0 e 24 horas) a proteína não foi detectada, sugerindo que as taxas de transcrição iniciais possam ser afetadas por excesso de metanol como constatado por Cereghino (2002). A proteína também não pode ser detectada no tempo correspondente a 96 horas de indução, o que sugere que a diminuição nos níveis da produção da proteína, talvez possa estar relacionada à alteração nos níveis de transcrição e/ou tradução de EDIII, como também mudanças nas condições de cultivo, interferindo na cinética e fisiologia celular que por consequência poderia levar a proteólise da proteína já produzida.

As amostras positivas nos ensaios de *Dot blot* seguiram para análise por meio de *Western blot* com as mesmas amostras e utilizando os mesmos anticorpos. Entretanto, não foi obtido resultado. Sendo assim, os níveis de expressão da proteína EDIII detectados nesse estudo podem estar relacionados às condições adotadas no cultivo das células ou durante o processo de indução do promotor AOX1.

Como alternativa para auxiliar na identificação de possíveis problemas de expressão a nível transcricional ou traducional, é cabível a realização da extração do RNA total dos transformantes induzidos nos diferentes períodos (0 até 96 horas) e submetê-los a reação de RT-qPCR.

Geralmente, a detecção de baixos níveis de expressão podem estar relacionados a erros no processamento traducional da proteína heteróloga. Essas falhas são provocadas ocasionalmente pela preferência das leveduras em determinados códons sinônimos. Em estudos correlatos foi demonstrado altos níveis de expressão de proteínas recombinantes devido a construção de gene sintético

apresentando códons preferências para *Pichia pastoris*. Sendo assim, problemas nesse segmento podem ser contornados otimizando o gene de interesse utilizando *codon usage* de *Pichia pastoris* (OUTCHKOUROV et al., 2002; SU et al., 2007).

Sabe-se que aproximadamente 95% da atividade álcool oxidase em *P. pastoris* é atribuída a AOX1 e que a produção de proteínas heterólogas pode corresponder até 30% das proteínas totais, caracterizando-o como o sistema mais bem-sucedido relatado para este organismo (PENNELL; ELDIN, 1998). No entanto, outras opções promotoras estão disponíveis para a produção heterólogas em *Pichia pastoris* e essas são discutidas amplamente por Cereghino e Cregg (2000).

Em alguns estudos baseados no promotor AOX, foi relatada alta eficiência na produção do precursor da insulina em *P. pastoris* (ZHU et al., 2009; XIE et al., 2008). Embora o uso do gene AOX1, muitas pesquisas têm sido realizadas para uso de promotores alternativos, pois apresenta desvantagens como, a toxicidade na célula a depender da concentração de metanol usada, assim como os subprodutos (formaldeído e peróxido de hidrogênio) de conversão gerada durante seu metabolismo, limitando o metanol como fonte de carbono (CEREGHINO; GREGG, 2000).

Em comparação, os estudos de Waterham et al. (1997) demonstraram a diferença entre a força dos promotores indutível (AOX) e constitutivo (GAP) na produção de  $\beta$ -lactamase e verificou que o promotor GAP era capaz de digerir maior produção do que o AOX em culturas crescidas em glicose. No entanto, em outros estudos utilizando os mesmos promotores foi verificada uma produção superior da enzima  $\beta$ -glucuronidase pelo AOX em relação aos outros promotores (SEARS et al., 1998).

Contudo, foi observado que os resultados obtidos em relação a expressão da proteína implica na consideração de diferentes condições de otimização do processo e não apenas no tipo de promotor escolhido (HONG et al., 2006). Lueking et al. (2003) explica que a obtenção de altos níveis de expressão heteróloga requer combinação de vários fatores, como tipo de linhagem hospedeira, vetor de expressão, local de integração do cassete de expressão, componentes do meio de cultura e propriedades da proteína a ser expressa.

É importante ressaltar que as proteínas recombinantes podem potencialmente ser degradadas proteoliticamente no meio de cultura por proteases extracelulares,

proteases ligadas a células ou por proteases intracelulares de células lisadas (KANG et al., 2000; JAHIC, 2003) . Vários problemas devido à proteólise podem ser previstos na produção de proteínas recombinantes e uma série de estratégias podem ser empregadas para controlar a proteólise em *P. pastoris* visando melhorar a qualidade e o rendimento da produção recombinante. Estes são baseados na modificação no meio de cultivo, célula e proteína recombinante (CEREGHINO; CREGG, 2000).

Alguns parâmetros, como por exemplo, a diminuição da temperatura do cultivo, também podem influenciar o rendimento da proteína recombinante, possivelmente devido à baixa estabilidade da proteína recombinante a temperaturas mais altas, à liberação de mais proteases das células mortas e a problemas de dobramento em temperaturas mais altas. Hong et al. (2002) alcançaram maior atividade de lacase diminuindo a temperatura de cultivo (de 30°C para 20°C) e reduzindo a concentração de metanol (de 1,0% para 0,5%).

