



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

LIGIA ROSA SALES LEAL

**ANÁLISE DA IMUNOGENICIDADE DE VACINAS DE DNA MULTIEPÍTOPOS
CONTRA O ZIKA VÍRUS**

Recife

2022

LIGIA ROSA SALES LEAL

**ANÁLISE DA IMUNOGENICIDADE DE VACINAS DE DNA MULTIEPÍTOPOS
CONTRA O ZIKA VÍRUS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Genética. Área de concentração: Biologia Molecular

Orientador: Dr. Antonio Carlos de Freitas

Coorientador: Dr. Lindomar José Pena

Coorientador: Dr. André Luiz Santos de Jesus

Recife

2022

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Natália Nascimento, CRB4/1743

Leal, Lígia Rosa Sales.

Análise da imunogenicidade de vacinas de DNA multiepítopos contra o zika vírus. / Lígia Rosa Sales Leal. – 2022.

133 f. : il., fig.; tab.

Orientador: Antonio Carlos de Freitas.

Coorientador: Lindomar José Pena.

Coorientador: André Luiz Santos de Jesus.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Genética, 2022.

Inclui referências.

1. Vacinas de DNA. 2. ZIKV. 3. Peptídeos sinais. 4. Sequências sinalizadoras. 5. Modelo murino. I. Freitas, Antonio Carlos de. (orient.). II. Pena, Lindomar José. (coorient.). III. Jesus, André Luiz Santos de. IV. Título.

587

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023-079

LIGIA ROSA SALES LEAL

**ANÁLISE DA IMUNOGENICIDADE DE VACINAS DE DNA MULTIEPÍTOPOS
CONTRA O ZIKA VÍRUS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Biociências, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Genética.

Aprovado em: 27/07/2022.

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof. Dr. Christian Robson de Souza Reis (Examinador Externo)
Instituto Aggeu Magalhães

Prof. Dr. Marcus Vinícius de Aragão Batista (Examinador Externo)
Universidade Federal de Sergipe

Prof. Dr. Marcos Antonio de Moraes Júnior (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha gratidão a todos aqueles que participaram e possibilitaram a conclusão desta jornada.

A minha família, em especial a minha avó Maria José, seu exemplo de vida e desejo por conhecimentos me inspirou a seguir na carreira acadêmica.

As minhas amigas Anna, Bianca e Daffany, pela paciência, carinho e companheirismo dentro e fora do laboratório. Acredito que vocês saibam o quanto tenho apreço a vocês, que sempre alegram meus dias.

Aos amigos e colaboradores do LEMTE Carolina, Larissa, Conceição, Nathalya, Carine, Ingrid, Bruna, Ana Paula, Georon, Guilherme, Samara e Benigno. Mesmo os momentos mais estressantes e difíceis são divertidos com vocês.

Aos membros do LAIA, em especial a professora Dr^a Cristiane Moutinho por todo auxílio e ensinamentos. Como iniciante em experimentação animal e análises imunológicas tenho certeza que esta tese não seria possível sem sua contribuição.

Ao meu orientador Professor Dr. Antonio Carlos de Freitas, pela confiança permanente em todos os projetos que desenvolvi no LEMTE ao longo de minha trajetória acadêmica. Sobretudo pelos ensinamentos como pesquisador, professor e pessoa. Tenho certeza que não poderia ter tido melhor orientador, sua calma, sabedoria e humildade contribuíram muito para meu amadurecimento acadêmico e profissional.

Aos meus coorientadores, Dr. Lindomar Pena e Dr. André Jesus, pelo suporte e conhecimento compartilhado. Diversas etapas desta tese fluíram bem em virtude de seus apoios.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco, e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo suporte acadêmico, técnico e financeiro que possibilitaram a conclusão desta tese.

Agradeço a todos aqueles não mencionados aqui, mas que de alguma forma tornam essa caminhada possível.

A todos, minha gratidão.

“É o que pensamos que já sabemos que muitas vezes nos impede de aprender.”

(Claude Bernard)

RESUMO

Infecções por Zika vírus geralmente estão associadas a malformações fetais e complicações neurológicas em adultos, representando um risco à saúde pública. Apesar disso, ainda não existem vacinas licenciadas para uso humano. Vacinas de DNA são plataformas altamente adaptáveis, eficientes, seguras e possuem rápida produção e bom custo-benefício, sendo opções interessantes para o desenvolvimento de estratégias vacinais. Neste trabalho, desenvolvemos dois candidatos a vacina de DNA contra o ZIKV, e avaliamos a imunogenicidade dessas em modelos murinos. Para tanto, foram utilizados 14 epítomos presentes nas proteínas do Envelope e NS1 do Zika vírus, preditos *in silico* como indutores de respostas mediadas por células T e B. O peptídeo sinal ssPGIP foi adicionado a um dos candidatos, como estratégia de otimização da imunogenicidade vacinal. As sequências multiepítomos e ssPGIP foram clonadas no vetor de pVAX1 para expressão em mamíferos e utilizadas para a imunização de camundongos Balb/c. Após o término do período de imunização (21 dias), o sangue e o baço dos animais foram coletados para análises bioquímicas, hematológicas e imunológicas. Até o presente momento, temos indícios que as duas vacinas de DNA testadas (pVAX_EnvNS1 e pVAX_ssEnvNS1) foram capazes de ativar linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, bem como gerar resposta imune humoral de perfil Th1. Os dados obtidos indicam que a imunização com pVAX_ssEnvNS1 resulta em um perfil polifuncional de produção de citocinas Th1, Th2 e Th17. Por outro lado, a ativação de células T CD4⁺ e CD8⁺ com o constructo pVAX_EnvNS1 foi mais robusta e persistente.

Palavras-chave: Vacinas de DNA; ZIKV; Peptídeos sinais; Sequências sinalizadoras; Modelo murino.

ABSTRACT

Zika virus infections are usually associated with fetal malformations and neurological complications in adults, representing a risk to public health. Despite this, there are still no vaccines licensed for human use. DNA vaccines are highly adaptable, efficient, safe platforms with rapid production and good cost-effectiveness, which are interesting options for developing vaccine strategies. In this work, we developed two DNA vaccine candidates against ZIKV and evaluated their immunogenicity in murine models. For this purpose, 14 epitopes present in the Zika virus Envelope and NS1 proteins, predicted in silico as inducers of responses mediated by T and B cells, were used. The ssPGIP signal peptide was added to one of the candidates, as a strategy to optimize vaccine immunogenicity. The multiepitope sequences and ssPGIP were cloned into the pVAX1 vector for expression in mammals and used for immunization of Balb/c mice. After the end of the immunization period (21 days), the blood and spleen of the animals were collected for biochemical, hematological and immunological analyses. So far, we have evidence that the two tested DNA vaccines (pVAX_EnvNS1 and pVAX_ssEnvNS1) were capable of activating CD4⁺ and T CD8⁺ lymphocytes, as well as generating a Th1-profile humoral immune response. The data obtained indicate that immunization with pVAX_ssEnvNS1 results in a polyfunctional profile of Th1, Th2 and Th17 cytokine production. On the other hand, activation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells with the pVAX_EnvNS1 construct was more robust and persistent.

Keywords: DNA vaccines; ZIKV; Signal peptides; Signal sequences; Murine model.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

TESE

Figura 1 –	Distribuição mundial de áreas de risco para infecção por ZIKV	14
Figura 2 –	Genoma do ZIKV e proteínas após processamento	17
Figura 3 –	Ciclo de replicação viral dos Flavivírus	19
Figura 4 –	Indução de imunidade celular e humoral por vacinas de DNA	27
Figura 5 –	Estrutura geral de um peptídeo sinal	28
Figura 6 –	Direcionamento por SRP de um ribossomo para a membrana do RE durante a síntese proteica	29

ARTIGO 1 – AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DE UM CANDIDATO A VACINA DE DNA MULTIEPÍTOPO CONTRA O ZIKA VÍRUS PELA UTILIZAÇÃO DE UM PEPTÍDEO SINAL DERIVADO DE PLANTAS

Figura 1 –	Esquemas das construções vacinais, confirmação dos recombinantes e expressão de proteínas recombinantes após transfecção	57
Figura 2 –	Perfil de citocinas dosadas do soro dos camundongos vacinados. A coleta foi realizada 14 dias após a última dose de reforço	58
Figura 3 –	Análises das subpopulações de linfócitos circulantes no sangue dos camundongos após a imunização	59
Figura 4 –	Perfil de citocinas dosadas de esplenócitos de camundongos vacinados estimulados com ZIKV.	59
Figura 5 –	Avaliação percentual dos linfócitos T CD4+, CD8+ e CD16+ isolados do baço dos animais imunizados e reestimulados in vitro com o ZIKV, nos períodos de 24, 48 e 72h.	60
Figura 6 –	Anticorpos produzidos em resposta a imunização detectados no soro dos camundongos vacinados.	60

LISTA DE TABELAS

TESE

Tabela 1 – Principais funções atribuídas às proteínas não-estruturais dos Flavivírus	18
Tabela 2 – Estratégias vacinais em estágio pré-clínico contra o ZIKV	22
Tabela 3 – Aplicações e achados relativos à utilização de peptídeos sinais	30

ARTIGO 1 – AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DE UM CANDIDATO A VACINA DE DNA MULTIEPÍTOPO CONTRA O ZIKA VÍRUS PELA UTILIZAÇÃO DE UM PEPTÍDEO SINAL DERIVADO DE PLANTAS

Tabela 1 – Razões Th2/Th1 para anticorpos	61
Tabela 2 – Média do peso dos grupos dos camundongos ao longo do experimento de imunização	61
Tabela 3 – Parâmetros hematológicos dos camundongos imunizados e do grupo controle (média por grupo)	61
Tabela 4 – Parâmetros bioquímicos dos camundongos imunizados e do grupo controle (média por grupo)	62

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	O ZIKA VÍRUS	13
2.1.1	<i>Epidemiologia do Zika vírus</i>	13
2.1.2	<i>Transmissão e manifestações clínicas</i>	15
2.1.3	<i>Aspectos filogenéticos, Genoma e Ciclo viral</i>	16
2.1.4	<i>Tropismo e patogênese viral</i>	20
2.1.5	<i>Desenvolvimento vacinal e aspectos imunológicos</i>	21
2.2	ESTRATÉGIAS VACINAIS DO PRESENTE ESTUDO	25
2.2.1	Vacinas de DNA	25
2.3	PEPTÍDEOS SINAIS	28
2.3.1	<i>Peptídeos sinais e suas aplicações</i>	28
3	OBJETIVOS	32
3.1	OBJETIVO GERAL	32
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	32
4	ARTIGO 1 – AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DE UM CANDIDATO A VACINA DE DNA MULTIEPÍTOPO CONTRA O ZIKA VÍRUS PELA UTILIZAÇÃO DE UM PEPTÍDEO SINAL DERIVADO DE PLANTAS	33
5	DISCUSSÃO GERAL	63
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
	REFERÊNCIAS	67
	APÊNDICE A – IN VITRO AND IN VIVO MODELS FOR STUDYING ZIKA VIRUS BIOLOGY	78
	ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DA CEUA DO INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES (PARA EXECUÇÃO DOS ENSAIOS IN VIVO)	127
	CURRICULUM VITAE (LATTES)	128

1 INTRODUÇÃO

O Zika vírus (ZIKV), é um membro reemergente da família Flaviviridae. Esta família engloba ainda outros vírus de importância médica como os vírus da Dengue e da Febre Amarela. De maneira geral, esses vírus têm como principal forma de transmissão a picada de mosquito do gênero *Aedes*, o que também é aplicado ao ZIKV. Contudo, este pode ainda ser disseminado por vias alternativas como materno-fetal, transfusão sanguínea e relações sexuais. Desde a recente epidemia do ZIKV em 2015-2016, a infecção por este vírus foi recentemente associada ao desenvolvimento de malformações congênitas, e em adultos a complicações neurológicas graves, como a Síndrome de Guillain-Barré.

Desse modo, mesmo com o declínio de novos casos notificados nos anos subsequentes à epidemia, a associação do ZIKV a estas complicações o mantém como um problema perene de saúde pública e, apesar dos esforços contínuos para o desenvolvimento de estratégias profiláticas e terapias antivirais, ainda não há nenhum tratamento ou profilaxia disponível contra a infecção por ZIKV.

Em relação ao desenvolvimento de vacinas contra o ZIKV, diversas estratégias vêm sendo testadas, desde abordagens mais clássicas como o uso de vírus inativados ou atenuados a estratégias que utilizam ácidos nucleicos (vacinas de DNA e RNA) e que tem com principais antígenos as proteínas virais do prM, Envelope viral e NS1, por serem alvos importantes da resposta imunológica durante a infecção por ZIKV.

Vacinas de DNA oferecem algumas vantagens importantes como flexibilidade na elaboração e seleção de antígenos, rapidez de obtenção e avaliação de candidatos vacinais, produção eficiente, e estabilidade térmica e estrutural de suas moléculas. Uma vez que essas vacinas permitem a utilização de sequências sintéticas como antígenos, é possível selecionar epítomos imunogênicos específicos como uma alternativa mais eficiente de induzir respostas mediadas por células B e T.

Neste contexto, o presente estudo propôs a utilização de uma sequência composta por epítomos derivados das proteínas do Envelope e NS1, preditos como indutores de respostas mediadas por células B e T como antígeno, na forma de uma vacina de DNA. Como versão alternativa a esta vacina, adicionamos à construção inicial uma sequência sinalizadora (ssPGIP) para avaliar a possibilidade de potencialização de resposta imunológica à construção. A avaliação da

imunogenicidade destes candidatos vacinais foi realizada em ensaio pré-clínico em camundongos imunocompetentes Balb/c.

Os resultados obtidos após a imunização indicam que as vacinas de DNA testadas, pVAX_EnvNS1 e pVAX_ssEnvNS1, foram capazes de induzir a proliferação de linfócitos T CD4+ e T CD8+, bem como gerar resposta imune humoral de perfil Th1. A adição da sequência sinalizadora ssPGIP ao candidato vacinal, o pVAX_ssEnvNS1, levou ao estabelecimento de um perfil polifuncional com produção de citocinas dos perfis Th1, Th2 e Th17, enquanto que a imunização por pVAX_EnvNS1 resultou na ativação de células T CD4+ e CD8+ de maneira mais robusta e persistente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O ZIKA VÍRUS

2.1.1 *Epidemiologia do Zika vírus*

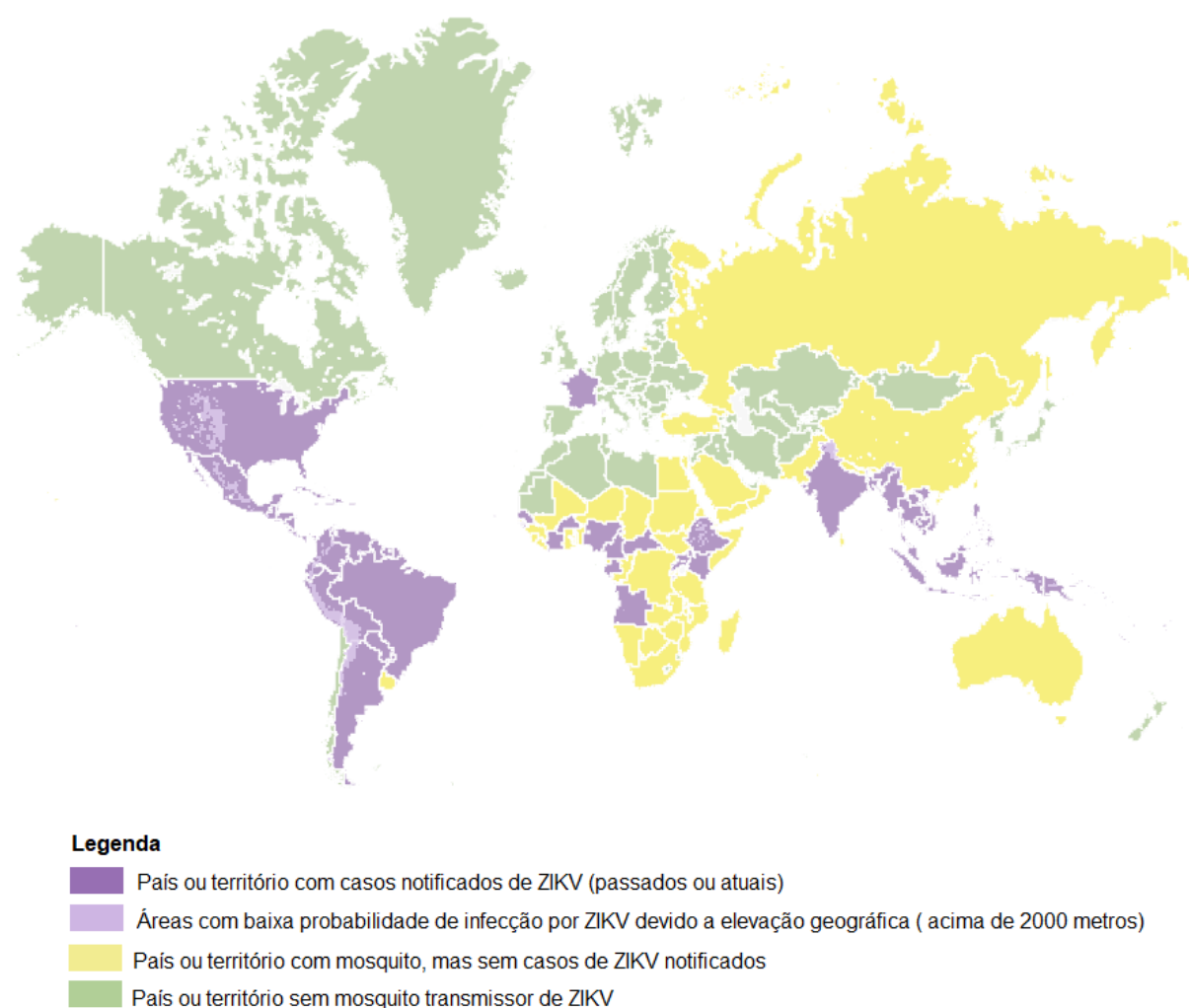
O Zika vírus foi primeiramente isolado a partir de um macaco rhesus febril, durante uma pesquisa de monitoramento de Febre Amarela no ano de 1947, em uma floresta da Uganda (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). Casos de infecção pelo ZIKV em humanos foram identificados nos anos seguintes, mas por décadas permaneceu como uma doença de pouca relevância. Entretanto, estudos sorológicos demonstraram incidência moderada de casos em alguns países da África e Ásia neste período (FAGBAMI, 1979; GESER; HENDERSON; CHRISTENSEN, 1970; MONLUN et al., 1993; OLSON et al., 1981; SIMPSON, 1964). A primeira epidemia relevante ocasionada pelo ZIKV ocorreu no ano de 2007, na ilha Yap, Micronésia (LANCIOTTI et al., 2008), com soroprevalência local estimada acima de 73% da população (DUFFY et al., 2009). Nos anos seguintes, pequenos surtos foram observados em territórios próximos, até o ano de 2013 onde ocorreu a segunda epidemia, agora na Polinésia Francesa, com casos da Síndrome de Guillain-Barré associados a infecção em adultos (CAO-LORMEAU et al., 2014).

Como principal afetado pelo surto de casos de ZIKV, o Brasil teve seus primeiros casos confirmados no segundo trimestre do ano de 2015 (KINDHAUSER et al., 2016). Entretanto, estima-se que a entrada do vírus no país tenha ocorrido entre o fim de 2013 e início de 2014, através do fluxo de pessoas vindas da Polinésia Francesa (FARIA et al., 2017; MASSAD et al., 2017). No ano de 2016, o Brasil firmou-se como epicentro dos casos, sendo polo de disseminação do vírus para outros países da América (FARIA et al., 2017; METSKY et al., 2017; VANNICE et al., 2019). Neste mesmo ano, o rápido alastramento do vírus em países e territórios em todo mundo, e o relato crescente de casos de microcefalia e malformações congênitas, atualmente classificadas como Síndrome Congênita do Zika (SCZ), associados à infecção por ZIKV nas Américas levou a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarar a epidemia do ZIKV como Emergência de Saúde Pública de Interesse Internacional (WILDER-SMITH; OSMAN, 2020).

O declínio da epidemia no Brasil e em outros países afetados ocorreu apenas entre 2017-2018, possivelmente devido às campanhas de controle aos vetores virais e aquisição de imunidade em grande parte da população (BRITO et al., 2021;

VANNICE et al., 2019). Desde então, pequenos surtos ocorreram em países como a Índia e Vietnã (BISWAS et al., 2020; NGUYEN et al., 2020). Mesmo com a diminuição de novos casos e fim da epidemia, o ZIKV passou a integrar em 2018 a lista de doenças prioritárias da OMS, que tem por objetivo incentivar pesquisas e soluções para doenças com potencial de causar emergências à saúde pública (JONKMANS; D'ACREMONT; FLAHAULT, 2021). Um relatório disponibilizado em julho de 2019 pela OMS, informou que 87 países das Américas, Ásia, região do Pacífico e África registraram casos de Zika em seus territórios (OMS, 2019), como mostra o mapa mundial de áreas de risco do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (*Centers for Disease Control and Prevention* - CDC) na Figura 1.

Figura 1- Distribuição mundial de áreas de risco para infecção por ZIKV.



Fonte: Adaptado de *Centers for Disease Control and Prevention* – CDC (2021).

No Brasil, a ampla distribuição dos principais agentes transmissores do ZIKV, mosquitos do gênero *Aedes* infectados, auxiliou a transição do ZIKV de epidêmico a endêmico em todas as regiões do país (TUNALI et al., 2021). Segundo dados da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), até a 22ª semana epidemiológica (junho de 2022), foram registrados 5.699 casos prováveis de ZIKV, com uma taxa de incidência de 2,7 casos a cada 100 mil habitantes no país. Em relação ao mesmo período em 2021, esses dados representam um aumento de 118,9% no número de casos no país (SVS, 2022).

Em relação a casos de SCZ no país, entre o período de 2015-2020 foram 3.577 confirmados, com pico de casos (2.554) observado entre os anos de 2015-2016, com maior ocorrência na Região Nordeste do país. Apesar da menor incidência de novos casos, para o ano de 2020, 1.007 novos casos foram notificados, dos quais 35 foram confirmados e 597 estão em investigação (SVS, 2021). Esta diminuição progressiva de novos casos confirmados de infecção por ZIKV, e consequentemente de SCZ, pode ser relacionada ao menor número de casos de ZIKV ocasionado em grande parte pela existência de imunidade coletiva da população. Embora o aumento progressivo da população não exposta e o decaimento da memória imunológica sejam possíveis explicações para essa diminuição (RIBEIRO et al., 2020), o aumento expressivo quanto ao percentual de casos entre os anos de 2021 e 2022 pode estar relacionado com a subnotificação de novos casos em virtude da pandemia do coronavírus e restrições associadas.

2.1.2 Transmissão e manifestações clínicas

Assim como observado para outros arbovírus endêmicos ao Brasil, como o vírus da Febre amarela (YFV), o vírus da Dengue (DENV) e o vírus Chikungunya, a principal forma de transmissão do ZIKV é a picada por mosquitos do gênero *Aedes* infectados (PETERSEN et al., 2016a). Entretanto, outras formas de transmissão não vetorial do ZIKV foram identificadas, como por transfusão sanguínea, relações sexuais e materno-fetal, esta última considerada relevante devido ao desenvolvimento de malformações fetais (MAGNUS et al., 2018; MUSSO et al., 2014; PETERSEN et al., 2016b; SHARMA et al., 2020).

Estima-se que aproximadamente 80% das infecções por ZIKV sejam assintomáticas (DUFFY et al., 2009). Entretanto, quando presentes, as manifestações

clínicas são similares àsquelas observadas em infecções leves por Dengue e Chikungunya, e tem como principais sintomas relatos de febre baixa, dor de cabeça, exantema maculopapular, mialgia, conjuntivite, dor retro-orbital e artralgia. Estas manifestações têm início entre 2 a 7 dias após a infecção, e desaparecem dentro de uma semana (SHARMA et al., 2020).

No entanto, apesar de ser uma doença majoritariamente inofensiva, a associação da infecção a malformações congênitas e distúrbios neurológicos tornou a larga circulação do ZIKV um sério problema de saúde pública (PETERSEN et al., 2016a). Os primeiros casos de microcefalia a serem associados ao ZIKV ocorreram no Brasil em 2015, embora análises retrospectivas de infecções ocorridas durante a epidemia de 2013-2014 na Polinésia Francesa tenham identificado casos anteriores de microcefalia e malformações neurológicas congênitas (BESNARD et al., 2016; CAUCHEMEZ et al., 2016). Com a evolução da epidemia nas Américas, foram notificadas outras desordens congênitas associadas a infecção tais como hipoplasia ou atrofia do sistema nervoso central, calcificações cerebrais, malformações e/ou baixa acuidade ocular (FREITAS et al., 2020; MOORE et al., 2017).

Em adultos, a infecção por ZIKV pode desencadear a Síndrome de Guillain-Barré, uma doença autoimune caracterizada pela rápida perda de tônus muscular e/ou paralisia (KATZ; GILBURD; SHOVMAN, 2019; LEONHARD et al., 2020). Enquanto a maior parte dos indivíduos afetados pela SGB se recuperam sem complicações, estima-se que 40% dos afetados necessitem de atendimento hospital intensivo (LEONHARD et al., 2020). Uma estimativa de custos financeiros diretos e indiretos dos casos de SGB ocorridos no Brasil no ano de 2016 alcançou um valor aproximado a 12 milhões de dólares, evidenciando a necessidade de monitoramento e prevenção da infecção por ZIKV (PEIXOTO et al., 2019).

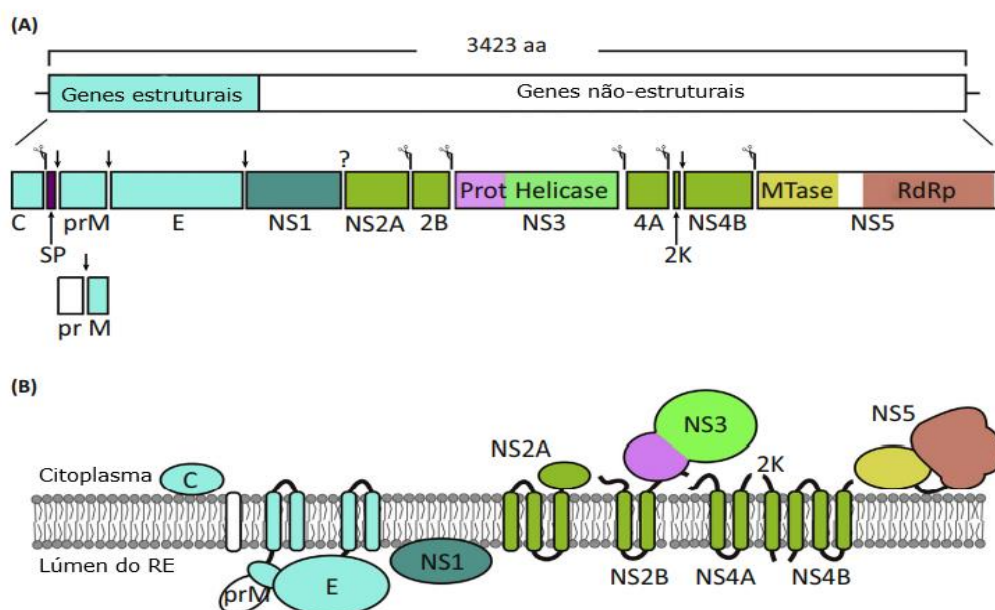
2.1.3 Aspectos filogenéticos, Genoma e Ciclo viral

Assim como outros vírus de importância médica como o DENV, o YFV, o vírus da Encefalite japonesa (JEV), o vírus do Oeste do Nilo (WNV) e o vírus da Encefalite do carrapato (TBEV), o Zika vírus (ZIKV) é membro da família Flaviviridae, (SIMMONDS et al., 2017). Entretanto, o ZIKV integra o sorocomplexo Spondweni, junto ao vírus que nomeia o grupo e cuja infecção em humanos resulta em manifestações clínicas similares aos presentes na infecção por ZIKV (HADDOW et al.,

2016). Análises genômicas e filogenéticas do ZIKV classificam as cepas circulantes em duas linhagens, a Africana e a Asiática, que divergem geneticamente em aproximadamente 11%, e são reconhecidas como um único sorotipo (LANCIOTTI et al., 2008; NUNES et al., 2020). Cepas da linhagem Asiática foram responsáveis pelos surtos ocorridos na Ásia, Oceania e Américas entre os anos de 2013 e 2016, e sequenciamentos de isolados demonstraram divergências genéticas suficiente para separá-las em duas sublinhagens: a Americana e Pacífica (HU et al., 2019).

Como outros vírus pertencentes ao gênero flavivírus, o ZIKV possui cerca de 50 nanômetros de diâmetro, e estrutura icosaédrica envolta por uma camada lipídica (HASAN et al., 2018). Seu genoma é composto por RNA de fita simples e senso positivo, de aproximadamente 10.800 pares de bases, e cujo único quadro aberto de leitura é flanqueado por regiões não traduzidas (NTRs) em cada extremidade (SHARMA et al., 2020). A poliproteína codificada pelo genoma do ZIKV é clivada por proteases virais e do hospedeiro e apresenta três proteínas estruturais e sete não estruturais: capsídeo (C), precursor da membrana/membrana (prM/M) e envelope (E), NS1 (*non-structural protein 1* – proteína não-estrutural 1), NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5 (Figura 2) (HASAN et al., 2018; LINDENBACH; RICE, 2003).

Figura 2 - Genoma do ZIKV e proteínas após processamento. (A) Processamento da poliproteína viral mediada por proteases virais e do hospedeiro. (B) Modelo proposto da topologia da poliproteína na membrana do Retículo Endoplasmático.



Fonte: Adaptado de Shi e Gao (2017).

O arcabouço que acomoda o genoma viral do ZIKV é composto por 180 cópias de cada uma das proteínas do capsídeo e envelope, que circundam múltiplas cópias da proteína do capsídeo contidas em uma camada bilipídica (HASAN et al., 2018). As proteínas não-estruturais, por sua vez, estão envolvidas nos processos de transcrição e replicação viral, processamento da poliproteína e evasão da resposta imunológica do hospedeiro (Tabela 1) (PIERSON; DIAMOND, 2018).

Tabela 1 - Principais funções atribuídas às proteínas não-estruturais dos Flavivírus.

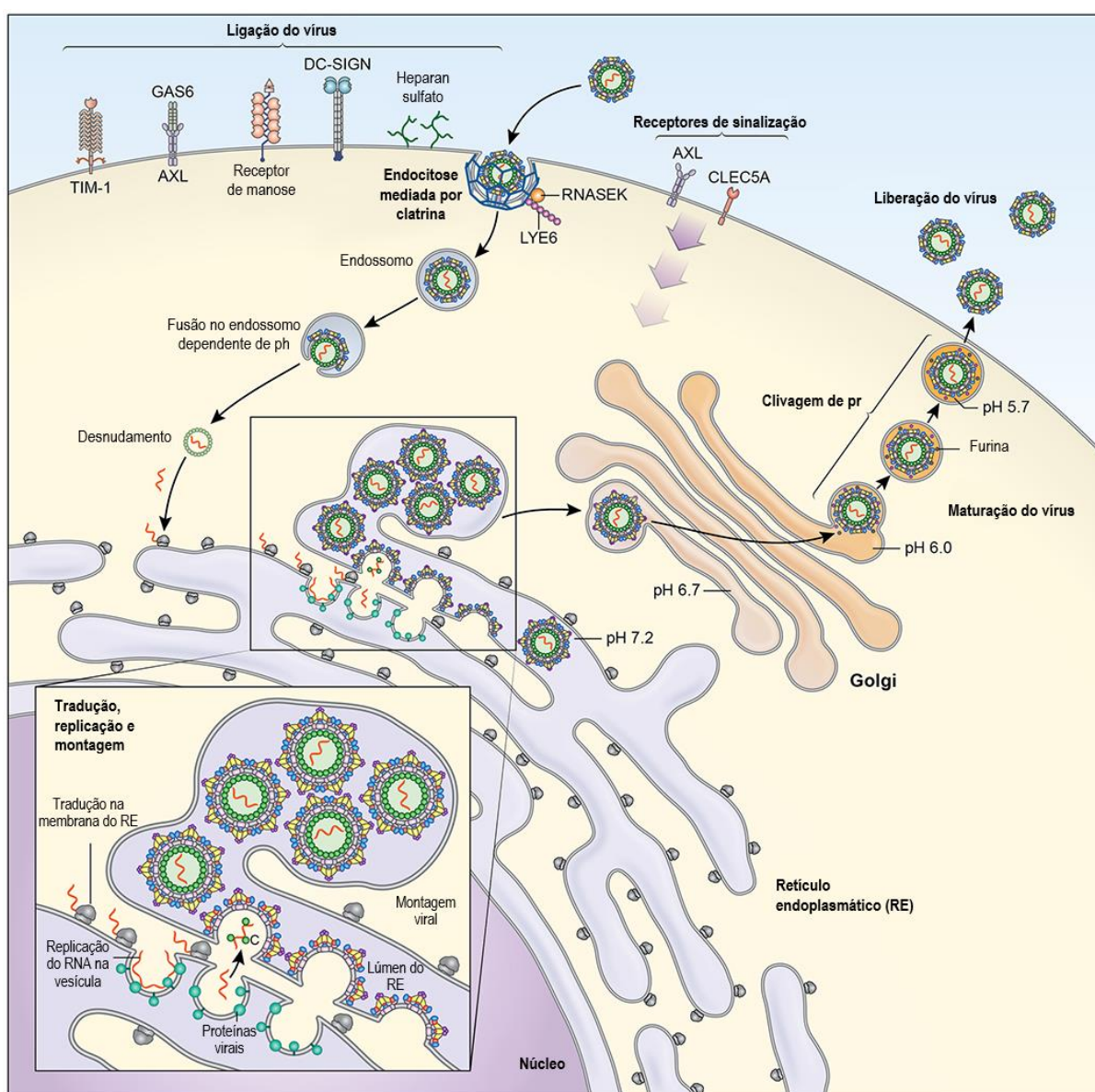
Proteína	Funções	Referências
	Age na formação do complexo de replicação viral.	
NS1	Participa da montagem e amadurecimento viral. Antagonista do sistema complemento.	(CARPIO; BARRETT, 2021)
	Inibe respostas mediadas por Interferons (IFN) tipo I e II.	
NS2A	Recrutamento do RNA genômico. Montagem viral.	(FANUNZA et al., 2021; ZHANG et al., 2019)
NS2B	Atua como cofator da porção protease de NS3.	(XING et al., 2020)
	N-terminal tem atividade serino-protease.	
NS3	C-terminal desempenha atividade helicase, RNA 5'-trifosfatase (RTPase) e nucleosídeo trifosfatase (NTPase).	(LI; KANG, 2021)
NS4A	Induz rearranjos de membrana. Participa da formação do complexo de replicação.	(KUMAR; KUMAR; GIRI, 2020)
NS4B	Auxilia a formação do complexo de replicação. Inibe sinalização por IFN tipo I.	(ZMURKO; NEYTS; DALLMEIER, 2015)
	Parte do complexo de replicação.	
NS5	Possui domínios metiltransferase (MTase) e RNA polimerase RNA dependente (RdRp). Suprime respostas IFN tipo I.	(ZHAO et al., 2019)

Fonte : A autora (2022).

Assim como observado em outros flavivírus, as regiões NTRs 5' e 3' do RNA do ZIKV se arranjam em estruturas secundárias, que desempenham funções importantes durante a replicação e tradução da proteína viral (NICOLAS CALDERON; FABIAN GALINDO; BERMUDEZ-SANTANA, 2021). A primeira etapa do ciclo viral observado no ZIKV ocorre mediante a ligação do vírus, por meio da proteína Envelope, a receptores de membrana presentes na superfície de células dos hospedeiros, que leva a entrada na célula por meio de endocitose (HASAN et al., 2018). Vários

receptores celulares como DC-SIGN, TAM, TIM, AXL, NMR e glicosaminoglicanos (GAGs) foram identificados como possíveis alvos de interação com o ZIKV, com usos diferenciais observados em tipos celulares distintos (FERRARIS et al., 2021). As etapas do ciclo viral dos flavivírus acima descritas estão representadas na Figura 3.

Figura 3 - Ciclo de replicação viral dos Flavivírus. A entrada dos vírus ocorre mediante interação de receptores de membrana das células do hospedeiro e proteínas do envelope viral. Com a endocitose, mudanças no pH levam a liberação do genoma viral no citoplasma celular. Após a tradução do mRNA viral, e subsequente formação de proteínas virais, ocorre a replicação e montagem viral no RE. A passagem de partículas imaturas pela rede trans-Golgi induz a maturação viral em maneira pH dependente. Os vírus maduros são então liberados ao meio extracelular.



Fonte: Adaptado de Pierson e Diamond (2020).

Resumidamente, o pH ácido do endossomo ocasiona mudanças conformacionais nas proteínas do envelope viral que se fundem à membrana endossômica, o que leva à liberação do RNA viral no citoplasma celular. Assim, nas membranas do retículo endoplasmático (RE), o mRNA viral é traduzido em uma única poliproteína que após processamento pós-traducional origina as proteínas estruturais e não-estruturais (HASAN et al., 2018). A montagem das partículas virais ocorre no lúmen do retículo endoplasmático, com a formação de partículas virais imaturas, não infecciosas, com múltiplos trímeros das proteínas E e prM, membrana lipídica e nucleocapsídeo presentes, protegendo o RNA viral (HEINZ; STIASNY, 2017). As partículas virais imaturas são transportadas para a rede trans do aparelho de Golgi, e o baixo pH local induz a novas mudanças conformacionais nas proteínas do envelope, e então proteases celulares clivam prM, separando a proteína M dos peptídeos pr. Esses peptídeos são responsáveis pela inibição da atividade fusogênica das proteínas do envelope, e sua remoção origina partículas virais maduras, que são então liberadas para o meio extracelular (HASAN et al., 2018).

2.1.4 Tropismo e patogênese viral

A heterogeneidade nas manifestações clínicas observada em decorrência da infecção por ZIKV pode ser atribuída à capacidade do vírus de se replicar em diversos tipos celulares e tecidos. A diversidade de receptores celulares possivelmente utilizados pelo ZIKV para entrada celular, como os receptores de fosfatidilserina das famílias TIM e TAM (TIM-1, TIM-4, Tyro3, Axl e Mer), um receptor de lectina do tipo C (DC-SIGN) e glicosaminoglicanos (Heparan sulfato), fornece indícios sobre o uso alternado de mecanismo de entrada celular a depender do tipo celular a ser infectado (FERRARIS et al., 2021; PIERSON; DIAMOND, 2020). De fato, o caráter pantrópico do ZIKV é corroborado por diversas publicações que evidenciam a infecção por esses vírus em diversos tipos celulares em humanos. A infecção por ZIKV já foi descrita em fibroblastos, queratinócitos e células dendríticas imaturas (HAMEL et al., 2015), em células do sistema nervoso como oligodendrócitos, microglias e astrócitos (CHRISTIAN; SONG; MING, 2019; SHER; GLOVER; COOMBS, 2019).

No contexto de tecidos e células envolvidos durante a gestação, o ZIKV foi detectado em células endoteliais, decíduais, citotrofoblastos, sinciciotrofoblastos, células Hofbauer, e ainda em macrófagos maternos (BHATNAGAR et al., 2017;

MARTINES et al., 2016; PARKER et al., 2020). A habilidade do ZIKV de atravessar as barreiras transplacentárias, e hemato-cefálica dos fetos de mães infectadas podem ocasionar danos diretos ao desenvolvimento neuromotor fetal, entretanto não se podem ser desconsiderados efeitos negativos no desenvolvimento neurológico de crianças aparentemente não afetadas expostas ao vírus (BHATNAGAR et al., 2017; MERCADO-REYES et al., 2021).

Alguns estudos demonstraram a persistência do ZIKV e RNA de interferência virais no sêmen e suas frações celulares, e a replicação do vírus em células testiculares germinativas humanas, o que sugere o testículo e epidídimo como possíveis reservatórios virais no trato reprodutivo masculino (JOGUET et al., 2017; KURSCHEIDT et al., 2019; MAHÉ et al., 2020). De maneira similar, o RNA viral já foi identificado em mulheres não-gestantes em amostras endocervicais e vaginais, embora pouco se conheça sobre os possíveis reservatórios no trato reprodutivo feminino humano (DA CRUZ et al., 2019; MURRAY et al., 2017; NICASTRI et al., 2016; VISSEAUX et al., 2016). Sendo assim, é possível que a persistência da infecção ZIKV nestes sítios colabore com os eventos de transmissão sexual do ZIKV.

O mRNA viral dos flavivírus, incluindo o do ZIKV, não é o único a contribuir para a patogenicidade observada durante o período de infecção. Os RNAs subgenômicos gerados por flavivírus (sfRNAs) estão envolvidos na inibição da resposta mediada por IFN-1 (Nicolas Calderon et al, 2021). O ZIKV produz ainda moléculas de RNA subgenômico resistentes a exonuclease 5'-3' Xrn1 (xrRNAs), cuja resistência está associada à sua estrutura em nó, e essas moléculas acumuladas nas células infectadas aumentam a patogenicidade viral ao interagir com proteínas do hospedeiro afetando atividades celulares normais (AKIYAMA et al., 2016; ZHAO; WOODSIDE, 2021).

2.1.5 Desenvolvimento vacinal e aspectos imunológicos

Como consequência da recente ressurgência do ZIKV e os efeitos nocivos associados à infecção, o desenvolvimento de estratégias farmacológicas e profiláticas foi amplamente incentivado por órgãos de saúde internacionais (FERRARIS; YSSEL; MISSÉ, 2019). Tratando-se de medidas profiláticas, diversos tipos e estratégias vacinais foram desenvolvidas, incluindo apresentações como vírus atenuados e inativados, vetores virais, partículas semelhantes a vírus (VLPs), e ácidos nucleicos

(PATTNAIK; SAHOO; PATTNAIK, 2020). Algumas das estratégias desenvolvidas e seus principais resultados estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Estratégias vacinais em estágio pré-clínico contra o ZIKV.

Tipos de vacinas	Antígenos	Imunogenicidade	Referências
DNA	prM e E	Forte indução de resposta celular e humoral. Imunização materna durante a gestação levou a produção de anticorpos neutralizantes de longa duração contra o ZIKV capazes de oferecer imunidade passiva a fetos.	(WANG et al., 2018)
DNA	prM e E	Indução de imunidade protetora contra três isolados de ZIKV.	(HRABER et al., 2018)
DNA	NS1	A vacina codificante de NS1 secretada, devido ao uso de um peptídeo sinal, induziu respostas humorais e T-dependentes robustas, capazes de oferecer proteção sistêmica com a infecção por ZIKV.	(GRUBOR-BAUK et al., 2019)
Subunidade	Envelope	Indução de produção de altos níveis de anticorpos neutralizantes, que ofereceram proteção completa contra viremia em camundongos imunocompetentes	(TO et al., 2018)
Subunidade	Fragmentos do Domínio III do Envelope (E 296–406; E 298–409; E 301–404)	Anticorpos específicos contra E 298–409 ofereceram proteção passiva contra o ZIKV em camundongos imunocomprometidos recém-nascidos e adultos.	(TAI et al., 2018)
Vírus atenuado	NS1 (com mutações que removeram sítios de N-glicosilação)	Proteção contra danos a placenta e mortes fetais em modelo <i>rhesus</i> .	(RICHNER et al., 2017)
Vetor viral	prM e E	Redução da viremia em camundongos, e resposta protetiva de longa duração	(LÓPEZ-CAMACHO et al., 2018)
Vírus inativado	—	Proteção completa em desafio letal em camundongos imunocompetentes após	(BALDWIN et

		duas doses	al., 2018)
VLPs	prM e E (produzidas em baculovírus)	Indução de resposta celular e de anticorpos neutralizantes	(DAI et al., 2018)
mRNA	prM e E	Forte resposta celular e humoral com uma dose baixa da vacina em múltiplos modelos murinos.	(ZHONG et al., 2019)

Fonte: Adaptada de Zhou et al (2021).

Embora alguns candidatos vacinais tenham avançado a fases clínicas, até o presente momento não há vacinas aprovadas para uso humano contra a infecção por ZIKV (HAN et al., 2021; SALISCH et al., 2021; TEBAS et al., 2021; ZHOU et al., 2021). Entretanto, os resultados obtidos nos ensaios pré-clínicos e clínicos forneceram dados importantes sobre o estabelecimento da imunidade protetora contra a infecção. As estratégias desenvolvidas contra o ZIKV utilizaram as bases estabelecidas por pesquisas a outros Flavivírus de importância médicas, como o DENV e YFV, que tem como principais antígenos as proteínas prM, Envelope e NS1 por serem capazes de elicitar resposta humoral (PIERSON; GRAHAM, 2016).

Um dos aspectos considerados necessários para o estabelecimento de resposta protetora duradoura contra infecções por Flavivírus é a produção de anticorpos com atividade neutralizante, o que é verdadeiro para infecções por ZIKV, sendo a proteína do Envelope o principal alvo desta resposta (SAPPARAPU et al., 2016; WANG et al., 2016). Esses anticorpos são capazes de impedir a ligação e entrada de flavivírus nas células, e têm papel importante na proteção sorotipo-específica, dado que anticorpos capazes de reconhecer múltiplos flavivírus podem atuar como potencializadores de infecção mediante interação com células que expressam receptores Fc-γ em suas superfícies, em um mecanismo conhecido como aprimoramento dependente de anticorpos (*ADE - Antibody-dependent enhancement*) (PIERSON; DIAMOND, 2020).

Anticorpos não neutralizantes, no entanto, podem exercer outros papéis na resposta imunológica contra flavivírus (RATHORE; ST. JOHN, 2020). A exemplo, anticorpos contra NS1, que não apresentam atividade neutralizante, podem ativar respostas dependentes e independentes de interação com receptores Fc, como a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) e fagocitose celular dependente de anticorpos (ADCP), respostas importantes para eliminação de células

infectadas. Além disso, esses anticorpos não são, aparentemente, capazes de causar a resposta ADE, como observada em infecções causadas por vírus que possuem múltiplos sorotipos, como o DENV (BAILEY et al., 2019; SANCHEZ VARGAS et al., 2021; YU et al., 2021).

Outro elemento importante a ser considerado é o papel de respostas T celulares anti-ZIKV, como demonstrado em estudos realizados com camundongos, primatas não humanos e humanos infectados (BADOLATO-CORRÊA et al., 2021; DUDLEY et al., 2016; ELONG NGONO et al., 2019; OSUNA et al., 2016; PARDY et al., 2017). O papel protetor de células T CD8⁺ foi demonstrado em um estudo onde situações de depleção e ausência genética para esta resposta em camundongos ocasionaram maiores níveis de replicação viral e mortalidades nos animais. A transferência passiva de células T CD8⁺ impediu o estabelecimento da infecção (ELONG NGONO et al., 2017). Resultados similares foram observados em animais imunocompetentes (HUANG et al., 2017). Células T CD4⁺ polifuncionais desempenham um papel relevante na proteção contra danos neurológicos em camundongos, e a ausência dessa resposta celular resultou em altos níveis de proliferação viral no sistema nervoso central dos animais (HASSERT et al., 2018). Em avaliações com camundongos deficientes para receptores de IFN tipo I, a transferência passiva de células T CD4⁺ ofereceu proteção contra modelos letais de infecção (ELONG NGONO et al., 2019; HASSERT et al., 2018).

Um estudo elaborado por Grubor-Bauk et al (2019), realizou a depleção de células T CD4⁺ e T CD8⁺ em camundongos Balb/c vacinados com uma vacina de DNA expressando NS1, e foi observado que anticorpos anti-NS1 não oferecem proteção na ausência de respostas celular após desafio viral (GRUBOR-BAUK et al., 2019). esses estudos indicam que a elaboração de estratégias vacinais contra o ZIKV devem considerar a capacidade de induzir respostas mediadas tanto por anticorpos quanto por células T CD4⁺ e T CD8⁺ para estabelecimento de respostas protetoras duradouras (PATTNAIK; SAHOO; PATTNAIK, 2020).

Os esforços implementados permitiram avanços importantes para a compreensão de aspectos imunológicos do ZIKV. Entretanto, as variações nos modelos utilizados, tais como antígenos, plataformas vacinais e avaliações das respostas imunológicas obtidas tornam difícil a definição de padrões de proteção imunológica comuns a todas as estratégias vacinais avaliadas contra o ZIKV (DIAMOND; LEDGERWOOD; PIERSON, 2019). Outro aspecto a ser considerado é

que com o declínio de novos casos, a avaliação da eficácia de vacinas contra o ZIKV em testes clínicos tornou-se difícil de ser realizada. O que torna ainda mais evidente a necessidade da definição clara de indicadores imunológicos de proteção para que seja possível a disponibilização de vacinas para uso humano (PATTNAIK; SAHOO; PATTNAIK, 2020). Vacinas eficientes contra o ZIKV devem induzir respostas imunológicas de longa duração, capazes de impedir a replicação, disseminação e patogênese viral, em adultos, crianças, e serem adequadas para imunização de mulheres grávidas, para a proteção dos fetos em gestação (DIAMOND; LEDGERWOOD; PIERSON, 2019).

2.2 ESTRATÉGIAS VACINAIS DO PRESENTE ESTUDO

2.2.1 Vacinas de DNA

A utilização de vacinas de DNA vem sendo amplamente explorada desde sua concepção no início dos anos 1990 (HOBERNIK; BROS, 2018; TANG; DEVIT; JOHNSTON, 1992). Essa tecnologia ganhou destaque por empregar antígenos específicos, representados por suas sequências gênicas naturais ou sintéticas, não sendo necessário o uso patógeno em sua integralidade. Em virtude de se utilizar uma sequência de DNA, o processamento nativo do antígeno pelo imunizado mimetiza a produção do peptídeo antigênico e resposta imunológica gerada por patógenos ou antígenos tumorais (KUTZLER; WEINER, 2008; ULMER et al., 1993). Este processo encontra-se resumido na Figura 4.

Vacinas de DNA oferecem vantagens importantes como formulação e produção rápidas que associadas a reprodutibilidade da produção e isolamento das moléculas em larga escala, permitem a rápida disponibilização de vacinas. Esses elementos são importantes em momentos de surtos e epidemias. São consideradas seguras por não utilizarem patógenos íntegros, ou tratados com produtos possivelmente tóxicos como vírus inativados. Apresentam estabilidade em temperatura ambiente, não sendo necessária a utilização de armazenamento e transporte em temperatura negativa. E demonstram ser capazes de induzir respostas celular e humoral em modelos animais. No entanto, testes em humanos demonstraram baixa eficiência em induzir respostas imunológicas robustas (KUTZLER; WEINER, 2008; SAADE; PETROVSKY, 2012).

Desse modo, diversas estratégias para a otimização da resposta imunológica gerada pela imunização por DNA vêm sendo desenvolvidas. Estas estratégias podem

ser realizadas na estrutura da vacina de DNA, ou quanto ao próprio antígeno, como a otimização de códons, seleção e utilização de epítomos de MHC-I e MHC-II, específicos aos patógenos de interesse com o auxílio de ferramentas de imunoinformática (OLI et al., 2020). Podem ainda ser referentes ao próprio vetor plasmidial e ao promotor utilizado, como adição de oligodeoxinucleotídeos CpG, sinais de localização celular e promotores híbridos. Sequências adjuvantes como peptídeos sinais, imunomoduladores, e codificantes para citocinas ou quimiocinas estimuladoras de células T e APCs também podem ser utilizadas (HOBERNIK; BROS, 2018).

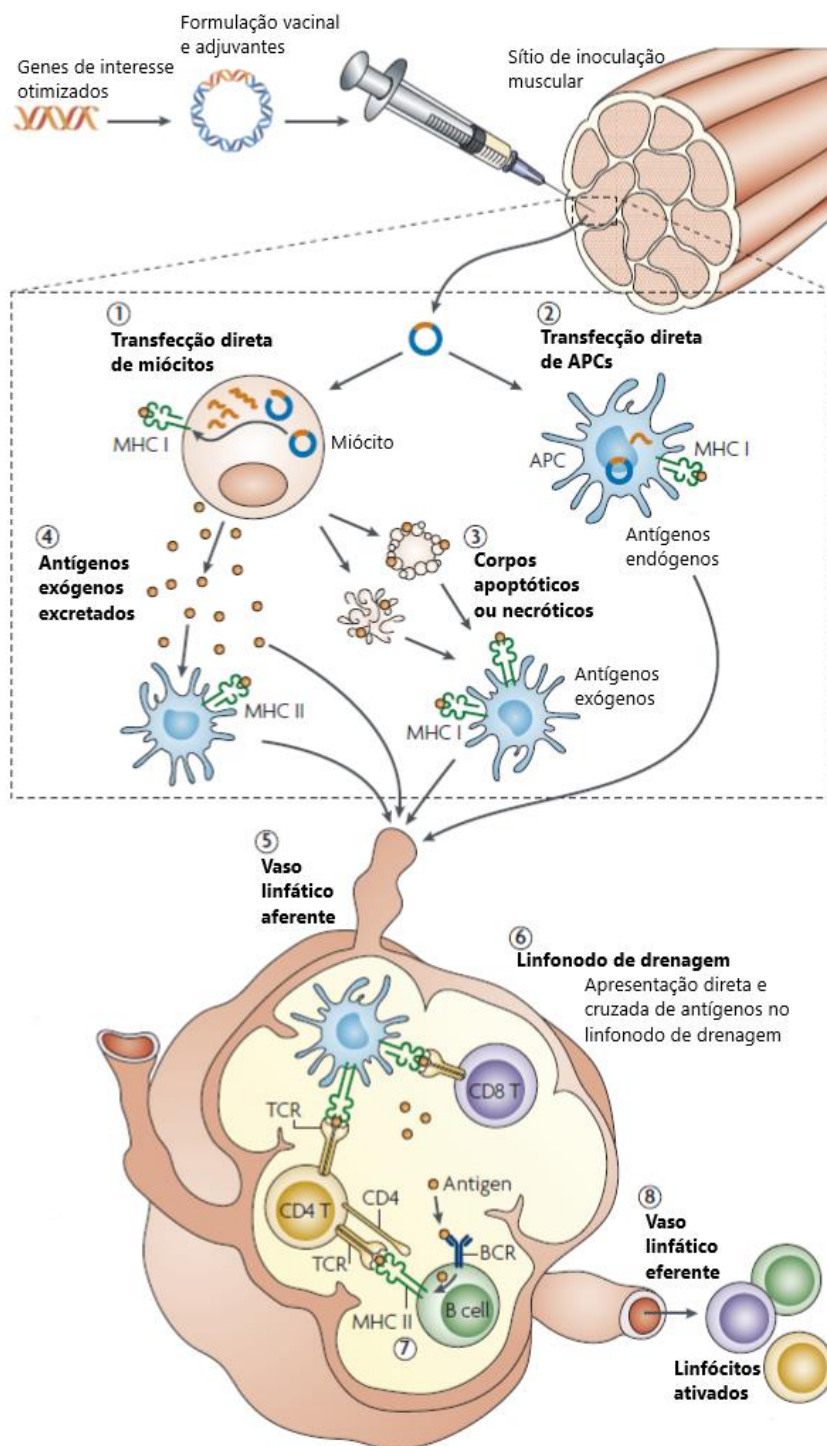
Além dessas modificações na molécula de DNA, a forma de carreamento e introdução celular como nanocarreadores lipídicos e proteicos, e eletroporação podem otimizar o número de moléculas que efetivamente entram nas células e auxiliar a montagem de respostas celulares robustas (JORRITSMA et al., 2016).

A eletroporação é uma técnica que consiste na aplicação local de pulsos elétricos de curta duração que permeabilizam a membrana celular por meio da formação de poros que permitem a entrada de moléculas (SARDESAI; WEINER, 2011). Essa técnica tem recebido destaque por aumentar expressivamente o número de moléculas transfectadas, e o dano local moderado causado leva ao recrutamento de células inflamatórias que contribuem com a duração e intensidade da resposta imunológica gerada pela imunização (LAMBRICHT et al., 2016).

Os esforços contínuos e os avanços obtidos para o melhoramento da imunogenicidade de vacinas de DNA têm sido avaliados em ensaios clínicos para o desenvolvimento de estratégias profiláticas e terapêuticas para diversas doenças, para humanos e animais, sendo possível a disponibilização de novas vacinas nos próximos anos (GARY; WEINER, 2020). Atualmente, existem 4 vacinas de DNA licenciadas para uso veterinário, duas para peixes, sendo uma para a doença do pâncreas em salmões e outra para o vírus da necrose hematopoiética; uma para o tratamento imunoterápico de câncer em cachorros; e uma contra o WNV em cavalos (LIU, 2019). Recentemente, foi aprovada a primeira vacina de DNA para uso humano contra a infecção por SARS-CoV-2 (DEY et al., 2021; MOMIN et al., 2021).

Figura 4 - Indução de imunidade celular e humoral por vacinas de DNA. A sequência antigênica de interesse é inserida em um vetor plasmidial por meio de reações enzimáticas e, unidos, esses elementos compõem a vacina de DNA. Após a expansão e purificação da vacina, ela pode ser inoculada por vias como a cutânea, subcutânea e muscular, onde células locais são transfectadas. **1-2.** A exemplo de transfecção intramuscular, pode ocorrer transfecção direta de miócitos e células apresentadoras de antígeno (APCs). Utilizando o aparato celular das células hospedeiras, a vacina de

DNA no núcleo das células é transcrita a mRNA, que no citosol é traduzido à proteína e passa por modificações pós-traducionais. **3-4.** Essas proteínas são processadas a peptídeos que são apresentados por moléculas dos MHC-I e MHC-II. APCs podem apresentar peptídeos endógenos resultantes de transfecção direta, ou exógenos resultantes. **5-6.** APCs apresentadoras de antígenos migram para linfonodos locais onde interagem via MHC com o receptor de célula T (TCR) *naïve* com auxílio de outras moléculas estimulatórias. Células T CD4+ ativadas liberam citocinas enquanto ligadas a moléculas co-estimulatórias necessárias à ativação de células B. **7.** Antígenos exógenos podem ser captados por receptores de célula B (BCR) presentes em células B que por sua vez podem apresentar o antígeno processado via MHC II a células T CD4+ *naïve*. **8.** Os linfócitos ativados deixam o linfonodo e em conjunto mediam respostas celulares e humorais.



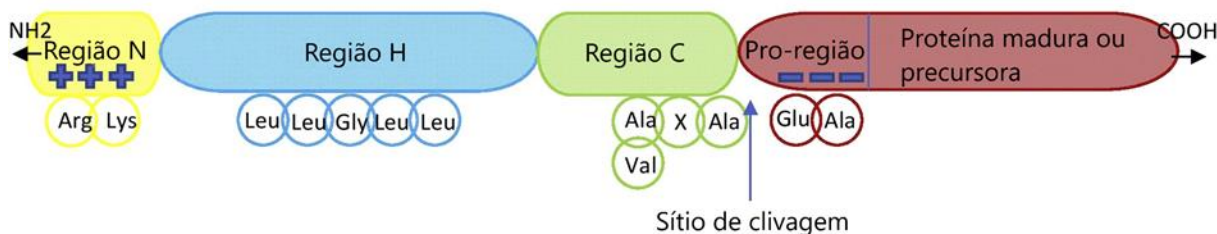
Fonte: Adaptado de Kutzler e Weiner (2008).

2.3 PEPTÍDEOS SINAIS

2.3.1 *Peptídeos sinais e suas aplicações*

Peptídeos sinais (SPs), também conhecidos como sequências sinalizadoras (SSs), são peptídeos com tamanhos entre 13-36 aminoácidos, presentes no N-terminal de proteínas, cuja função é auxiliar no direcionamento de polipeptídeos nascentes ao RE (EMANUELSSON et al., 2007; MØLHØJ; DEGAN, 2004). Esses peptídeos não apresentam sequências consenso com alto grau de conservação, mas exibem organizações estruturais comuns entre si. O peptídeo sinal pode ser dividido em três regiões: a região N, localizada no N-terminal da estrutura, positivamente carregada; a região H, composta por aminoácidos apolares; e a região C, localizada na porção C-terminal da estrutura, e que contém o sítio de clivagem do SP (VON HEIJNE, 1990) (Figura 5).

Figura 5 - Estrutura geral de um peptídeo sinal. O peptídeo sinal apresenta 3 regiões distintas. A região N, carregada positivamente. a região H, com aminoácidos apolares, e a região C, onde está localizado o sítio de clivagem do SP.



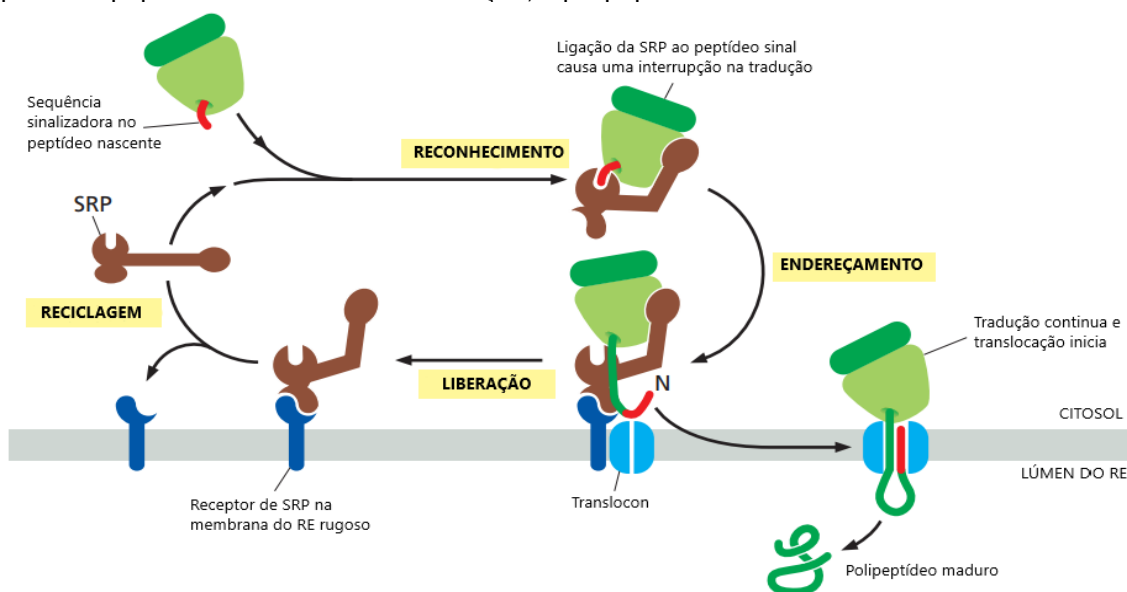
Fonte: Adaptado de Owji et al (2018).

Em eucariotos, o reconhecimento de um peptídeo sinal é realizado por uma partícula de reconhecimento de sinal (SRP), e ocorre co-traducionalmente. Após se ligar ao peptídeo sinal, a SRP passa por alterações conformacionais que afetam a ligação de fatores de alongamento, e ocasiona a parada temporária da tradução proteica. Esta interrupção exerce papel importante, pois impede o acúmulo de proteínas secretadas com possível ação nociva à célula no citosol, bem como previne o dobramento inadequado das proteínas nascentes no citosol (HEGDE; BERNSTEIN, 2006; KARAMYSHEV; TIKHONOVA; KARAMYSHEVA, 2020).

O complexo formado pela união da SRP-ribossomo permite o endereçamento e ligação deste complexo ao receptor de SRP presente na membrana do retículo endoplasmático que participa da transferência do complexo para o translocon, um complexo proteico da membrana do RE responsável pela translocação do

polipeptídeo nascente para o RE (GEMMER; FÖRSTER, 2020). A ligação entre o ribossomo e o translocon libera a SRP permitindo a retomada da tradução proteica e o polipeptídeo em formação é translocado para o lúmen do RE. Durante este processo, o peptídeo sinal é clivado por sinal-peptidases presentes na membrana do RE (KARAMYSHEV; TIKHONOVA; KARAMYSHEVA, 2020). Os eventos descritos acima estão ilustrados na Figura 6.

Figura 6 - Direcionamento por SRP de um ribossomo para a membrana do RE durante a síntese proteica. Em eucariotos, a SRP reconhece e se liga ao peptídeo sinal presente no N-terminal do peptídeo em tradução pelo ribossomo. O complexo ribossomo-SRP é direcionado à membrana do RE, onde se liga ao receptor de SRP que direciona o complexo ao translocador presente na membrana do RE. O SRP e seu receptor se dissociam do ribossomo, agora associado ao translocador. O peptídeo sinal e o polipeptídeo são inseridos na membrana do RE. Durante o processo, o peptídeo sinal é clivado por sinal-peptidases. Ao fim da translocação, o polipeptídeo maduro é liberado do translocon.



Fonte: Adaptado de Alberts et al (2015).

Embora a presença de um peptídeo sinal seja comumente associada a secreção da proteína por ele marcada para o meio extracelular, isto não é determinado apenas pela presença do mesmo, sendo possível o direcionamento para localizações intracelulares devido a presença de sequências de localização na estrutura polipeptídica (KELLOGG et al., 2021; MØLHØJ; DEGAN, 2004).

Entretanto, o direcionamento de proteínas a serem secretadas ao retículo endoplasmático por ação de SPs não apenas permite o trânsito eficiente destas proteínas para o Complexo de Golgi e subsequente liberação para o meio extracelular, como também pode impedir a degradação precoce ou dobramento incorreto da proteína produzida no citosol (KARAMYSHEV; TIKHONOVA; KARAMYSHEVA, 2020; WESTERS; WESTERS; QUAX, 2004).

A importância funcional de SPs se estende a outros processos biológicos e encontra aplicações nos mais diversos organismos, como exemplificado na Tabela 3. Essas aplicações podem gerar impactos positivos para o desenvolvimento biofarmacêutico, auxiliando na produção de novos fármacos e estratégias terapêuticas e profiláticas de diversas doenças.

Tabela 3 - Aplicações e achados relativos à utilização de peptídeos sinais.

Aplicação	Origem do SP	Achados	Referências
Produção de proteínas recombinantes	BiP (proteína de ligação à imunoglobulina) de <i>Drosophila</i>	Aumento relevante da produção de proteínas recombinantes. Impedimento da formação de corpos de inclusão e da degradação proteica por proteases	(MERGULHÃO; SUMMERS; MONTEIRO, 2005; OHMURO-MATSUYAMA; YAMAJI, 2018)
Alvo de drogas	CD4 humana	Alvos da droga ciclotriazadissulfonamida, inibindo a produção de CD4 nos tímócitos humanos, apresentando potencial contra infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana.	(VERMEIRE et al., 2014)
Terapia gênica	IL-2	A utilização de um SP otimizado levou ao aumento do nível sérico da molécula terapêutica	(ZHANG; LENG; MIXSON, 2005)
Retardo do enovelamento de proteínas por utilizar códons não usuais	β -lactamase e MBP (proteína de ligação a Maltose)	Redução expressiva de proteínas secretadas devido a substituição de códons não usuais naturais por otimizados	(KANG et al., 2014; ZALUCKI; BEACHAM; JENNINGS, 2009)
Controle da tradução e transcrição	Interferon-12b de <i>Escherichia coli</i>	Modificação da estrutura secundária do mRNA e o início da tradução devido a alteração dos códons presentes no SP.	(RAMANAN et al., 2010)
Candidatos vacinais	Peptídeos tumorais e bacterianos; calreticulina humana; elementos do MHC	Ativação da imunidade inata e as respostas mediadas por células. Atuação independente do transportador associado ao processamento de antígeno. Direcionamento efetivo do antígeno ao RE, evitando acúmulo de proteínas heterólogas no citosol e auxiliando a homeostase celular.	(ALADIN et al., 2007; KOVJAZIN; CARMON, 2014; PEREZ-TRUJILLO et al., 2017)

Fonte: Adaptado de Owji et al (2018).

Diversos estudos demonstraram que aplicação de SPs heterólogos a espécie produtora das proteínas recombinantes pode ser eficaz, resultar em uma maior eficiência na tradução proteica e consequentemente maior biodisponibilidade e produção da proteína de interesse (HEMMERICH et al., 2016; KOBER; ZEHE; BODE, 2013; OHMURO-MATSUYAMA; YAMAJI, 2018). Esta capacidade foi explorada para

o desenvolvimento de vacinas de DNA profiláticas e terapêuticas contra o HPV-16 utilizando um peptídeo sinal derivado uma sequência sinalizadora derivada de *Phaseolus vulgaris*, chamada ssPGIP, a mesma utilizada na presente pesquisa. No trabalho conduzido por Massa e colaboradores (2017), a fusão de ssPGIP ao N-terminal das sequências sintéticas das proteínas L2 e E7 do HPV-16 resultou na forte indução da resposta imune humoral em camundongos C57BL/6, sendo essa indução considerada relevante uma vez que a produção de anticorpos por parte de vacinas de DNA pode ser limitada (MASSA et al., 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e avaliar candidatos a vacina de DNA com base em sequências das proteínas do Envelope e NS1 do Zika vírus, tendo como antígenos construções multiepítopos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desenvolver vacinas de DNA multiepítopos associadas ou não ao peptídeo sinal ssPGIP para profilaxia da infecção por ZIKV;
2. Avaliar a resposta imune in vivo induzida pelas construções vacinais, utilizando camundongos Balb/c como modelo animal;
3. Avaliar se a adição de ssPGIP a construção multiepítopo induz resposta imunológica diferenciada ao candidato sem o peptídeo sinal.

4 ARTIGO 1 - AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DE UM CANDIDATO A VACINA DE DNA MULTIEPÍTOPO CONTRA O ZIKA VÍRUS PELA UTILIZAÇÃO DE UM PEPTÍDEO SINAL DERIVADO DE PLANTAS

Artigo a ser submetido para a revista Vaccine (ISSN: 0264-410X) – Fator de impacto: 4,169; Qualis/CAPES Ciências Biológicas I: B1

Lígia Rosa Sales Leal¹, Anna Jéssica Duarte Silva¹, André Luiz Santos de Jesus², Georon Ferreira de Sousa³, Bárbara Rafaela da Silva Barros³, Cristiane Moutinho Lagos de Melo³, Lindomar José Pena⁴, Francesca Paolini⁵, Aldo Venuti⁵, Antonio Carlos de Freitas^{1*}.

¹ Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimentos, Departamento de Genética, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

² Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso (IFMT) – Campus Avançado Lucas do Rio Verde, Lucas do Rio Verde, Mato Grosso, Brazil

³ Laboratório de Análises Imunológicas e Anti-tumorais, Departamento de Antibióticos, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

⁴ Laboratório de Virologia e Estudos Experimentais, Departamento de Virologia, Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Recife, Pernambuco, Brasil

⁵ Unidade de HPV, UOSD Imunologia Tumoral e Imunoterapia, IRCCS Instituto Nacional de Câncer Regina Elena, Istituti Fisioterapici Ospitalieri (IFO), Roma, Itália

*Autor correspondente em: Chefe do Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental, Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

E-mail: acf.ufpe@yahoo.br

Resumo

A associação da infecção por Zika vírus (ZIKV) ao desenvolvimento de alterações congênitas que comprometem o desenvolvimento neuromotor de crianças afetadas demonstra a necessidade do desenvolvimento de estratégias profiláticas contra este vírus, que permanece sem vacinas licenciadas para uso humano. Nesta pesquisa, avaliamos o potencial imunogênico de uma vacina de DNA codificante de uma sequência multiepítipo com alvos em células T CD4, T CD8 e B derivada dos genes Envelope e NS1, e de uma versão da mesma fusionada ao peptídeo sinal ssPGIP. A imunização de camundongos imunocompetentes Balb/c por duas doses das vacinas de DNA avaliadas induziu a resposta T CD4+ e T CD8+, com produção de anticorpos associados ao perfil Th1. A presença de ssPGIP induziu a produção de citocinas do

perfil Th1, Th2 e Th17, enquanto sua ausência foi associada a um discreto aumento de células T CD4+ e T CD8+ com pobre produção de citocinas. Os resultados obtidos indicam que estratégias focadas em epítomos podem ser uma alternativa segura para indução de resposta imunológicas eficientes. A exploração de peptídeos sinais tais como o utilizado neste trabalho pode contribuir para a melhor expressão dos antígenos escolhidos com alvos imunológicos.

Palavras-chave: Zika vírus. Vacina de DNA. Epítomos. T CD4+. T CD8+. Anticorpos.

Introdução

Atualmente observamos poucos casos confirmados de infecção ZIKV nos países previamente afetados pela epidemia de 2015-2016 [1],[2]. Isso pode ser atribuído a ausência de relatos de casos de reinfecção descritos na literatura, assim como proteção cruzada conferida por infecções prévias por outros flavivírus [3]. No entanto, diante dos casos de malformações congênitas e de Guillain-Barré em adultos observadas durante os surtos anteriores [4],[5], além da persistência de transmissão do vírus nas Américas [6], torna-se necessário a atenção quanto à possibilidade de novos surtos epidêmicos e estratégias profiláticas. Apesar dos esforços direcionados ao desenvolvimento de vacinas contra o ZIKV, a diminuição dos casos notificados e complicações associadas nos anos recentes reduziu o ritmo dos testes em curso. Consequentemente, nenhuma vacina foi licenciada para uso em humanos [7].

Desde o princípio do surto epidêmico em 2016, uma parte significativa das estratégias vacinais desenvolvidas para o ZIKV extrapolaram o já conhecido potencial de indução de anticorpos neutralizantes produzidos em resposta a epítomos presentes em prM e E dos flavivírus [7],[8]. Algumas dessas estratégias utilizam vacinas de DNA como plataforma de imunização em estudos com modelos murinos e primatas não humanos que demonstraram a efetividade destes [9],[10],[11],[12],[13]. Entretanto, o sucesso de vacinas de DNA em animais de pequeno porte é dificilmente replicável em humanos, exigindo a utilização de mecanismos de melhoramento tais como a eletroporação *in vivo*, técnica conhecida por melhorar a permeabilidade celular a entrada de moléculas de DNA [14], e cuja inflamação local pode auxiliar e melhorar o estabelecimento da resposta adaptativa [15],[16],[17]. De modo similar, quanto ao desenvolvimento de vacinas de DNA tem sido observado a aplicação de adjuvantes e

potencializadores imunológicos, como imunoestimuladores e peptídeos sinais, como forma de otimização da imunogenicidade [18], [19].

Em estudo anterior Massa e colaboradores [20] avaliaram os efeitos sobre o processamento intracelular e de secreção de antígenos derivados do HPV-16 quando fusionados ao peptídeo sinal ssPGIP, um peptídeo derivado do feijão-vulgar, para o desenvolvimento de vacinas de DNA terapêuticas. Neste estudo, observou-se uma indução forte e duradoura na produção de anticorpos em resposta a imunização com antígenos fusionados a ssPGIP, demonstrando seu potencial como melhorador da resposta humoral para vacinas de DNA.

O potencial imunogênico de uma vacina multiepítopo baseada nas proteínas Não-Estrutural 1 (NS1) e do Envelope do ZIKV foi recentemente avaliada *in vitro* em uma plataforma de levedura inteira [21]. Esta construção compreende oito epítomos do Envelope e seis de NS1 preditos *in silico* como possíveis alvos de ação de células T CD4, T CD8 e B, uma vez que são componentes necessários a resposta eficiente contra infecção por Zika vírus [22],[23],[24], [25]. Neste estudo, nós avaliamos a imunogenicidade de uma vacina de DNA contendo epítomos do Envelope e NS1 do ZIKV, fusionado ao peptídeo sinal ssPGIP e avaliamos sua eficiência em potencializar a resposta imunológica como estratégia contra o Zika vírus

2. Materiais e Métodos

2.1 Considerações éticas

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Utilização de Animais do Instituto Aggeu Magalhães (IAM; Fundação Oswaldo Cruz – PE, Brasil) (Anexo 1). Todos os experimentos animais foram desenvolvidos seguindo as diretrizes de biossegurança e manejo animal do Biotério do Instituto Aggeu Magalhães.

2.2 Vírus, células e reagentes

O isolado ZIKV_{PE243} (número de referência no *GenBank* KX197192) foi providenciado pelo Dr. Lindomar Pena (Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, PE). A propagação viral foi realizada em células VERO, segundo descrito por Baz, 2020 [26]. A titulação viral foi executada utilizando o método de sobreposição de agarose em placa de 6 poços [26]. As células HEK 293T utilizadas para transfecção foram cultivadas em

meio DMEM (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) e 100 U/ml de penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich).

2.3 Desenho e construção vacinal

Os epítomos do Envelope e NS1 do ZIKV utilizados neste trabalho foram previamente descritos [21]. Inicialmente, foi feita a amplificação da sequência referente a construção multiepítipo, intitulada EnvNS1, a partir do vetor pCloneEnvNS1 e inserida no vetor pVAX1 (Invitrogen). O plasmídeo pVAX-ss-L21–200-E7* (Massa et al, 2017), contendo a sequência sinalizadora ssPGIP, foi gentilmente cedido pelo Dr. Aldo Venuti (Instituto Nacional do Câncer Regina Elena, Roma, Itália) e utilizado com molde para amplificação de ssPGIP (cuja sequência codifica o peptídeo MTQFNIPVTMSSSLSIIL-VILVSLRTALS) [20]. Esta sequência foi fusionada a porção N-terminal da sequência EnvNS1, e inserida no vetor pVAX1. Os DNAs plasmidiais foram transformados em *Escherichia coli* TOP10. Todos os DNAs recombinantes foram digeridos por restrição enzimática e sequenciados pelo método de Sanger para confirmação da acurácia das sequências. Células de *E. coli* TOP10 contendo pVAX_EnvNS1 ou pVAX_ssEnvNS1 foram cultivadas sob agitação a 37°C em meio Luria Bertani com Canamicina (50ug/ml) por 16 horas e extraídas com o kit PureLink™ Expi Endotoxin-Free Maxi Plasmid Purification (Invitrogen).