Em estudo recente, de Kaushik et al. (2016), utilizando EDIII do sorotipo 3 do vírus da Dengue recombinante em *P. pastoris*, foi visto que a temperatura sozinha teve um impacto significativo, resultando em um aumento de 2,5 vezes na quantidade de proteína secretada devido a redução da temperatura de indução de 30°C para 20°C. No entanto, a suplementação de meio de cultura com Casaminoácidos (CA), aumentou ainda mais o título secretório de EDIII, com queda concomitante dos níveis intracelulares em ambas as temperaturas. No entanto, a redução na retenção intracelular de EDIII foi mais proeminente a 20°C do que a 30°C. Isso sugere que a suplementação de CA facilita a superexpressão de *P. pastoris* para secretar mais EDIII, reduzindo a proporção retida intracelularmente.

Portanto, a estabilidade do produto também pode ser alcançada por meio da adição de suplementos ricos em aminoácidos (por exemplo, peptona, casaminoácidos) ao meio de cultura, possivelmente agindo como substratos alternativos e como concorrentes para uma ou mais proteases problemáticas (CEREGHINO; CREGG, 2000; ).

Embora o *Pichia pastoris* seja enquadrado como um sistema de expressão eficiente e com processos bem definidos, é necessário que haja otimização dos processos de expressão para alcançar a produção máxima da proteína heteróloga, bem como a sua atividade. As condições de rendimento e a atividade são muitas

vezes dependente dos parâmetros físicos de cultura, como por exemplo, pH, temperatura, aeração, e das concentrações residuais de metanol. Todos esses fatores podem ser monitorados para garantir as condições exatas necessárias para boa expressão por meio da levedura (MACAULEY-PATRICK et al., 2005; HOHENBLUM, 2004).

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste estudo demonstram que a linhagem GS115 de *Pichia pastoris*, transformada com o cassete de expressão pPICZA $\alpha$ EDIII $\alpha$ , é capaz de produzir a proteína correspondente ao fragmento EDIII do ZIKV quando induzida por metanol. Embora os níveis de produção da proteína estejam abaixo do esperado, é importante salientar que a otimização das etapas de produção possam proporcionar melhores rendimentos. O estudo também comprova a utilização do mecanismo de ancoragem de proteína heteróloga em superfície de *Pichia pastoris*, que contribui para elaboração de sistema vacinal baseado em “*Yeast Surface Display*”. Ademais, o estudo representa uma etapa fundamental para a implantação de um sistema viável contra a infecção pelo vírus Zika, servindo de base para estudos futuros no contexto vacinal e possibilita potenciais aplicações biotecnológicas na produção de proteínas recombinantes.

## REFERÊNCIAS

- ABBASI, Jennifer. First inactivated Zika vaccine trial. **Jama**, v. 316, n. 24, p. 2588-2588, 2016.
- ABBINK, Peter et al. Protective efficacy of multiple vaccine platforms against Zika virus challenge in rhesus monkeys. **Science**, v. 353, n. 6304, p. 1129-1132, 2016.
- ACOSTA, Eliana G.; CASTILLA, Viviana; DAMONTE, Elsa B. Functional entry of dengue virus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. **Journal of General Virology**, v. 89, n. 2, p. 474-484, 2008.
- ALAM, Aftab et al. Recent trends in ZikV research: A step away from cure. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 91, p. 1152-1159, 2017.
- ALMEIDA, João Ricardo Moreira; DE MORAES, Lídia Maria Pepe; 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.
- 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, 2010.
- ARRUDA, Andrelisse et al. A constitutive expression system for *Pichia pastoris* based on the PGK1 promoter. **Biotechnology letters**, v. 38, n. 3, p. 509-517, 2016.
- ÁVILA-PÉREZ, Ginés et al. Reverse genetic approaches for the generation of recombinant Zika virus. **Viruses**, v. 10, n. 11, p. 597, 2018.
- BAL, Jyotiranjana et al. Evaluation of cell-surface displayed synthetic consensus dengue EDIII cells as a potent oral vaccine candidate. **Microbial cell factories**, v. 17, n. 1, p. 1-13, 2018.
- BARJAS-CASTRO, Maria L. et al. Probable transfusion-transmitted Zika virus in Brazil. **Transfusion**, v. 56, n. 7, p. 1684-1688, 2016.
- BARRETO-VIEIRA, Debora Ferreira et al. Ultrastructure of Zika virus particles in cell cultures. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 8, p. 532-534, 2016..BAROUCH, Dan H.; THOMAS, Stephen J.; MICHAEL, Nelson L. Prospects for a Zika virus vaccine. **Immunity**, v. 46, n. 2, p. 176-182, 2017.

BARRON, Michelle A. et al. Human dendritic cell interactions with whole recombinant yeast: implications for HIV-1 vaccine development. **Journal of clinical immunology**, v. 26, n. 3, p. 251-264, 2006.

BAUMANN, Kristin et al. The impact of oxygen on the transcriptome of recombinant *S. cerevisiae* and *P. pastoris*-a comparative analysis. **BMC genomics**, v. 12, n. 1, p. 218, 2011.