2.4 Transfecção de células de mamífero e imunofluorescência

A expressão dos candidatos vacinais foi detectada por meio de imunofluorescência. Para isso, 1×10^5 de células HEK 293T foram distribuídas por poço em uma lâmina Nunc® Lab-Tek® Chamber Slide System (Thermo Fisher Scientific) de 8 poços e incubadas até o estabelecimento de 50% de confluência. As células foram então transfectadas transientemente com as construções vacinais (500 ng por poço) e o vetor vazio pVAX1 com o reagente de transfecção Lipofectamine™ 3000 (Thermo Fisher Scientific) segundo as instruções do fabricante e incubadas por 24 horas em estufa com 5% CO₂ a 37°C.

Para a realização da microscopia de fluorescência, as células crescidas na lâmina multi-câmara foram lavadas 3 vezes com PBS pH 7.4 gelado, fixadas por 20 minutos com 4% paraformaldeído, permeabilizadas por 10 minutos com 0,1 % Triton X-100 em PBS, e bloqueadas com a solução de bloqueio (1% BSA, PBS pH 7.6, 0,05% Tween 20 e glicina a 22,52 mg/ml) por 1 hora em temperatura ambiente (TA)

sob agitação. Após o bloqueio, as células foram incubadas com uma diluição 1:3000 do anticorpo monoclonal Anti-6X His tag produzido em camundongo (Sigma-Aldrich) em TA por 1 hora sob agitação. Após a retirada do anticorpo primário, as células foram incubadas com uma diluição de 1:5000 do anticorpo Anti-Mouse IgG (whole molecule)–FITC produzido em cabra (Sigma-Aldrich) por 40 minutos em TA sob agitação. Os núcleos celulares foram contrastados com 0,5 µg/ml de 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI) (Sigma-Aldrich). As lâminas foram analisadas com o microscópio Leica DM2500 e as imagens foram obtidas com o programa CytoVision DM2500 sob aumento de 100 vezes.

2.5 Avaliação da imunogenicidade em camundongos

Camundongos BALB/c fêmeas entre 6 – 8 semanas foram imunizados por injeção intramuscular no músculo tibial anterior com 50 µg de pVAX_EnvNS1, pVAX_ssEnvNS1, ou pVAX1 vazio (controle), duas vezes com intervalo de uma semana entre as imunizações. Imediatamente após cada imunização, realizou-se a eletroporação do local de inoculação nas seguintes condições: 175V/cm, 8 pulsos, 20 ms (BTX Harvard - ECM® 830). Duas semanas após a segunda dose vacinal, os animais foram anestesiados (Cloridrato de Xilazina 10 mg/Kg e Cetamina 115 mg/Kg) e eutanasiados por deslocamento cervical. O sangue e baço dos animais foram coletados para realização de ensaios imunológicos, bioquímicos e hematológicos.

2.6 Isolamento de esplenócitos para ensaios imunológicos

Os esplenócitos dos animais imunizados foram tratados com Ficoll-Paque PLUS 1.077 g/mL (GE Healthcare Life Sciences) para o isolamento das células mononucleares. As células isoladas foram distribuídas em placas de 48 poços com 10^6 células por poço. As células foram reestimuladas com 10^5 partículas virais de ZIKV_{PE243} e cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) por períodos de 24, 48 e 72 horas.

2.7 Citometria de fluxo

Os marcadores de superfície anti-CD4-FITC, anti-CD8-PE e anti-CD16/32-FITC (BD Bioscience) foram utilizados para avaliar a proliferação das subpopulações de células T CD4+, CD8+ e CD16+ presentes no sangue e esplenócitos reestimulados *in vitro*. Resumidamente, os linfócitos foram centrifugados, lavados com PBS

(suplementado com BSA 0,5% e azida 0,1%), e incubados com os anticorpos correspondentes a cada marcador de superfície. A presença de sete citocinas, interleucina-2 (IL-2), IL-4, IL-6, IL-17, IL-10, interferon- γ (IFN- γ) e fator de necrose tumoral α (TNF- α), foi avaliada a partir do soro e do sobrenadante da cultura dos esplenócitos dos animais imunizados. Para isso foi utilizado o Cytometric bead array (CBA) mouse TH1/TH2/TH17 cytokine kit (BD Biosciences), seguindo as instruções do fabricante. O soro animal foi analisado para concentrações relativas dos anticorpos IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, IgM e IgE por meio do kit Mouse Immunoglobulin Isotyping Cytometric Bead Array (BD Biosciences, San Diego, CA) seguindo as instruções do fabricante para a realização do experimento. As análises foram executadas nos citômetros de fluxo BD FACSCalibur™ e BD Accuri™ C6 Plus, e analisadas com os softwares Flowing (Turku Biosciences) e BD Accuri C6 Software.

2.8 Análises hematológicas e bioquímicas

As amostras de sangue colhidas foram distribuídas em microtubos contendo EDTA K2 (Hemstab), e centrifugadas a 500 x g por 10 minutos, para separação do plasma. A avaliação hematológica consistiu em: números totais de hemácias, leucócitos e plaquetas; determinação do hematócrito (Ht), concentração de hemoglobina, volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). A contagem celular foi realizada na câmara de Neubauer, e para a contagem diferencial em lâminas coradas foi utilizado o método Panótico Rápido [27]. O número de plaquetas foi determinado pelo método de Fonio [28]. A concentração de hemoglobina foi obtida por colorimetria utilizando espectrofotômetro.

Para os testes bioquímicos, ensaios enzimáticos colorimétrico de ponto final foi empregado para obtenção dos níveis de glicose, ureia e creatinina presentes. Para a detecção da fosfatase alcalina foi utilizado o método cinético – colorimétrico Roy modificado, e para as transaminases hepáticas o método de Reitman - Frankel.

2.9 Análises estatísticas

Os gráficos e a análise estatística foram gerados pelo GraphPad Prism versão 9.0.0. O teste de análise de variância (ANOVA) foi aplicado para avaliar diferenças estatísticas entre os grupos. Resultados com valor de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$).

3. Resultados

3.1 Definição dos candidatos, clonagem no vetor pVAX1 e imunofluorescência

A sequência multiepítopo EnvNS1 e uma fusão da mesma com o peptídeo sinal ssPGIP foram clonadas no vetor pVAX1 (Figura 1A). Os epítomos foram arranjados em grupos de alvos imunológicos, e separados com as sequências linker EAAAKE-AAAKEAAK (entre epítomos de células B), AEAAAKEAAK (entre epítomos T CD4) e AAY (entre epítomos T CD8) (Figura 1 B). A sequência multiepítopo finalizada está descrita Figura 1 C. Após a clonagem dos candidatos EnvNS1 e ssEnvNS1 em pVAX1 foi realizada a digestão enzimática pelas enzimas *NheI* e *XhoI* para a confirmação dos clones recombinantes referentes aos candidatos vacinais (Figura 1 D). A análise de imunofluorescência de células HEK 293T transfectadas com pVAX_EnvNS1 e pVAX_ssEnvNS1 foi realizada para confirmação da expressão das proteínas codificadas pelos candidatos vacinais (Figura 1 E). Para as duas construções de DNA foi observado a presença de fluorescência no citoplasma e membranas intracelulares, com destaque para fluorescência aumentada associada a expressão de ssEnvNS1.

3.2 Análise de citocinas Th1, Th2 e Th17 presentes no sangue

Após 14 dias da segunda dose dos imunizantes recolheu-se o sangue dos animais imunizados e do grupo controle pVAX1. A partir do soro obtido deste material foi realizada a análise das citocinas induzidas sistemicamente. Não houve detecção significativa das citocinas dosadas nos animais do grupo pVAX_EnvNS1 quando comparado ao grupo pVAX. Para as análises do pVAX_ssEnvNS1 observa-se uma produção significativa de IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-17A e IL-10 (Figura 2 A, B, C, D, E, F e G) quando comparado aos grupos pVAX e EnvNS1, com destaque para IL-2, TNF- α , IL-4, IFN- γ e IL-6 (Figura 2 A, C, D, F e G). A partir desses dados, observamos um perfil misto de resposta Th1/Th2/Th17 no grupo imunizado por pVAX_ssEnvNS1.

3.3 Detecção de linfócitos circulantes após duas doses vacinais

A análise percentual de linfócitos T CD4+, CD8+ e CD16+ após a imunização foi feita por citometria de fluxo. Um aumento significativo no número de células CD4+ foi observado a partir das amostras derivadas dos animais imunizados com as duas vacinas, com destaque naqueles referentes ao grupo imunizado com pVAX_EnvNS1 quando comparado com o grupo controle (Figura 3 A). Em relação a população de

células CD8⁺ foram observados níveis discretamente superiores para os grupos imunizados com pVAX_EnvNS1 e pVAX_ssEnvNS1 em relação ao controle (Figura 3 B). Em contrapartida, houve uma diminuição no estímulo à produção de linfócitos CD16⁺ no grupo ssEnvNS1 em relação aos grupos pVAX1 e pVAX_EnvNS1 que apresentaram níveis similares de produção observados (Figura 3 C).

3.4 Citocinas produzidas por esplenócitos em resposta a estímulo viral

Para caracterizar a indução de uma resposta sistêmicas, foram dosadas as citocinas secretadas pelos esplenócitos dos camundongos imunizados que foram estimulados *in vitro* com ZIKV. Não foram observados níveis significativos de IL-4, IL-2, IFN- γ e IL-17A nos períodos estabelecidos de estímulo. Entretanto, os esplenócitos derivados do grupo pVAX_ssEnvNS1 apresentaram um pico de secreção TNF- α (Figura 4 A) em 48 horas de estímulo, assim como elevação dos níveis de IL-6 (Figura 4 B) em 48 e 72 horas, indicando um perfil pró-inflamatório de resposta. Os esplenócitos derivados do grupo pVAX_EnvNS1 apresentaram um nível de IL-6 (Figura 4 B) similar ao grupo ssEnvNS1 em 72h, e produção significativa de IL-10 (Figura 4 C) no 3 dia de estímulo. Assim, esses perfis indicam um tendências diferenciadas de resposta entre os grupos, com tendência de resposta Th1 para o grupo pVAX_ssEnvNS1 e misto Th1/Th2 para o grupo pVAX_EnvNS1.

3.5 Proliferação de células T CD4⁺, CD8⁺ e CD16⁺ em resposta a estímulo em linfócitos isolados do baço

A ativação de linfócitos CD4⁺, CD8⁺ e CD16⁺ frente ao estímulo por ZIKV também foi avaliada em períodos de 24h, 48h e 72h de cultura dos esplenócitos dos camundongos imunizados. Ao analisar a população de células CD4⁺ (Figura 5 A) é possível observar um discreto aumento no percentual celular ao longo dos períodos para todos os grupos avaliados. No período de 24h, há uma diferença significativa entre EnvNS1 e os grupos pVAX_ssEnvNS1 e pVAX1 que apresentam níveis similares entre si. No entanto, há uma elevação no percentual observado de pVAX_ssEnvNS1 na cultura de 48h frente a pVAX_EnvNS1 e pVAX1, e nota-se ainda uma diferença significativa entre esses dois últimos. Em contraste com o que se observou nos tempos de 24h e 48h, houve um aumento expressivo em 72h da resposta para pVAX_ssEnvNS1 em relação aos níveis observados para pVAX1 e pVAX_EnvNS1. Tratando-se das avaliações para linfócitos CD8⁺ (Figura 5 B) observou-se um pico de resposta para

pVAX_EnvNS1 na cultura de 24 horas, com forte significância em relação aos outros dois grupos. No entanto, houve uma diminuição no nível observado para pVAX_EnvNS1 na cultura de 48 horas ainda que este se apresenta estatisticamente significativo em relação aos outros grupos. Para ambos grupos imunizados houve uma regulação negativa dos níveis analisados em 72 horas. Como um todo, não houve proliferação significativa para as análises do grupo pVAX_ssEnvNS1. Nas análises referentes a linfócitos CD16+ (Figura 5 C) o estímulo produzido em pVAX_ssEnvNS1 apresentou um único pico de proliferação em 24h, significativamente superior aos grupos restantes, porém seguiu em declínio contínuo da resposta em 48h e 72h. pVAX_EnvNS1 por sua vez, demonstrou pico proliferativo em 48h, que não foi mantido em 72h.

3.6 Detecção de anticorpos no soro dos camundongos imunizados

A resposta humoral gerada em decorrência da imunização foi avaliada por meio da isotipagem de anticorpos presentes no soro imunizado. Uma indução robusta da resposta imune inata representada pelo nível de IgM foi observada nos animais imunizados por pVAX_ssEnvNS1 (Figura 6 A). Ainda para este grupo, observaram-se níveis significativos de IgG3, IgG2a e IgG1 (Figura 6 B, C, D), 14 dias após a dose de reforço. Diferente ao observado para pVAX_ssEnvNS1, a imunização por pVAX_EnvNS1 não ocasionou produção significativa de IgM, induzindo a produção de IgG3, IgG2a, IgG1, IgG2b e IgE (Figura 6 B, C, D, E e F). Nenhum dos grupos imunizados levou a produção de IgA (Figura 6 G).

Através das análises das razões calculadas entre os subtipos IgG2a, IgG2b e IgG1 é possível indicar tendências do perfil de resposta imunológica associado a imunização, sendo Th1 (IgG2a) ou Th2 (IgG1 e IgG2b) [29]. Para esse fim, foram calculadas as razões entre (IgG1/IgG2a) e (IgG2b/IgG2a), pelos quais valores menores que 1, são considerados indicativos de resposta Th1 (Tabela 1). Ambas vacinas apresentaram valores inferiores a 1, indicando a indução de um perfil de resposta Th1, com valores discretamente menores observados para pVAX_ssEnvNS1.

3.7. Avaliação de reações adversas decorrentes da imunização

O peso, grau aparente de atividade dos animais e os sítios de inoculação e eletroporação, foram observados para a notificação de alterações ao decorrer do cronograma vacinal. Não foram observadas alterações comportamentais significativas tais como agressividade e letargia no período experimental. Os sítios de inoculação e

eletroporação não apresentaram danos. Todos os animais foram pesados antes dos eventos de imunização (1º e 7º dias) bem como no 21º dia, no qual foi realizada a eutanásia dos animais. Na tabela 2 estão descritas as médias por grupo em cada pesagem realizada, e concluiu-se que não houve alterações significativas de peso.

3.8 Alterações clínicas

Para avaliar se o processo de imunização causou alguma alteração clínica aos camundongos vacinados, foram realizadas análises hematológicas e bioquímicas a partir do sangue coletado ao final do cronograma vacinal. Em relação aos parâmetros hematológicos, não houve alterações significativas e os valores aferidos são similares entre os grupos (Tabela 3). No entanto, considerando-se os valores de referência utilizados, todos os grupos apresentaram leucocitose caracterizada por neutrofilia e linfopenia. Similarmente, não foram constatadas alterações significativas quando analisados os parâmetros bioquímicos utilizados em todos os grupos (Tabela 4).

Discussão

Nesta pesquisa, avaliamos a imunogenicidade de duas vacinas de DNA que codificam como antígeno uma sequência contendo múltiplos epítomos do Envelope e NS1 do Zika vírus, sendo uma delas fusionada ao peptídeo sinal ssPGIP, e avaliada quanto sua capacidade de melhoramento da imunogenicidade. O desenvolvimento de vacinas de DNA multiepítomos apresenta um importante diferencial por possibilitarem a utilização de epítomos cujos alvos imunológicos tais como células B e T, levando a indução respostas humoral e celular, aliada às características inerentes de uma vacina de DNA, como estabilidade térmica, produção rápida e barata [30].

O papel da resposta imunológica direcionada a epítomos presentes no Envelope e NS1 tem sido descrito em alguns estudos de modelo *ex vivo* com PBMCs de pacientes convalescentes da infecção por Zika vírus [31], [32], [33]. Alguns dos epítomos utilizados neste trabalho mostraram ser reconhecidos por células T CD4+ de memória em humanos, como LVTCAKFAC (E₁₁₃₋₁₂₁), VQLTVVGS (NS₁₈₄₋₉₂), WRLKRAHLI (NS₁₂₁₀₋₂₁₈) [31]. Além destes, três epítomos selecionados para esta estratégia estão localizados no EDIII, conhecido como um dos principais alvos da resposta neutralizante por anticorpos durante a infecção por ZIKV [10], [34], [35]. Pesquisas demonstram a indução de respostas celular e humoral robustas por parte de candidatos baseados na NS1 do ZIKV, e reforçam a importância da ativação de células T

para estabelecimento de imunidade protetiva [13], [36], em linha com dados que indicam que respostas seguras podem ser induzidas por proteínas não estruturais [36].

Para avaliar a imunogenicidade das duas vacinas de DNA construídas neste trabalho, pVAX_EnvNS1 e pVAX_ssEnvNS1, realizamos a imunização de camundongos Balb/c. A análise de citocinas sistêmicas presentes no soro dos animais após 14 dias da dose de reforço indica que a imunização por pVAX_EnvNS1 não é capaz de induzir uma produção duradoura de nenhuma das citocinas avaliadas. Isto contrasta diretamente com o observado para o grupo imunizado com pVAX_ssEnvNS1 o qual levou a um aumento na produção de todas as citocinas avaliadas. Apesar de induzir resposta celular e humoral, como relatado em ensaios clínicos com humanos, vacinas de DNA são fracamente imunogênicas sendo este um dos desafios para sua utilização [37]. Diversos eventos parecem estar envolvidos, dentre eles a rápida degradação da molécula de DNA, a necessidade de seu deslocamento para núcleo celular para transcrição e localização final da proteína codificada [38],[39].

A adição de sequências que codificam moléculas com ação adjuvante como citocinas, ligantes de receptores *Toll-like* e peptídeos sinais são empregadas como potencializadores da imunogenicidade de vacinas de DNA [18],[19]. Nesta pesquisa, utilizamos o peptídeo sinal ssPGIP, previamente utilizado por Franconi e colaboradores (2006) e Massa e colaboradores (2017), em estudos para produção de vacinas terapêuticas e profiláticas contra o HPV-16 [20],[40]. A avaliação de seu efeito em vacinas de DNA partiu da observação de que a ssPGIP assim como outros peptídeos sinais de eucariotos apresenta características estruturais conservadas que possibilitam sua utilização em mamíferos. Quando avaliados em desafio tumoral em camundongos fêmeas, as vacinas de DNA fusionadas a ssPGIP foram capazes de elicitar respostas celular e humoral, com produção de IgG marcadamente mais robusta do que aquelas observadas nas vacinas sem o peptídeo sinal [20].

Os dados obtidos a partir das análises de imunofluorescência demonstram a localização citoplasmática das proteínas codificadas pela sequência EnvNS1. É interessante observar, entretanto, a maior intensidade na fluorescência captada pelas células transfectadas com ssEnvNS1. Desse modo, é possível que a fusão de ssPGIP à sequência multiepítipo possa ter direcionado a proteína nascente ao lúmen do RE, possibilitando um processamento traducional e pós-traducional mais eficiente, permitindo um maior nível da proteína sintetizada [41].

A análise de citocinas produzidas em resposta a imunização por pVAX_ssEnvNS1 demonstrou produção significativa de todas as moléculas avaliadas, indicando um perfil multifuncional de produção de células T. A imunização por pVAX_ENVNS1, induziu uma discreta produção de IL-10 e TNF- α . Entretanto, esses resultados não são significativos quando comparado ao grupo controle pVAX1. Neste estudo, esplenócitos derivados dos animais imunizados foram estimulados *in vitro* com ZIKV para detecção de citocinas produzidas em resposta. Para o grupo pVAX_ssENVNS1, houve a produção de TNF- α e IL-6, enquanto no grupo pVAX_ENVNS1 houve produção de IL-6 e IL-10. Embora discretamente diferenciadas, as citocinas produzidas indicam tendências distintas de resposta com pVAX_ssENVNS1 apresentando tendência a Th1 e pVAX_ssENVNS1 um perfil misto Th1/Th2.

Níveis elevados de citocinas derivadas de diversas subpopulações de células T são observadas durante a infecção aguda por Zika vírus, com um balanço delicado entre respostas pró e anti-inflamatórias presente na resposta inicial à infecção viral. Citocinas associadas a perfis Th1, Th2, Th9 e Th17 como IL-1 β , IL-2, IL-6, IFN- γ e TNF- α (Th1), IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (Th2), IL-9 (Th9) e IL-17 (Th17) são as mais relatadas [42],[43],[44]. Enquanto na fase convalescente observam-se produções de TNF- α , IFN- γ IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-13 [42], [43]. Desse modo, visto que as vacinas avaliadas no presente trabalho são compostas por múltiplos epítomos originados de duas proteínas do Zika vírus, e que tem como alvos células T CD4+ e CD8+, este direcionamento pode originar um perfil polifuncional de resposta imunológica.

O papel protetivo de células T CD4+ e T CD8+ efetoras contra a infecção pelo vírus da Dengue é corroborado por pesquisas com humanos infectados [45], [46], [47]. De maneira similar, é provável que a indução de uma forte resposta por células T seja necessária para o desenvolvimento de vacinas contra o Zika vírus eficientes, mas há bastante pontos a esclarecer quanto aos papéis definidos dos subtipos celulares envolvidos na resposta imune protetora contra a infecção [48], [49].

Como parte da caracterização do perfil de imunogenicidade das vacinas de DNA deste estudo foram realizadas análises das subpopulações de células T CD4+, T CD8+ e T CD16+. Estas análises foram feitas avaliando a presença destas subpopulações circulantes após imunização dos animais e por meio de estímulo dos esplenócitos dos animais imunizados, com o Zika vírus. Entre as subpopulações analisadas a partir do sangue, a maior proliferação foi observada para células T CD4+, para

ambos os grupos imunizados, com maior percentual destas células observado no grupo imunizado por pVAX_EnvNS1.

No entanto, os esplenócitos estimulados *in vitro* apresentaram um perfil diferente, com ativação dos linfócitos derivados do grupo pVAX_EnvNS1 apenas nas primeiras 24 horas de cultivo. Para os esplenócitos do grupo pVAX_ssEnvNS1 o estímulo ocorreu ao longo do período de cultura, com elevação progressiva até as 72 horas. Células T CD4⁺ tem papel fundamental na produção e manutenção duradoura da resposta mediada anticorpos sendo, portanto, importante a sua ativação mediante a vacinação [50], [51]. Ensaios em modelos animais demonstraram que a infecção por Zika vírus induz a proliferação de células T CD4⁺ foliculares (Tfh) e reguladoras, essenciais a produção de anticorpos neutralizantes contra a infecção [24],[52].

Hassert e colaboradores (2018) ao avaliar os efeitos da depleção de células T CD4⁺ em camundongos *Ifnar1*^{-/-} infectados por Zika vírus, observaram sérios danos neurológicos e carga viral elevadas no sistema nervoso central dos animais infectados na ausência de células T CD4⁺. Ainda, demonstraram que a transferência de células T CD4⁺ de camundongos imunizados foi suficiente para proteção contra desafio letal em camundongos susceptíveis à infecção por Zika vírus [53].

Alguns estudos em modelos animais demonstraram a capacidade protetora linfócitos T CD8⁺ polifuncionais e com atividade citotóxica contra a infecção pelo ZIKV, capaz de reduzir títulos virais e gerar células de memória [22],[23],[54],[55]. No estudo conduzido por Elong Ngono e colaboradores (2020), a resposta mediada por T CD8⁺ induzida por vacinação com a proteína NS3 do ZIKV demonstrou ser eficiente em proteger camundongos HLA-B*0702 *Ifnar1*^{-/-} da infecção letal mesmo na ausência de anticorpos neutralizantes [56].

A imunização por pVAX_ssEnvNS1 e pVAX_EnvNS1 induziu proliferação sistêmica moderada de células T CD8⁺ segundo analisado ao fim do período experimental. Entretanto, durante a estimulação *in vitro* dos esplenócitos dos camundongos imunizados apenas em células derivadas do grupo pVAX_EnvNS1 foi observado estímulo, com proliferações detectadas entre 24-48 horas.

É possível que a discreta ativação de células T CD8⁺ ocorra devido a um menor processamento dos epítomos escolhidos, que por sua vez também se apresentam em menor número de alvos na construção multiepítopo (HLA-A: 3/14; HLA-A e DR: 2/14). Enquanto evidências indicam que a resposta mediada por células T CD4⁺ é induzida por epítomos presentes em todo genoma do ZIKV, a resposta mediada por células T

CD8⁺ é fortemente direcionada a epítomos presentes nas proteínas não estruturais do vírus [56]. Entretanto, um dos epítomos presentes na construção multiepítomo, NS1₂₆₂₋₂₇₅, está presente um epítomo recentemente caracterizado como imunodominante em resposta a infecção por ZIKV, com potencial atividade citotóxica [57]. De todo modo, é importante considerarmos que os epítomos T CD8⁺ selecionados para esta pesquisa estão em sua maioria presentes na proteína E, o que pode não favorecer a resposta mediada por esta subpopulação celular.

A expressão de CD16 é observada em monócitos intermediários e não clássicos, e células Natural Killer (NK), estas últimas compõem parte da resposta inata a infecções virais [58],[59]. Neste contexto, avaliamos a resposta mediada por células T CD16⁺ após a imunização, mas não houve detecção significativa para ambas vacinas de DNA. Entretanto, a análise dos esplenócitos reestimulados demonstraram ativação transitória em 24 horas para pVAX_{ssEnvNS1} e em 48 horas para pVAX_{EnvNS1}. Após 72 horas de estímulo, foi observado uma redução notável em ambos os grupos. Este resultado é similar ao obtido por Silva e colaboradores (2021), que avaliaram *in vitro* o potencial estimulatório da sequência multiepítomos utilizada no presente trabalho, utilizando leveduras recombinantes como carreadoras [21]. A suprarregulação de moléculas do MHC I e inibição da atividade de células NK foi descrita durante a infecção por ZIKV, com expressões limitadas ou ausentes [60].

Como parte da avaliação da resposta humoral estimulada após a imunização pelas vacinas de DNA, foi realizada a isotipagem de anticorpos presentes no soro dos camundongos após o encerramento dos 21 dias do esquema de imunização. Na infecção natural por ZIKV, os anticorpos IgM são detectados logo após o início dos sintomas e podem perdurar por mais de 12 meses [61]. Em indivíduos previamente infectados pelo vírus da Dengue, anticorpos IgM específicos a ZIKV apresentaram pouca reatividade cruzada e foram capazes de induzir resposta neutralizante [62].

Após 14 dias da última dose vacinal foi possível detectar níveis expressivos de IgM no grupo imunizado por pVAX_{ssEnvNS1}. Ambas as vacinas apresentaram estímulos similares à produção de anticorpos IgG3, IgG2a, IgG1, IgG2b e IgE. Estes resultados assemelham-se aos observados em um estudo de que explorou o papel de células Tfh *Th1-like* no desenvolvimento da resposta humoral contra o ZIKV, identificadas como essenciais para a resposta neutralizante e para mudança de classe de anticorpos IgG2a em camundongos BALB/c [52]. Os dados obtidos em nosso estudo sugerem uma estimulação humoral polarizada à Th1 para pVAX_{ssEnvNS1} e

pVAX_EnvNS1. Entretanto, considerando a complexidade da resposta imunológica contra a infecção por ZIKV é preciso considerar outros componentes da resposta induzida pelas vacinas testadas.

Este trabalho apresenta algumas limitações, tal como o uso de camundongos Balb/c imunocompetentes sem estudos de desafio imunológico, uma vez que a baixa susceptibilidade a infecção por ZIKV destes animais os limitam como modelo, sendo comum a utilização de doses letais de infecção para estudos de proteção [63]. Frequentemente, animais nocauteados para STAT2 e *lfnar*^{-/-} são utilizados como modelos de infecção uma vez que a via de sinalização de IFN- γ tipo I é considerada essencial para proteção inata contra infecções por flavivírus. Entretanto, estes modelos limitam a avaliação de resposta mediadas por células B e T na proteção contra infecção [64].

Outra limitação é a ausência de dados sobre a capacidade neutralizante dos anticorpos produzidos em resposta as vacinas avaliadas nesta pesquisa. Assim como ocorre com outros flavivírus de importância médica, as proteínas estruturais da pre-membrana (prM) e do Envelope (E) são os principais alvos da resposta mediada por anticorpos neutralizantes, de modo que grande parte das estratégias de imunização desenvolvidas as utiliza como antígeno [65]. Entretanto, estas proteínas apresentam alta similaridade nucleotídica e estrutural entre os flavivírus, de modo que há possibilidade de desencadeamento de aprimoramento dependente de anticorpos (ADE - Antibody-dependent enhancement) devido a produção de anticorpos de reação cruzada [66]. Assim, a existência de áreas onde múltiplos flavivírus circulam implica o desenvolvimento de candidatos vacinais que evitem esta reação.

Estudos recentes que utilizaram a proteína NS1 como imunógeno demonstraram capacidade de proteção sistêmica contra a infecção por ZIKV mesmo na ausência de anticorpos neutralizantes, com anticorpos não-neutralizantes agindo através de citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos e citotoxicidade dependente de complemento [13],[67],[68],[69]. Estas observações evidenciam a importância do desenvolvimento de estratégias vacinais contra o ZIKV que consideram a resposta mediada por células e não apenas a resposta humoral neutralizante. Tomados em conjunto, os resultados neste trabalho demonstram a capacidade de indução de resposta T CD4⁺, T CD8⁺ e produção de anticorpos de perfil Th1 em resposta a imunização por ambos as vacinas avaliadas.

A fusão do peptídeo sinal ssPGIP resultou em resposta diferenciada a vacina codificante do multiepitopo com perfil polifuncional de citocinas dos perfis Th1, Th2 e Th17. Enquanto que a ativação de células T CD4+ e CD8+ observada para pVAX_EnvNS1 foi mais robusta e persistente. Análises posteriores quanto a capacidade neutralizante dos anticorpos induzidos pela imunização com nossos candidatos vacinais, bem como a avaliação da indução de proteção mediante desafio imunológico serão necessárias para determinação da viabilidade do emprego destes imunizantes em estratégias vacinais profiláticas contra o Zika vírus.

Conflitos de interesse

Os autores declaram que não têm interesses financeiros conflitantes ou relações pessoais que possam ter influenciado o trabalho relatado neste artigo.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer o auxílio de Dr. Darlene Paiva Bezerra (Universidade Federal de Pernambuco, Brasil) por seu auxílio durante as sessões de microscopia de imunofluorescência.

Contribuições

LRSL concepção e desenho do estudo, realização de experimentos, obtenção e interpretação de dados, escrita do manuscrito. AJDS: Concepção e desenho do estudo, realização de experimentos, obtenção e interpretação de dados, revisão do manuscrito. ALSJ: Concepção e desenho do estudo, revisão do manuscrito. GFS: Realização de experimentos. BRSB: Realização de experimentos. LJP: Revisão do manuscrito. CLML: Realização de experimentos, obtenção e interpretação de dados, revisão do manuscrito. AV: Revisão do manuscrito. ACF: Concepção e desenho do estudo, revisão e aprovação da versão final do manuscrito.

Financiamento

Este trabalho foi financiado pela agência brasileira Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) Edital 04/2016 – PPE: Vírus Zika, APQ-0110-2.02/16.

Disponibilidade de dados

Os dados obtidos e analisados durante o desenvolvimento deste trabalho estão disponíveis mediante a solicitação ao autor correspondente.

Referências

- [1] Faria NR, Quick J, Claro IM, et al. Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas. *Nature*. 2017 Jun 15;546(7658):406-410. doi: 10.1038/nature22401. Epub 2017 May 24. PMID: 28538727; PMCID: PMC5722632.
- [2] Hills SL, Fischer M, Petersen LR. Epidemiology of Zika Virus Infection. *J Infect Dis*. 2017 Dec 16;216(suppl_10):S868-S874. doi: 10.1093/infdis/jix434. PMID: 29267914; PMCID: PMC5853392.
- [3] Rodriguez-Barraquer I, Costa F, Nascimento EJM, et al. Impact of preexisting dengue immunity on Zika virus emergence in a dengue endemic region. *Science*. 2019 Feb 8;363(6427):607-610. doi: 10.1126/science.aav6618. PMID: 30733412; PMCID: PMC8221194..
- [4] Brasil P, Pereira JP Jr, Moreira ME, et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *N Engl J Med*. 2016 Dec 15;375(24):2321-2334. doi: 10.1056/NEJMoa1602412. Epub 2016 Mar 4. PMID: 26943629; PMCID: PMC5323261.
- [5] Petersen E, Wilson ME, Touch S, et al. Rapid Spread of Zika Virus in The Americas--Implications for Public Health Preparedness for Mass Gatherings at the 2016 Brazil Olympic Games. *Int J Infect Dis*. 2016 Mar;44:11-5. doi: 10.1016/j.ijid.2016.02.001. Epub 2016 Feb 4. PMID: 26854199.
- [6] Yakob L. Zika Virus after the Public Health Emergency of International Concern Period, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2022 Apr;28(4):837-840. doi: 10.3201/eid2804.211949. PMID: 35318937; PMCID: PMC8962915.
- [7] Diamond MS, Ledgerwood JE, Pierson TC. Zika Virus Vaccine Development: Progress in the Face of New Challenges. *Annu Rev Med*. 2019 Jan 27;70:121-135. doi: 10.1146/annurev-med-040717-051127. Epub 2018 Nov 2. PMID: 30388054.
- [8] Shan C, Xie X, Shi PY. Zika Virus Vaccine: Progress and Challenges. *Cell Host Microbe*. 2018 Jul 11;24(1):12-17. doi: 10.1016/j.chom.2018.05.021. Epub 2018 Jun 28. PMID: 30008291; PMCID: PMC6112613.
- [9] Dai L, Song J, Lu X, et al. Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. *Cell Host Microbe*. 2016 May

11;19(5):696-704. doi: 10.1016/j.chom.2016.04.013. Epub 2016 May 2. PMID: 27158114.

[10] Zhao H, Fernandez E, Dowd KA, et al. Structural Basis of Zika Virus-Specific Antibody Protection. *Cell*. 2016 Aug 11;166(4):1016-1027. doi: 10.1016/j.cell.2016.07.020. Epub 2016 Jul 27. PMID: 27475895; PMCID: PMC4983199.

[11] Muthumani K, Griffin BD, Agarwal S, et al. In vivo protection against ZIKV infection and pathogenesis through passive antibody transfer and active immunisation with a prMEnv DNA vaccine. *NPJ Vaccines*. 2016 Nov 10;1:16021. doi: 10.1038/npjvaccines.2016.21. PMID: 29263859; PMCID: PMC5707885.;

[12] Wang R, Liao X, Fan D, Wang L, Song J, Feng K, Li M, Wang P, Chen H, An J. Maternal immunization with a DNA vaccine candidate elicits specific passive protection against post-natal Zika virus infection in immunocompetent BALB/c mice. *Vaccine*. 2018 Jun 7;36(24):3522-3532. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.04.051. Epub 2018 May 9. PMID: 29753607.;

[13] Grubor-Bauk B, Wijesundara DK, Masavuli M, et al. NS1 DNA vaccination protects against Zika infection through T cell-mediated immunity in immunocompetent mice. *Sci Adv*. 2019 Dec 11;5(12):eaax2388. doi: 10.1126/sciadv.aax2388. PMID: 31844662; PMCID: PMC6905874.

[14] Babiuk S, Baca-Estrada ME, Foldvari M, et al. Increased gene expression and inflammatory cell infiltration caused by electroporation are both important for improving the efficacy of DNA vaccines. *J Biotechnol*. 2004 May 13;110(1):1-10. doi: 10.1016/j.jbiotec.2004.01.015. PMID: 15099900.

[15] Lambricht L, Lopes A, Kos S, et al. Clinical potential of electroporation for gene therapy and DNA vaccine delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. 2016;13(2):295-310. doi: 10.1517/17425247.2016.1121990. Epub 2015 Dec 19. Erratum in: *Expert Opin Drug Deliv*. 2016;13(5):769. PMID: 26578324.

[16] Todorova B, Adam L, Culina S, et al. Electroporation as a vaccine delivery system and a natural adjuvant to intradermal administration of plasmid DNA in macaques. *Sci Rep*. 2017 Jun 23;7(1):4122. doi: 10.1038/s41598-017-04547-2. PMID: 28646234; PMCID: PMC5482824.

[17] Adam L, Tchitchek N, Todorova B, Rosenbaum P, Joly C, Poux C, Chapon C, Spetz AL, Ustav M, Le Grand R, Martinon F. Innate Molecular and Cellular Signature in the Skin Preceding Long-Lasting T Cell Responses after Electroporated DNA

- Vaccination. *J Immunol.* 2020 Jun 15;204(12):3375-3388. doi: 10.4049/jimmunol.1900517. Epub 2020 May 8. PMID: 32385135; PMCID: PMC7276943.
- [18] Li L, Petrovsky N. Molecular mechanisms for enhanced DNA vaccine immunogenicity. *Expert Rev Vaccines.* 2016;15(3):313-29. doi: 10.1586/14760584.2016.1124762. Epub 2015 Dec 28. PMID: 26707950; PMCID: PMC4955855.
- [19] Suschak JJ, Williams JA, Schmaljohn CS. Advancements in DNA vaccine vectors, non-mechanical delivery methods, and molecular adjuvants to increase immunogenicity. *Hum Vaccin Immunother.* 2017 Dec 2;13(12):2837-2848. doi: 10.1080/21645515.2017.1330236. Epub 2017 Jun 12. PMID: 28604157; PMCID: PMC5718814.
- [20] Massa S, Paolini F, Curzio G, et al. A plant protein signal sequence improved humoral immune response to HPV prophylactic and therapeutic DNA vaccines. *Hum Vaccin Immunother.* 2017 Feb;13(2):271-282. doi: 10.1080/21645515.2017.1264766. Epub 2017 Jan 24. PMID: 28118086; PMCID: PMC5328226.
- [21] Silva AJD, Jesus ALS, Leal LRS, et al. *Pichia pastoris* displaying ZIKV protein epitopes from the Envelope and NS1 induce in vitro immune activation. *Vaccine.* 2021 Apr 28;39(18):2545-2554. doi: 10.1016/j.vaccine.2021.03.065. Epub 2021 Apr 2. PMID: 33814233.
- [22] Elong Ngono A, Vizcarra EA, Tang WW, et al. Mapping and Role of the CD8+ T Cell Response During Primary Zika Virus Infection in Mice. *Cell Host Microbe.* 2017 Jan 11;21(1):35-46. doi: 10.1016/j.chom.2016.12.010. PMID: 28081442; PMCID: PMC5234855.
- [23] Huang H, Li S, Zhang Y, Han X, Jia B, Liu H, Liu D, Tan S, Wang Q, Bi Y, Liu WJ, Hou B, Gao GF, Zhang F. CD8+ T Cell Immune Response in Immunocompetent Mice during Zika Virus Infection. *J Virol.* 2017 Oct 27;91(22):e00900-17. doi: 10.1128/JVI.00900-17. PMID: 28835502; PMCID: PMC5660488.
- [24] Elong Ngono A, Young MP, Bunz M, et al. CD4+ T cells promote humoral immunity and viral control during Zika virus infection. *PLoS Pathog.* 2019 Jan 24;15(1):e1007474. doi: 10.1371/journal.ppat.1007474. Erratum in: *PLoS Pathog.* 2019 May 28;15(5):e1007821. PMID: 30677097; PMCID: PMC6345435.
- [25] Badolato-Corrêa J, Carvalho FR, Paiva IA, et al. Differential Longevity of Memory CD4 and CD8 T Cells in a Cohort of the Mothers With a History of ZIKV Infection and Their Children. *Front Immunol.* 2021 Feb 12;12:610456. doi: 10.3389/fimmu.2021.610456. PMID: 33679748; PMCID: PMC7928292.