BAZAN, Silvia Boschi et al. Maturation and cytokine pattern of human dendritic cells in response to different yeasts. **Medical microbiology and immunology**, v. 207, n. 1, p. 75-81, 2018.

BAZAN, Silvia Boschi et al. 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, 2011.

BEASLEY, David WC; BARRETT, Alan DT. Identification of neutralizing epitopes within structural domain III of the West Nile virus envelope protein. **Journal of virology**, v. 76, n. 24, p. 13097-13100, 2002.

BELMUSTO-WORN, Vivian E. et al. Randomized, double-blind, phase iii, pivotal field trial of the comparative immunogenicity, safety, and tolerability of two yellow fever 17d vaccines (arilvax™ and yf-vax®) in healthy infants and children in peru. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 72, n. 2, p. 189-197, 2005.

BHATNAGAR, Julu et al. Zika virus RNA replication and persistence in brain and placental tissue. **Emerging infectious diseases**, v. 23, n. 3, p. 405, 2017.

BIAN, Guanglin et al. 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, 2009.

BORDON, Yvonne. Infection: Zika virus: end of transmission?. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 12, p. 718, 2016.

BRASIL, Patrícia et al. Guillain-Barré syndrome associated with Zika virus infection. **The lancet**, v. 387, n. 10026, p. 1482, 2016.

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2016. **Bol Epidemiol**, v. 48, n. 5, p. 1-9, 2017.

- BROOKS, Richard B. Likely sexual transmission of Zika virus from a man with no symptoms of infection—Maryland, 2016. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 65, 2016.
- BÜGL, Hans et al. RNA methylation under heat shock control. **Molecular cell**, v. 6, n. 2, p. 349-360, 2000.
- BUTCHER, Sarah J. et al. A mechanism for initiating RNA-dependent RNA polymerization. **Nature**, v. 410, n. 6825, p. 235-240, 2001.
- CAO-LORMEAU, Van-Mai et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. **The Lancet**, v. 387, n. 10027, p. 1531-1539, 2016.
- ÇELİK, Eda; ÇALĐK, Pınar. **Production of recombinant proteins by yeast cells. Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 30, n. 5, p.1108-1118, set. 2012.
- CEREGHINO, Joan Lin; CREGG, James M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS microbiology reviews**, v. 24, n. 1, p. 45-66, 2000.
- CHEN, X. Yeast cell surface display: An efficient strategy for improvement of bioethanol fermentation performance. **Bioengineered** 8:115-119, 2017.
- CHERF, Gerald M.; COCHRAN, Jennifer R.. **Applications of Yeast Surface Display for Protein Engineering. Methods In Molecular Biology**, [s.l.], p.155-175, 2015.
- CHU, J. J. H.; LEONG, P. W. H.; NG, M. L. Analysis of the endocytic pathway mediating the infectious entry of mosquito-borne flavivirus West Nile into *Aedes albopictus* mosquito (C6/36) cells. **Virology**, v. 349, n. 2, p. 463-475, 2006.
- CHU, J. J. H.; NG, M. L. Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway. **Journal of virology**, v. 78, n. 19, p. 10543-10555, 2004.
- CIOFALO, Vince et al. Safety evaluation of a lipase enzyme preparation, expressed in *Pichia pastoris*, intended for use in the degumming of edible vegetable oil. **Regulatory Toxicology And Pharmacology**, [s.l.], v. 45, n. 1, p.1-8, jun. 2006.
- COUDERC, R.; BARATTI, J. Oxidation of methanol by the yeast, *Pichia pastoris*. Purification and properties of the alcohol oxidase. *Agricultural and biological chemistry*, v. 44, n. 10, p. 2279-2289, 1980.



- CRABTREE, M. B.; KINNEY, R. M.; MILLER, B. R. Deglycosylation of the NS1 protein of dengue 2 virus, strain 16681: construction and characterization of mutant viruses. **Archives of virology**, v. 150, n. 4, p. 771-786, 2005.
- CREGG, J M et al. Pichia pastoris as a host system for transformations. **Molecular And Cellular Biology**, [s.l.], v. 5, n. 12, p.3376-3385, dez. 1985.
- CREGG, James M. et al. Recombinant protein expression in Pichia pastoris. **Molecular biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 23-52, 2000.
- DAI, Lianpan et al. Structures of the Zika virus envelope protein and its complex with a flavivirus broadly protective antibody. **Cell host & microbe**, v. 19, n. 5, p. 696-704, 2016.
- DALY, Rachel; HEARN, Milton T. W.. Expression of heterologous proteins in Pichia pastoris: a useful experimental tool in protein engineering and production. **Journal Of Molecular Recognition**, [s.l.], v. 18, n. 2, p.119-138, 2005.
- DAVIDSON, Alexander. Suspected female-to-male sexual transmission of Zika virus—New York City, 2016. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 65, 2016.
- DE SMET, Rebecca; ALLAIS, Liesbeth; CUVELIER, Claude A. Recent advances in oral vaccine development: Yeast-derived  $\beta$ -glucan particles. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 10, n. 5, p. 1309-1318, 2014.
- DECKARD, D. Trew et al. Male-to-male sexual transmission of Zika virus—Texas, January 2016. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 14, p. 372-374, 2016.
- DEFRANCESCO, Laura. Zika pipeline progresses. 2016.
- DEJNIRATTISAI, Wanwisa et al. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. **Nature immunology**, v. 17, n. 9, p. 1102, 2016.
- DENG, Yong-Qiang et al. A broadly flavivirus cross-neutralizing monoclonal antibody that recognizes a novel epitope within the fusion loop of E protein. *PloS one*, v. 6, n. 1, 2011.
- DIALLO, Diawo et al. Zika virus emergence in mosquitoes in southeastern Senegal, 2011. **PloS one**, v. 9, n. 10, 2014.