- [26] Baz M. Zika Virus Isolation, Purification, and Titration. *Methods Mol Biol.* 2020;2142:9-22. doi: 10.1007/978-1-0716-0581-3_2. PMID: 32367355.
- [27] Horobin RW. How Romanowsky stains work and why they remain valuable - including a proposed universal Romanowsky staining mechanism and a rational troubleshooting scheme. *Biotech Histochem.* 2011 Feb;86(1):36-51. doi: 10.3109/10520295.2010.515491. PMID: 21235292.
- [28] Comar, SR, Danchura, HSM, Silva, PH. Contagem de plaquetas: avaliação de metodologias manuais e aplicação na rotina laboratorial. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* [online]. 2009, v. 31, n. 6, pp. 431-436. doi: 10.1590/S1516-84842009005000087. Epub 11 Dez 2009. ISSN 1806-0870.
- [29] Eroglu E, Singh A, Bawage S, et al. Immunogenicity of RSV F DNA Vaccine in BALB/c Mice. *Adv Virol.* 2016;2016:7971847. doi: 10.1155/2016/7971847. Epub 2016 Sep 5. PMID: 27688769; PMCID: PMC5027326.
- [30] Gary EN, Weiner DB. DNA vaccines: prime time is now. *Curr Opin Immunol.* 2020 Aug;65:21-27. doi: 10.1016/j.coi.2020.01.006. Epub 2020 Apr 4. PMID: 32259744; PMCID: PMC7195337.
- [31] Campbell VL, Nguyen L, Snoey E, et al. Proteome-Wide Zika Virus CD4 T Cell Epitope and HLA Restriction Determination. *Immunohorizons.* 2020 Aug 4;4(8):444-453. doi: 10.4049/immunohorizons.2000068. PMID: 32753403; PMCID: PMC7839664.
- [32] Reynolds CJ, Watber P, Santos CNO, et al. Strong CD4 T Cell Responses to Zika Virus Antigens in a Cohort of Dengue Virus Immune Mothers of Congenital Zika Virus Syndrome Infants. *Front Immunol.* 2020 Feb 18;11:185. doi: 10.3389/fimmu.2020.00185. PMID: 32132999; PMCID: PMC7040481.
- [33] Crooke SN, Ovsyannikova IG, Kennedy RB, Poland GA. Identification of naturally processed Zika virus peptides by mass spectrometry and validation of memory T cell recall responses in Zika convalescent subjects. *PLoS One.* 2021 Jun 2;16(6):e0252198. doi: 10.1371/journal.pone.0252198. PMID: 34077451; PMCID: PMC8171893.
- [34] Robbiani DF, Olsen PC, Costa F, et al. Risk of Zika microcephaly correlates with features of maternal antibodies. *J Exp Med.* 2019 Oct 7;216(10):2302-2315. doi: 10.1084/jem.20191061. Epub 2019 Aug 14. PMID: 31413072; PMCID: PMC6781003.

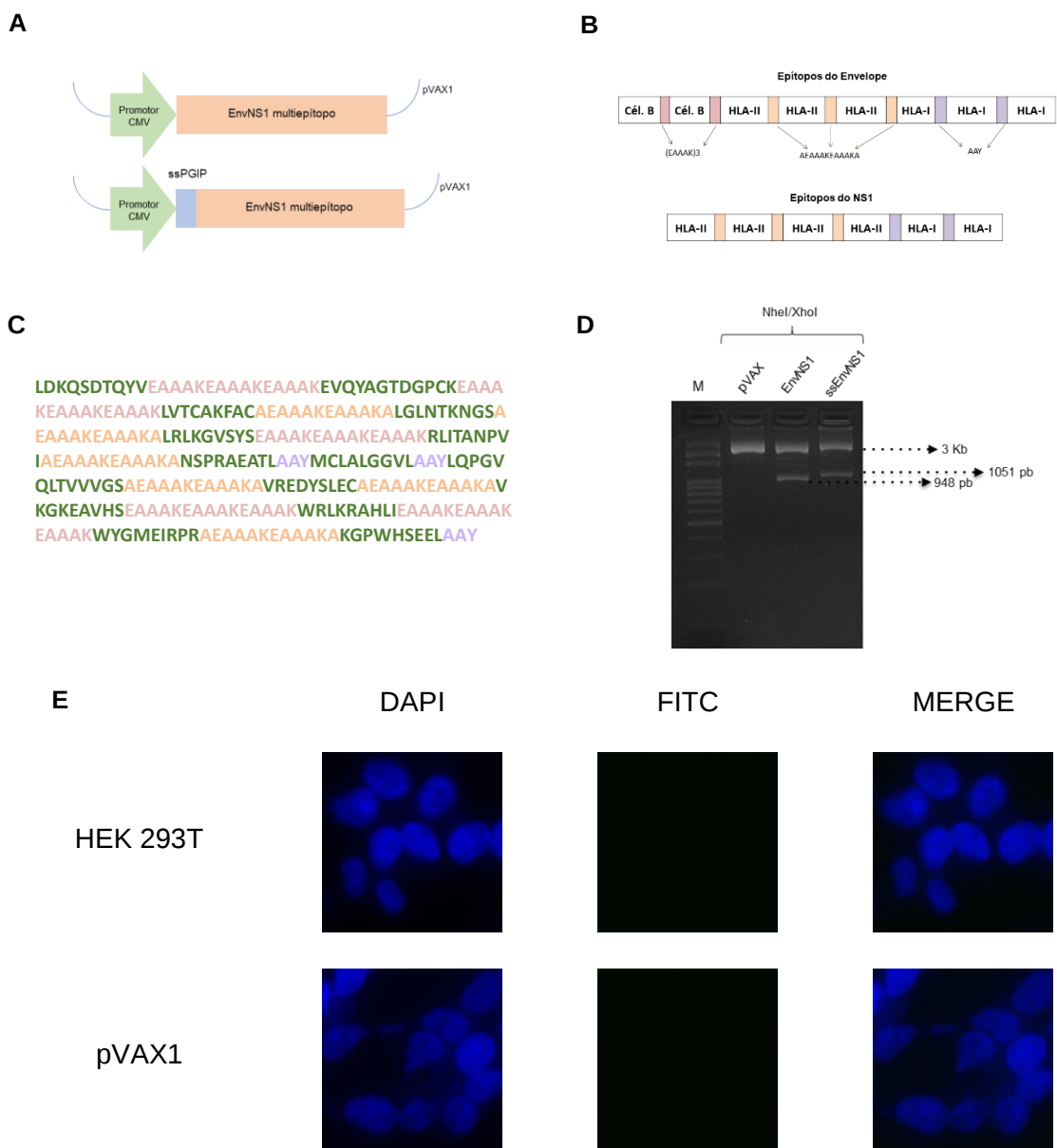
- [35] Wang L, Wang R, Wang L, et al. Structural Basis for Neutralization and Protection by a Zika Virus-Specific Human Antibody. *Cell Rep.* 2019 Mar 19;26(12):3360-3368.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2019.02.062. PMID: 30893607.
- [36] Bailey MJ, Duehr J, Dulin H, et al. Human antibodies targeting Zika virus NS1 provide protection against disease in a mouse model. *Nat Commun.* 2018 Nov 1;9(1):4560. doi: 10.1038/s41467-018-07008-0. PMID: 30385750; PMCID: PMC6212565.
- [37] Coban C, Kobiyama K, Aoshi T, et al. Novel strategies to improve DNA vaccine immunogenicity. *Curr Gene Ther.* 2011 Dec;11(6):479-84. doi: 10.2174/156652311798192815. PMID: 22023477.
- [38] Luo M, Tao P, Li J, et al. Immunization with plasmid DNA encoding influenza A virus nucleoprotein fused to a tissue plasminogen activator signal sequence elicits strong immune responses and protection against H5N1 challenge in mice. *J Virol Methods.* 2008 Dec;154(1-2):121-7. doi: 10.1016/j.jviromet.2008.08.011. Epub 2008 Sep 27. PMID: 18789973.
- [39] Hobernik D, Bros M. DNA Vaccines-How Far From Clinical Use? *Int J Mol Sci.* 2018 Nov 15;19(11):3605. doi: 10.3390/ijms19113605. PMID: 30445702; PMCID: PMC6274812.
- [40] Franconi R, Massa S, Illiano E, et al. Exploiting the plant secretory pathway to improve the anticancer activity of a plant-derived HPV16 E7 vaccine. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2006 Jan-Mar;19(1):187-97. PMID: 16569357.
- [41] Stern B, Olsen LC, Trøbe C, Ravneberg H, Pryme IF. 2007. Improving mammalian cell factories: The selection of signal peptide has a major impact on recombinant protein synthesis and secretion in mammalian cells. *Trends Cell Mol Biol* 2:1–17
- [42] Tappe D, Pérez-Girón JV, Zammarchi L, et al. Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to convalescent phase. *Med Microbiol Immunol.* 2016 Jun;205(3):269-73. doi: 10.1007/s00430-015-0445-7. Epub 2015 Dec 24. PMID: 26702627; PMCID: PMC4867002.
- [43] Kam YW, Leite JA, Lum FM, et al; Zika-Unicamp Network. Specific Biomarkers Associated With Neurological Complications and Congenital Central Nervous System Abnormalities From Zika Virus-Infected Patients in Brazil. *J Infect Dis.* 2017 Jul 15;216(2):172-181. doi: 10.1093/infdis/jix261. PMID: 28838147; PMCID: PMC5853428.

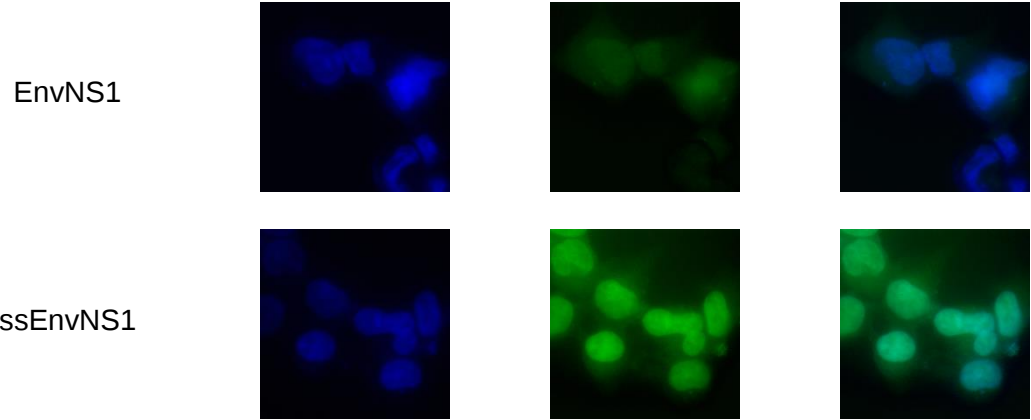
- [44] Barros JBS, da Silva PAN, Koga RCR, et al. Acute Zika Virus Infection in an Endemic Area Shows Modest Proinflammatory Systemic Immunoactivation and Cytokine-Symptom Associations. *Front Immunol.* 2018 May 3;9:821. doi: 10.3389/fimmu.2018.00821. PMID: 29774022; PMCID: PMC5943559.
- [45] Jeewandara C, Adikari TN, Gomes L, et al. Functionality of dengue virus specific memory T cell responses in individuals who were hospitalized or who had mild or sub-clinical dengue infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015 Apr 13;9(4):e0003673. doi: 10.1371/journal.pntd.0003673. PMID: 25875020; PMCID: PMC4395258.
- [46] Wijeratne DT, Fernando S, Gomes L, et al. Quantification of dengue virus specific T cell responses and correlation with viral load and clinical disease severity in acute dengue infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018 Oct 1;12(10):e0006540. doi: 10.1371/journal.pntd.0006540. PMID: 30273352; PMCID: PMC6181435.
- [47] Valentine KM, Croft M, Shrestha S. Protection against dengue virus requires a sustained balance of antibody and T cell responses. *Curr Opin Virol.* 2020 Aug;43:22-27. doi: 10.1016/j.coviro.2020.07.018. Epub 2020 Aug 13. PMID: 32798886; PMCID: PMC7655611.
- [48] Rivino L, Lim MQ. CD4+ and CD8+ T-cell immunity to Dengue - lessons for the study of Zika virus. *Immunology.* 2017 Feb;150(2):146-154. doi: 10.1111/imm.12681. Epub 2016 Nov 27. PMID: 27763656; PMCID: PMC5214511.
- [49] Mapalagamage M, Weiskopf D, Sette A, De Silva AD. Current Understanding of the Role of T Cells in Chikungunya, Dengue and Zika Infections. *Viruses.* 2022 Jan 25;14(2):242. doi: 10.3390/v14020242. PMID: 35215836; PMCID: PMC8878350.
- [50] Sant AJ, McMichael A. Revealing the role of CD4(+) T cells in viral immunity. *J Exp Med.* 2012 Jul 30;209(8):1391-5. doi: 10.1084/jem.20121517. PMID: 22851641; PMCID: PMC3420330.
- [51] Ahrends T, Busselaar J, Severson TM, Bąbała N, de Vries E, Bovens A, Wessels L, van Leeuwen F, Borst J. CD4+ T cell help creates memory CD8+ T cells with innate and help-independent recall capacities. *Nat Commun.* 2019 Dec 4;10(1):5531. doi: 10.1038/s41467-019-13438-1. PMID: 31797935; PMCID: PMC6892909.
- [52] Liang H, Tang J, Liu Z, et al. ZIKV infection induces robust Th1-like Tfh cell and long-term protective antibody responses in immunocompetent mice. *Nat Commun.* 2019 Aug 27;10(1):3859. doi: 10.1038/s41467-019-11754-0. PMID: 31455769; PMCID: PMC6712032.

- [53] Hassert M, Wolf KJ, Schwetye KE, DiPaolo RJ, Brien JD, Pinto AK. CD4+T cells mediate protection against Zika associated severe disease in a mouse model of infection. *PLoS Pathog*. 2018 Sep 13;14(9):e1007237. doi: 10.1371/journal.ppat.1007237. PMID: 30212537; PMCID: PMC6136803.
- [54] Hassert M, Harris MG, Brien JD, Pinto AK. Identification of Protective CD8 T Cell Responses in a Mouse Model of Zika Virus Infection. *Front Immunol*. 2019 Jul 17;10:1678. doi: 10.3389/fimmu.2019.01678. PMID: 31379867; PMCID: PMC6652237.
- [55] Nazeraï L, Schøller AS, Bassi MR, et al. Effector CD8 T Cell-Dependent Zika Virus Control in the CNS: A Matter of Time and Numbers. *Front Immunol*. 2020 Aug 18;11:1977. doi: 10.3389/fimmu.2020.01977. PMID: 32973802; PMCID: PMC7461798.
- [56] Tonnerre P, Melgaço JG, Torres-Cornejo A, Pinto MA, Yue C, Blümel J, de Sousa PSF, de Mello VDM, Moran J, de Filippis AMB, Wolski D, Grifoni A, Sette A, Barouch DH, Hoogeveen RC, Baylis SA, Lauer GM, Lewis-Ximenez LL. Evolution of the innate and adaptive immune response in women with acute Zika virus infection. *Nat Microbiol*. 2020 Jan;5(1):76-83. doi: 10.1038/s41564-019-0618-z. Epub 2019 Dec 2. PMID: 31792427; PMCID: PMC6938397.
- [57] Sun J, Zheng Z, Li M, et al. Development of a novel ZIKV vaccine comprised of immunodominant CD4+ and CD8+ T cell epitopes identified through comprehensive epitope mapping in Zika virus infected mice. *Vaccine*. 2021 Aug 23;39(36):5173-5186. doi: 10.1016/j.vaccine.2021.07.036. Epub 2021 Aug 2. PMID: 34353682.
- [58] Lee HR, Son CH, Koh EK, Bae JH, Kang CD, Yang K, Park YS. Expansion of cytotoxic natural killer cells using irradiated autologous peripheral blood mononuclear cells and anti-CD16 antibody. *Sci Rep*. 2017 Sep 11;7(1):11075. doi: 10.1038/s41598-017-09259-1. PMID: 28894091; PMCID: PMC5593981.
- [59] O'Brien KL, Finlay DK. Immunometabolism and natural killer cell responses. *Nat Rev Immunol*. 2019 May;19(5):282-290. doi: 10.1038/s41577-019-0139-2. PMID: 30808985.
- [60] Glasner A, Oiknine-Djian E, Weisblum Y, Diab M, Panet A, Wolf DG, Mandelboim O. Zika Virus Escapes NK Cell Detection by Upregulating Major Histocompatibility Complex Class I Molecules. *J Virol*. 2017 Oct 27;91(22):e00785-17. doi: 10.1128/JVI.00785-17. PMID: 28878071; PMCID: PMC5660495.

- [61] Griffin I, Martin SW, Fischer M, et al. Zika Virus IgM Detection and Neutralizing Antibody Profiles 12-19 Months after Illness Onset. *Emerg Infect Dis.* 2019 Feb;25(2):299-303. doi: 10.3201/eid2502.181286. PMID: 30666931; PMCID: PMC6346474.
- [62] Calvert AE, Horiuchi K, Boroughs KL, et al. The Specificity of the Persistent IgM Neutralizing Antibody Response in Zika Virus Infections among Individuals with Prior Dengue Virus Exposure. *J Clin Microbiol.* 2021 Jul 19;59(8):e0040021. doi: 10.1128/JCM.00400-21. Epub 2021 Jul 19. PMID: 33980647; PMCID: PMC8288270.
- [63] Pena LJ, Miranda Guarines K, Duarte Silva AJ, et al. In vitro and in vivo models for studying Zika virus biology. *J Gen Virol.* 2018 Dec;99(12):1529-1550. doi: 10.1099/jgv.0.001153. Epub 2018 Oct 16. PMID: 30325302.
- [64] Balint E, Montemarano A, Feng E, Ashkar AA. From Mosquito Bites to Sexual Transmission: Evaluating Mouse Models of Zika Virus Infection. *Viruses.* 2021 Nov 8;13(11):2244. doi: 10.3390/v13112244. PMID: 34835050; PMCID: PMC8625727.
- [65] Cimica V, Galarza JM, Rashid S, Stedman TT. Current development of Zika virus vaccines with special emphasis on virus-like particle technology. *Expert Rev Vaccines.* 2021 Nov;20(11):1483-1498. doi: 10.1080/14760584.2021.1945447. Epub 2021 Aug 9. PMID: 34148481.
- [66] Hurtado-Monzón AM, Cordero-Rivera CD, Farfan-Morales CN, et al. The role of anti-flavivirus humoral immune response in protection and pathogenesis. *Rev Med Virol.* 2020 Jul;30(4):e2100. doi: 10.1002/rmv.2100. Epub 2020 Feb 26. PMID: 32101633.
- [67] Brault AC, Domi A, McDonald EM, et al. A Zika Vaccine Targeting NS1 Protein Protects Immunocompetent Adult Mice in a Lethal Challenge Model. *Sci Rep.* 2017 Nov 7;7(1):14769. doi: 10.1038/s41598-017-15039-8. PMID: 29116169; PMCID: PMC5677088.
- [68] Sanchez Vargas LA, Adam A, Masterson M, et al. Non-structural protein 1-specific antibodies directed against Zika virus in humans mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Immunology.* 2021 Oct;164(2):386-397. doi: 10.1111/imm.13380. Epub 2021 Jun 14. PMID: 34056709; PMCID: PMC8442231.
- [69] Yu L, Liu X, Ye X, et al. Monoclonal Antibodies against Zika Virus NS1 Protein Confer Protection via Fcγ Receptor-Dependent and -Independent Pathways. *mBio.* 2021 Feb 9;12(1):e03179-20. doi: 10.1128/mBio.03179-20. PMID: 33563822; PMCID: PMC7885117.

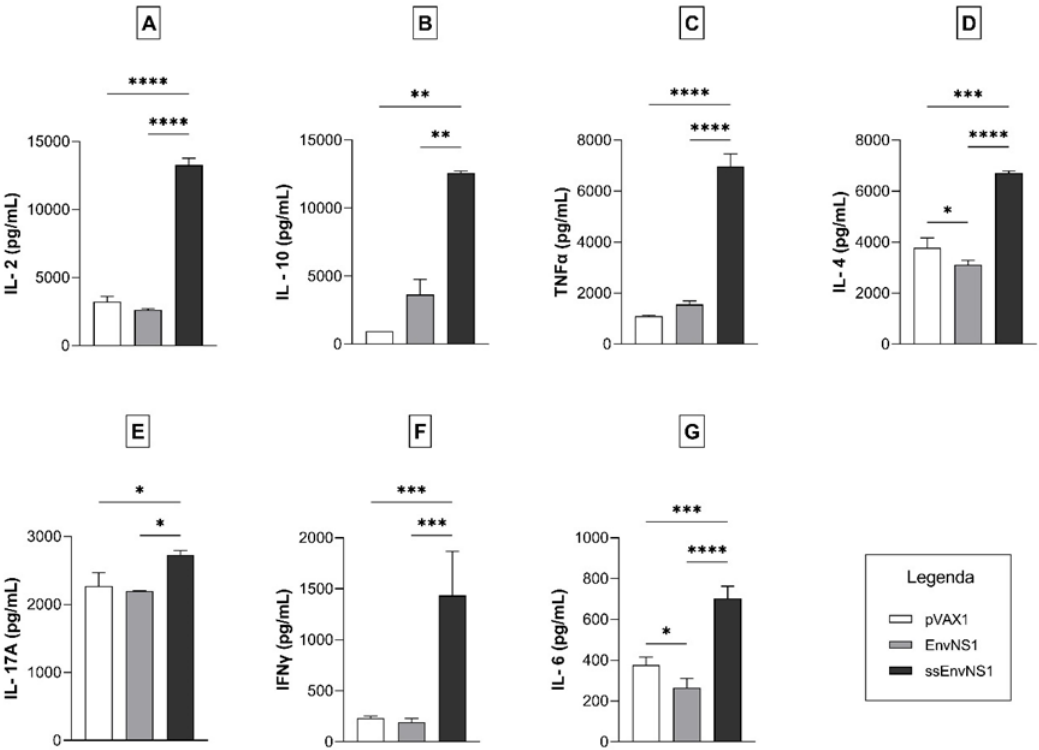
Figura 1 - Esquemas das construções vacinais, confirmação dos recombinantes e expressão de proteínas recombinantes após transfecção. A. Representação esquemática dos candidatos vacinais inseridos no vetor pVAX1 sobre controle do promotor CMV. B. Representação esquemática da disposição dos epítomos segundo seus alvos e sequências linker que os intercalam. C. Sequência peptídica de EnvNS1 com epítomos (verde) e os linkers EAAAKEAAAKEAAAK (rosa), AEAAAKEAAAK (laranja) e AAY (lavanda). D. Digestões do vetor vazio pVAX1 (3 Kb) e dos recombinantes pVAX_EnvNS1 (948 pb) e pVAXssEnvNS1 (1051 pb) com as enzimas NheI e XhoI para verificação da clonagem. M: Marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder Ready to Load (Solis BioDyne). E. Imagens representativas da microscopia de fluorescência (FITC) em células transfectadas com pVAX1, pVAX_EnvNS1 e pVAXssEnvNS1. Células HEK 29T não transfectadas foram utilizadas como controle de autofluorescência. A captura de imagens foi realizada em 100 vezes de aumento.





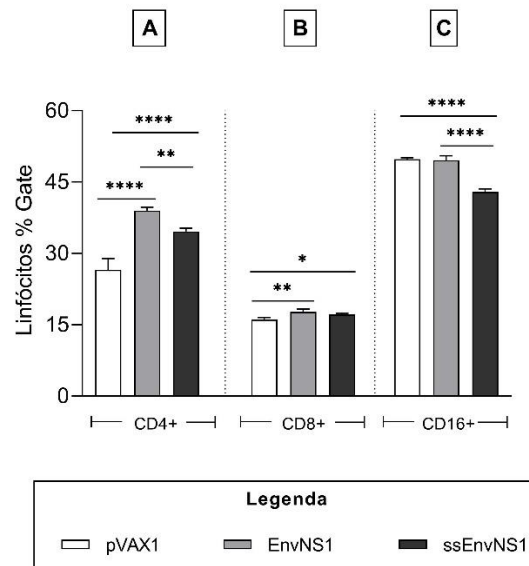
Fonte: A autora (2022).

Figura 2 - Perfil de citocinas dosadas do soro dos camundongos vacinados. A coleta foi realizada 14 dias após a última dose de reforço. A) IL-2, B) IL-10, C) TNF- α , D) IL-4, E) IL-17A, F) IFN- γ , G) IL-6. Os valores das citocinas foram mensurados em pg/mL. Os asteriscos representam significâncias estatísticas (* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, **** P < 0.0001).



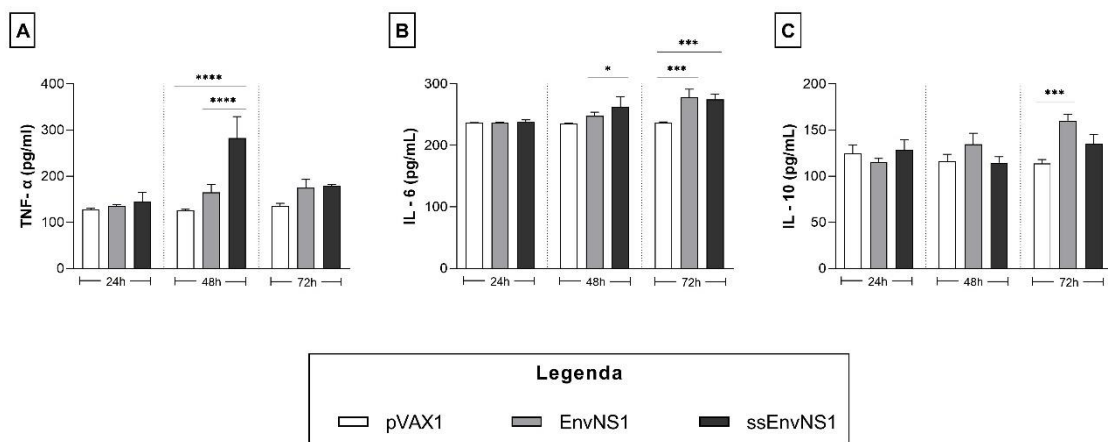
Fonte: A autora (2022).

Figura 3 - Análises das subpopulações de linfócitos circulantes no sangue dos camundongos após a imunização. A coleta foi realizada 14 dias após a dose de reforço. A) %CD4+, B) %CD8+, C) %CD16+. Os asteriscos representam significâncias estatísticas (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$).



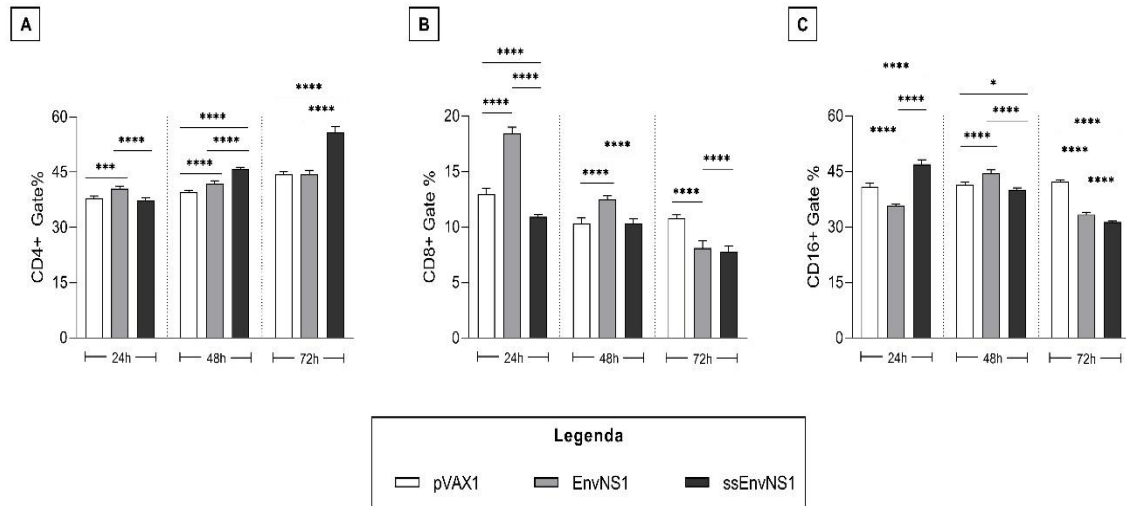
Fonte: A autora (2022).

Figura 4 - Perfil de citocinas dosadas de esplenócitos de camundongos vacinados estimulados com ZIKV. A coleta foi realizada 14 dias após a última dose de reforço. A) TNF- α , B) IL-6 e C) IL-10. Os valores das citocinas foram mensurados em pg/mL. Os asteriscos representam significâncias estatísticas (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$).



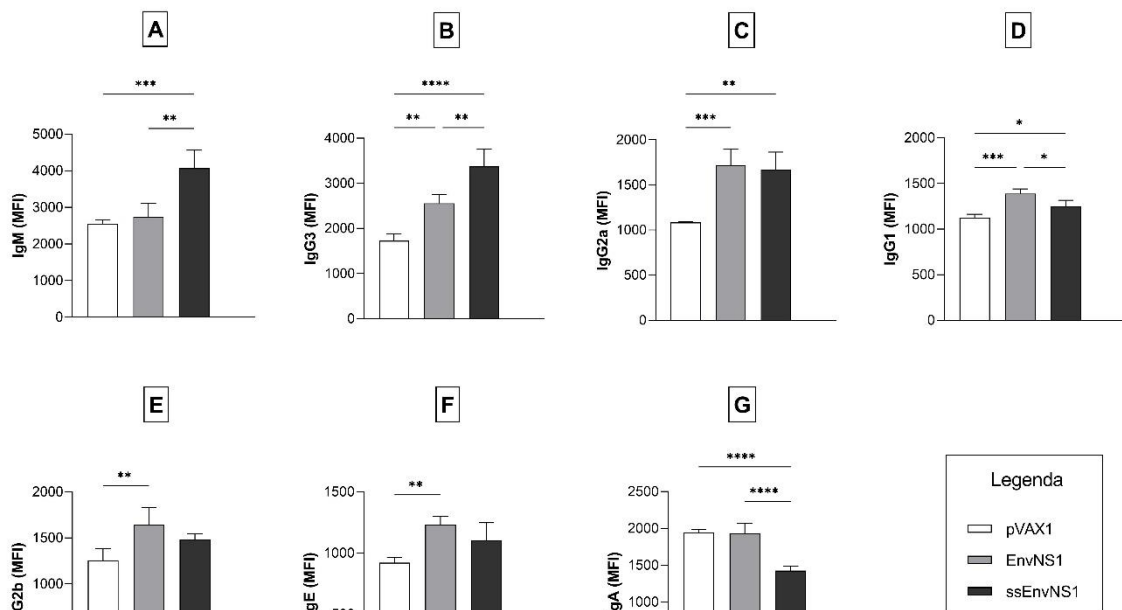
Fonte: A autora (2022).

Figura 5 - Avaliação percentual dos linfócitos T CD4+, CD8+ e CD16+ isolados do baço dos animais imunizados e reestimulados *in vitro* com o ZIKV, nos períodos de 24, 48 e 72h. Os asteriscos representam significâncias estatísticas (** $P < 0.001$ **** $P < 0.0001$).



Fonte: A autora (2022).

Figura 6 - Anticorpos produzidos em resposta a imunização detectados no soro dos camundongos vacinados. A coleta foi realizada 14 dias após a última dose de reforço. **A)** IgM, **B)** IgG3, **C)** IgG2a, **D)** IgG1, **E)** IgG2b, **F)** IgE, **G)** IgA. Os valores das citocinas foram mensurados em MFI. Os asteriscos representam significâncias estatísticas (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$).



Fonte: A autora (2022).

Tabela 1 - Razões Th2/Th1 para anticorpos. Os isotipos de IgG foram detectados por citometria de fluxo a partir do soro dos camundongos BALBc no vigésimo oitavo do esquema de imunização.

IgG1/IgG2a			IgG2b/IgG2a		
pVAX1	EnvNS1	ssEnvNS1	pVAX1	EnvNS1	ssEnvNS1
1,0405	0,8083	0,7482	1,1572	0,9558	0,8879

Fonte: A autora (2022).

Tabela 2 - Média do peso dos grupos dos camundongos ao longo do experimento de imunização.

GRUPOS	PESO (g)		
	Dia 1	Dia 7	Dia 21
pVAX1	21,12 ± 0,53	21,99 ± 0,57	23,17 ± 0,53
pVAX_EnvNS1	19,36 ± 1,99	20,31 ± 1,93	21,35 ± 2,14
pVAX_ssEnvNS1	21,02 ± 1,52	22,04 ± 1,28	22,79 ± 2,40

Fonte: A autora (2022).

Tabela 3 - Parâmetros hematológicos dos camundongos imunizados e do grupo controle (média por grupo). Siglas: VR: Valor de Referência; VCM: Volume Corpuscular Médio; HCM: Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média; Referência dos VR: Barbosa et al. 2017.

Análises	pVAX1	pVAX_EnvNS1	pVAX_ssEnvNS1	V.R.
Hemácias (10 ⁶ /mm ³)	4,58 ± 0,28	4,94 ± 0,61	4,61 ± 0,24	7,3 ± 2,01
Hemoglobina (g/dL)	13,5 ± 0,91	14,62 ± 2,06	13,62 ± 0,84	13,82 ± 1,0
Hematócrito (%)	40,72 ± 2,72	44 ± 6,22	41 ± 2,54	38,44 ± 3,93
VCM (fL)	89,24 ± 1,83	90,76 ± 3,46	90,32 ± 2,70	60,26 ± 18,25
CHCM (%)	33 ± 0	33,12 ± 0,14	32,97 ± 0,10	33,00 ± 2,60

Leucócitos totais (10 ³ /mm ³)	9,02 ± 0,41	10 ± 0,42	9,07 ± 0,74	6,23 ± 2,57
Neutrófilos (%)	40,2 ± 4,9	34 ± 5,21	39,25 ± 4,02	22,96 ± 5,54
Linfócitos (%)	56,8 ± 5,41	62,8 ± 4,79	58,25 ± 3,69	71,76 ± 5,9
Eosinófilos (%)	1,2 ± 0,4	1,6 ± 0,8	1,25 ± 0,43	2,16 ± 1,71
Monócitos (%)	1,8 ± 0,97	1,6 ± 0,8	1,25 ± 0,43	2,68 ± 1
Plaquetas (10 ³ /mm ³)	417,4 ± 62,92	412,4 ± 67	433,5 ± 33,26	560 ± 119

Fonte: A autora (2022).

Tabela 4 – Parâmetros bioquímicos dos camundongos imunizados e do grupo controle (média por grupo). Siglas: VR: Valor de Referência; AST: Aspartato Aminotransferase; ALT: Alanina Aminotransferase; FAL: Fosfatase Alcalina. Referência VR: Almeida et al. 2008; Barbosa et al. 2017; Silva-Santana et al. 2020.

Análises	pVAX1	pVAX_EnvNS1	pVAX_ssEnvNS1	V.R.
Glicose	74,28 ± 5,68	77,12 ± 3,72	74,97 ± 7,13	80,75 ± 20,25
Uréia (mg/dL)	64,38 ± 1,33	69,58 ± 2,73	67,45 ± 3,66	51,2 ± 15,92
Creatinina (mg/dL)	0,56 ± 0,08	0,61 ± 0,06	0,53 ± 0,04	0,44 ± 0,11
AST (UI/L)	130,32 ± 4,52	131,22 ± 3,22	130,6 ± 2,16	239,50 ± 141,20
ALT (UI/L)	152,44 ± 5,86	150,5 ± 5,50	147,85 ± 3,55	156,70 ± 57,20
FAL (UI/L)	223,84 ± 5,29	220,72 ± 3,43	225,4 ± 4,64	362,90 ± 226,60

Fonte: A autora (2022).

5 DISCUSSÃO GERAL

O rápido estabelecimento da pandemia do SARS-CoV-2, tornou evidente a necessidade do desenvolvimento de estratégias vacinais que apresentem como características relevantes alta especificidade e imunogenicidade, estabilidade, baixo custo e rapidez de produção (BANERJEE; SANTRA; MAITI, 2020). Neste sentido, vacinas de DNA se destacam por sua flexibilidade na utilização de sequências antigênicas de patógenos e de adjuvantes moleculares que permitem o desenvolvimento de estratégias diversificadas contra patógenos de interesse médico (GARY; WEINER, 2020; HOBERNIK; BROS, 2018).

Com a emergência do Zika vírus na América Latina no ano 2015, foram desenvolvidas estratégias vacinais que exploravam a capacidade de indução de produção de anticorpos neutralizantes em resposta a epítomos presentes em prM e E, observada entre diversos flavivírus (DIAMOND; LEDGERWOOD; PIERSON, 2019; SHAN; XIE; SHI, 2018). Entretanto, com o avanço das pesquisas acerca da resposta imunológica contra a infecção por ZIKV tornou-se evidente a possibilidade da utilização de outros alvos imunológicos como epítomos presentes em proteínas não estruturais tais como as proteínas NS1 e NS3 do ZIKV para ativação de células T, aumentando assim a eficácia das vacinas frente à infecção viral (ELONG NGONO et al., 2020; GRUBORBAUK et al., 2019; LIMA et al., 2017).

Desse modo, nosso grupo elaborou uma construção vacinal codificando 14 epítomos presentes nas proteínas do Envelope e NS1 do ZIKV (intitulada EnvNS1), visando a indução e conciliação de respostas imunológicas humoral e celular. Os epítomos selecionados foram preditos *in silico* por (BADAWI et al., 2016; DAR et al., 2016; DIKHIT et al., 2016), e tem como alvos moléculas HLA I, HLA II e de células B.

No presente estudo, avaliamos o potencial imunogênico de uma vacina de DNA baseada na sequência EnvNS1, por si, ou fusionada ao peptídeo sinal ssPGIP em camundongos imunocompetentes. A imunização dos camundongos Balb/c com as vacinas de DNA avaliadas induziu a proliferação de células T CD4⁺ (Artigo I -Figura 3) e T CD8⁺ (Artigo I – Figura 3), com produção de anticorpos associados ao perfil Th1 (Artigo I – Tabela 1). Diversos estudos apontam a importância da ativação de células T para o estabelecimento de resposta eficiente contra infecção por ZIKV, a exemplo de células T CD8⁺ sendo demonstradas como capazes de impedir o desenvolvimento de SCZ em camundongos gerados por mães imunes e não imunes a DENV(REGLA-

NAVA et al., 2018), e de proteger e controlar a infecção em modelos letais em camundongos imunocompetentes e deficientes para IFN- γ tipo I (ELONG NGONO et al., 2017, 2020; GAMBINO et al., 2021; NAZERAI et al., 2020). Células T CD4⁺ exercem papel de destaque para indução de resposta humoral, sendo necessárias para o estabelecimento de resposta neutralizante (ELONG NGONO et al., 2019; MCCARTHY et al., 2022).

A presença de ssPGIP induziu a produção de citocinas do perfil Th1, Th2 e Th17, enquanto sua ausência foi associada a um discreto aumento de células T CD4⁺ e T CD8⁺ com pobre produção de citocinas. Os resultados obtidos indicam que estratégias focadas em epítomos podem ser uma alternativa segura para indução de resposta imunológicas eficientes. Peptídeos sinais tais como o utilizado neste trabalho, têm sido explorados como vacinas independentes de outras regiões peptídicas, em ensaios pré-clínicos e clínicos fase I/II que indicaram a eficácia destes (CARMON et al., 2015; KOVJAZIN et al., 2011; KOVJAZIN; CARMON, 2014). Neste sentido, podemos observar que embora a adição de ssPGIP a EnvNS1 possa ter aumentado a eficiência de processamento peptídico, resultando em um produto vacinal com perfil diferente, é possível que este peptídeo sinal seja alvo de respostas imunológicas ainda não avaliadas individualmente.

Quando consideramos o modelo animal utilizado nesta pesquisa para a avaliação de potencial imunogênico, é necessário observar que animais imunocompetentes permitem a avaliação mais robusta da resposta imune celular adaptativa, embora não apresente susceptibilidade natural a infecção por ZIKV. Desse modo, levando a necessidade de aplicação de elevados títulos virais ou infecção por via intracraniana (BALINT et al., 2021; NAZERAI et al., 2018; PENA et al., 2018). Assim, camundongos deficientes de componentes da via de sinalização IFN tipo I, como o A129, são utilizados em estudos de proteção e patogênese uma vez que são susceptíveis a infecção mesmo em baixos títulos virais (PENA et al., 2018). Em nossa pesquisa, obtivemos dados preliminares da imunogenicidade vacinal, porém estudos em modelos infecção por ZIKV são necessários para elucidação da resposta imunológica e proteção induzidas pelas vacinas aqui avaliadas.

A sequência multiepítopo utilizada nesta pesquisa foi explorada no contexto da produção e *delivery* em um sistema de levedura inteira e os resultados indicaram ativação de células T CD4⁺, CD8⁺ e CD16⁺, além de produção de citocinas IL-6, IL-10, e TNF- α , *in vitro* (SILVA et al., 2021). Considerando que perfis diferentes de respostas

imunológicas foram observados entre os resultados obtidos aqui demonstrados, é necessário considerar também que a forma de apresentação ao sistema imunológico entre plataformas vacinais diferentes pode alterar o perfil de resposta induzido por estas (ELONG NGONO et al., 2020).

É interessante considerar a possibilidade da exploração de esquema heterólogo de vacinação utilizando as estratégias estudadas nesta pesquisa e na realizada por Silva e colaboradores (SILVA et al., 2021). Um protocolo imunização heteróloga com uma vacina de DNA e vírus Vaccinia Ankara modificado (MVA) expressando a sequência prM-E do ZIKV induziu a potencialização de resposta mediada por células T CD4⁺ e T CD8⁺ polifuncionais, com produção de anticorpos neutralizantes, quando comparado aos regimes homólogos de cada plataforma individual (PEREZ-TRUJILLO et al., 2017).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a fusão de ssPGIP a sequência multiepítopo foi capaz de melhorar o processamento antigênico dos epítomos do Envelope e NS1 do Zika vírus. Como um todo, este melhoramento levou a diversificação da resposta imunológica observada quando comparado a vacina sem a fusão, em especial quanto a indução de citocinas de perfil Th1 e Th17 e de anticorpos de perfil Th1. A seleção de outros alvos antigênicos a serem fusionados a ssPGIP, assim como a exploração de regimes e modelos alternativos de imunização poderão contribuir para o desenvolvimento de vacinas não apenas contra o Zika vírus mas também para outros vírus de interesse médico.

REFERÊNCIAS

AKIYAMA, B. M. et al. Zika virus produces non-coding RNAs using a multi-pseudoknot structure that confounds a cellular exonuclease. **Science (New York, N.Y.)**, v. 354, n. 6316, p. 1148–1152, 2 dez. 2016.

ALADIN, F. et al. Targeting tumour cells with defects in the MHC Class I antigen processing pathway with CD8+ T cells specific for hydrophobic TAP- and Tapasin-independent peptides: the requirement for directed access into the ER. **Cancer immunology, immunotherapy: CII**, v. 56, n. 8, p. 1143–1152, ago. 2007.

BADAWI, M. M. et al. Highly Conserved Epitopes of ZIKA Envelope Glycoprotein May Act as a Novel Peptide Vaccine with High Coverage: Immunoinformatics Approach. **American Journal of Biomedical Research**, v. 4, n. 3, p. 46–60, 29 jun. 2016.

BADOLATO-CORRÊA, J. et al. Differential Longevity of Memory CD4 and CD8 T Cells in a Cohort of the Mothers With a History of ZIKV Infection and Their Children. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 610456, 2021.

BAILEY, M. J. et al. Antibodies Elicited by an NS1-Based Vaccine Protect Mice against Zika Virus. **mBio**, v. 10, n. 2, p. e02861-18, 2 abr. 2019.

BALDWIN, W. R. et al. Purified Inactivated Zika Vaccine Candidates Afford Protection against Lethal Challenge in Mice. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 16509, 7 nov. 2018.

BALINT, E. et al. From Mosquito Bites to Sexual Transmission: Evaluating Mouse Models of Zika Virus Infection. **Viruses**, v. 13, n. 11, p. 2244, 8 nov. 2021.

BESNARD, M. et al. Congenital cerebral malformations and dysfunction in fetuses and newborns following the 2013 to 2014 Zika virus epidemic in French Polynesia. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 13, p. 30181, 31 mar. 2016.

BHATNAGAR, J. et al. Zika Virus RNA Replication and Persistence in Brain and Placental Tissue. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 3, p. 405–414, mar. 2017.

BISWAS, A. et al. Zika outbreak in India in 2018. **Journal of Travel Medicine**, v. 27, n. 4, p. taaa001, 14 jul. 2020.

BRITO, A. F. et al. Lying in wait: the resurgence of dengue virus after the Zika epidemic in Brazil. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 2619, 11 maio 2021.

CAO-LORMEAU, V.-M. et al. Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 6, p. 1085–1086, jun. 2014.

CARMON, L. et al. Phase I/II study exploring ImMucin, a pan-major histocompatibility complex, anti-MUC1 signal peptide vaccine, in multiple myeloma patients. **British Journal of Haematology**, v. 169, n. 1, p. 44–56, abr. 2015.

CARPIO, K. L.; BARRETT, A. D. T. Flavivirus NS1 and Its Potential in Vaccine Development. **Vaccines**, v. 9, n. 6, p. 622, 9 jun. 2021.

CAUCHEMEZ, S. et al. Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013-15: a retrospective study. **Lancet (London, England)**, v. 387, n. 10033, p. 2125–2132, 21 maio 2016.

CHRISTIAN, K. M.; SONG, H.; MING, G. Pathophysiology and Mechanisms of Zika Virus Infection in the Nervous System. **Annual review of neuroscience**, v. 42, p. 249–269, 8 jul. 2019.

DA CRUZ, T. E. et al. Case Reports: Prolonged Detection of Zika Virus RNA in Vaginal and Endocervical Samples from a Brazilian Woman, 2018. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 1, p. 183–186, jan. 2019.

DAI, S. et al. Zika Virus Baculovirus-Expressed Virus-Like Particles Induce Neutralizing Antibodies in Mice. **Virologica Sinica**, v. 33, n. 3, p. 213–226, jun. 2018.

DAR, H. et al. Prediction of promiscuous T-cell epitopes in the Zika virus polyprotein: An in silico approach. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 9, p. 844–850, set. 2016.

DEY, A. et al. Immunogenic potential of DNA vaccine candidate, ZyCoV-D against SARS-CoV-2 in animal models. **Vaccine**, v. 39, n. 30, p. 4108–4116, 5 jul. 2021.

DIAMOND, M. S.; LEDGERWOOD, J. E.; PIERSON, T. C. Zika Virus Vaccine Development: Progress in the Face of New Challenges. **Annual Review of Medicine**, v. 70, p. 121–135, 27 jan. 2019.

DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509–520, set. 1952.

DIKHIT, M. R. et al. Computational prediction and analysis of potential antigenic CTL epitopes in Zika virus: A first step towards vaccine development. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, v. 45, p. 187–197, nov. 2016.

DUDLEY, D. M. et al. A rhesus macaque model of Asian-lineage Zika virus infection. **Nature Communications**, v. 7, p. 12204, 28 jun. 2016.

DUFFY, M. R. et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **The New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536–2543, 11 jun. 2009.

ELONG NGONO, A. et al. Mapping and Role of the CD8+ T Cell Response During Primary Zika Virus Infection in Mice. **Cell Host & Microbe**, v. 21, n. 1, p. 35–46, 11 jan. 2017.

ELONG NGONO, A. et al. CD4+ T cells promote humoral immunity and viral control during Zika virus infection. **PLoS pathogens**, v. 15, n. 1, p. e1007474, jan. 2019.

ELONG NGONO, A. et al. CD8⁺ T cells mediate protection against Zika virus induced by an NS3-based vaccine. **Science Advances**, v. 6, n. 45, p. eabb2154, nov. 2020.

EMANUELSSON, O. et al. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. **Nature Protocols**, v. 2, n. 4, p. 953–971, abr. 2007.

FAGBAMI, A. H. Zika virus infections in Nigeria: virological and seroepidemiological investigations in Oyo State. **The Journal of Hygiene**, v. 83, n. 2, p. 213–219, out. 1979.

FANUNZA, E. et al. Zika virus NS2A inhibits interferon signaling by degradation of STAT1 and STAT2. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 1580–1596, 31 dez. 2021.

FARIA, N. R. et al. Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas. **Nature**, v. 546, n. 7658, p. 406–410, 15 jun. 2017.

FERRARIS, P. et al. Human host genetics and susceptibility to ZIKV infection. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, v. 95, p. 105066, nov. 2021.

FERRARIS, P.; YSSEL, H.; MISSÉ, D. Zika virus infection: an update. **Microbes and Infection**, v. 21, n. 8–9, p. 353–360, 2019.

FREITAS, D. A. et al. Congenital Zika syndrome: A systematic review. **PloS One**, v. 15, n. 12, p. e0242367, 2020.

GAMBINO, F. et al. A vaccine inducing solely cytotoxic T lymphocytes fully prevents Zika virus infection and fetal damage. **Cell Reports**, v. 35, n. 6, p. 109107, 11 maio 2021.

GARY, E. N.; WEINER, D. B. DNA vaccines: prime time is now. **Current Opinion in Immunology**, v. 65, p. 21–27, ago. 2020.

GEMMER, M.; FÖRSTER, F. A clearer picture of the ER translocon complex. **Journal of Cell Science**, v. 133, n. 3, p. jcs231340, 4 fev. 2020.

GESER, A.; HENDERSON, B. E.; CHRISTENSEN, S. A multipurpose serological survey in Kenya. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 43, n. 4, p. 539–552, 1970.

GRUBOR-BAUK, B. et al. NS1 DNA vaccination protects against Zika infection through T cell-mediated immunity in immunocompetent mice. **Science Advances**, v. 5, n. 12, p. eaax2388, dez. 2019.

HADDOW, A. D. et al. Genetic Characterization of Spondweni and Zika Viruses and Susceptibility of Geographically Distinct Strains of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) to Spondweni Virus. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 10, p. e0005083, out. 2016.

HAMEL, R. et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. **Journal of Virology**, v. 89, n. 17, p. 8880–8896, set. 2015.

HAN, H.-H. et al. Safety and immunogenicity of a purified inactivated Zika virus vaccine candidate in healthy adults: an observer-blind, randomised, phase 1 trial. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 21, n. 9, p. 1282–1292, set. 2021.

HASAN, S. S. et al. Structural biology of Zika virus and other flaviviruses. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 25, n. 1, p. 13–20, jan. 2018.

HASSERT, M. et al. CD4+T cells mediate protection against Zika associated severe disease in a mouse model of infection. **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 9, p. e1007237, 13 set. 2018.

HEGDE, R. S.; BERNSTEIN, H. D. The surprising complexity of signal sequences. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 31, n. 10, p. 563–571, out. 2006.

HEINZ, F. X.; STIASNY, K. The Antigenic Structure of Zika Virus and Its Relation to Other Flaviviruses: Implications for Infection and Immunoprophylaxis. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 81, n. 1, p. e00055-16, mar. 2017.

HEMMERICH, J. et al. Use of a Sec signal peptide library from *Bacillus subtilis* for the optimization of cutinase secretion in *Corynebacterium glutamicum*. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 208, 7 dez. 2016.

HOBERNIK, D.; BROS, M. DNA Vaccines-How Far From Clinical Use? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 11, p. 3605, 15 nov. 2018.

HRABER, P. et al. Amphiphilic block copolymer delivery of a DNA vaccine against Zika virus. **Vaccine**, v. 36, n. 46, p. 6911–6917, 12 nov. 2018.

HU, T. et al. The Asian Lineage of Zika Virus: Transmission and Evolution in Asia and the Americas. **Virologica Sinica**, v. 34, n. 1, p. 1–8, 25 jan. 2019.

HUANG, H. et al. CD8+ T Cell Immune Response in Immunocompetent Mice during Zika Virus Infection. **Journal of Virology**, v. 91, n. 22, p. e00900-17, 27 out. 2017.

JOGUET, G. et al. Effect of acute Zika virus infection on sperm and virus clearance in body fluids: a prospective observational study. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p. 1200–1208, nov. 2017.

JONKMANS, N.; D'ACREMONT, V.; FLAHAULT, A. Scoping future outbreaks: a scoping review on the outbreak prediction of the WHO Blueprint list of priority diseases. **BMJ global health**, v. 6, n. 9, p. e006623, set. 2021.

JORRITSMA, S. H. T. et al. Delivery methods to increase cellular uptake and immunogenicity of DNA vaccines. **Vaccine**, v. 34, n. 46, p. 5488–5494, 4 nov. 2016.

KARAMYSHEV, A. L.; TIKHONOVA, E. B.; KARAMYSHEVA, Z. N. Translational Control of Secretory Proteins in Health and Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 7, p. 2538, 6 abr. 2020.

KATZ, I.; GILBURD, B.; SHOVMAN, O. Zika autoimmunity and Guillain-Barré syndrome. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 31, n. 5, p. 484–487, set. 2019.

KELLOGG, M. K. et al. SRPassing Co-translational Targeting: The Role of the Signal Recognition Particle in Protein Targeting and mRNA Protection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 12, p. 6284, 11 jun. 2021.

KINDHAUSER, M. K. et al. Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 94, n. 9, p. 675- 686C, 1 set. 2016.

KOBER, L.; ZEHE, C.; BODE, J. Optimized signal peptides for the development of high expressing CHO cell lines. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 110, n. 4, p. 1164–1173, abr. 2013.

KOVJAZIN, R. et al. Signal peptides and trans-membrane regions are broadly immunogenic and have high CD8+ T cell epitope densities: Implications for vaccine development. **Molecular Immunology**, v. 48, n. 8, p. 1009–1018, abr. 2011.

KOVJAZIN, R.; CARMON, L. The use of signal peptide domains as vaccine candidates. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 10, n. 9, p. 2733–2740, 30 out. 2014.

KUMAR, A.; KUMAR, P.; GIRI, R. Zika virus NS4A cytosolic region (residues 1-48) is an intrinsically disordered domain and folds upon binding to lipids. **Virology**, v. 550, p. 27–36, nov. 2020.

KURSCHEIDT, F. A. et al. Persistence and clinical relevance of Zika virus in the male genital tract. **Nature reviews Urology**, v. 16, n. 4, p. 211–230, 1 abr. 2019.

KUTZLER, M. A.; WEINER, D. B. DNA vaccines: ready for prime time? **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n. 10, p. 776–788, out. 2008.

LAMBRICHT, L. et al. Clinical potential of electroporation for gene therapy and DNA vaccine delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 13, n. 2, p. 295–310, 2016.

LANCIOTTI, R. S. et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1232–1239, ago. 2008.

LEONHARD, S. E. et al. Guillain-Barré syndrome related to Zika virus infection: A systematic review and meta-analysis of the clinical and electrophysiological phenotype. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 14, n. 4, p. e0008264, abr. 2020.

LI, Q.; KANG, C. Structure and Dynamics of Zika Virus Protease and Its Insights into Inhibitor Design. **Biomedicines**, v. 9, n. 8, p. 1044, 19 ago. 2021.

LIMA, N. S. et al. T Cell Immunity and Zika Virus Vaccine Development. **Trends in Immunology**, v. 38, n. 8, p. 594–605, 1 ago. 2017.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. **Advances in Virus Research**, v. 59, p. 23–61, 2003.

LIU, M. A. A Comparison of Plasmid DNA and mRNA as Vaccine Technologies. **Vaccines**, v. 7, n. 2, p. 37, 24 abr. 2019.

LÓPEZ-CAMACHO, C. et al. Rational Zika vaccine design via the modulation of antigen membrane anchors in chimpanzee adenoviral vectors. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 2441, 1 jun. 2018.

MAGNUS, M. M. et al. Risk of Zika virus transmission by blood donations in Brazil. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 40, n. 3, p. 250–254, 2018.

MAHÉ, D. et al. Long-term Zika virus infection of non-sperm cells in semen. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 20, n. 12, p. 1371, dez. 2020.

MARTINES, R. B. 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**, v. 65, n. 6, p. 159–160, 1 fev. 2016.

MASSA, S. et al. A plant protein signal sequence improved humoral immune response to HPV prophylactic and therapeutic DNA vaccines. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 13, n. 2, p. 271–282, fev. 2017.

MASSAD, E. et al. On the origin and timing of Zika virus introduction in Brazil. **Epidemiology and Infection**, v. 145, n. 11, p. 2303–2312, ago. 2017.

MCCARTHY, E. E. et al. A cytotoxic-skewed immune set point predicts low neutralizing antibody levels after Zika virus infection. **Cell Reports**, v. 39, n. 7, p. 110815, 17 maio 2022.

MERCADO-REYES, M. et al. Pregnancy, Birth, Infant, and Early Childhood Neurodevelopmental Outcomes among a Cohort of Women with Symptoms of Zika Virus Disease during Pregnancy in Three Surveillance Sites, Project Vigilancia de Embarazadas con Zika (VEZ), Colombia, 2016–2018. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 6, n. 4, p. 183, 12 out. 2021.

MERGULHÃO, F. J. M.; SUMMERS, D. K.; MONTEIRO, G. A. Recombinant protein secretion in Escherichia coli. **Biotechnology Advances**, v. 23, n. 3, p. 177–202, maio 2005.

METSKY, H. C. et al. Zika virus evolution and spread in the Americas. **Nature**, v. 546, n. 7658, p. 411–415, 1 jun. 2017.

MØLHØJ, M.; DEGAN, F. D. Leader sequences are not signal peptides. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 12, p. 1502, dez. 2004.

MOMIN, T. et al. Safety and Immunogenicity of a DNA SARS-CoV-2 vaccine (ZyCoV-D): Results of an open-label, non-randomized phase I part of phase I/II clinical study by intradermal route in healthy subjects in India. **EClinicalMedicine**, v. 38, p. 101020, ago. 2021.

MONLUN, E. et al. [Surveillance of the circulation of arbovirus of medical interest in the region of eastern Senegal]. **Bulletin de la Societe de pathologie exotique (1990)**, v. 86, n. 1, p. 21–28, 1 jan. 1993.

MOORE, C. A. et al. Characterizing the Pattern of Anomalies in Congenital Zika Syndrome for Pediatric Clinicians. **JAMA pediatrics**, v. 171, n. 3, p. 288–295, 1 mar. 2017.

MURRAY, K. O. et al. Prolonged Detection of Zika Virus in Vaginal Secretions and Whole Blood. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 1, p. 99–101, jan. 2017.

MUSSO, D. et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. **Euro Surveillace: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin**, v. 19, n. 14, p. 20761, 10 abr. 2014.

NAZERAI, L. et al. A New In Vivo Model to Study Protective Immunity to Zika Virus Infection in Mice With Intact Type I Interferon Signaling. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 2018.

NAZERAI, L. et al. Effector CD8 T Cell-Dependent Zika Virus Control in the CNS: A Matter of Time and Numbers. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1977, 2020.

NGUYEN, C. T. et al. Prevalence of Zika virus neutralizing antibodies in healthy adults in Vietnam during and after the Zika virus epidemic season: a longitudinal population-based survey. **BMC infectious diseases**, v. 20, n. 1, p. 332, 11 maio 2020.

NICASTRI, E. et al. Zika Virus Infection in the Central Nervous System and Female Genital Tract. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 12, p. 2228–2230, dez. 2016.

NICOLAS CALDERON, K.; FABIAN GALINDO, J.; BERMUDEZ-SANTANA, C. I. Evaluation of Conserved RNA Secondary Structures within and between Geographic Lineages of Zika Virus. **Life (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 4, p. 344, 14 abr. 2021.

NUNES, B. T. D. et al. Zika structural genes determine the virulence of African and Asian lineages. **Emerging Microbes & Infections**, v. 9, n. 1, p. 1023–1033, 1 jan. 2020.

OHMURO-MATSUYAMA, Y.; YAMAJI, H. Modifications of a signal sequence for antibody secretion from insect cells. **Cytotechnology**, v. 70, n. 3, p. 891–898, jun. 2018.

OLI, A. N. et al. Immunoinformatics and Vaccine Development: An Overview. **ImmunoTargets and Therapy**, v. 9, p. 13–30, 26 fev. 2020.

OLSON, J. G. et al. Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 3, p. 389–393, 1981.

OSUNA, C. E. et al. Zika viral dynamics and shedding in rhesus and cynomolgus macaques. **Nature Medicine**, v. 22, n. 12, p. 1448–1455, dez. 2016.

OWJI, H. et al. A comprehensive review of signal peptides: Structure, roles, and applications. **European Journal of Cell Biology**, v. 97, n. 6, p. 422–441, ago. 2018.

PARDY, R. D. et al. Analysis of the T Cell Response to Zika Virus and Identification of a Novel CD8+ T Cell Epitope in Immunocompetent Mice. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 2, p. e1006184, 23 fev. 2017.

PARKER, E. L. et al. Viral-Immune Cell Interactions at the Maternal-Fetal Interface in Human Pregnancy. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2020.

PATTNAIK, A.; SAHOO, B. R.; PATTNAIK, A. K. Current Status of Zika Virus Vaccines: Successes and Challenges. **Vaccines**, v. 8, n. 2, p. 266, 31 maio 2020.

PEIXOTO, H. M. et al. Guillain-Barré syndrome associated with Zika virus infection in Brazil: a cost-of-illness study. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 113, n. 5, p. 252–258, 1 maio 2019.

PENA, L. J. et al. In vitro and in vivo models for studying Zika virus biology. **The Journal of General Virology**, v. 99, n. 12, p. 1529–1550, dez. 2018.

PEREZ-TRUJILLO, J. J. et al. DNA vaccine encoding human papillomavirus antigens flanked by a signal peptide and a KDEL sequence induces a potent therapeutic antitumor effect. **Oncology Letters**, v. 13, n. 3, p. 1569–1574, mar. 2017.

PETERSEN, E. et al. Rapid Spread of Zika Virus in The Americas--Implications for Public Health Preparedness for Mass Gatherings at the 2016 Brazil Olympic Games. **International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases**, v. 44, p. 11–15, mar. 2016a.

PETERSEN, L. R. et al. Zika Virus. **The New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 16, p. 1552–1563, 21 abr. 2016b.

PIERSON, T. C.; DIAMOND, M. S. The emergence of Zika virus and its new clinical syndromes. **Nature**, v. 560, n. 7720, p. 573–581, ago. 2018.

PIERSON, T. C.; DIAMOND, M. S. The continued threat of emerging flaviviruses. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 6, p. 796–812, jun. 2020.

PIERSON, T. C.; GRAHAM, B. S. Zika virus: immunity and vaccine development. **Cell**, v. 167, n. 3, p. 625–631, 20 out. 2016.

RAMANAN, R. N. et al. Effect of promoter strength and signal sequence on the periplasmic expression of human interferon- γ in Escherichia coli. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 3, 2010.

RATHORE, A. P. S.; ST. JOHN, A. L. Cross-Reactive Immunity Among Flaviviruses. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2020.

RIBEIRO, G. S. et al. Influence of herd immunity in the cyclical nature of arboviruses. **Current Opinion in Virology**, v. 40, p. 1–10, fev. 2020.

RICHNER, J. M. et al. Vaccine Mediated Protection Against Zika Virus-Induced Congenital Disease. **Cell**, v. 170, n. 2, p. 273–283.e12, 13 jul. 2017.

SAADE, F.; PETROVSKY, N. Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines. **Expert Review of Vaccines**, v. 11, n. 2, p. 189–209, fev. 2012.

SALISCH, N. C. et al. A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Phase 1 Study of Ad26.ZIKV.001, an Ad26-Vectored Anti-Zika Virus Vaccine. **Annals of Internal Medicine**, v. 174, n. 5, p. 585–594, maio 2021.

SANCHEZ VARGAS, L. A. et al. Non-structural protein 1-specific antibodies directed against Zika virus in humans mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity. **Immunology**, v. 164, n. 2, p. 386–397, out. 2021.

SAPPARAPU, G. et al. Neutralizing human antibodies prevent Zika virus replication and fetal disease in mice. **Nature**, v. 540, n. 7633, p. 443–447, dez. 2016.

SARDESAI, N. Y.; WEINER, D. B. Electroporation delivery of DNA vaccines: prospects for success. **Current Opinion in Immunology**, v. 23, n. 3, p. 421–429, jun. 2011.

SHAN, C.; XIE, X.; SHI, P.-Y. Zika Virus Vaccine: Progress and Challenges. **Cell Host & Microbe**, v. 24, n. 1, p. 12–17, 11 jul. 2018.

SHARMA, V. et al. Zika virus: an emerging challenge to public health worldwide. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 87–98, fev. 2020.

SHER, A. A.; GLOVER, K. K. M.; COOMBS, K. M. Zika Virus Infection Disrupts Astrocytic Proteins Involved in Synapse Control and Axon Guidance. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.

SHI, Y.; GAO, G. F. Structural Biology of the Zika Virus. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 42, n. 6, p. 443–456, jun. 2017.

SILVA, A. J. D. et al. *Pichia pastoris* displaying ZIKV protein epitopes from the Envelope and NS1 induce in vitro immune activation. **Vaccine**, v. 39, n. 18, p. 2545–2554, 28 abr. 2021.

SIMMONDS, P. et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. **The Journal of General Virology**, v. 98, n. 1, p. 2–3, jan. 2017.

SIMPSON, D. I. H. Zika virus infection in man. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 4, p. 335–338, 1 jul. 1964.

TAI, W. et al. Critical neutralizing fragment of Zika virus EDIII elicits cross-neutralization and protection against divergent Zika viruses. **Emerging Microbes & Infections**, v. 7, p. 7, 24 jan. 2018.

TANG, D. C.; DEVIT, M.; JOHNSTON, S. A. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. **Nature**, v. 356, n. 6365, p. 152–154, 12 mar. 1992.

TEBAS, P. et al. Safety and Immunogenicity of an Anti-Zika Virus DNA Vaccine. **The New England Journal of Medicine**, v. 385, n. 12, p. e35, 16 set. 2021.

TO, A. et al. Recombinant Zika Virus Subunits Are Immunogenic and Efficacious in Mice. **mSphere**, v. 3, n. 1, p. e00576-17, 10 jan. 2018.

TUNALI, M. et al. A review exploring the overarching burden of Zika virus with emphasis on epidemiological case studies from Brazil. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 28, n. 40, p. 55952–55966, 2021.

ULMER, J. B. et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. **Science (New York, N.Y.)**, v. 259, n. 5102, p. 1745–1749, 19 mar. 1993.

VANNICE, K. S. et al. Demonstrating vaccine effectiveness during a waning epidemic: A WHO/NIH meeting report on approaches to development and licensure of Zika vaccine candidates. **Vaccine**, v. 37, n. 6, p. 863–868, 4 fev. 2019.

VERMEIRE, K. et al. Signal Peptide-Binding Drug as a Selective Inhibitor of Co-Translational Protein Translocation. **PLoS Biology**, v. 12, n. 12, p. e1002011, 2 dez. 2014.

VISSEAU, B. et al. Zika virus in the female genital tract. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 11, p. 1220, 1 nov. 2016.

VON HEIJNE, G. The signal peptide. **The Journal of Membrane Biology**, v. 115, n. 3, p. 195–201, maio 1990.

WANG, Q. et al. Molecular determinants of human neutralizing antibodies isolated from a patient infected with Zika virus. **Science Translational Medicine**, v. 8, n. 369, p. 369ra179, 14 dez. 2016.

WANG, R. et al. Maternal immunization with a DNA vaccine candidate elicits specific passive protection against post-natal Zika virus infection in immunocompetent BALB/c mice. **Vaccine**, v. 36, n. 24, p. 3522–3532, 1 jun. 2018.

WESTERS, L.; WESTERS, H.; QUAX, W. J. Bacillus subtilis as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1694, n. 1–3, p. 299–310, 11 nov. 2004.

WILDER-SMITH, A.; OSMAN, S. Public health emergencies of international concern: a historic overview. **Journal of Travel Medicine**, v. 27, n. 8, p. taaa227, 23 dez. 2020.

XING, H. et al. Zika NS2B is a crucial factor recruiting NS3 to the ER and activating its protease activity. **Virus Research**, v. 275, p. 197793, 2 jan. 2020.

YU, L. et al. Monoclonal Antibodies against Zika Virus NS1 Protein Confer Protection via Fcγ Receptor-Dependent and -Independent Pathways. **mBio**, v. 12, n. 1, p. e03179-20, 9 fev. 2021.

ZHANG, L.; LENG, Q.; MIXSON, A. J. Alteration in the IL-2 signal peptide affects secretion of proteins in vitro and in vivo. **The Journal of Gene Medicine**, v. 7, n. 3, p. 354–365, mar. 2005.

ZHANG, X. et al. Zika Virus NS2A-Mediated Virion Assembly. **mBio**, v. 10, n. 5, p. e02375-19, 29 out. 2019.

ZHAO, M.; WOODSIDE, M. T. Mechanical strength of RNA knot in Zika virus protects against cellular defenses. **Nature Chemical Biology**, v. 17, n. 9, p. 975–981, set. 2021.

ZHAO, Z. et al. Nuclear localization of Zika virus NS5 contributes to suppression of type I interferon production and response. **The Journal of General Virology**, v. 102, n. 3, p. 001376, 20 dez. 2019.

ZHONG, Z. et al. Immunogenicity and Protection Efficacy of a Naked Self-Replicating mRNA-Based Zika Virus Vaccine. **Vaccines**, v. 7, n. 3, p. 96, set. 2019.

ZHOU, K. et al. Current Progress in the Development of Zika Virus Vaccines. **Vaccines**, v. 9, n. 9, p. 1004, 9 set. 2021.

ZMURKO, J.; NEYTS, J.; DALLMEIER, K. Flaviviral NS4b, chameleon and jack-in-the-box roles in viral replication and pathogenesis, and a molecular target for antiviral intervention. **Reviews in Medical Virology**, v. 25, n. 4, p. 205–223, jul. 2015.

APÊNDICE A – IN VITRO AND IN VIVO MODELS FOR STUDYING ZIKA VIRUS BIOLOGY

Artigo publicado na revista Journal of General Virology – Fator de impacto: 4,87;
Qualis/CAPES Ciências Biológicas I: B1

Lindomar José Pena ¹, Klarissa Miranda Guarines ¹, Anna Jéssica Duarte Silva ²,
Lígia Rosa Sales Leal ², Daniele Mendes Félix ¹, Adalúcia Silva ¹, Sheilla Andrade de
Oliveira ³, Constância Flávia Junqueira Ayres ⁴, Abelardo Silva Júnior ⁵, Antonio
Carlos de Freitas ²

Affiliations:

¹ Department of Virology, Aggeu Magalhaes Institute (IAM), Oswaldo Cruz
Foundation (Fiocruz), Recife, Pernambuco, Brazil.

² Department of Genetics, Laboratory of Molecular Studies and Experimental
Therapy (LEMTE), Center of Biological Sciences, Federal University of Pernambuco
(UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil.

³ Department of Immunology, Aggeu Magalhaes Institute (IAM), Oswaldo Cruz
Foundation (Fiocruz), Recife, Pernambuco, Brazil.

⁴ Department of Entomology, Aggeu Magalhaes Institute (IAM), Oswaldo Cruz
Foundation (Fiocruz), Recife, Pernambuco, Brazil.

⁵ Department of Veterinary Medicine, Federal University of Viçosa (UFV), Viçosa,
Minas Gerais, Brazil.

***Correspondence:** Lindomar José Pena, lindomar.pena@cpqam.fiocruz.br

In vitro and in vivo models for studying Zika virus biology

Abstract

The emergence and rapid spread of Zika virus (ZIKV) in the Americas has prompted the development of in vitro and in vivo models to understand several aspects of ZIKV biology and boost the development of vaccines and antivirals. In vitro model studies include reverse genetics systems, two-dimensional (2D) cell models, such as primary cells and cell lines, and ex vivo three-dimensional (3D) models derived from skin, brain and placenta. While these models are cost-effective and allow rigorous control of experimental variables, they do not always recapitulate in vivo scenarios. Thus, a number of in vivo models have been developed, including mosquitoes (*Aedes* sp. and *Culex* sp.), embryonated chicken eggs, immunocompetent and immunodeficient mice strains, hamsters, guinea pigs, conventional swine and non-human primates. In this review, we summarize the main research systems that have been developed in recent years and discuss their advantages, limitations and main applications.

Keywords: ZIKV; animal models; ex vivo; in vitro; in vivo.

Introduction

Zika virus (ZIKV) is a mosquito-borne arbovirus that has silently circulated in African and Asian countries for many decades and only caused outbreaks of a mild febrile illness. In 2007, however, a large ZIKV outbreak occurred in Yap Island. Later, the virus reemerged in French Polynesia in 2013 and rapidly spread throughout the Pacific [1, 2]. Nonetheless, the dramatic increase of birth defects reported in 2015 in Brazilian newborns changed the world's perspective on this hitherto overlooked pathogen [3]. Fifty-nine countries and territories have reported ZIKV cases from 2015 onwards. The virus continues to spread geographically to areas where competent vectors are present [4]. In the Americas continent alone, there have been 223477 confirmed autochthonous cases of Zika disease and 3720 cases of congenital Zika syndrome (CZS) since 2015 [5].

The virus belongs to the genus *Flavivirus* within the *Flaviviridae* family and as such it has a single-stranded positive-sense RNA genome that is approximately 11 Kb in length. The genome is translated as a single long open reading frame (ORF) that is

flanked by 5' and 3' untranslated regions (UTRs) [6]. Translation of the ZIKV ORF generates three structural proteins (C, prM and E) and seven non-structural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B and NS5). The ZIKV genome produces two types of 3'UTR-derived, non-coding subgenomic flavivirus RNA (sfRNA), which play a role in antagonizing the host innate immune response [7, 8].

ZIKV is primarily transmitted to humans through the bites of infected mosquitoes from certain species. However, the virus can also be transmitted by blood transfusion, transplacentally, perinatally and sexually [9]. In most patients, infection by ZIKV causes a self-limiting exanthematous disease. However, fetuses infected with ZIKV may develop a number of serious teratogenic effects, including microcephaly, cerebral calcifications, ventriculomegaly, cerebellar hypoplasia, arthrogryposis, diaphragm paralysis, and visual and hearing impairments [10]. Moreover, in some patients the virus can cause a broad range of severe neurological manifestations, such as encephalomyelitis, myelitis, ophthalmologic disease, and Guillain–Barré syndrome (GBS) [11–13].

These severe clinical manifestations in humans have prompted the development of several *in vitro* and *in vivo* models aimed at uncovering the underlying mechanisms of ZIKV pathogenesis and transmission and boosting the development of countermeasures. In this review, we summarize the main research systems that have been developed to study the biology of ZIKV in recent years and discuss their advantages, limitations and applications (Fig. 1).

In vitro models

Two-dimensional cell culture models

Two-dimensional (2D) cell culture systems provide a simple and valuable system for studies in a highly controlled environment. Primary cells are isolated directly from animal or human tissue and usually have a limited lifespan. Conversely, cell lines can be continually passaged over a long period of time, since they have acquired mutations that allow them to proliferate readily. Primary cells better resemble the original tissue from which they were isolated, but they are more difficult to obtain, maintain and propagate compared to cell lines.

Primary cells

The infection of primary human epidermal keratinocytes obtained from neonatal foreskins and in vitro-generated immature dendritic cells (DCs) resulted in active ZIKV replication and the activation of the innate immune response [14]. Heparinized whole blood and human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors are also susceptible to ZIKV infection. CD14⁺ blood monocytes are major targets for ZIKV and blood from pregnant women showed an enhanced susceptibility to infection by different ZIKV strains, suggesting differential immunomodulatory responses of blood monocytes during pregnancy [15, 16]. However, these data should be taken with caution, because they are based on studies carried out in countries where dengue is endemic and antibodies against dengue may modulate ZIKV infectivity by an antibody-dependent enhancement (ADE) mechanism [17]. Primary human DCs supported productive ZIKV replication following infection and exhibited donor-dependent variability in viral replication, but not viral binding. Different ZIKV strains antagonized type I interferon (IFN)-mediated phosphorylation of STAT1 and STAT2 [18].

Siemann and coworkers provided insights into the pathogenesis of ZIKV for male hosts by demonstrating that primary human Sertoli cells are susceptible to ZIKV infection. ZIKV infection of these cells leads to a strong antiviral response which compromises the integrity of the blood–testis barrier [19]. Amniotic epithelial cells (AmEpCs) isolated from human mid- and late-gestation placentas are productively infected by ZIKV. Trophoblast progenitor cells (TBPCs) from chorion, human placental fibroblasts (HPFs) and cytotrophoblasts (CTBs) from chorionic villi are also susceptible to ZIKV. Interestingly, cells from mid-gestation produced higher titres than cells from late gestation [20]. Jurado et al. demonstrated that ZIKV productively infects primary human placental macrophages, known as Hofbauer cells, and placental villous fibroblasts [21].