DICK, G. W. A. et al. Zika virus (II). Pathogenicity and physical properties. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, v. 46, n. 5, 1952.

DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509-520, 1952.

DU, Lanying; ZHOU, Yusen; JIANG, Shibo. The latest advancements in Zika virus vaccine development. **Expert Review Of Vaccines**, v. 16, n. 10, p.951-954, 2017.

DUFFY, Mark R. et al. Zika virus outbreak on Yap Island, federated states of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536-2543, 2009.

ETEMAD, Behzad et al. An envelope domain III–based chimeric antigen produced in pichia pastoris elicits Neutralizing antibodies against all four dengue virus serotypes. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 79, n. 3, p. 353-363, 2008.

FAUCI, Anthony S.; MORENS, David M. Zika virus in the Americas—yet another arbovirus threat. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 7, p. 601-604, 2016.

FRÉOUR, Thomas et al. Sexual transmission of Zika virus in an entirely asymptomatic couple returning from a Zika epidemic area, France, April 2016. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 23, p. 30254, 2016.

GALAO, Rui P; SCHELLER, Nicoletta; ALVES-RODRIGUES, Isabel; BREINIG, Tanja; MEYERHANS, Andreas; DÍEZ, Juana. **Saccharomyces cerevisiae**: a versatile eukaryotic system in virology. **Microbial Cell Factories**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.32-32, 2007.

GASSER, Brigitte et al. Pichia pastoris: protein production host and model organism for biomedical research. **Future Microbiology**, [s.l.], v. 8, n. 2, p.191-208, fev. 2013.

GELLISSEN G. New yeast expression platforms based on methylotrophic Hansenula polymorpha and Pichia pastoris and on dimorphic Arxula adenivorans and Yarrowia lipolytica – A comparison. **FEMS Yeast Research** 5: 1079-1096, 2005.

GREGORY, Christopher J. et al. Modes of transmission of Zika virus. **The Journal of infectious diseases**, v. 216, n. suppl\_10, p. S875-S883, 2017.

GRIFFIN, Bryan D. et al. DNA vaccination protects mice against Zika virus-induced damage to the testes. **Nature communications**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2017.

- GUILLIERMOND A. Zygosaccharomyces pastori, nouvelle espèce de levures copulation hétérogamique. **Bulletin de la Société Mycologique de France** 36:203-11, 1920.
- GUIRAKHOO, Farshad; BOLIN, Richard A.; ROEHRIG, John T. The Murray Valley encephalitis virus prM protein confers acid resistance to virus particles and alters the expression of epitopes within the R2 domain of E glycoprotein. **Virology**, v. 191, n. 2, p. 921-931, 1992.
- HAMEL, Rodolphe et al. Biology of Zika virus infection in human skin cells. **Journal of virology**, v. 89, n. 17, p. 8880-8896, 2015.
- HARTNER, Franz S; GLIEDER, Anton. Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts. **Microbial Cell Factories**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.39, 2006. Springer Science and Business Media LLC.
- HASAN, S. Saif et al. A human antibody against Zika virus crosslinks the E protein to prevent infection. **Nature communications**, v. 8, n. 1, p. 1-6, 2017.
- HAYES, Edward B. Zika virus outside Africa. **Emerging infectious diseases**, v. 15, n. 9, p. 1347, 2009.
- HEINZ, Franz X. et al. Field effectiveness of vaccination against tick-borne encephalitis. **Vaccine**, v. 25, n. 43, p. 7559-7567, 2007.
- HIGGINS, David R.; CREGG, James M. Introduction to Pichia pastoris. In: **Pichia protocols**. Humana Press. p. 1-15, 1998.
- HOHENBLUM, Hubertus et al. Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant Pichia pastoris. **Biotechnology And Bioengineering**, [s.l.], v. 85, n. 4, p.367-375, 2004
- HONG, Feng; MEINANDER, Nina Q.; JÖNSSON, Leif J.. Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in Pichia pastoris. **Biotechnology And Bioengineering**, [s.l.], v. 79, n. 4, p.438-449, 13 jun. 2002.
- HONG, In-Pyo; ANDERSON, Stephen; CHOI, Shin-Geon. Evaluation of a new episomal vector based on the GAP promoter for structural genomics in Pichia pastoris. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 1362-1368, 2006.