An independent study performed with human placental trophoblasts showed that ZIKV actively replicates in these cells without causing trophoblast dysfunction, senescence or death. This suggests that the placenta may serve as a silent portal for mother-to-foetus transmission [22]. Primary human endometrial stromal cells (HESC) supported the replication of different ZIKV strains. ZIKV replication and expression of the entry co-receptor AXL was enhanced by cyclic AMP and progesterone-induced decidualization of these cells, indicating that they may serve as virus sources for spreading to placental trophoblasts during pregnancy [23]. Primary human

trophoblasts (PHTs), which are the barrier cells of the placenta, are refractory to ZIKV infection through the constitutive release of type III IFN λ 1, which functions in both a paracrine and an autocrine manner to protect trophoblast and non-trophoblast cells from infection [24].

Given the devastating neurological disorders linked to ZIKV affecting the peripheral and central nervous systems (PNS and CNS, respectively), Cumberworth et al. infected primary mouse PNS and CNS myelinating cells derived from wild-type and *Ifnar1* knockout mice with ZIKV [25]. Through systematic quantification of ZIKV-infected cells in myelinating cultures, they found that CNS cells are considerably more susceptible to infection than PNS cells, especially CNS axons and myelinating oligodendrocytes. The infection of primary human astrocytes and microglia resulted in high viral replication and the induction of elevated levels of proinflammatory immune cytokines, which may be involved in neuropathogenesis [26, 27]. Primary human neural stem cells (hNSCs) derived from three different donors demonstrated donor-dependent ZIKA-mediated transcriptome alterations and reduction in neuronal differentiation, suggesting that a genetic component is involved in ZIKV neuropathology [28].

Cell lines

Viral growth kinetics in cell culture is useful to characterize different viral strains, and also to identify and test drug and vaccine candidates. In general, cell lines are considered to be genetically and phenotypically homogenous, but biological differences among the same cell line from different laboratories might occur and researchers should be aware of this possibility.

Like other flaviviruses, ZIKV replicates well in Vero and C6/36 cells, which are widely used for virus isolation from both clinical and mosquito samples [7, 29]. The susceptibility of different human and animal cell lines has been systematically characterized. Here we will summarize a few studies using different cell lines. Human cell lines derived from placenta (JEG-3), neurones (SF268), muscle (RD), retina (ARPE19), lung (Hep-2 and HFL), colon (Caco-2) and liver (Huh-7) allowed productive ZIKV replication and displayed cytopathic effects (CPE). In contrast, cell lines originating from prostate (LNCaP), testes (833KE), cervix (Hela), endometrium (HOSE6-3) and kidneys (HEK) supported viral replication but did not show CPE. Among animal cell lines, those of nonhuman primate (Vero and LLC-MK2), swine (PK-

15), rabbit (RK-13), hamster (BHK21) and chicken (DF-1) origin permitted productive ZIKV replication [30]. Guinea pig lung fibroblast cells (JH4) are also susceptible to infection [31]. Recently, a human neuroblastoma cell line (SH-SY5Y) has been shown to be very useful for the evaluation of antiviral drugs against ZIKV [32].

ZIKV replicates in human monocytic leukaemia cells (THP-1) at a low rate, but triggers robust antiviral innate cytokine responses. The infection of first trimester human extravillous trophoblast cells (HTR8) demonstrated that ZIKV replicates efficiently in these cells and induces strong inflammatory cytokine and chemokine production [33]. ZIKV can also infect U87-MG (human glioblastoma) cells and produce NLRP3 inflammasome activation and IL-1 β release after infection. Increased gene expression for superoxide dismutase 2 (SOD2) and heme oxygenase (HemeOX), two important antioxidant enzymes commonly used to assess oxidative stress, has also been observed. This suggests that ZIKV infection can cause oxidative stress and inflammasome activation, which can lead to cell death via pyroptosis and CNS damage [34].

Mosquito cell lines have been used to elucidate basic biological questions. For instance, Varjak et al. used the *Aedes aegypti*-derived Aag2, AF319 and AF5 cell lines to elucidate ZIKV–mosquito RNAi interactions [35]. C6/36 cells were also employed to investigate the cytoarchitecture of ZIKV during replication, and the authors suggested that these cells are good models for this kind of study [36–38]. To demonstrate ZIKV inhibition by *Wolbachia* strains in mosquito cell cultures, Schultz et al. used *Ae. albopictus* C710 and C/wStri cells (derived from C710 cells). In this case, this study confirmed previous data obtained using in vivo models [39].

Three-dimensional (3D) cell culture models

Although 2D cell culture systems allow better control of experimental variables and are much easier to manipulate than 3D cell cultures, they do not exhibit the natural physiological conditions, cytoarchitecture and cellular complexity present in vivo. Therefore, 2D systems sometimes provide misleading or nonpredictive outcomes for in vivo settings [40]. Thus, researchers have chosen 3D systems to better characterize infection. Table 1 summarizes the main 3D cell systems developed to date. Protocols for generating human brain region-specific organoids have been developed [41].

The skin is the site of ZIKV entry following the bite of an infected mosquito. Skin explants obtained from healthy donors following abdominoplastic surgery have proved

valuable in understanding ZIKV pathogenesis in this site [14]. Because of their differentiation potential, pluripotent stem cells can generate virtually any cell type. Recently, structures resembling whole organs, termed organoids, have been generated from stem cells through the development of 3D culture systems [42]. Organoid cell culture systems are based on the properties of stem cells to differentiate and self-organize, creating multi-cellular tissues that resemble the structure of and function as an intact organ [43]. Several studies have used this system to study the connection between ZIKV infection and microcephaly [44–49]. Organoids also allow us to understand phenotypic and transcriptomic responses during neural development, for example [45]. ZIKV infects cells at different stages of brain maturation, leading to alterations in the cortical layer organization [47]. Qian et al. [44] engineered a miniaturized spinning bioreactor using 3D design and printing technology and developed protocols to generate forebrain-specific organoids from human iPSCs and for midbrain and hypothalamic organoids. They provided an accessible, cost-effective, simple-to-use and versatile platform for modelling human brain development and disease and for screening antiviral drug candidates. Garcez et al. [46] used iPSCs cultured as neural stem cells (NSCs) neurospheres and brain organoids to demonstrate that ZIKV infection induces cell death in human iPSC-derived NSCs, disrupts the formation of neurospheres and reduces the growth of organoids. Tang et al. [50] also used a protocol to differentiate iPSCs into forebrain-specific human neural progenitor cells (hNPCs), which can be further differentiated into cortical neurons, as an in vitro model to investigate whether ZIKV directly infects human neural cells and the nature of its impact. They showed that ZIKV can directly infect hNPCs in vitro with high efficiency and that the infection of these cells led to attenuated population growth through virally induced caspase-3-mediated apoptosis and cell cycle deregulation.

Nowakowski et al. [48] hypothesized that protein expression may be promoting ZIKV entry and infectivity during neurogenesis. They analysed the expression of candidate genes mediating flavivirus entry across single cells from the developing human cerebral cortex and reported the importance of candidate ZIKV receptor AXL in vulnerability to ZIKV infection. In agreement with these findings, Wells et al. [49] studied the effects of AXL deletion and demonstrated that it was not able to protect against ZIKV infection.

ZIKV can replicate in first-trimester human maternal decidual tissues grown ex vivo as 3D organ cultures [51]. In explants of chorionic villi from first-trimester placentas, ZIKV

infected proliferating villus cytotrophoblasts (CTBs), invasive CTBs and Hofbauer cells in the villus core, and expressed E and NS3 proteins, indicating viral replication [20, 21]. Tabata et al. suggested that ZIKV transmission occurs through placental and paraplacental routes and that the virus spreads from basal and parietal decidua to chorionic villi and amniochorionic membranes [52].

Reverse genetics systems for ZIKV

Reverse genetics is a powerful tool that allows important viral properties such as replication, virulence, cell penetration, transmission, host range and the function of coding or non-coding genomic regions to be studied. However, the construction of reverse genetics systems for flaviviruses is often difficult, as it involves multiple cloning of fragments of cDNA. The process is laborious and the difficulties encountered in replicating such clones in bacterial cells can cause viral sequences to be unstable and can even cause toxicity in bacterial hosts [53, 54]. Upon the emergence of ZIKV in the Americas, this technology was employed by several groups using the classical and epidemic strains [55–64]. The main ZIKV reverse genetics systems and their major applications are summarized in Table 2. The first system to be developed used the Cambodian ZIKV FSS13025 strain. Rescued viruses were shown to be highly infectious for *Ae. aegypti* mosquitoes and virulent to both A129 and AG129 mice, although it was more attenuated than the wild-type virus [55].

The Brazilian ZIKV Paraiba 01/2015 strain and the MR766 prototype of ZIKV have been used recently to generate infectious clones. Their genetic stability was further improved by inserting intron sequences into the NS1 and NS5 genes [56, 65]. ZIKV expressing reporter genes such as luciferase and GFP was proved to be a valuable tool for virus growth and replication analysis, as well as antiviral tests [55, 66]. The introduction of an NS1 K265E mutation significantly increased virus production on Vero cells, which has an impact on vaccine production [63]. Using reverse genetics, it was found that a single serine-to-asparagine substitution (S139N) in the prM protein of ZIKV contributes to foetal microcephaly, demonstrating the power of the system to identify genetic determinants of virulence [67].

A bacteria-free approach that does not require cloning, termed ‘infectious subgenomic amplicons’ (ISA), has been used to recover infectious viruses from PCR products in both mammalian and insect cells [59, 62]. The concept of ISA is based on the production by PCR of three to six overlapping DNA fragments that encompass the

entire viral genome. The ZIKV genome is flanked by the CMV promoter and the hepatitis delta (HDV) ribozyme followed by the simian virus 40 (SV40) polyadenylation signal in the 5' and 3' ends, respectively. The amplicons are then mixed and transfected directly into susceptible cells to enable virus rescue through as yet unknown in cellulo recombination events. Unlike other bacterium-free approaches, the ISA method does not require any additional steps, such as cloning, propagation of cDNA into bacteria, or even RNA synthesis [59].

Setoh et al. used a modified circular polymerase extension reaction protocol to generate de novo a fully functional ZIKV directly from deep sequencing data. This technique has the advantage of generating infectious virus without the need for prior virus isolation and passaging in cell culture and/or suckling mice, which may result in the accumulation of adaptive mutations that may affect viral phenotypes [64].

More recently, infectious clones have been employed for in vivo and in vitro research on emerging mutations. A reverse genetics system was used to evaluate the effect of the V2634M mutation in NS5, a mutation associated with changes in viral replication efficiency as well as the incidence of microcephaly in Latin America. However, the mutant infectious clone showed no significant change in cell culture replication, and nor did it alter the pathogenesis characteristic and virulence of ZIKV in AG6 mice [68].

In addition to the infectious clones, the use of replicons has also been a useful tool to study viral replication, to investigate the role of specific mutations and to discover novel antiviral drugs. They have the advantage of not being infectious, which makes handling them in the laboratory safer [69, 70]. Taken together, these systems are valuable tools for the discovery of new antiviral compounds and for studying the physiopathology of ZIKV infection.

In vivo models

Murine models

Murine models have contributed significantly to the acquisition of new insights into the biology of ZIKV infection [47, 71–73]. Mice have contributed to elucidate several aspects of ZIKV pathogenesis, including the link between ZIKV infection in pregnant women and congenital defects [46, 50, 74]. Mice have also been a valuable model for the evaluation of vaccine and antiviral candidates. Their small size, low cost and fast reproductive rate make these animals attractive models for ZIKV studies.

Immunocompetent mice strains

Immunocompetent adult mice show little susceptibility to ZIKV infection and do not emulate the spectrum of ZIKV clinical manifestations seen in humans (Table 3). One of the reasons for this phenotype is the ability of ZIKV to degrade STAT2, an IFN-regulated transcriptional activator in humans but not mice [75]. Since ZIKV is sensitive to the action of IFN types I, II and III, blockage of IFN receptors has been used to develop susceptible mouse models [14, 24, 76]. Lazear et al. used an IFNAR1-blocking monoclonal antibody (MAR1-5A3) in C57BL/6 mice to make them susceptible to ZIKV infection. These animals did not develop neurological manifestations and the disease was not as severe as that observed in *Ifnar1*^{-/-} mice [76]. A similar approach was applied to develop a lethal C57BL/6 mice model. In this study, animals inoculated with the DAKAR D41525 strain via either the subcutaneous or the intraperitoneal route had 40 and 100% mortality rates, respectively. ZIKV administration through either route caused viraemia, motor impairment and weight loss [77]. Immunocompetent mice treated with anti-IFNar1 antibodies have also been used for the discovery of antiviral drugs acting against ZIKV. Five-week-old CB57/6 mice previously treated with anti-*ifnar1* antibodies and later infected with the mouse-adapted DAKAR 41519 strain showed a survival rate of almost 20%, even when not treated with sofosbuvir, an inhibitor of the ZIKV NS5 RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) [78]. The DAKAR D41519 strain is a lethal mouse-adapted ZIKV strain obtained following brain homogenate passage in *Rag1*^{-/-} mice [79]. The antiviral action of sofosbuvir was also demonstrated in 3-day-old Swiss mice, without the need for IFN blockage [80]. Given that mouse models based on antibody blockage of IFN receptors are expensive for routine use and may not be able to completely deplete the IFN response [78], alternative ways to develop immunocompromised models must be explored. One strategy is to administer immunosuppressive drugs. After ZIKV infection, dexamethasone-immunocompromised BALB/c mice sustained high viral replication in multiple organs, inflammation and mild weight loss after inoculation via the peritoneal route [81]. Interestingly, immunohistochemical analyses conducted in the tissues of euthanized mice, especially from those that had been withdrawn from dexamethasone after day 9, indicated that the rapid systemic deterioration effects observed after viral challenge were partially due to the host immune response to ZIKV infection [81].

Previous studies have indicated the possible protective role of T-cell responses during ZIKV infection [82]. SJL mice are immunocompetent, but have elevated levels

of circulating T-cells [83, 84]. Interestingly, pregnant SJL mice, when inoculated intravenously with a high dose of 10¹⁰–10¹² plaque-forming units (p.f.u.) of ZIKV, generated pups that presented neurological and ophthalmological malformations similar to those observed in humans, in addition to intrauterine growth retardation [47]. Using C57BL/6 mice, the authors found that ZIKV was not able to cross the placental barrier in C57BL/6 females infected during gestation, as they had offspring that were free of infection [47]. In contrast, fetuses of C57BL/6 female mice that were inoculated intraperitoneally with an Asian lineage strain during gestation displayed signs of ZIKV infection in their brains and viral RNA was detected in mouse placentas at day 3 post-inoculation [85].

Similar to C57BL/6 mice, the outbred CD-1 mice have been demonstrated to be resistant to ZIKV infection. Infection of these animals at 3 weeks with the FSS13025 ZIKV Asian strain resulted in no clinical signs of infection and no detectable viraemia [73]. However, this apparent resistance might not be solely due to the route of infection chosen, but also to the viral strain used. When CD1 mice were challenged intracranially with the MR766 ZIKV strain, they exhibited an 80–100% mortality rate that was age-independent. Intraperitoneal inoculation with the same strain generated morbidity signs, but no mortality in a dose-dependent manner [86]. Remarkably, 5–6-week-old female 129 Sv/Ev mice inoculated through the subcutaneous route with 10⁶ pfu of ZIKV showed no clinical and histopathological signs of infection. Viraemia and low viral RNA levels were found in the brain, ovaries, liver and spleen after infection [87]. Remarkably, intravenous ZIKV infection of pregnant immunocompetent C57BL/6J pregnant mice led to profound placental pathology and a high frequency of foetal demise, in the absence of foetal infection [88].

Another immunocompetent mouse used in ZIKV research is the ICR strain, a highly prolific outbred mouse strain derived from Swiss mice. Direct intracerebral inoculation of mouse fetuses resulted in high viral replication, cell cycle arrest, apoptosis and inhibition of neural precursor cell differentiation, leading to microcephaly [89].

A fully immunocompetent humanized mouse model has been recently developed by knocking in (KI) the human STAT2 into the mouse Stat2 locus (hSTAT2 KI). Infection of pregnant hSTAT2 KI mice was carried with a highly virulent mouse-adapted ZIKV strain derived from the ZIKV-Dak-41525 strain. The infection resulted in viral spread to the placenta and foetal brain [90].

In addition to mouse age and lineage, the route of infection can directly affect the outcome of ZIKV infection. Significant lesions and cell death in the CNS were observed in newborn Swiss mice inoculated with ZIKV through either the intracerebral or the subcutaneous route, which led to the development of myelopathy and encephalopathy, respectively. Further, animals inoculated by the subcutaneous route presented spinal cord injury [91]. A haematogenic infection model was conceived to evaluate the effects of ZIKV infection on embryonic and foetal development, using FBV/NJ and C57BL/6J mice. Early infections caused growth restriction and/or severe malformations in infected embryos, including hydrocephalus and dysraphia. Later exposure to ZIKV did not generate significant effects as foetal development progressed [92]. Remarkably, intravenous ZIKV infection of pregnant immunocompetent C57BL/6J pregnant mice led to profound placental pathology and a high frequency of foetal demise, in the absence of foetal infection. In this study, placental pathology rather than embryonic/foetal viral infection seemed to be a stronger contributor to adverse pregnancy outcomes in mice and direct viral infection of the embryo was not essential for foetal demise. [88]. Yockey et al. observed long-lasting infections and high rates of viral replication in C57BL/6 females infected intravaginally. In addition, fetuses of females inoculated by this route during pregnancy developed cerebral infection and intrauterine growth retardation [93].

Thus, although immunocompetent mice models present limitations regarding clinical manifestation of the disease, they are valuable to obtain evidences about viral pathogenesis under the full action of the innate and adaptive immune responses of the host to ZIKV.

Immune-deficient strains

In contrast to immunocompetent mice, immunocompromised mice display signs of disease and high levels of viraemia, and can be infected even with low-passage viral strains (Table 4). The major disadvantage of immunocompromised mice is the lack of essential components of the immune response, which may underestimate the efficacy of some vaccine candidates and not model disease pathogenesis accurately in immunocompetent hosts. Nevertheless, these models have been successfully used for preclinical evaluation of vaccines and antivirals against ZIKV [94–97].

A129 mice lack the receptor for IFN α/β , making them unresponsive to type I IFNs. It was one of the first models used to characterize ZIKV infection, although it had already

been used in studies about other viruses, such as chikungunya virus (CHIKV) and yellow fever virus (YFV) [87, 98]. On the other hand, the AG129 mouse strain is a double knockout for the IFN α/β and γ receptors and is more susceptible to ZIKV-induced disease than A129 mice, highlighting the role of IFN- γ in the outcome of the disease. Although the ZIKV infection kinetics in AG129 mice is similar to that in A129, the disease signs are more severe in AG129, probably because of the protective role of IFN γ [57, 71–73].

The A129 mice may also be useful in vaccine challenge studies since they remain susceptible to the induction of morbidity and mortality caused by ZIKV even when infected at 6 months of age. The detection of persistent infection foci in organs such as the brain, spinal cord, testes and ovaries even after the resolution of disease symptoms is an important finding in the study of the development of GBS and congenital infections (associated or not with microcephaly) and the occurrence of sexual transmission [73, 76, 87, 99]. Furthermore, Rossi and colleagues [73] characterized ZIKV infection in both A129 and AG129 mice. Intraperitoneal ZIKV infection of A129 mice resulted in clinical disease (tremors, lethargy and anorexia) and mortality in an age-dependent manner. The virus replicated in several organs, but the highest titres were found in the spleen, testes and brain. Overall, little difference was seen between the disease and virulence of ZIKV in A129 and AG129 mice, except for the severity of the neurological manifestations, which was more pronounced in the latter strain [73]. The neurovirulence of ZIKV in AG129 mice was endorsed by Aliota and coworkers, who reported significant histopathological lesions in the brain upon infection [71]. These observations suggest the relevance of these mice strains for studying disease pathogenesis in humans, including the Guillain–Barré Syndrome and microcephaly.

Another relevant model is characterized by *Irf3*^{-/-} *Irf5*^{-/-} *Irf7*^{-/-} mice that are C57BL/6 triple knockout (TKO) for the transcription factors interferon-regulatory factors 3, 5 and 7, respectively [76, 100]. This lineage has been used to study the impact of ZIKV in the CNS, where high levels of viral RNA were detected in tissues after infection and severe signs of neurological disease, such hindlimb weakness and paralysis, were observed [76]. Compared to *Ifnar1*^{-/-}, which is knockout for IFN α/β receptors, the TKO model was more susceptible to ZIKV infection and this difference points to a role for an IRF-3 dependent, IFN- α/β -independent mechanism. In fact, ZIKV infection blocks

the induction of type I IFN by downregulating IRF3 and antiviral NF- κ B-mediated signalling and targets STAT2 for proteasomal degradation [101].

Following the discovery that ZIKV evades the innate immune system by targeting STAT2 for degradation, Tripathi et al. infected Stat2^{-/-} mice subcutaneously and showed that this strain is highly susceptible to ZIKV infection. They demonstrated that ZIKV spread systemically in this knockout mice strain and caused neurological disease [102]. Interestingly, it has been observed that SCID mice (deficient in T and B lymphocytes) develop more severe disease and are more resistant to infection than the AG129 model, suggesting that ZIKV infection in mice is mainly controlled by the innate immune response mediated by IFNs rather than the adaptive response mediated by T-cells. A systemic inflammatory response mediated by proinflammatory cytokines was also detected in the sera of AG129 mice [99, 103].

Different immunocompromised mice have also been applied to identify which cells of the nervous system are permissive to replication. Brain analysis of Ifnar1^{-/-} mice revealed that astrocytes are one of the most susceptible types, while cerebral cortex neurons are the least permissive, being observed not only in the brain but also in other regions of the CNS, such as the cerebellum and spinal cord [104]. While in the Ifnar1^{-/-} model the most permissive infection sites were the astrocytes, in Rag1^{-/-} mice treated with anti-IFNAR, the most evident focal areas were neurons in the cerebral cortex and hippocampus regions [105]. The disagreement of these results reinforces the need to explore different models in order to characterize a strain that can mimic the infection in the CNS with more fidelity.

Case reports of ZIKV sexual transmission and viral persistence in the human genital tract are mounting. Murine models recapitulate these phenotypes and may provide bases for understanding the sexual transmission of ZIKV in humans. In fact, recurrent viral detection in the mouse testes has been achieved in experimental studies [73, 76, 106, 107]. In this sense, studies using females may also be informative for research about this route. Vaginal exposure of pregnant mice during early pregnancy resulted in foetal infection and intrauterine growth restriction [93]. The evaluation of different mice strains with attenuation of the innate immune response mediated by IFNs shows that the transcription factors IRF3 and IRF7 are required to block viral replication locally. In contrast, the adaptive immune response does not seem to play a critical role in the control of vaginal infection [93]. Tang and colleagues inoculated ZIKV into the vagina of both AG129 mice and LysMCre+IFNAR^{fl/fl} C57BL/6 mice, which lack

IFNAR in myeloid cells, in diestrus-like and estrus-like phases after respective hormonal treatments [progesterone and pregnant mare serum gonadotropin (PMSG), respectively]. Whereas the mice infected during the estrus-like phase were resistant to vaginal infection, those infected during the diestrus-like phase developed disease following atraumatic intravaginal ZIKV administration. There was a strain-dependent susceptibility, in which LysMCre+IFNAR^{fl/fl} C57BL/6 mice experienced transient illness and AG129 mice succumbed to infection [108]. These models of venereal transmission will be useful to understand the pathogenesis of ZIKV through this route and will be a suitable challenge system for evaluating the protective efficacy of vaccine and antiviral candidates.

Chicken embryos

The chicken embryo is a well-established model in developmental biology and has advantageous features, including size, low cost, easy manipulation and the fact that it allows high-throughput *in vivo* screening of drugs. The model closely mirrors human foetal neural development and the sequencing of the chicken genome has opened up possibilities for uncovering the molecular basis of development and changes associated with viral infections [109, 110].

An early study using the MR766 ZIKV strain showed that cultured primary embryonic chicken cells were not susceptible to infection [111]. However, recent studies have demonstrated that the DF-1 chicken fibroblast cell line [30] and chicken embryos are susceptible to infection by contemporary ZIKV strains [110]. The infection of chicken embryos at embryonic days 2.5 and 5 resulted in dose-dependent mortality, virus replication in various organs, stunted brain growth and other malformations, such as enlarged ventricles, but not calcifications (Table 5). Thus, the chicken embryo proved to be a well-characterized, non-immunocompromised *in vivo* animal model capable of recapitulating some of the teratogenic manifestations of ZIKV in human fetuses [110]. The postnatal effects of ZIKV infection of chicken embryos warrant further investigation.

Guinea pigs

Guinea pigs have been used as a model for infectious disease since the nineteenth century, including tick-borne encephalitis virus (TBEV), Japanese encephalitis virus (JEV) and West Nile virus (WNV) [112–114]. Their small size and

docility and the low cost of acquiring and maintaining them make them an attractive laboratory animal model, although the paucity of available immunological reagents is a limitation [115]. In contrast to mice and rats, they have a haemochorial placenta, through which maternal and foetal circulation is separated by a single layer of trophoblasts, making them useful for studying congenital infections [31]. Initial studies characterizing the pathogenicity of the MR766 strain shortly after the discovery of ZIKV by the virologist George Dick found that guinea pigs (n=2) that had been inoculated intracerebrally had no signs of infection but died on the sixth day after inoculation with a low-passage mouse-adapted virus. Infection with highly mouse-adapted viruses did not result in lethal infection, suggesting that adaptation to mice reduces the virulence to guinea pigs (and also monkeys) [116].

The guinea pig model has been recently revisited using contemporary ZIKV strains (Table 5) [31, 117, 118]. The infection of juvenile animals (200–250 g) with ZIKV PRVABC59 strain (Puerto Rico/2015) via the subcutaneous route resulted in fever, lethargy, hunched back, ruffled fur and decreased mobility. Viraemia was detected at 2 and 3 days post-infection (p.i.), but not at 5 days p.i. ZIKV RNA load was detected in the spleen (only at 2 days p.i.) and brain (at 2, 3 and 5 days p.i.) of these animals. Analysis of cytokines, chemokines and growth factors in the serum using multiplex immunoassay showed a marked increase in the levels of IL-2, IL-5, IL-18, IL-12 (p70), TNF- α , G-CSF, MCP-1, MIP-1 α , LIX, fractalkine and VEGF, whose roles in ZIKV pathogenesis need to be further investigated [117]. Deng and coworkers [118] demonstrated that guinea pigs are susceptible to infection through the intranasal route and that the virus can be detected in the sera, saliva, tears, brain and parotid glands. Interestingly, the 2010 Cambodian ZIKV strain FSS13025 was less virulent than the 2016 Chinese ZIKV strain GZ01 FSS13025. Remarkably, close-contact transmission experiments showed that ZIKV is highly transmissible to co-caged animals. No overt clinical signs were seen for any of the routes of infection used (intranasal, subcutaneous or direct contact). A third study evaluated the effect of ZIKV infection in non-pregnant and pregnant adult guinea pigs infected at mid-gestation (at 18 to 21 days gestational age) [31]. Clinical signs of disease were not observed in either non-pregnant or pregnant animals infected with the 2013 French Polynesian ZIKV strain. Naturally circulating ZIKV strains are not pathogenic to immunocompetent guinea pigs and do not interfere with normal pup development.

Although pregnant guinea pigs and their pups seroconverted upon infection, no detectable viral levels were seen in maternal or pup blood, plasma or tissues. Of special interest, no significant adverse outcome was detected in the guinea pigs' offspring following challenge, suggesting that ZIKV is not pathogenic during the pregnancy of guinea pigs and does not interfere with normal foetal development in this species. The reason for the difference in overt clinical disease among these studies is not clear but might be related to the age of animals used and strain differences.

Hamsters

Syrian golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) have been established as a model for some neurotropic flaviviruses, including WNV [119] and JEV [120]. Recently, the model has been evaluated for ZIKV (Table 5). Like guinea pigs, hamsters are small and relatively inexpensive to maintain, but there are few immunological reagents for this species. The infection of hamsters with a 2010 Cambodian ZIKV strain did not result in clinical disease, viraemia or seroconversion [121]. However, genetic ablation of the STAT2 gene, a key mediator of type I and type III IFN signal transduction pathway signalling, renders these animals susceptible to ZIKV infection [122]. Subcutaneous infection with 500 or 50 TCID₅₀ of ZIKV resulted in 37 and 42% mortality, respectively, over a course of 30 days of infection. ZIKV replication was detected in the brain, testes, spinal cords, kidney and spleen, although no histopathological lesions were seen. Infection of pregnant STAT2 knockout (KO) hamsters, but not immunocompetent hamsters, led to ZIKV infection in placental and foetus brains, but no adverse phenotype in pups. Taken together, these studies indicate that wild-type hamsters are not susceptible to infection, but STAT2 KO animals are valuable for some studies.

Swine

Swine are used as a model for biomedical research because they share similarities in several aspects of human anatomy, physiology, genetics and immune response. Regarding their immunity, pigs closely resemble humans in more than 80% of immunological parameters, as opposed to less than 10% in mice [123]. In addition, pigs are susceptible to several flaviviruses, including dengue virus (DENV), WNV and JEV [124]. Based on this, Darbellay et al. experimentally infected neonatal piglets with a 2015 Puerto Rican strain of ZIKV using three different inoculation routes:

intracerebral, intradermal and intraperitoneal. They found that 2 out of 11 piglets inoculated intracerebrally, a non-natural route of infection, exhibited leg weakness, ataxia and tremor. ZIKV infection of piglets also resulted in seroconversion and low-titre viraemia, viruria and virus replication in internal organs, demonstrating that newborn pigs can be used as models to study some aspects of ZIKV biology (Table 4). An independent study using 3-month-old pigs did not detect viraemia or overt clinical signs, albeit the animals did seroconvert [121]. From these initial studies, it seems that pigs can serve as reservoirs for ZIKV, but not as amplifying hosts, given the low viraemia following the infection. However, additional studies using a larger number of animals are needed to clarify the role of pigs in the epidemiology of ZIKV.

Experimental in utero infection of conventional swine with ZIKV at 50 gestation days (i.e. mid-gestation) resulted in persistent infection in porcine conceptuses and impaired health in porcine offspring characterized by weak piglets, delayed feeding, lower neonatal body length and weight than controls, seizure-like activities, splayed back leg, reduced growth rate and aggressive behaviour [125]. A recent study inoculated pregnant sows with ZIKV in utero at 50 gestation days and euthanized them at 4 weeks after inoculation, which is comparable to the end of the second trimester of human pregnancy, and examined the fetuses [126]. The sows remained healthy during the experiment, but at necropsy 2 out of 15 inoculated foetal piglets were found to have microencephaly and all inoculated fetuses presented mild to severe neuropathology, characterized by neuronal depletion in the cerebral cortices of various lobes (Table 5). Although useful, their large size and high cost, and the lack of disease signs exhibited by the majority of infected animals, limit the utility of swine for widespread use in ZIKV research.

Non-human primates

Nonhuman primates (NHPs) are the most closely related animals to humans and are therefore the preferred human surrogates in ZIKV studies. NHPs are natural hosts for ZIKV and recapitulate several aspects of the disease in humans. In fact, the first described ZIKV-susceptible animal model was the rhesus monkey, which had historical importance for the discovery of ZIKV in 1947. Mice intracerebrally inoculated with viraemic rhesus monkey sera developed clinical disease, but mice and monkeys inoculated with the same virus intraperitoneally had no overt disease [127]. Since the emergence of ZIKV in the Americas, several groups have carried out experiments in

NHPs to understand pathogenesis and transmissibility and develop countermeasures [128–143]. NHP models are essential for advancing ZIKV vaccine and drug candidates into clinics. Table 6 summarizes the studies that have used NHPs for ZIKV. Although NHP models are the most similar to human beings, the need for special animal facilities and their high cost and limited availability, together with the ethical issues associated with their use, limit the applications of this model for ZIKV studies.

Rhesus macaque (Macaca mulatta) Rhesus macaques have been the most widely used NHP model for ZIKV. Most studies have used needle infection by the subcutaneous route to mimic mosquito bites. In these experiments, ZIKV infection in non-pregnant animals resulted in either subclinical infection or mild clinical signs of disease, such as rash, fever and conjunctivitis. Viraemia and virus excretion in several body fluids, such as urine, saliva, tears, semen, vaginal secretions and cerebrospinal fluid, have been reported. ZIKV has also been detected in several organs, where it resulted in gross and histopathological changes, with a marked tropism to the CNS [128–135]. ZIKV can persist in the CNS, lymph nodes and other immune privileged sites of rhesus monkeys for weeks after virus has been cleared from peripheral blood, urine and mucosal secretions [144]. ZIKV infection resulted in robust innate and humoral and cellular adaptive responses in these animals, which were protected from subsequent challenge with homologous or heterologous strains [131–133, 136, 137]. This monkey species has been useful in characterizing the innate and adaptive immune responses after ZIKV infection. In one study, Hirsch and coworkers infected pregnant rhesus macaques and found that ZIKV causes placental dysfunction and immunopathology. Within 5 days p.i., all infected dams showed innate immune cell activation, as demonstrated by the presence of CD169⁺ staining within monocytes/macrophages, myeloid DCs and NK subsets. Infected dams displayed marked activation of DCs and NK cells which peaked at 70 and 85 days p.i. Proliferation of CD8 T-cell and B-cell was also detected, with maximum responses seen in the first two weeks post infection. ZIKV-specific maternal antibodies were detected as early as 6 days p.i. and the antibody titres increased through 28 days p.i. Serum collected from dams and foetuses at 85 days p.i. showed neutralizing activity [136]. The evaluation of three vaccine platforms (inactivated vaccine, plasmid DNA vaccine or a rhesus adenovirus serotype 52 vector-based vaccine) led to the development of neutralizing antibodies and full protection of the rhesus macaques

against challenge [129]. The infection of pregnant animals resulted in long-lasting viraemia, vertical transmission and microcephaly in foetuses [137]. The viraemia in pregnant animals was longer than that for non-pregnant animals [128, 143]. A recent study demonstrated that the infection of pregnant rhesus monkeys early in pregnancy recapitulates many lesions that are characteristic of congenital Zika syndrome (CZS), including foetal loss, smaller brain size, and microscopic brain pathology characterized by microcalcifications, necrosis, vasculitis, haemorrhage, gliosis and apoptosis of neuroprogenitor cells. The viraemia in animals infected early in pregnancy was longer (28–70 days) than that in animals infected later in pregnancy (14–42 days) [143].

A single study that inoculated ZIKV intravenously reported no clinical disease, but the animals developed short-lived viraemia, viruria and virus excretion in saliva. ZIKV was present in the lymph nodes and spleen and in cardiopulmonary, gastrointestinal, integument and genitourinary tissues, in the absence of major histopathological changes [135]. Direct inoculation of high-dose ZIKV directly to the tonsils resulted in viraemia, but saliva from infected monkeys inoculated in the palatine tonsils or conjunctiva or nasally did result in infection, suggesting that the transmission risk from saliva is low [139]. Animals inoculated through either the vaginal or the rectal route had overt clinical disease, but viraemia was detected in 50 and 100% of the macaques inoculated by these routes, respectively [138].

Cynomolgus macaques (Macaca fascicularis) The ban on exporting rhesus monkeys from India has reduced the availability of these animals and stimulated research using other NHP species. *Cynomolgus macaques* (*Macaca fascicularis*) are closely related to rhesus monkeys, but they are smaller and therefore easier to handle and maintain in animal facilities.

Similar to rhesus monkeys, subcutaneous inoculation of these animals with the PRVABC59 strain resulted in viraemia and viral detection in the lymph nodes, CNS and male (seminal vesicles, testes, prostate) and female genital tracts (uterus, ovaries) [132]. Intravaginal and intrarectal inoculation resulted in viraemia in 50 and 100% of inoculated animals, respectively, and no clinical disease [138]. Infections carried with the Asian and African ZIKV strains suggested that *Cynomolgus* monkeys appear to be susceptible only to infection with ZIKV isolates of the Asian lineage [134], although these results have not been reproduced using different African isolates of ZIKV.

Pig-tailed macaque (*Macaca nemestrina*) The pigtail macaque (*Macaca nemestrina*) has been known to be susceptible to several viruses from the family Flaviviridae, including DENV, JEV and HCV. ZIKV that was inoculated subcutaneously in pregnant pigtail monkeys did not cause overt clinical disease, but the foetuses developed brain lesions characterized by cerebral white matter hypoplasia, periventricular white matter gliosis, and axonal and ependymal injury, all of which are associated with the presence of ZIKV RNA [130].

Marmoset (*Callithrix jacchus*) The common marmoset (*Callithrix jacchus*) is a small-sized primate from the Americas that has been regarded as a relevant and convenient experimental model for investigating ZIKV pathogenesis. Intramuscular infection of these animals with the MR766 strain (Uganda/1947) resulted in no overt clinical disease, but ZIKV persisted in body fluids such as semen and saliva for longer periods of time than in serum. Infection with this non-contemporary African strain elicited strong neutralizing antibodies and antiviral responses, and complete protection against a heterologous challenge with a recent Asian lineage strain isolated in Brazil [140].

A second study by the same research group in pregnant marmosets reported no clinical disease in these animals upon infection with the SPH2015 strain (Brazil/2015). However, the animals developed viraemia, viruria and had spontaneous pregnancy loss at 16–18 days p.i., with extensive active ZIKV replication in the placenta and foetal neurocellular disorganization indicating a disruption in the development and neuronal migration patterns of the cerebral cortex, as seen in humans [141].

Other vertebrate animal models

Early studies with the prototype MR766 strain in rabbits and cotton rats has shown that these animals do not develop clinical signs of infection after intracerebral inoculation of late-passage mouse brain virus, but do seroconvert [116]. In addition to serological evidence for natural infection, some African bat species supported replication and developed clinical signs of disease upon experimental infection with ZIKV. However, studies with contemporary ZIKV strains in bat species from the New World are needed to better elucidate the role of bats in ZIKV ecology [145–147]. Recently, Ragan et al. infected several animal species from North America with ages ranging from neonates to adults. The species investigated included armadillos,

cottontail rabbits, goats, mink, chickens, pigeons, ground hogs, deer mice, cattle, raccoons, ducks, Syrian golden hamsters, garter snakes, leopard frogs, house sparrows and pigs. Animals were infected with ZIKV by the subcutaneous and intradermal routes with a high virus dose (10⁵ p.f.u.). Low-level viraemia was found only in frogs and armadillos. Neutralizing antibodies were detected in goats, rabbits, ducks, frogs and pigs, suggesting these animals are unlikely to act as animal reservoirs or good models to reproduce ZIKV disease [121].

Mosquito infection models

ZIKV is thought to be transmitted mainly by mosquito vectors and most of the available ZIKV strains have been recovered from mosquito species collected in nature. Several species of mosquitoes have been detected that are naturally infected by ZIKV – primarily *Aedes* species, which are vectors for YFV, DENV and other arboviruses.

Before the ZIKV epidemics reported in Yap Island (2007) and in French Polynesia (2013), very few studies registered experimental infections in mosquitoes. These studies were mainly performed to demonstrate the vectorial competence of mosquito species in order to identify or incriminate a mosquito species as potential vectors. *Ae. aegypti* has been used as the major experimental model, as it is a mosquito species that is easy to colonize and maintain in insectaries. It was the first mosquito species to be used in an artificial feeding system for studying ZIKV infections (148Boorman and Porterfield, 1956). *Ae. aegypti* was employed to feed directly on a Zika patient through the exposure of the left forearm to a batch of mosquito females in order to demonstrate ZIKV transmission by mosquitoes [149]. Most of the studies use an artificial membrane feeder to infect mosquitoes and study the spread of ZIKV in the mosquito organs. Usually, the midgut and salivary glands or mosquito saliva are collected to detect and quantify the presence of ZIKV particles. In addition, ZIKV can be inoculated via intrathoracic injection [150]. *Ae. aegypti* artificially infected with ZIKV through blood meal successfully transmitted ZIKV to BALB/c mouse upon feeding on the ears of these animals, an approach that allows evaluation of the development of infection in and transmission from mosquitoes using a transmission process that resembles the natural process [151]. *Ae. aegypti* that were allowed to feed on infected AG129 mice acquired ZIKV in their midguts, but transmission from these mosquitoes depended largely on the colony of *Ae. aegypti* used, suggesting that genetic differences play an important role in vector competence for ZIKV [150].

A recent debate about the possible role that another mosquito species, *Culex quinquefasciatus*, could play in ZIKV transmission [152] inspired several groups to investigate the vector competence of mosquito species from the genera *Aedes* and *Culex*. Several studies using different combinations of ZIKV strains and mosquito colonies or populations failed to demonstrate ZIKV transmission by *Culex* species [153–155]. However, Guo et al. successfully demonstrated the transmission of ZIKV by *Cx. quinquefasciatus* to mice [156]. In addition, Guedes et al. photographed ZIKV mature particles in the salivary glands of this mosquito species after 7 days p.i. [157]. Further field studies reported *Cx. quinquefasciatus* naturally infected with ZIKV [158], confirming that it is possible that other species besides *Ae. aegypti* are transmitting ZIKV in urban environments. Further investigations are required to determine the primary, secondary or occasional vectors of ZIKV during outbreaks. Care should be taken in interpreting transmission studies using laboratory-reared mosquitoes. Furthermore, although the virus maybe found in certain mosquito species, this does not mean the the virus will be transmitted by that species under natural conditions.

Thus, mosquito models fed using the available systems of artificial infection could be better exploited, for instance in studies to understand the pathogen–vector–host interactions, in order to identify the immune response triggered by distinct mosquito species against the viral strains. This response, together with receptor molecules, is the basis for a mosquito that is refractory to viral infection and could be used in future studies to develop new strategies for ZIKV control.

Models to study antibody-dependent enhancement

Antibody-dependent enhancement (ADE) is a phenomenon by which non-neutralizing antibodies enhance viral entry and replication in host cells, resulting in increased viral load and exacerbation of clinical disease. ADE is a well-studied mechanism in DENV pathogenesis and is thought to occur through the formation of infectious virus–antibody immune complexes (ICs) that bind to Fc gamma receptors (FcγR) expressed on permissive cells such as DCs and monocytes/macrophages [159]. The enhancement of ZIKV infection by DENV antiserum was first described in 1987 [160], and has been evaluated by many groups recently, given the possible impact of ADE on ZIKV pathogenesis, vaccine development and immunotherapy [17, 161–165].

Typical in vitro assays to study ADE consist of incubating ZIKV with serially diluted test serum (or antibodies) and then infecting a cell line that expresses the FcγR. ADE is then defined as a significant increase in virus titres obtained after incubation with test serum relative to controls. Several cell lines have been used to study ZIKV ADE activity, including the murine macrophage-like P388D1 cell line [160], FcγR-expressing BHK cell lines [166], the human erythroleukemic K-562 cell line [162, 165, 167], the human macrophage cell line U937 [17], the human monocytic cell line THP-1 [161] and primary human macrophages [168].

ADE of ZIKV infection has been evaluated in vivo using immunodeficient mice and monkeys. Bardina et al. were able to reproduce ADE in vivo by using Stat2^{-/-} knockout C57BL/6 mice and convalescent plasma from DENV- and WNV-infected individuals and then infecting these animals 2 hours later with the ZIKV strain PRVABC59. They found that pretreatment with anti-DENV or anti-WNV plasma resulted in more elevated body temperature, higher viraemia and viral burden in the spinal cord and testes (but not in the brains, ovaries and eyes), increased weight loss, higher mortality and enhanced clinical symptom scores relative to controls. Their study also showed that in vivo ADE occurs optimally at low concentrations of ZIKV-reactive IgG, while high levels may be protective [167]. In fact, treatment of type I interferon receptor-deficient (IFNAR^{-/-}) mice with a cross-reactive dengue human monoclonal antibody (mAb) protected adult non-pregnant mice from ZIKV-induced weight loss and mortality. Treatment of pregnant mice infected with ZIKV with mAb also significantly reduced the viral titres in the placenta and foetal organs and abolished virus-induced foetal growth retardation [165].

Recently, a study using two groups of rhesus monkeys (one naïve to flavivirus infection and the other previously exposed to DENV almost 3 years earlier) demonstrated that while ADE could be confirmed in vitro, preexisting DENV immunity did not result in exacerbated ZIKV disease [163]. These findings were supported by a human cohort study of ZIKV-infected patients previously exposed to dengue [164]. However, more studies using a larger number of animals and including patients from different epidemiological settings are needed to better establish the role of ADE on ZIKV-induced disease.

Conclusion and perspectives

Tremendous advances have been made in the development of in vitro and in vivo models that recapitulate many aspects of ZIKV biology and disease in humans. Infection by contemporary ZIKV strains has been characterized in a variety of cell culture systems and animal models, and this has already contributed to advancements in the fields of viral pathogenesis, epidemiology, vaccinology and antiviral discovery. However, each of these models has limitations that must be considered in the design and interpretation of experiments, and in the extrapolation of experimental results to humans. Sharing of these research models among different laboratories will ensure data reproducibility and accelerate the discovery and development of new products and processes. The continuous development and characterization of research models is essential for a better understanding of ZIKV biology and the translation of research findings from the bench to the clinic.

Funding information

We would like to thank the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES) and the Pernambuco State Foundation for Science and Technology (FACEPE) for the grants and scholarships that made this work possible.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

1. Musso D. Zika virus transmission from French polynesia to Brazil. *Emerg Infect Dis* 2015; 21:1887
2. Gatherer D, Kohl A. Zika virus: a previously slow pandemic spreads rapidly through the Americas. *J Gen Virol* 2016; 97:269–273
3. Mlakar J, Korva M, Tul N, Popović M, Poljšak-Prijatelj M et al. Zika virus associated with microcephaly. *N Engl J Med Overseas Ed* 2016; 374:951–958
4. WHO 2017; Situation report: Zika virus, microcephaly and Guillain-Barré syndrome. www.who.int/emergencies/zika-virus/situation-report/10-march-2017/en/ [accessed 1 August 2018]
5. PAHO 2018; Zika cumulative cases. www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=12390&Itemid=42090&lang=en [accessed 1 August 2018]

6. Göertz GP, Abbo SR, Fros JJ, Pijlman GP. Functional RNA during Zika virus infection. *Virus Res* 2018; 254:41–53
7. Donald CL, Brennan B, Cumberworth SL, Rezelj VV, Clark JJ et al. Full genome sequence and sfRNA interferon antagonist activity of Zika virus from Recife, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10:e0005048
8. Akiyama BM, Laurence HM, Massey AR, Costantino DA, Xie X et al. Zika virus produces noncoding RNAs using a multi-pseudoknot structure that confounds a cellular exonuclease. *Science* 2016; 354:1148–1152
9. Rodriguez-Morales AJ, Bandeira AC, Franco-Paredes C. The expanding spectrum of modes of transmission of Zika virus: a global concern. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2016; 15:13
10. Meneses J, Ishigami AC, de Mello LM, de Albuquerque LL, de Brito CAA et al. Lessons learned at the epicenter of Brazil's congenital zika epidemic: evidence from 87 confirmed cases. *Clin Infect Dis* 2017; 64:1302–1308
11. da Silva IRF, Frontera JA, Bispo de Filippis AM, Nascimento O. Neurologic complications associated with the zika virus in Brazilian adults. *JAMA Neurol* 2017; 74:1190–1198
12. Furtado JM, Espósito DL, Klein TM, Teixeira-Pinto T, da Fonseca BA. Uveitis associated with Zika virus infection. *N Engl J Med Overseas Ed* 2016; 375:394–396
13. Brito Ferreira ML, Antunes de Brito CA, Moreira ÁJP, de Moraes Machado MÍ, Henriques-Souza A et al. Guillain-Barré syndrome, acute disseminated encephalomyelitis and encephalitis associated with zika virus infection in Brazil: detection of viral RNA and isolation of virus during late infection. *Am J Trop Med Hyg* 2017; 97:1405–1409
14. Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A et al. Biology of zika virus infection in human skin cells. *J Virol* 2015; 89:8880–8896
15. Foo SS, Chen W, Chan Y, Bowman JW, Chang LC et al. Asian Zika virus strains target CD14+ blood monocytes and induce M2-skewed immunosuppression during pregnancy. *Nat Microbiol* 2017; 2:1558–1570
16. Michlmayr D, Andrade P, Gonzalez K, Balmaseda A, Harris E. CD14+CD16+ monocytes are the main target of Zika virus infection in peripheral blood mononuclear cells in a paediatric study in Nicaragua. *Nat Microbiol* 2017; 2:1462–1470
17. Dejnirattisai W, Supasa P, Wongwiwat W, Rouvinski A, Barba-Spaeth G et al. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. *Nat Immunol* 2016; 17:1102–1108
18. Bowen JR, Quicke KM, Maddur MS, O'Neal JT, McDonald CE et al. Zika virus antagonizes type I interferon responses during infection of human dendritic cells. *PLoS Pathog* 2017; 13:e1006164
19. Siemann DN, Strange DP, Maharaj PN, Shi PY, Verma S et al. Zika virus infects human sertoli cells and modulates the integrity of the in vitro blood-testis barrier model. *J Virol* 2017; 91:e00623-17

20. Tabata T, Pettitt M, Puerta-Guardo H, Michlmayr D, Wang C et al. Zika virus targets different primary human placental cells, suggesting two routes for vertical transmission. *Cell Host Microbe* 2016; 20:155–166
21. Jurado KA, Simoni MK, Tang Z, Uraki R, Hwang J et al. Zika virus productively infects primary human placenta-specific macrophages. *JCI Insight* 2016; 1:e88461
22. Aagaard KM, Lahon A, Suter MA, Arya RP, Seferovic MD et al. Primary human placental trophoblasts are permissive for zika virus (ZIKV) replication. *Sci Rep* 2017; 7:41389
23. Pagani I, Ghezzi S, Ulisse A, Rubio A, Turrini F et al. Human endometrial stromal cells are highly permissive to productive infection by zika virus. *Sci Rep* 2017; 7:44286
24. Bayer A, Lennemann NJ, Ouyang Y, Bramley JC, Morosky S et al. Type III interferons produced by human placental trophoblasts confer protection against zika virus infection. *Cell Host Microbe* 2016; 19:705–712
25. Cumberworth SL, Barrie JA, Cunningham ME, de Figueiredo DPG, Schultz V et al. Zika virus tropism and interactions in myelinating neural cell cultures: CNS cells and myelin are preferentially affected. *Acta Neuropathol Commun* 2017; 5:50
26. Hamel R, Ferraris P, Wichit S, Diop F, Talignani L et al. African and Asian Zika virus strains differentially induce early antiviral responses in primary human astrocytes. *Infect Genet Evol* 2017; 49:134–137
27. Lum FM, Low DK, Fan Y, Tan JJ, Lee B et al. Zika virus infects human fetal brain microglia and induces inflammation. *Clin Infect Dis* 2017; 64:914–920
28. McGrath EL, Rossi SL, Gao J, Widen SG, Grant AC et al. Differential responses of human fetal brain neural stem cells to zika virus infection. *Stem Cell Reports* 2017; 8:715–727
29. Barreto-Vieira DF, Barth OM, Silva MA, Santos CC, Santos AS et al. Ultrastructure of Zika virus particles in cell cultures. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2016; 111:532–534
30. Chan JF, Yip CC, Tsang JO, Tee KM, Cai JP et al. Differential cell line susceptibility to the emerging Zika virus: implications for disease pathogenesis, non-vector-borne human transmission and animal reservoirs. *Emerg Microbes Infect* 2016; 5:e93
31. Bierle CJ, Fernández-Alarcón C, Hernandez-Alvarado N, Zabeli JC, Janus BC et al. Assessing Zika virus replication and the development of Zika-specific antibodies after a mid-gestation viral challenge in guinea pigs. *PLoS One* 2017; 12:e0187720
32. de Carvalho OV, Félix DM, de Mendonça LR, de Araújo C, de Oliveira Franca RF et al. The thiopurine nucleoside analogue 6-methylmercaptopurine riboside (6MMP_r) effectively blocks Zika virus replication. *Int J Antimicrob Agents* 2017; 50:718–725

33. Luo H, Winkelmann ER, Fernandez-Salas I, Li L, Mayer SV et al. Zika, dengue and yellow fever viruses induce differential anti-viral immune responses in human monocytic and first trimester trophoblast cells. *Antiviral Res* 2018; 151:55–62
34. Tricarico PM, Caracciolo I, Crovella S, D'Agaro P. Zika virus induces inflammasome activation in the glial cell line U87-MG. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 492:597–602
35. Varjak M, Donald CL, Mottram TJ, Sreenu VB, Merits A et al. Characterization of the Zika virus induced small RNA response in *Aedes aegypti* cells. *PLoS Negl Trop Dis* 2017; 11:e0006010
36. Barreto-Vieira DF, Jácome FC, da Silva MAN, Caldas GC, de Filippis AMB et al. Structural investigation of C6/36 and Vero cell cultures infected with a Brazilian Zika virus. *PLoS One* 2017; 12:e0184397
37. Xin QL, Deng CL, Chen X, Wang J, Wang SB et al. Quantitative proteomic analysis of mosquito C6/36 cells reveals host proteins involved in Zika virus infection. *J Virol* 2017; 91:e00554-17
38. Offerdahl DK, Dorward DW, Hansen BT, Bloom ME. Cytoarchitecture of Zika virus infection in human neuroblastoma and *Aedes albopictus* cell lines. *Virology* 2017; 501:54–62
39. Schultz MJ, Isern S, Michael SF, Corley RB, Connor JH et al. Variable inhibition of Zika virus replication by different Wolbachia strains in mosquito cell cultures. *J Virol* 2017; 91:e00339-17
40. Pena L, Vincent AL, Loving CL, Henningson JN, Lager KM et al. Strain-dependent effects of PB1-F2 of triple-reassortant H3N2 influenza viruses in swine. *J Gen Virol* 2012; 93:2204–2214
41. Qian X, Jacob F, Song MM, Nguyen HN, Song H et al. Generation of human brain region-specific organoids using a miniaturized spinning bioreactor. *Nat Protoc* 2018; 13:565–580
42. Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science* 2014; 345:1247125
43. Yin X, Mead BE, Safaee H, Langer R, Karp JM et al. Engineering stem cell organoids. *Cell Stem Cell* 2016; 18:25–38
44. Qian X, Nguyen HN, Song MM, Hadiono C, Ogden SC et al. Brain-region-specific organoids using mini-bioreactors for modeling ZIKV exposure. *Cell* 2016; 165:1238–1254
45. Dang J, Tiwari SK, Lichinchi G, Qin Y, Patil VS et al. Zika virus depletes neural progenitors in human cerebral organoids through activation of the innate immune receptor TLR3. *Cell Stem Cell* 2016; 19:258–265
46. Garcez PP, Loiola EC, Madeiro da Costa R, Higa LM, Trindade P et al. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science* 2016; 352:816–818

47. Cugola FR, Fernandes IR, Russo FB, Freitas BC, Dias JL et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature* 2016; 534:267–271
48. Nowakowski TJ, Pollen AA, di Lullo E, Sandoval-Espinosa C, Bershteyn M et al. Expression analysis highlights AXL as a candidate zika virus entry receptor in neural stem cells. *Cell Stem Cell* 2016; 18:591–596
49. Wells MF, Salick MR, Wiskow O, Ho DJ, Worringer KA et al. Genetic ablation of AXL does not protect human neural progenitor cells and cerebral organoids from zika virus infection. *Cell Stem Cell* 2016; 19:703–708
50. Tang H, Hammack C, Ogden SC, Wen Z, Qian X et al. Zika virus infects human cortical neural progenitors and attenuates their growth. *Cell Stem Cell* 2016; 18:587–590
51. Weisblum Y, Oiknine-Djian E, Vorontsov OM, Haimov-Kochman R, Zakay-Rones Z et al. Zika virus infects early- and midgestation human maternal decidual tissues, inducing distinct innate tissue responses in the maternal-fetal interface. *J Virol* 2017; 91:e01905-16
52. Tabata T, Petitt M, Puerta-Guardo H, Michlmayr D, Wang C et al. Zika virus targets different primary human placental cells, suggesting two routes for vertical transmission. *Cell Host Microbe* 2016; 20:155–166
53. Ruggli N, Rice CM. Functional cDNA clones of the Flaviviridae: strategies and applications. *Adv Virus Res* 1999; 53:183–207
54. Aubry F, Nougairède A, Gould EA, de Lamballerie X. Flavivirus reverse genetic systems, construction techniques and applications: a historical perspective. *Antiviral Res* 2015; 114:67–85
55. Shan C, Xie X, Muruato AE, Rossi SL, Roundy CM et al. An infectious cDNA clone of zika virus to study viral virulence, mosquito transmission, and antiviral inhibitors. *Cell Host Microbe* 2016; 19:891–900
56. Tsetsarkin KA, Kenney H, Chen R, Liu G, Manukyan H et al. A full-length infectious cDNA clone of zika virus from the 2015 epidemic in brazil as a genetic platform for studies of virus-host interactions and vaccine development. *MBio* 2016; 7:e01114-16
57. Weger-Lucarelli J, Duggal NK, Bullard-Feibelman K, Veselinovic M, Romo H et al. Development and characterization of recombinant virus generated from a new world zika virus infectious clone. *J Virol* 2017; 91:e01765-16
58. Widman DG, Young E, Yount BL, Plante KS, Gallichotte EN et al. A reverse genetics platform that spans the zika virus family tree. *MBio* 2017; 8:e02014-16
59. Atieh T, Nougairède A, Klitting R, Aubry F, Failloux AB et al. New reverse genetics and transfection methods to rescue arboviruses in mosquito cells. *Sci Rep* 2017; 7:13983
60. Liu ZY, Yu JY, Huang XY, Fan H, Li XF et al. Characterization of cis-acting RNA elements of zika virus by using a self-splicing ribozyme-dependent infectious clone. *J Virol* 2017; 91:e00484-17

61. Mutso M, Saul S, Rausalu K, Susova O, Žusinaite E et al. Reverse genetic system, genetically stable reporter viruses and packaged subgenomic replicon based on a Brazilian Zika virus isolate. *J Gen Virol* 2017; 98:2712–2724
62. Atieh T, Baronti C, de Lamballerie X, Nougairède A. Simple reverse genetics systems for Asian and African Zika viruses. *Sci Rep* 2016; 6:39384
63. Yang Y, Shan C, Zou J, Muruato AE, Bruno DN et al. A cDNA clone-launched platform for high-yield production of inactivated zika vaccine. *EBioMedicine* 2017; 17:145–156
64. Setoh YX, Prow NA, Peng N, Hugo LE, Devine G et al. De Novo generation and characterization of new zika virus isolate using sequence data from a microcephaly case. *mSphere* 2017; 2:e00190-17
65. Schwarz MC, Sourisseau M, Espino MM, Gray ES, Chambers MT et al. Rescue of the 1947 zika virus prototype strain with a cytomegalovirus promoter-driven cDNA clone. *mSphere* 2016; 1:e00246-16
66. Gadea G, Bos S, Krejbich-Trotot P, Clain E, Viranaicken W et al. A robust method for the rapid generation of recombinant Zika virus expressing the GFP reporter gene. *Virology* 2016; 497:157–162
67. Yuan L, Huang XY, Liu ZY, Zhang F, Zhu XL et al. A single mutation in the prM protein of Zika virus contributes to fetal microcephaly. *Science* 2017; 358:933–936
68. Zhao F, Xu Y, Lavillette D, Zhong J, Zou G et al. Negligible contribution of M2634V substitution to ZIKV pathogenesis in AG6 mice revealed by a bacterial promoter activity reduced infectious clone. *Sci Rep* 2018; 8:10491
69. Jq L, Deng CL, Gu D, Li X, Shi L et al. Development of a replicon cell line-based high throughput antiviral assay for screening inhibitors of Zika virus. *Antiviral Res* 2018; 150:148–154
70. Xie X, Zou J, Shan C, Yang Y, Kum DB et al. Zika virus replicons for drug discovery. *EBioMedicine* 2016; 12:156–160
71. Aliota MT, Caine EA, Walker EC, Larkin KE, Camacho E et al. Characterization of lethal zika virus infection in AG129 mice. *PLoS neglected tropical diseases* 2016; 10:e0004682
72. Miner JJ, Cao B, Govero J, Smith AM, Fernandez E et al. Zika virus infection during pregnancy in mice causes placental damage and fetal demise. *Cell* 2016; 165:1081–1091
73. Rossi SL, Tesh RB, Azar SR, Muruato AE, Hanley KA et al. Characterization of a novel murine model to study zika virus. *Am J Trop Med Hyg* 2016; 94:1362–1369
74. Mlakar J, Korva M, Tul N, Popović M, Poljšak-Prijatelj M et al. Zika virus associated with microcephaly. *N Engl J Med Overseas Ed* 2016; 374:951–958
75. Grant A, Ponia SS, Tripathi S, Balasubramaniam V, Miorin L et al. Zika virus targets human STAT2 to inhibit type I interferon signaling. *Cell Host Microbe* 2016; 19:882–890

76. Lazear HM, Govero J, Smith AM, Platt DJ, Fernandez E et al. A mouse model of zika virus pathogenesis. *Cell Host Microbe* 2016; 19:720–730
77. Smith DR, Hollidge B, Daye S, Zeng X, Blancett C et al. Neuropathogenesis of zika virus in a highly susceptible immunocompetent mouse model after antibody blockade of type I interferon. *PLoS Negl Trop Dis* 2017; 11:e0005296
78. Bullard-Feibelman KM, Govero J, Zhu Z, Salazar V, Veselinovic M et al. The FDA-approved drug sofosbuvir inhibits Zika virus infection. *Antiviral research* 2017; 137:134–140
79. Zhao H, Fernandez E, Dowd KA, Speer SD, Platt DJ et al. Structural basis of zika virus-specific antibody protection. *Cell* 2016; 166:1016–1027
80. Ferreira AC, Zaverucha-do-Valle C, Reis PA, Barbosa-Lima G, Vieira YR et al. Sofosbuvir protects Zika virus-infected mice from mortality, preventing short- and long-term sequelae. *Sci Rep* 2017; 7:9409
81. Chan JF, Zhang AJ, Chan CC, Yip CC, Mak WW et al. Zika virus infection in dexamethasone-immunosuppressed mice demonstrating disseminated infection with multi-organ involvement including orchitis effectively treated by recombinant type I interferons. *EBioMedicine* 2016; 14:112–122
82. Elong Ngono A, Vizcarra EA, Tang WW, Sheets N, Joo Y et al. Mapping and role of the CD8+ T cell response during primary zika virus infection in mice. *Cell Host Microbe* 2017; 21:35–46
83. Hutchings PR, Varey AM, Cooke A. Immunological defects in SJL mice. *Immunology* 1986; 59:445–450
84. Jain S, Chen J, Nicolae A, Wang H, Shin DM et al. IL-21-driven neoplasms in SJL mice mimic some key features of human angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *The American journal of pathology* 2015; 185:3102–3114
85. Ky W, Zuo GL, Xf L, Ye Q, Deng YQ et al. Vertical transmission of Zika virus targeting the radial glial cells affects cortex development of offspring mice. *Cell research* 2016; 26:645–654
86. Duggal NK, Ritter JM, McDonald EM, Romo H, Guirakhoo F et al. Differential neurovirulence of african and asian genotype zika virus isolates in outbred immunocompetent mice. *Am J Trop Med Hyg* 2017; 97:1410–1417
87. Dowall SD, Graham VA, Rayner E, Atkinson B, Hall G et al. A susceptible mouse model for zika virus infection. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10:e0004658
88. Szaba FM, Tighe M, Kummer LW, Lanzer KG, Ward JM et al. Zika virus infection in immunocompetent pregnant mice causes fetal damage and placental pathology in the absence of fetal infection. *PLoS Pathog* 2018; 14:e1006994
89. Li C, Xu D, Ye Q, Hong S, Jiang Y et al. Zika virus disrupts neural progenitor development and leads to microcephaly in mice. *Cell Stem Cell* 2016; 19:672
90. Gorman MJ, Caine EA, Zaitsev K, Begley MC, Weger-Lucarelli J et al. An immunocompetent mouse model of zika virus infection. *Cell Host Microbe* 2018; 23:672–685

91. Fernandes NC, Nogueira JS, Réssio RA, Cirqueira CS, Kimura LM et al. Experimental Zika virus infection induces spinal cord injury and encephalitis in newborn Swiss mice. *Exp Toxicol Pathol* 2017; 69:63–71
92. Xavier-Neto J, Carvalho M, Pascoalino BD, Cardoso AC, Costa ÂM et al. Hydrocephalus and arthrogryposis in an immunocompetent mouse model of ZIKA teratogeny: a developmental study. *PLoS Negl Trop Dis* 2017; 11:e0005363
93. Yockey LJ, Varela L, Rakib T, Khoury-Hanold W, Fink SL et al. Vaginal exposure to zika virus during pregnancy leads to fetal brain infection. *Cell* 2016; 166:1247–1256
94. Shan C, Muruato AE, Nunes BT, Luo H, Xie X et al. A live-attenuated Zika virus vaccine candidate induces sterilizing immunity in mouse models. *Nat Med* 2017; 23:763–767
95. Chattopadhyay A, Aguilar PV, Bopp NE, Yarovinsky TO, Weaver SC et al. A recombinant virus vaccine that protects against both Chikungunya and Zika virus infections. *Vaccine* 2018; 36:3894–3900
96. Yu Y, Deng YQ, Zou P, Wang Q, Dai Y et al. A peptide-based viral inactivator inhibits Zika virus infection in pregnant mice and fetuses. *Nat Commun* 2017; 8:15672
97. Li C, Zhu X, Ji X, Quanquin N, Deng YQ et al. Chloroquine, a FDA-approved drug, prevents zika virus infection and its associated congenital microcephaly in mice. *EBioMedicine* 2017; 24:189–194
98. Meier KC, Gardner CL, Khoretonenko MV, Klimstra WB, Ryman KD. A mouse model for studying viscerotropic disease caused by yellow fever virus infection. *PLoS pathogens* 2009; 5:e1000614
99. Zmurko J, Marques RE, Schols D, Verbeken E, Kaptein SJ et al. The viral polymerase inhibitor 7-Deaza-2'-C-methyladenosine is a potent inhibitor of in vitro zika virus replication and delays disease progression in a robust mouse infection model. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10:e0004695
100. Li H, Saucedo-Cuevas L, Regla-Nava JA, Chai G, Sheets N et al. Zika virus infects neural progenitors in the adult mouse brain and alters proliferation. *Cell Stem Cell* 2016; 19:593–598
101. Kumar A, Hou S, Airo AM, Limonta D, Mancinelli V et al. Zika virus inhibits type-I interferon production and downstream signaling. *EMBO Rep* 2016; 17:1766–1775
102. Tripathi S, Balasubramaniam VR, Brown JA, Mena I, Grant A et al. A novel Zika virus mouse model reveals strain specific differences in virus pathogenesis and host inflammatory immune responses. *PLoS Pathog* 2017; 13:e1006258
103. Shrestha S, Kyle JL, Snider HM, Basavapatna M, Beatty PR et al. Interferon-dependent immunity is essential for resistance to primary dengue virus infection in mice, whereas T- and B-cell-dependent immunity are less critical. *Journal of virology* 2004; 78:2701–2710

104. Jurado KA, Yockey LJ, Wong PW, Lee S, Huttner AJ et al. Antiviral CD8 T cells induce Zika-virus-associated paralysis in mice. *Nat Microbiol* 2018; 3:141–147
105. Winkler CW, Myers LM, Woods TA, Messer RJ, Carmody AB et al. Adaptive immune responses to zika virus are important for controlling virus infection and preventing infection in brain and testes. *J Immunol* 2017; 198:3526–3535
106. Govero J, Esakky P, Scheaffer SM, Fernandez E, Drury A et al. Zika virus infection damages the testes in mice. *Nature* 2016; 540:438–442
107. Ma W, Li S, Ma S, Jia L, Zhang F et al. Zika virus causes testis damage and leads to male infertility in mice. *Cell* 2016; 167:1511–1524
108. Tang WW, Young MP, Mamidi A, Regla-Nava JA, Kim K et al. A mouse model of zika virus sexual transmission and vaginal viral replication. *Cell reports* 2016; 17:3091–3098
109. Davey MG, Tickle C. The chicken as a model for embryonic development. *Cytogenet Genome Res* 2007; 117:231–239
110. Goodfellow FT, Tesla B, Simchick G, Zhao Q, Hodge T et al. Zika virus induced mortality and microcephaly in chicken embryos. *Stem Cells Dev* 2016; 25:1691–1697
111. Way JH, Bowen ET, Platt GS. Comparative studies of some African arboviruses in cell culture and in mice. *J Gen Virol* 1976; 30:123–130
112. Inouye S, Matsuno S, Tsurukubo Y. "Original antigenic sin" phenomenon in experimental flavivirus infections of guinea pigs: studies by enzyme-linked immunosorbent assay. *Microbiol Immunol* 1984; 28:569–574
113. Lee HH, Hong SK, Yoon SH, Jang SJ, Bahk YY et al. Immunogenicity of Japanese encephalitis virus envelope protein by Hyphantria cunea nuclear polyhedrosis virus vector in guinea pig. *Appl Biochem Biotechnol* 2012; 167:259–269
114. Labuda M, Jones LD, Williams T, Nuttall PA. Enhancement of tick-borne encephalitis virus transmission by tick salivary gland extracts. *Med Vet Entomol* 1993; 7:193–196
115. Hickey AJ. Guinea pig model of infectious disease - viral infections. *Curr Drug Targets* 2011; 12:1018–1023
116. Dick GW. Zika virus. II. Pathogenicity and physical properties. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1952; 46:521–534
117. Kumar M, Krause KK, Azouz F, Nakano E, Nerurkar VR. A guinea pig model of Zika virus infection. *Virol J* 2017; 14:75
118. Deng YQ, Zhang NN, Li XF, Wang YQ, Tian M et al. Intranasal infection and contact transmission of Zika virus in guinea pigs. *Nat Commun* 2017; 8:1648
119. Xiao SY, Guzman H, Zhang H, Travassos da Rosa AP, Tesh RB. West Nile virus infection in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*): a model for West Nile encephalitis. *Emerg Infect Dis* 2001; 7:714–721

120. Bosco-Lauth A, Mason G, Bowen R. Pathogenesis of Japanese encephalitis virus infection in a golden hamster model and evaluation of flavivirus cross-protective immunity. *Am J Trop Med Hyg* 2011; 84:727–732
121. Ragan IK, Blizzard EL, Gordy P, Bowen RA. Investigating the potential role of North American animals as hosts for zika virus. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2017; 17:161–164
122. Siddharthan V, van Wettere AJ, Li R, Miao J, Wang Z et al. Zika virus infection of adult and fetal STAT2 knock-out hamsters. *Virology* 2017; 507:89–95
123. Meurens F, Summerfield A, Nauwynck H, Saif L, Gerdtts V. The pig: a model for human infectious diseases. *Trends Microbiol* 2012; 20:50–57
124. Darbellay J, Lai K, Babiuk S, Berhane Y, Ambagala A et al. Neonatal pigs are susceptible to experimental Zika virus infection. *Emerg Microbes Infect* 2017; 6:e6
125. Darbellay J, Cox B, Lai K, Delgado-Ortega M, Wheler C et al. Zika virus causes persistent infection in porcine conceptuses and may impair health in offspring. *EBioMedicine* 2017; 25:73–86
126. Wichgers Schreur PJ, van Keulen L, Anjema D, Kant J, Kortekaas J. Microencephaly in fetal piglets following in utero inoculation of Zika virus. *Emerg Microbes Infect* 2018; 7:42
127. Dick GW, Kitchen SF, Haddow AJ. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1952; 46:509–520
128. Dudley DM, Aliota MT, Mohr EL, Weiler AM, Lehrer-Brey G et al. A rhesus macaque model of Asian-lineage Zika virus infection. *Nat Commun* 2016; 7:12204
129. Abbink P, Larocca RA, de La Barrera RA, Bricault CA, Moseley ET et al. Protective efficacy of multiple vaccine platforms against Zika virus challenge in rhesus monkeys. *Science* 2016; 353:1129–1132
130. Adams Waldorf KM, Stencel-Baerenwald JE, Kapur RP, Studholme C, Boldenow E et al. Fetal brain lesions after subcutaneous inoculation of Zika virus in a pregnant nonhuman primate. *Nature medicine* 2016; 22:1256–1259
131. Li XF, Dong HL, Huang XY, Qiu YF, Wang HJ et al. Characterization of a 2016 clinical isolate of zika virus in non-human primates. *EBioMedicine* 2016; 12:170–177
132. Osuna CE, Lim SY, Deleage C, Griffin BD, Stein D et al. Zika viral dynamics and shedding in rhesus and cynomolgus macaques. *Nat Med* 2016; 22:1448–1455
133. Aliota MT, Dudley DM, Newman CM, Mohr EL, Gellerup DD et al. Heterologous protection against Asian zika virus challenge in rhesus macaques. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10:e0005168
134. Koide F, Goebel S, Snyder B, Walters KB, Gast A et al. Development of a zika virus infection model in cynomolgus macaques. *Front Microbiol* 2016; 7:7

135. Coffey LL, Pesavento PA, Keesler RI, Singapuri A, Watanabe J et al. Zika virus tissue and blood compartmentalization in acute infection of rhesus macaques. *PLoS One* 2017; 12:e0171148
136. Hirsch AJ, Smith JL, Haese NN, Broeckel RM, Parkins CJ et al. Zika virus infection of rhesus macaques leads to viral persistence in multiple tissues. *PLoS Pathog* 2017; 13:e1006219
137. Nguyen SM, Antony KM, Dudley DM, Kohn S, Simmons HA et al. Highly efficient maternal-fetal Zika virus transmission in pregnant rhesus macaques. *PLoS Pathog* 2017; 13:e1006378
138. Haddow AD, Nalca A, Rossi FD, Miller LJ, Wiley MR et al. High infection rates for adult macaques after intravaginal or intrarectal inoculation with zika virus. *Emerg Infect Dis* 2017; 23:1274–1281
139. Newman CM, Dudley DM, Aliota MT, Weiler AM, Barry GL et al. Oropharyngeal mucosal transmission of Zika virus in rhesus macaques. *Nat Commun* 2017; 8:169
140. Chiu CY, Sánchez-San Martín C, Bouquet J, Li T, Yagi S et al. Experimental zika virus inoculation in a new world monkey model reproduces key features of the human infection. *Sci Rep* 2017; 7:17126
141. Seferovic M, Martín CS, Tardif SD, Rutherford J, Castro ECC et al. Experimental Zika virus infection in the pregnant common marmoset induces spontaneous fetal loss and neurodevelopmental abnormalities. *Sci Rep* 2018; 8:6851
142. Silveira ELV, Rogers KA, Gumber S, Amancha P, Xiao P et al. Immune cell dynamics in rhesus macaques infected with a brazilian strain of zika virus. *J Immunol* 2017; 199:1003–1011
143. Martinot AJ, Abbink P, Afacan O, Prohl AK, Bronson R et al. Fetal neuropathology in zika virus-infected pregnant female rhesus monkeys. *Cell* 2018; 173:1111–1122
144. Aid M, Abbink P, Larocca RA, Boyd M, Nityanandam R et al. Zika virus persistence in the central nervous system and lymph nodes of rhesus monkeys. *Cell* 2017; 169:610–620
145. Shepherd RC, Williams MC. Studies on viruses in East African bats (Chiroptera). 1. Haemagglutination inhibition and circulation of arboviruses. *Zoonoses Res* 1964; 3:125–139
146. Simpson DI, O'Sullivan JP. Studies on arboviruses and bats (Chiroptera) in East Africa. I. Experimental infection of bats and virus transssion attempts in *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus). *Ann Trop Med Parasitol* 1968; 62:422–431
147. Reagan RL, Rumbaugh H, Nelson H, Brueckner AL. Effect of zika virus and bwamba virus in the cave bat (*Myotis lucifugus*). *Trans Am Microsc Soc* 1955; 74:77
148. Boorman JP, Porterfield JS. A simple technique for infection of mosquitoes with viruses; transmission of Zika virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1956; 50:238–242

149. Bearcroft WG. Zika virus infection experimentally induced in a human volunteer. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1956; 50:438–441
150. Uraki R, Hastings AK, Gloria-Soria A, Powell JR, Fikrig E. Altered vector competence in an experimental mosquito-mouse transmission model of Zika infection. *PLoS Negl Trop Dis* 2018; 12:e0006350
151. Secundino NFC, Chaves BA, Orfano AS, Silveira KRD, Rodrigues NB et al. Zika virus transmission to mouse ear by mosquito bite: a laboratory model that replicates the natural transmission process. *Parasit Vectors* 2017; 10:346
152. Ayres CF. Identification of Zika virus vectors and implications for control. *Lancet Infect Dis* 2016; 16:278–279
153. Amraoui F, Atyame-Nten C, Vega-Rúa A, Lourenço-de-Oliveira R, Vazeille M et al. *Culex* mosquitoes are experimentally unable to transmit Zika virus. *Euro Surveill* 2016; 21:
154. Richard V, Paoaafaite T, Cao-Lormeau VM. Acquittal of *Culex quinquefasciatus* in transmitting Zika virus during the French polynesian outbreak. *Acta Trop* 2017; 173:200–201
155. Dodson BL, Pujhari S, Rasgon JL. Vector competence of selected North American *Anopheles* and *Culex* mosquitoes for Zika virus. *PeerJ* 2018; 6:e4324
156. Guo XX, Li CX, Deng YQ, Xing D, Liu QM et al. *Culex pipiens quinquefasciatus*: a potential vector to transmit Zika virus. *Emerg Microbes Infect* 2016; 5:e102
157. Guedes DR, Paiva MH, Donato MM, Barbosa PP, Krovovsky L et al. Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. *Emerg Microbes Infect* 2017; 6:e69
158. Elizondo-Quiroga D, Medina-Sánchez A, Sánchez-González JM, Eckert KA, Villalobos-Sánchez E et al. Zika virus in salivary glands of five different species of wild-caught mosquitoes from Mexico. *Sci Rep* 2018; 8:809
159. Halstead SB. Dengue antibody-dependent enhancement: knowns and unknowns. *Microbiol Spectr* 2014; 2:249–271
160. Fagbami AH, Halstead SB, Marchette NJ, Larsen K. Cross-infection enhancement among African flaviviruses by immune mouse ascitic fluids. *Cytobios* 1987; 49:49–55
161. Charles AS, Christofferson RC. Utility of a dengue-derived monoclonal antibody to enhance zika infection in vitro. *PLoS Curr* 2016; 8:
162. Paul LM, Carlin ER, Jenkins MM, Tan AL, Barcellona CM et al. Dengue virus antibodies enhance Zika virus infection. *Clin Transl Immunology* 2016; 5:e117
163. Pantoja P, Pérez-Guzmán EX, Rodríguez IV, White LJ, González O et al. Zika virus pathogenesis in rhesus macaques is unaffected by pre-existing immunity to dengue virus. *Nat Commun* 2017; 8:15674
164. Terzian ACB, Schanoski AS, Mota MTO, da Silva RA, Estofolete CF et al. Viral load and cytokine response profile does not support antibody-dependent enhancement in dengue-primed zika virus-infected patients. *Clin Infect Dis* 2017; 65:1260–1265

165. Kam YW, Lee CY, Teo TH, Howland SW, Amrun SN et al. Cross-reactive dengue human monoclonal antibody prevents severe pathologies and death from Zika virus infections. *JCI Insight* 2017; 2:92428
166. Urakami A, Ngwe Tun MM, Moi ML, Sakurai A, Ishikawa M et al. An envelope-modified tetravalent dengue virus-like-particle vaccine has implications for flavivirus vaccine design. *J Virol* 2017; 91:e01181-17
167. Bardina SV, Bunduc P, Tripathi S, Duehr J, Frere JJ et al. Enhancement of zika virus pathogenesis by preexisting ant flavivirus immunity. *Science* 2017; 356:175–180
168. Londono-Renteria B, Troupin A, Cardenas JC, Hall A, Perez OG et al. A relevant in vitro human model for the study of Zika virus antibody-dependent enhancement. *J Gen Virol* 2017; 98:1702–1712
169. Winkler GC, Cheville NF. Ultrastructural morphometric investigation of early lesions in the pulmonary alveolar region of pigs during experimental swine influenza infection. *Am J Pathol* 1986; 122:541–552

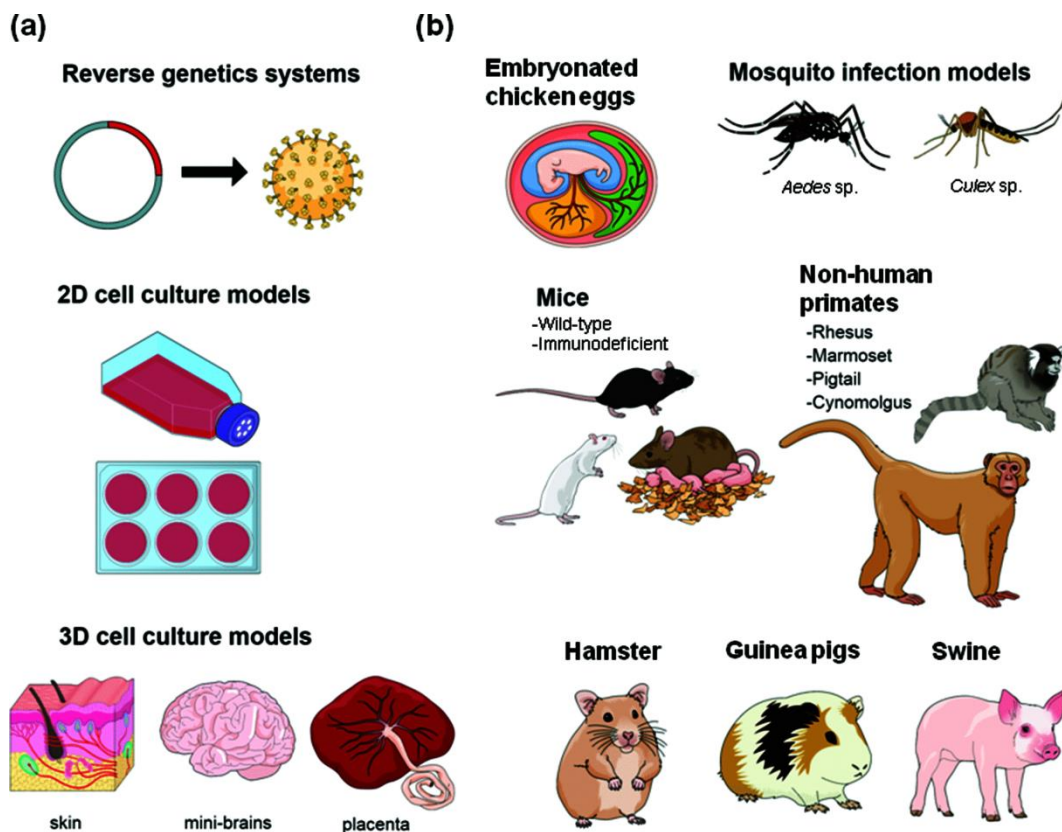


Figure 1. In vitro and in vivo models for studying ZIKV biology. (a) In vitro models for ZIKV include reverse genetics systems, two-dimensional (2D) cell models (primary cells and cell lines) and ex vivo three-dimensional (3D) models (skin, brains and placenta). (b) A number of animal models have been developed to study ZIKV, including mosquitoes (*Aedes* sp. and *Culex* sp.), embryonated chicken eggs, several mice strains, hamster, guinea pigs, swine and non-human primates.