- HOWLAND, Shanshan W. et al. Inducing efficient cross-priming using antigen-coated yeast particles. **Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)**, v. 31, n. 7, p. 607, 2008.
- JAHIC, Mehmedalija et al. Analysis and control of proteolysis of a fusion protein in *Pichia pastoris* fed-batch processes. **Journal Of Biotechnology**, [s.l.], v. 102, n. 1, p.45-53, abr. 2003.
- JARMER, Johanna et al. Variation of the specificity of the human antibody responses after tick-borne encephalitis virus infection and vaccination. **Journal of virology**, v. 88, n. 23, p. 13845-13857, 2014.
- JONES, Christopher T. et al. Flavivirus capsid is a dimeric alpha-helical protein. **Journal of virology**, v. 77, n. 12, p. 7143-7149, 2003.
- KANG, H. A. et al. Proteolytic stability of recombinant human serum albumin secreted in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 53, n. 5, p.575-582, 15 maio 2000.
- KAUSHIK, Neha et al. Casamino acids facilitate the secretion of recombinant dengue virus serotype-3 envelope domain III in *Pichia pastoris*. **Bmc Biotechnology**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.12-16, 4 fev. 2016.
- KIM, Eun et al. Preventative vaccines for Zika virus outbreak: preliminary evaluation. **EBioMedicine**, v. 13, p. 315-320, 2016.
- KONDO, A.; UEDA, M. Yeast cell-surface display-applications of molecular display. **Appl Microbiol Biotechnol** 64:28–40, 2004.
- KOSTYUCHENKO, Victor A. et al. Structure of the thermally stable Zika virus. **Nature**, v. 533, n. 7603, p. 425-428, 2016.
- KRAEMER, Moritz UG et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. **elife**, v. 4, p. e08347, 2015.
- KUHN, Richard J. et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. **Cell**, v. 108, n. 5, p. 717-725, 2002.
- KURTZMAN C. Description of *Komagataella phaffii* sp. nov. and the transfer of *Pichia pseudopastoris* to the methylotrophic yeast genus *Komagataella*. **Int J Syst Evol Microbiol** 55:973-6, 2005.

- KURTZMAN, Cletus Paul. Biotechnological strains of Komagataella (*Pichia*) pastoris are Komagataellaphaffii as determined from multigene sequence analysis. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 36, n. 11, p. 1435, 2009.
- KWON, Woo-Taeg et al. Protective immunity of *Pichia pastoris*-expressed recombinant envelope protein of Japanese encephalitis virus. **J Microbiol Biotechnol**, v. 22, n. 11, p. 1580-1587, 2012.
- LAROCCA, Rafael A. et al. Vaccine protection against Zika virus from Brazil. **Nature**, v. 536, n. 7617, p. 474-478, 2016.
- LAZEAR, Helen M.; DIAMOND, Michael S. Zika virus: new clinical syndromes and its emergence in the Western Hemisphere. **Journal of virology**, v. 90, n. 10, p. 4864-4875, 2016.
- LEI, Han et al. Yeast surface-displayed H5N1 avian influenza vaccines. **Journal of immunology research**, v. 2016, 2016.
- LEVINE, Myron M.; SZTEIN, Marcelo B. Vaccine development strategies for improving immunization: the role of modern immunology. **Nature immunology**, v. 5, n. 5, p. 460-464, 2004.
- LIANG, Qiming et al. Zika virus NS4A and NS4B proteins deregulate Akt-mTOR signaling in human fetal neural stem cells to inhibit neurogenesis and induce autophagy. **Cell stem cell**, v. 19, n. 5, p. 663-671, 2016.
- LIN, Hsiao-Han et al. Zika virus structural biology and progress in vaccine development. **Biotechnology advances**, v. 36, n. 1, p. 47-53, 2018.
- LINDENBACH, Brett D. et al. Flaviviridae: the viruses and their replication. 2007.
- LINDENBACH, Brett D.; RICE, Charles M. Molecular biology of flaviviruses. **Advances in virus research**, v. 59, p. 23-62, 2003.
- LIU, Wen Jun et al. A single amino acid substitution in the West Nile virus nonstructural protein NS2A disables its ability to inhibit alpha/beta interferon induction and attenuates virus virulence in mice. **Journal of virology**, v. 80, n. 5, p. 2396-2404, 2006.
- LIU, Wen Jun et al. Inhibition of interferon signaling by the New York 99 strain and Kunjin subtype of West Nile virus involves blockage of STAT1 and STAT2 activation by nonstructural proteins. **Journal of virology**, v. 79, n. 3, p. 1934-1942, 2005.

LUEKING, Angelika et al. A dual-expression vector allowing expression in *E. coli* and *P. pastoris*, including new modifications. In: **E. coli Gene Expression Protocols**. Humana Press, 2003. p. 31-42.

MACAULEY-PATRICK, Sue et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, [s.l.], v. 22, n. 4, p.249-270, 2005.

MALLET, H. P. et al. Bilan de l'épidémie à virus Zika en Polynésie Française, 2013–2014. **Bulletin d'information sanitaires, épidémiologiques et statistiques**, p. 20-21, 2015.

MARTINES, Roosecelis Brasil et al. Notes from the Field: Evidence of Zika Virus Infection in Brain and Placental Tissues from Two Congenitally Infected Newborns and Two Fetal Losses — Brazil, 2015. **Mmwr. Morbidity And Mortality Weekly Report**, [s.l.], v. 65, n. 06, p.1-2, 10 fev. 2016.

MCARTHUR, Monica A.; HOLBROOK, Michael R. Japanese encephalitis vaccines. **Journal of bioterrorism & biodefense**, p. 002, 2011.

MEI, M et al. Application of modified yeast surface display technologies for non-Antibody protein engineering. **Microbiological Research** 196:118-128, 2017.

MILLER, Sven; SPARACIO, Sandra; BARTENSCHLAGER, Ralf. Subcellular localization and membrane topology of the dengue virus type 2 non-structural protein 4B. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 13, p. 8854-8863, 2006.

MING, Guo-li; TANG, Hengli; SONG, Hongjun. Advances in Zika virus research: stem cell models, challenges, and opportunities. **Cell Stem Cell**, v. 19, n. 6, p. 690-702, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA DAS DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS. Protocolo de vigilância e resposta à ocorrência de microcefalia relacionada à infecção pelo vírus Zika. 2015.

MISHRA, Pushpendra Mani; UVERSKY, Vladimir N.; GIRI, Rajanish. Molecular recognition features in Zika virus proteome. **Journal of molecular biology**, v. 430, n. 16, p. 2372-2388, 2018.

MLAKAR, Jernej et al. Zika virus associated with microcephaly. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 10, p. 951-958, 2016.

MODIS, Yorgo et al. Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein. **Journal of virology**, v. 79, n. 2, p. 1223-1231, 2005.

MOORE, Cynthia A. et al. Characterizing the pattern of anomalies in congenital Zika syndrome for pediatric clinicians. **JAMA pediatrics**, v. 171, n. 3, p. 288-295, 2017.

MOSSO, Clemente et al. Endocytic pathway followed by dengue virus to infect the mosquito cell line C6/36 HT. **Virology**, v. 378, n. 1, p. 193-199, 2008.

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

MUNJAL, Ashok et al. Advances in developing therapies to combat Zika virus: current knowledge and future perspectives. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1469, 2017

MUSSO, Didier et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 14, p. 20761, 2014.

NAUMOV, G.I. et al. Komagataella kurtzmanii sp. nov., a new sibling species of Komagataella (Pichia) pastoris based on multigene sequence analysis. **Antonie Van Leeuwenhoek** 104:339-47, 2013.

OLAGNIER, David et al. Mechanisms of Zika virus infection and neuropathogenesis. **DNA and cell biology**, v. 35, n. 8, p. 367-372, 2016.

OLIPHANT, Theodore et al. Antibody recognition and neutralization determinants on domains I and II of West Nile Virus envelope protein. **Journal of virology**, v. 80, n. 24, p. 12149-12159, 2006.

OUTCHKOUROV, Nikolay S.; STIEKEMA, Willem J.; JONGSMA, Maarten A.. Optimization of the Expression of Equistatin in Pichia pastoris. **Protein Expression And Purification**, [s.l.], v. 24, n. 1, p. 18-24, fev. 2002.

PATTERSON, Robert et al. Oral application of freeze-dried yeast particles expressing the PCV2b Cap protein on their surface induce protection to subsequent PCV2b challenge in vivo. **Vaccine**, v. 33, n. 46, p. 6199-6205, 2015.

PAUPY, Christophe et al. Aedes albopictus, an arbovirus vector: from the darkness to the light. **Microbes and infection**, v. 11, n. 14-15, p. 1177-1185, 2009.

- PAVOT, Vincent et al. New insights in mucosal vaccine development. **Vaccine**, v. 30, n. 2, p. 142-154, 2012.
- Pennell, C.; Eldin, P. In vitro production of recombinant antibody fragments in *Pichia pastoris*. **Research in Immunology**, v. 149, n. 6, p. 599-603, JUL-AUG 1998.
- PENOT, Pauline et al. Infectious Zika virus in vaginal secretions from an HIV-infected woman, France, August 2016. **Eurosurveillance**, v. 22, n. 3, 2017.
- PHAFF, H. J.; MILLER, M. W.; SHIFRINE, M.. The taxonomy of yeasts isolated from *Drosophila* in the Yosemite region of California. **Antonie van Leeuwenhoek**, [s.l.], v. 22, n. 1, p.145-161, dez. 1956.
- PIERSON, Theodore C.; GRAHAM, Barney S. Zika virus: immunity and vaccine development. **Cell**, v. 167, n. 3, p. 625-631, 2016.
- PIERSON, Theodore C.; KIELIAN, Margaret. Flaviviruses: braking the entering. **Current opinion in virology**, v. 3, n. 1, p. 3-12, 2013.
- PONLAWAT, Alongkot; HARRINGTON, Laura C. Blood feeding patterns of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Thailand. **Journal of medical entomology**, v. 42, n. 5, p. 844-849, 2005.
- POTVIN, Gabriel; AHMAD, Ayla; ZHANG, Zisheng. **Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review**. **Biochemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 64, p.91-105, maio 2012.
- PRYOR, Melinda J.; WRIGHT, Peter J. Glycosylation mutants of dengue virus NS1 protein. **Journal of General Virology**, v. 75, n. 5, p. 1183-1187, 1994.
- RASMUSSEN, Sonja A. et al. Zika virus and birth defects—reviewing the evidence for causality. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 20, p. 1981-1987, 2016.
- REY, Félix A. et al. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. **Nature**, v. 375, n. 6529, p. 291-298, 1995.
- RICHNER, Justin M. et al. Modified mRNA vaccines protect against Zika virus infection. **Cell**, v. 168, n. 6, p. 1114-1125. e10, 2017.
- ROBY, Justin A. et al. Post-translational regulation and modifications of flavivirus structural proteins. **Journal of General Virology**, v. 96, n. 7, p. 1551-1569, 2015.



- SCHREUDER, M. P. et al. Yeast expressing hepatitis B virus surface antigen determinants on its surface: implications for a possible oral vaccine. **Vaccine**, v. 14, n. 5, p. 383-388, 1996.
- SCOTT, Thomas W.; TAKKEN, Willem. Feeding strategies of anthropophilic mosquitoes result in increased risk of pathogen transmission. **Trends in parasitology**, v. 28, n. 3, p. 114-121, 2012.
- SEARS, Irina B. et al. A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene expression in *Pichia pastoris*. **Yeast**, v. 14, n. 8, p. 783-790, 1998.
- SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (SVS) DO MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL - Monitoring of cases of urban arboviruses transmitted by *Aedes* (dengue, chikungunya and zika) up to an epidemiological week 15, 2019. **Bol. Epidemiol.** 30:1-11, 2019.
- SHAN, Chao et al. Zika virus: diagnosis, therapeutics, and vaccine. **ACS infectious diseases**, v. 2, n. 3, p. 170-172, 2016.
- SHIBASAKI, Seiji et al. An oral vaccine against candidiasis generated by a yeast molecular display system. **Pathogens and disease**, v. 69, n. 3, p. 262-268, 2013.
- SHIBASAKI, Seiji; MAEDA, Hatsuo; UEDA, Mitsuyoshi. **Molecular Display Technology Using Yeast—Arming Technology—**. **Analytical Sciences**, [s.l.], v. 25, n. 1, p.41-49, 2009.
- SHRESTHA, Bimmi et al. The development of therapeutic antibodies that neutralize homologous and heterologous genotypes of dengue virus type 1. **PLoS pathogens**, v. 6, n. 4, 2010.
- SIMMONDS, Peter et al. ICTV virus taxonomy profile: Flaviviridae. **The Journal of general virology**, v. 98, n. 1, p. 2, 2017.
- SIMPSON, D. I. H. et al. Zika virus infection in man. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 4, p. 335-8, 1964.
- SONG, Byung-Hak et al. Zika virus: history, epidemiology, transmission, and clinical presentation. **Journal of neuroimmunology**, v. 308, p. 50-64, 2017.
- STETTLER, Karin et al. Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. **Science**, v. 353, n. 6301, p. 823-826, 2016.

STUBBS, Andrew C. et al. Whole recombinant yeast vaccine activates dendritic cells and elicits protective cell-mediated immunity. **Nature medicine**, v. 7, n. 5, p. 625-629, 2001.

SU, Zhijian; WU, Xiaoping; FENG, Ya; DING, Changcai; XIAO, Yechen; CAI, Lu; FENG, Wenke; LI, Xiaokun. High level expression of human endostatin in *Pichia pastoris* using a synthetic gene construct. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 73, n. 6, p. 1355-1362, jan. 2007.

SUKUPOLVI-PETTY, Soila et al. Structure and function analysis of therapeutic monoclonal antibodies against dengue virus type 2. **Journal of virology**, v. 84, n. 18, p. 9227-9239, 2010.

TAI, Wanbo et al. Critical neutralizing fragment of Zika virus EDIII elicits cross-neutralization and protection against divergent Zika viruses. **Emerging microbes & infections**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2018.

TANAKA, Tsutomu et al. Recent developments in yeast cell surface display toward extended applications in biotechnology. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 95, n. 3, p. 577-591, 2012.

TEBAS, Pablo et al. Safety and immunogenicity of an anti-Zika virus DNA vaccine—preliminary report. **New England Journal of Medicine**, 2017.

THOMAS, Stephanie Margarete et al. Low-temperature threshold for egg survival of a post-diapause and non-diapause European aedine strain, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Parasites & vectors**, v. 5, n. 1, p. 100, 2012.

THOMPSON, Cheryl A.. FDA approves kallikrein inhibitor to treat hereditary angioedema. **American Journal Of Health-system Pharmacy**, [s.l.], v. 67, n. 2, p.93-93, 15 jan. 2010.

TORRESI, J.; EBERT, G.; PELLEGRINI, M. Vaccines licensed and in clinical trials for the prevention of dengue. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 13, n. 5, p. 1059-1072, 2017.

TRIPP, Ralph A.; ROSS, Ted M. Development of a Zika vaccine. 2016.

VAN DER SCHAAR, Hilde M. et al. Characterization of the early events in dengue virus cell entry by biochemical assays and single-virus tracking. **Journal of virology**, v. 81, n. 21, p. 12019-12028, 2007.

VAN DER SCHAAR, Hilde M. et al. Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. **PLoS pathogens**, v. 4, n. 12, 2008.

VASILAKIS, Nikos; WEAVER, Scott C. Flavivirus transmission focusing on Zika. **Current opinion in virology**, v. 22, p. 30-35, 2017.

VENTURA, Liana O. et al. Visual impairment in children with congenital Zika syndrome. **Journal of American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus**, v. 21, n. 4, p. 295-299. e2, 2017.

VERMA, Ramesh; KHANNA, Pardeep; CHAWLA, Suraj. Yellow fever vaccine: an effective vaccine for travelers. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 10, n. 1, p. 126-128, 2014.

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, 2013.

WADLE, Andreas et al. Cross-presentation of HLA class I epitopes from influenza matrix protein produced in *Saccharomyces cerevisiae*. **Vaccine**, v. 24, n. 37-39, p. 6272-6281, 2006.

WANG, Lina; COPPEL, Ross L. Oral vaccine delivery: can it protect against non-mucosal pathogens?. **Expert review of vaccines**, v. 7, n. 6, p. 729-738, 2008.

WANG, Man; JIANG, Shuai; WANG, Yefu. **Recent advances in the production of recombinant subunit vaccines in *Pichia pastoris***. **Bioengineered**, [s.l.], v. 7, n. 3, p.155-165, 8 abr. 2016.

WATERHAM, Hans R. et al. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. **Gene**, v. 186, n. 1, p. 37-44, 1997.

WEAVER, Scott C. et al. Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. **Antiviral research**, v. 130, p. 69-80, 2016.

WILLIS, Elinor; HENSLEY, Scott E. Characterization of Zika virus binding and enhancement potential of a large panel of flavivirus murine monoclonal antibodies. **Virology**, v. 508, p. 1-6, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Director-General Summarizes the Outcome of the Emergency Committee Regarding Clusters of Microcephaly and Guillain-Barré Syndrome**. Disponível em:

<<http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2016/emergency-committee-zika-microcephaly/en/>> Acesso em: 12 de Dezembro de 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Vaccine Pipeline Tracker Zika**. Disponível em: <[http://www.who.int/immunization/research/vaccine\\_pipeline\\_tracker\\_spreadsheet/en/](http://www.who.int/immunization/research/vaccine_pipeline_tracker_spreadsheet/en/)> Acesso em: 20 de Dezembro de 2019.

World Health Organization. **Immunization, Vaccines and Biologicals: WHO vaccine pipeline tracker**. Disponível em: [https://www.who.int/immunization/research/vaccine\\_pipeline\\_tracker\\_spreadsheet/en/](https://www.who.int/immunization/research/vaccine_pipeline_tracker_spreadsheet/en/). Acesso em: 20 out. 2019.

World Health Organization. **WHO Director-General summarizes the outcome of the Emergency Committee regarding clusters of microcephaly and Guillain-Barré syndrome**. 2016. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/detail/01-02-2016-who-director-general-summarizes-the-outcome-of-the-emergency-committee-regarding-clusters-of-microcephaly-and-guillain-barr%c3%a9-syndrome>. Acesso em: 12 set. 2019.

XIE, T. et al. Secretory expression of insulin precursor in *Pichia pastoris* and simple procedure for producing recombinant human insulin. **Preparative biochemistry & biotechnology**, v. 38, n. 3, p. 308-317, 2008.

YAMADA, Y et al. The phylogenetic relationships of methanol-assimilating yeasts based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs: the proposal of *Komagataella* gen. nov. (Saccharomycetaceae). **Biosci Biotechnol Biochem** 59:439-44, 1995.

YUN, Seok-min; KIM, Su-yeon; HAN, Myung Guk; JEONG, Young Eui; YONG, Tai-soon; LEE, Chan-hee; JU, Young Ran. **Analysis of the Envelope (E) Protein Gene of Tick-Borne Encephalitis Viruses Isolated in South Korea. Vector-borne And Zoonotic Diseases**, [s.l.], v. 9, n. 3, p.287-293, jun. 2009.

ZHANG, Congdang et al. Human Enterovirus 71 protein displayed on the surface of *Saccharomyces cerevisiae* as an Oral vaccine. **Viral immunology**, v. 29, n. 5, p. 288-295, 2016.

ZHAO, Haiyan et al. Structural basis of Zika virus-specific antibody protection. **Cell**, v. 166, n. 4, p. 1016-1027, 2016.

ZHU, Kailing et al. 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, 2006.

ZHU, T. et al. Efficient generation of multi-copy strains for optimizing secretory expression of porcine insulin precursor in yeast *Pichia pastoris*. **Journal of applied microbiology**, v. 107, n. 3, p. 954-963, 2009.