Table 1. Three-dimensional (3D) cell culture models

3D model	ZIKV strain	Major findings	Reference
Forebrain-specific human neural progenitor cells (hNPCs)	MR766 (original ZIKV strain)	ZIKV virus directly infects human cortical neural progenitor cells with high efficiency, resulting in stunted growth of this cell population and transcriptional deregulation	[50]
Developing human retina progenitors and cerebral organoid model	?	The candidate ZIKV receptor AXL is highly enriched in radial glia, the neural stem cells of the human foetal cerebral cortex, providing a hypothesis for why these cells are particularly vulnerable to ZIKV infection and a candidate mechanism for ZIKV-induced microcephaly	[48]
Induced pluripotent stem cells (iPSCs) growing as neurospheres and brain organoids	MR766	ZIKV induces cell death in human iPSC-derived neural stem cells (NSCs), disrupts the formation of neurospheres and reduces the growth of organoids	[46]
Forebrain-specific organoids from human iPSCs	MR766 and FSS13025 (Asian lineage)	Development of a forebrain organoid platform for chemical compound testing and modelling ZIKV infection. ZIKV, upon access to the foetal brain, targets NPSCs and causes microcephalic-like deficits in cortical development	[44]
Human cortical NPCs, neurons, neurospheres and cerebral organoids	ZIKV-BR (patient from Paraiba, 2015) and MR766	ZIKV-BR induces cell death in human NPCs, impairing the growth and morphogenesis of healthy neurospheres. Microcephaly is a distinctive feature of recent ZIKV Asian-lineage virus	[47]
Explants JEG-3 (trophoblast cell line) and BeWo (cytotrophoblast cell line)	H/PF/2013 (French Polynesia, 2013)	ZIKV infects pregnant dams and placenta, infecting the developing foetus, causing a foetal syndrome that resembles intrauterine growth restriction and spontaneous abortion	[72]
Chorionic villus explants	MR766, Nica1-16 and Nica 2-16 (isolates from Nicaraguan patients)	ZIKV replicates in primary human placental cells from mid- and late gestation and villus explants from first-trimester human placentas, suggesting placental and paraplacental routes of transmission, and that infection of these cells is inhibited by the cyclic peptide duramycin	[20]
Primary human Hofbauer cells (HBCs) and cytotrophoblast cells from term placentas	ZIKV-UG/MR766 (Uganda 1947), ZIKV-CAM/FSS13025 (Cambodian/Asian isolate from 2010) and ZIKV-MEX/MEX 2-81 (Americas-derived virus isolated in 2016)	Primary placental-specific fibroblasts and HBCs are permissive for ZIKV replication in isolated cultures <i>in vitro</i> , while HBCs demonstrate susceptibility <i>ex vivo</i> in the context of placental tissues	[21]

3D model	ZIKV strain	Major findings	Reference
iPSCs and cerebral organoids	ZIKV-UG (VR-1838/Uganda 1947) or ZIKV-PR (VR-1843/Puerto Rico outbreak, 2015)	Loss of AXL gene had no effect on infectivity or virus-mediated cell death in neural progenitors or cerebral organoids	[49]
First-trimester human maternal decidual tissues grown ex vivo as 3D organ cultures	PRVABC59 (patient from Puerto Rico outbreak, 2015) or MP1751 (mosquitoes from Zika Forest, maternal uterine aspect of the human placenta as a likely route of ZIKV Uganda, 1962)	Zika virus can replicate in the maternal decidua, identifying the maternal uterine aspect of the human placenta as a likely route of ZIKV transmission to the foetus	[51]

Table 2. ZIKV reverse genetics systems

ZIKV strain (country/year)	Nature of system	Molecular strategy	Major findings	Reference
Paraiba_01/2015 (Brazil/2015)	Full-length ZIKV cDNA inserted into the vector pACNR1811 between the CMV promoter and HDV ribozyme and poly(A) signal/RNA Pol-II terminator	Plasmid toxicity and stability in <i>Escherichia coli</i> (strain MC1061) was improved by inserting an intron sequence after nt position 2711 (NS1 gene) and after nt position 8882 (NS5 gene), respectively. A Vero adaption mutation (C-T) was introduced into nt position 5680 of the ZIKV genome (NS3 gene) to generate ZIKV-NS3m carrying a Ser356Phe substitution in the NS3 protein	The clone replicated efficiently in Vero, neuronal and placental cells. However, virus growth was lower than that for wild-type ZIKV	[56]
MR766 (Uganda, 1947)	Infectious subgenomic amplicon (ISA) fragments cloned into vector pUC57. ZIKV genome was cloned between the CMV promoter and HDV ribozyme and poly(A) signal/RNA Pol-II terminator	Four overlapping fragments covering the full-length viral genomic RNA was used. Two clones were generated and in 1 of them the eGFP gene and the protease 2A were fused in-frame to the first 33 amino acids of the ZIKV C protein	ZIKV expressing eGFP was suitable for viral replication studies in both mosquito and human cells and can be used for screening antiviral molecules and measuring neutralizing antibody titres	[66]
MR766 (Uganda, 1947)	The pWNII- GFP subgenomic West Nile virus (WNV) replicon plasmid was used as a scaffold. The ZIKV genome was	The ZIKV construct with the wild-type sequence had large deletions, which we deduced were probably a result of	The infectious clone demonstrated similar growth to the parental virus. The addition of introns to the viral cDNA decreased the	[65]

ZIKV strain (country/year)	Nature of system	Molecular strategy	Major findings	Reference
	cloned between the CMV promoter and HDV ribozyme and poly(A) signal/RNA Pol-II terminator	homologous recombination events. This was circumvented by inserting a synthetic intron into NS1, such that the coding sequence would be disrupted in bacteria but splicing in mammalian cells would restore the viral RNA	toxicity in bacteria, which improves the processes of cloning and rescue of the plasmids	
FSS13025 (Cambodia/2010)	pCR2.1-TOPO with a T7 promoter and a HDV ribozyme sequence were engineered at the 5' and 3' ends of the complete viral cDNA for <i>in vitro</i> transcription and for generation of the authentic 3' end of the RNA transcript, respectively	Five RT-PCR fragments (A–E) spanning the complete viral genome were individually cloned and assembled into the full-length cDNA of ZIKV. Regions spanning the viral prM-E-NS1 genes were into the low copy-number plasmid pACYC177 to reduce bacterial toxicity. A reporter gene was generated by inserting the fused template capsid luciferase gene and the FMD 2A peptide generated between the C-terminus of the luciferase gene and the ZIKV complete open reading frame	The recombinant virus had reduced replication in cell culture. However, it was virulent in mice and successfully infected <i>Ae. aegypti</i> mosquitoes experimentally. The Luciferase-expressing ZIKV was useful for antiviral screening	[55]
H/PF/2013 (French Polynesia/2013) taylori- tc/SEN/1984/41662- DAK (Senegal/1984) MRS_OPY_Martinique e_PaRi_2015 (Martinique/2015)	The ISA method was used to recover infectious ZIKV. The viral fragments were flanked at the 5' and 3' untranslated regions by the pCMV and the HDR/SV40pA and transfected in three different mammalian cell lines (BHK-21, SW13 and HEK-293 cells)	Three overlapping genome fragments were generated for each virus by PCR. The amplicons were pooled and transfected into permissive cells to generate infectious ZIKV. Exchanging DNA fragments, inter- and intra-lineage chimeric ZIKV were produced. This is a bacteria-free approach, which overcomes the problems with plasmid stability in bacteria	Using the ISA method, it was possible to recover recombinant viruses derived from wild-type strains and also intra- and inter-lineage chimeras, and this could be a good tool to study the effect of genetic alterations and specific regions of the ZIKV genome. The replication kinetics of parental and recombinant viruses were essentially similar	[62]
H/PF/2013 (French Polynesia/2013) taylori- tc/SEN/1984/41662- DAK (Senegal/1984)	The ISA method was used to recover infectious ZIKV. Virus was rescued in both mosquitoes (C6/36) and mammalian (BHK-21) cells. The ZIKV genome is flanked in 5' and 3' by the CMV promoter and the hepatitis delta ribozyme followed by the simian virus 40 polyadenylation	Three fragments comprising the whole genome were transfected to generate an infectious clone. Three overlapping linear non-infectious subgenomic DNA fragments that encompass the entire viral genome were mixed and transfected directly into susceptible cells to	The ISA method was used to produce recombinant viruses in mammalian cells and mosquitoes efficiently; in addition to ZIKV, other arboviruses (YFV, JEV, CHIKV and WNV) were also efficiently recovered by this methodology	[59]

ZIKV strain (country/year)	Nature of system	Molecular strategy	Major findings	Reference
	signal, respectively	enable the recovery of infectious viruses. This is a bacteria-free approach, which overcomes problems with plasmid stability in bacteria		
SPH2015 (Brazil/2015) and SZ-WIV0 (China/2016)	pFK-Jc1E2Flag vector. Artificial synthetic DNA sequences that contain ZIKV cDNA flanked by T7 promoter and HDV ribozyme were cloned into pFK plasmid, which is a low-copy vector	Several silent mutations were inserted into the viral genome sequence in order to reduce the activity of cryptic bacterial promoters from the infectious clone and thus facilitate rescue of the plasmid	The plasmid was stable in bacteria, and the recombinant ZIKV virus was able to infect a panel of cell lines, including Vero E6, C6/36, U-251MG, and cause lethal infection in AG6 mice. The V2634M substitution in NS5 caused negligible effects for the ZIKV life cycle in cell culture and pathogenesis in AG6 mice	[68]
GZ01 (China/2016)	Four ZIKV fragments were cloned into plasmids vectors. The SP6 promoter was placed upstream of the 5' end of the ZIKV genome	The construction was engineered to contain a modified version of the group II self-splicing intron P.li.LSUI2 near the junction between the E and NS1 genes, which were removed from the RNA transcripts by an <i>in vitro</i> splicing reaction. Spliced viral RNA transcripts were used to generate infectious virus upon transfection of susceptible cells	Self-splicing ribozyme-based construction abolished the potential toxicity of ZIKV cDNA clones to the <i>E. coli</i> host. Two crucial cis-acting replication elements (5'-SLA and 5'-CS) of ZIKV were identified [60] and a S139N mutation in the prM protein of ZIKV was found to contribute to foetal microcephaly [67]	
Natal RGN (Brazil/2015)	Seven DNA fragments covering the entire genome were generated by circular polymerase extension reaction (CPER) and cloned into the pUC19 vector. An eighth pUC19 plasmid contained elements required for transcription [CMV, HDV ribozyme and a polyadenylation (pA) signal]	These plasmids were then used to generate cDNA fragments by PCR, with the resulting eight dsDNA fragments being mixed in equimolar amounts and subjected to cycles of CPER with a high-fidelity polymerase. The CPER products were then transfected into Vero cells for viral rescue	Fully functional Zika virus isolates were obtained directly from deep sequencing data from virus-infected tissues without the need for prior virus passaging and for the generation and propagation of full-length cDNA clones. The recombinant ZIKV was virulent for mice foetuses and transmitted efficiently in <i>Ae. aegypti</i> mosquitoes	[64]
PRVABC59 (Puerto Rico/2015)	The ZIKV genome was cloned in two separate pieces into the pACYC177 vector using Gibson assembly. The ZIKV genome was flanked by a T7 promoter	Plasmids were amplified, digested and ligated using Gibson assembly to create a plasmid containing the full-length virus sequence with a T7 promoter and hepatitis D virus ribozyme sequence, which was then transcribed into	Rescued ZIKV replicated similarly to wild-type virus in both human and mosquito cells. Infectious clone-derived virus initiated displayed similar rates of transmission in <i>Ae. aegypti</i> mosquitoes	[57]

ZIKV strain (country/year)	Nature of system	Molecular strategy	Major findings	Reference
	and an HDV ribozyme sequence.	RNA using T7 polymerase. The resulting RNA was then electroporated into Vero cells to generate infectious virus. A single synonymous mutation was identified at nucleotide position C8489T, which allowed differentiation from wild-type virus	and similar pathogenesis in AG129 mice as compared to the wild-type virus	
MR766 (Uganda, 1947) H/PF/2013 (French Polynesia/2013) PRVABC59 (Puerto Rico/2015) BeH819015 (Brazil/2015) SPH2015 (Brazil/2015)	The genome of the virus is divided into four fragments using the diagrammed restriction endonucleases and cloned into pUC57 vector. ZIKV genome was flanked by a T7 promoter and the HDV ribozyme. Plasmids were amplified in <i>E. coli</i> strain MC1061	The four plasmids were digested, ligated, <i>in vitro</i> -transcribed and electroporated into C6/36 cells to rescue virus	A panel of six infectious clones was generated. This system allowed the identification of lethal errors in the published sequence of the SPH2015 virus. Recombinant viruses had satisfactory replication in cell culture, immunogenicity and virulence in mice	[58]
FSS13025 (Cambodia/2010)	The ZIKV replicon was constructed by replacing the viral structural genes with Rluc using a full-length cDNA infectious clone (pFLZIKV) obtained from a previous study [55]. A T7 promoter and an HDV ribozyme sequence were engineered at the 5' and 3' ends of the replicon cDNA for <i>in vitro</i> transcription and for generation of the authentic 3' end of the RNA transcript, respectively	The C38-Rluc2A-E30 cassette encodes the N-terminal 38 amino acids of protein C, Rluc reporter, FMDV 2A protease and the 30 C-terminal amino acids of the EI protein (E30) of ZIKV. The cassette was cloned into pFLZIKV at the NotI and SphI sites, replacing the structural genes. A second ZIKV replicon containing Rluc and Neo genes (Rep-Neo) was constructed by inserting an EMCV IRES into the 3' UTR of the above Rluc replicon to generate a stable cell line expressing ZIKV proteins	The replicons were used to evaluate the effect of the NS5 mutation on viral RNA synthesis and the analysis of a known inhibitor of ZIKV. The replicon was useful for antiviral screening without the use of infectious virus, since the clones do not generate infectious particles, eliminating the risk of viral infection acquired in the laboratory	[7]

Table 3. Immunocompetent mice models for studying ZIKV biology

Mouse strain	Age	ZIKV strain (country/year)	Route of infection/dose	Major findings	Reference
C57BL/6J	5 weeks old	Dakar 41519 (Senegal/1984)	Subcutaneous/ 105 p.f.u.	Mice infected after treatment with antibody had a better rate of survival after the FDA-approved drug sofosbuvir was administered. However, almost 20 % of the untreated mice survived ZIKV infection	[78]
BALB/c	5–8 weeks old	PRVABC59 (Puerto Rico/2015)	Intraperitoneal/3.24×10 ⁶ p.f.u.	High viral load was observed in dexamethasone immunosuppressed mice, as well as the development of several inflammations in organ tissues. Treatment with recombinant type I interferons was able to mitigate disease effects	[81]
129 Sv/Ev	5–6 weeks old	MP1751 (Uganda/1962)	Subcutaneous/ 106 p.f.u.	Low viraemia; no weight loss; no clinical disease; viral detection only in the brain, ovaries, spleen and liver	[87]
C57BL/6	5 weeks old	DAK AR D 41525 (Senegal/1984)	Subcutaneous or intraperitoneal/ 106 p.f.u.	Anti-Ifnar1-treated mice suffered severe lesions to CNS; high viraemia; weight loss; intraperitoneal injection led to a 100% mortality rate	[77]
Swiss	1 day old	SPH 2015 (Brazil/2015)	Subcutaneous/intracranial/10% suspension	Mild to severe CNS lesions observed; ataxia; paralysis; lethargy; subcutaneous infection caused spinal cord damage and myelopathy	[91]
FBV/NJ and C57BL/6J	5.5, 7.5, 9.5 or 12.5 days <i>post-coitum</i>	HS-2015-BA-01 (Brazil/2015)	Intravenous (jugular vein)/ 105 p.f.u.	Earlier infections lead to severe malformations and intrauterine growth restriction; 10.5 days post-challenge (p.c.) the exposed mice developed both dysraphia and hydrocephalus; no significant effects noticed after 12.5 days p.c.	[92]
SJL	10–13 embryonic days	ZIKVBR (Brazil/2015)	Intravenous/10 ³ , 4×10 ¹⁰ , 10 ¹² p.f.u.	Neurological and optical malformations; intrauterine growth restriction; upregulation of apoptotic related genes	[47]

Table 4. Major immunocompromised mouse strains used in the study of ZIKV infection

Strain	Background	Knockout	Applications	References
A129	129 Sv/Ev	IFN α and β receptors	Study of the spread of the virus in different organs. Evaluation of the immune response induced by vaccines	[118].
AG129	129/Sv	IFN α / β and γ receptors	Viral dissemination profile, lethality, mechanisms of neuropathogenesis and attenuation/virulence of viral strains using various inoculation routes	[57, 71–73].
Irf3-/-Irf5-/-Irf7-/-	C57BL/6	Transcription factors 3, 5 and 7 (interferon pathway)	Analysis of viraemia and lethality conferred by ZIKV. Important for findings related to infection of neural stem cells	[76, 100].
Ifnar1-/-	C57BL/6	IFN α and β receptors	Characterization of infection. Mimics immunosuppressed individuals, neonates and elderly. Studies on placental infection, trans-placental transmission, neuroinvasion and consequences of neurological disease	[104]
LysMCre+IFN-ARfl/fl	C57BL/6 (H-2b)	Type I IFN in myeloid lineage cells	Demonstration of protection mediated by CD8+ T cells in the control of ZIKV infection. Promising for more complete studies on the cellular immune response and for the evaluation of control measures such as vaccines and antivirals	[108]
Rag1-/-	C57BL/6	T-cell and B-cell responses	Role of the adaptive cellular response in the control of ZIKV infection	[169]

Table 5. Non-murine models for studying ZIKV biology

Animal Species	Age	ZIKV strain (country/year)	Route of infection/dose	Major findings	Reference
Guinea pigs	200–250 g*	PRVABC59 (Puerto Rico/2015)	Subcutaneous/ ~106 p.f.u.	Fever; lethargy; hunched back; ruffled fur; decreased mobility; seroconversion; viraemia; increase in the levels of multiple cytokines; chemokines and growth factors in the serum	[117]
	5 weeks old	GZ01 (China/2016) or FSS13025 (Cambodia/2010)	Subcutaneous, intranasal, or contact /105 p.f.u.	Infectious dose 50 % (ID50) of ZIKV was calculated to 103.5 p.f.u. by the subcutaneous route; no overt clinical signs; sustained viraemia; viral shedding in both saliva and tears; seroconversion; replication and pathology in multiple organs; 100 % contact transmission	[118]

Animal Species	Age	ZIKV strain (country/year)	Route of infection/dose	Major findings	Reference
Hamsters	6 months old , at 18 to 21 days gestational age	H/PF/2013 (French Polynesia/2013)	Subcutaneous/107 p.f.u.	Non-pregnant animals had low-level viraemia and no clinical disease; pregnant animals had no overt clinical signs; no interference with normal pup development; no detectable viraemia and antigenaemia in pregnant animals; seroconversion in pup and dams	[31]
	8 weeks old	FSS13025 (Cambodia/2010)	Subcutaneous or intradermal/~105 p.f.u.	No clinical disease; no viraemia; no seroconversion	[121]
	6–8 weeks old	P6-740 (Malaysia/1966)	Subcutaneous/5000, 500, and 50 TCID50	Used <i>STAT2</i> knock-out hamsters; death; weight loss; viral load in the brain, testes, spinal cords, kidney, spleen; no histopathological lesions; infection of pregnant <i>STAT2</i> knock-out hamsters led to ZIKV infection in placental and foetus brains, but no detectable phenotype in pups; infection of wild-type hamsters did not result in placental or foetal brain infection	[122]
Chicken embryo	Embryonic days 2.5 and 5	MEX 1–44 (Mexico/2015)	<i>In ovo</i> /0.2 to 104 p.f.u.	Embryo mortality; virus replication in various organs; microcephaly-like phenotype; ventriculomegaly	[110]
Swine	1 day old	PRVABC59 (Puerto Rico/2015)	Intracerebral/~106TCID50	Seroconversion and low-titre viraemia, viruria and virus replication in internal organs. Two out of eleven pigs exhibited leg weakness, ataxia and tremor	[124]
	3 months old	FSS13025 (Cambodia/2010); PRVABC59 (Puerto Rico/2015)	Subcutaneous or intradermal/~105 p.f.u.	Subclinical infection without viraemia but with seroconversion	[121]
	Mid-gestation (gestation day 50)	PRVABC59 (Puerto Rico/2015)	<i>In utero</i> intraperitoneally+intra amniotic or intracerebrall /~105 TCID50	Detection of ZIKV RNA in foetal membranes; persistent infection in porcine conceptuses; no brain lesions or histopathology in offspring; impaired health in offspring: weak piglets, delayed feeding, neonatal body length and weight lower than controls, seizures, splayed back leg, reduced growth rate, aggressive behavior	[125]
	Mid-gestation (gestation day 50)	PRVABC59 (Puerto Rico/2015)	<i>In utero</i> or intravenous /~105–6 TCID50	Microcephaly in 2 out of 15 pigs inoculated <i>in utero</i> and mild to severe neuropathology, characterized by neuronal depletion in the cerebral cortices of various lobes, in all foetuses	[126]

Table 6. Non-human primate models for ZIKV

Animal species	ZIKV strain (country/year)	Route of infection/dose	Major findings	Reference
Rhesus macaque (<i>Macaca mulatta</i>)	H/PF/2013 (French Polynesia/2013)	Subcutaneous /104 to 106 p.f.u.	Viraemia in non-pregnant and pregnant animals for 21 days and for up to at least 57 days, respectively. Virus was present in saliva, urine and cerebrospinal fluid. Homologous challenge at 10 weeks after the initial infection resulted in protection from disease and virus replication	[128]
	Brazil/ZKV/2015 (Brazil/2015)	Subcutaneous/103 p.f.u.	Animals were immunized with either an inactivated vaccine, a plasmid DNA vaccine or a rhesus adenovirus serotype 52 vector-based vaccine. Vaccinated animals developed neutralizing antibodies and were fully protected from challenge	[129]
	GZ01/2016 (China/2016)	Subcutaneous /105 p.f.u.	Fever, viraemia and ZIKV RNA excretion in urine, saliva and lacrimal fluid. Necropsy of two infected animals revealed systemic infections involving the CNS and visceral organs. Robust humoral and cellular response was detected in infected animals	[131]
	PLCaI_ZV (Canada/2014) and PRVABC59(Puerto Rico/2016)	Subcutaneous/106 p.f.u.	High-level viraemia and viral detection in saliva, urine, cerebrospinal fluid (CSF) and semen (but only transiently in vaginal secretions); increase in the levels of aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase and creatinine phosphatase. Animals were protected from heterologous ZIKV infection	[132]
	MR766 (Uganda/1947) and H/PF/2013 (French Polynesia/2013)	Subcutaneous/104 to 106 p.f.u.	Immunity elicited by African lineage ZIKV protects against subsequent infection with Asian lineage ZIKV; robust cellular and humoral immunity to ZIKV	[133]
	PRVABC59 (Puerto Rico/2016)	Subcutaneous/104 to 106	Transient plasma viraemia and viruria from 1 to 7 days p.i.; rash, fever and conjunctivitis; strong adaptive immune response to ZIKV, although systemic cytokine response was minimal; virus detection in peripheral nervous tissue, multiple lymphoid tissues, joints, and the uterus of the necropsied animals at 7 days p.i.	[136]
	H/PF/2013 (French Polynesia/2013)	Subcutaneous or oral/105	Application of high-dose ZIKV directly to the tonsils resulted in viraemia. Animals infected either to the palatine tonsils, conjunctivae or nasal passages	[139]

Animal species	ZIKV strain (country/year)	Route of infection/dose	Major findings	Reference
Cynomolgus macaques (<i>Macaca fascicularis</i>)		p.f.u.	with saliva from monkeys infected subcutaneously did not become infected	
	Brazil/ZKV/2015 (Brazil/2015)	Intravenous/105 p.f.u.	Animals had no clinical disease; short-lived viraemia that cleared as neutralizing antibody developed; ZIKV RNA detected in urine and saliva; virus present in lymph nodes, spleen, cardiopulmonary, gastrointestinal, integument and genitourinary tissues	[135]
	H/PF/2013 (French Polynesia/2013)	Subcutaneous or oral/104 p.f.u.	Pregnant macaques had viraemia from 11 to 70 days p.i.; head circumference (HC) in all foetuses was between one and three sd below the mean and ZIKV RNA was detected in tissues from all foetuses, suggesting consistent vertical transmission	[137]
	PRVABC59(Puerto Rico/2016) or Brazil/ZKV/2015 (Brazil/2015)	Subcutaneous/103 to 105 f.f.u.	Persistence in central nervous system, lymph nodes and colorectal tissues for weeks after virus has been cleared from peripheral blood, urine and mucosal secretions	[144]
	ArD 41525 (Senegal/1984)	Intravaginal or intrarectal/107 p.f.u.	No overt clinical signs; viraemia was detected in 50 and 100% of macaques inoculated intravaginally or intrarectally, respectively	[138]
	Brazil/ZKV/2015 (Brazil/2015)	Subcutaneous/103 p.f.u.	Infection of pregnant monkeys recapitulates many lesions that are characteristic of CZS, including consistent neuropathology in the foetal brain and spinal cord. Pregnant animals infected early in pregnancy exhibited prolonged viraemia (28–70 days) compared with dams infected later in pregnancy (14–42 days)	[143]
	PRVABC59 (Puerto Rico/2016)	Subcutaneous/105 TCID50	Viraemia, viral detection in lymph nodes, CNS and male (seminal vesicles, testes, prostate) and female genital tracts (uterus, ovaries)	[132]
	ArD 41525 (Senegal/1984)	Intravaginal or intrarectal/107 p.f.u.	No overt clinical signs; viraemia was detected in 50 and 100% of macaques inoculated intravaginally or intrarectally, respectively	[138]
	PRVABC59(Puerto Rico/2016) or FSS13025 (Cambodia/2010) or IBH30656 (Nigeria/1968)	Subcutaneous/104 to 105 p.f.u.	RVABC59 strain induced viraemia detectable up to day 10 and moderate viral in testes, urine and saliva. FSS13025 strain induced shorter and lower viraemia compared to PRVABC59 and had detectable viral loads in testes but not in urine and saliva. IBH30656 failed to establish infection	[134]

Animal species	ZIKV strain (country/year)	Route of infection/dose	Major findings	Reference
Pig-tailed macaque (<i>Macaca nemestrina</i>)	FSS13025 (Cambodia/2010)	Subcutaneous/107 p.f.u.	The pregnant inoculated animal did not develop clinical disease; foetal necropsy revealed ZIKV in the brain, and marked cerebral white matter hypoplasia, periventricular white matter gliosis, and axonal and ependymal injury	[130]
Marmoset (<i>Callithrix jacchus</i>)	MR766 (Uganda/1947)	Intramuscular/105 p .f.u.	No overt clinical signs; virus persistence in body fluids such as semen and saliva for longer periods of time than in serum; strong neutralizing antibodies and antiviral responses; MR766-infected animals rechallenged with the SPH2015 Brazilian strain were fully protected.	[140]
	SPH2015 (Brazil/2015)	Intramuscular/105 p .f.u.	Pregnant animals had no overt clinical signs; seroconversion; induction of type I/II interferon-associated genes and proinflammatory cytokines; persistent viraemia and viruria; spontaneous pregnancy loss was observed 16–18 days p.i., with extensive active placental viral replication and foetal neurocellular disorganization similar to that seen in humans	[141]

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DA CEUA DO INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES (PARA EXECUÇÃO DOS ENSAIOS IN VIVO)



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Aggeu Magalhães

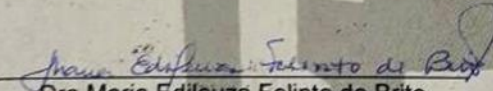
INSTITUTIONAL ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE (IACUC)

Letter of IACUC Approval

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

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

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



Dra Maria Edileuza Felinto de Brito
IACUC Vice Chair/IAM

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

Av. Professor Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária – Campus da UFPE
 Recife - PE - CEP: 50.670-420
 Telefone: (81) 2101-2500/2101-2600 Fax: (81) 3453-1911
 www.cpqam.fiocruz.br

CURRICULUM VITAE (LATTES)

Lígia Rosa Sales Leal

Curriculum Vitae

Nome civil

Nome Lígia Rosa Sales Leal

Atuação profissional

1. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Vínculo institucional

2019 - 2019 Vínculo: Estágio de docência , Enquadramento funcional: Estágio de Docência , Carga horária: 4, Regime: Parcial
Outras informações:
Professora auxiliar da Disciplina de Genética Humana.

2018 - 2019 Vínculo: Estágio de docência , Enquadramento funcional: Estágio de Docência , Carga horária: 4, Regime: Parcial
Outras informações:
Professora auxiliar da disciplina de Biotecnologia Aplicada à Saúde.

Atividades

05/2020 - Atual Pesquisa e Desenvolvimento, Centro de Ciências Biológicas
Linhas de pesquisa:
Desenvolvimento de estratégias vacinais contra o Sars-CoV-2.

03/2016 - Atual Pesquisa e Desenvolvimento, Centro de Ciências Biológicas
Linhas de pesquisa:
Desenvolvimento de estratégias vacinais contra o Zika vírus.

2012 - Atual Pesquisa e Desenvolvimento, Centro de Ciências Biológicas
Linhas de pesquisa:
Biologia Molecular Aplicada ao Estudo da Papilomavirose Humana

2. Instituto Nazionale Tumori Regina Elena - IRE

Vínculo institucional

2019 - 2019 Vínculo: Missão de curta duração , Enquadramento funcional: Bolsista , Carga horária: 40, Regime: Integral
 Outras informações:
 Missão de curta duração realizada ao laboratório do Dr. Aldo Venuti, que desenvolve pesquisas sobre cânceres relacionados a HPV e imunoterapias contra câncer. Financiado pelo edital FA-CEPE 01/2017 de Estímulo à cooperação Internacional dos Programas de Pós-graduação de Pernambuco.

Linhas de pesquisa

1. Biologia Molecular Aplicada ao Estudo da Papilomavírose Humana
2. Desenvolvimento de estratégias vacinais contra o Sars-CoV-2.
3. Desenvolvimento de estratégias vacinais contra o Zika vírus.

Áreas de atuação

1. Genética
2. Biologia Molecular
3. Vacinas e Kits para Diagnósticos
4. Genética Molecular e de Microorganismos

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. SILVA, ANNA JÉSSICA D.; JESUS, ANDRÉ LUIZ S.; **LEAL, LÍGIA ROSA S.**; SILVA, GUILHERME ANTONIO S.; MELO, CRISTIANE MOUTINHO L.; FREITAS, ANTONIO C.
 Pichia pastoris displaying ZIKV protein epitopes from the Envelope and NS1 induce in vitro immune activation. VACCINE. , v.39, p.2545 - 2554, 2021.
2. SILVA, ANNA JÉSSICA DUARTE; DE MACÊDO, LARISSA SILVA; **LEAL, LÍGIA ROSA SALES**; DE JESUS, ANDRÉ LUIZ SANTOS; FREITAS, ANTONIO CARLOS
 Yeasts as a promising delivery platform for DNA and RNA vaccines. FEMS YEAST RESEARCH. , v.21, p.foab018 - , 2021.
3. OLIVEIRA, T. H. A.; BARROS JR, M. R.; SANTOS, D. L.; SILVA, R. C. O.;

MARCOS, B. S.; NASCIMENTO, K. C. G.; **LEAL, L. R. S.**; SILVA NETO, J. C.; SILVA, A. J. D.; FREITAS, A. C.

Expression of the Oncoprotein E5 from Human Papillomavirus and miR-203 in Pre-Cancer Lesions and Cervical Cancer. *Clinics in Oncology*. , v.5, p.76 - , 2020.

4. PENA, LINDOMAR JOSÉ; MIRANDA GUARINES, KLARISSA; DUARTE SILVA, ANNA JÉSSICA; **SALES LEAL, LÍGIA ROSA**; MENDES FÉLIX, DANIELE; SILVA, ADALÚCIA; DE OLIVEIRA, SHEILLA ANDRADE; JUNQUEIRA AYRES, CONSTÂNCIA FLÁVIA; JÚNIOR, ABELARDO SILVA; DE FREITAS, ANTONIO CARLOS

In vitro and in vivo models for studying Zika virus biology. *Journal of General Virology*. , v.1, p.1 - , 2018.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. BOMFIM, M. A.; SILVA, A. J. D.; **LEAL, L. R. S.**; FREITAS, A. C.

EXPERIÊNCIAS VIVENCIADAS POR UM GRADUANDO EM UM LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA À SAÚDE In: III Congresso Internacional das Ciências da Saúde, 2021

III Congresso Internacional das Ciências da Saúde - COINTER PDVS 2021. , 2021.

2. SILVA, A. J. D.; **LEAL, L. R. S.**; Cardozo, GHA; Ribeiro, I.S.; BENEVIDES, T. F.; JESUS, A. L. S.; FREITAS, A. C.

PRODUCTION OF RECOMBINANT ZIKA VIRUS NS3 PROTEIN FOR ASSESSMENT OF DIAGNOSTIC AND IMMUNOGENIC POTENTIAL. In: XXVIII Congresso Brasileiro de Virologia, 2017, Belo Horizonte.

Anais do XXVIII Congresso Brasileiro de Virologia. , 2017. p.1 - 440

3. SILVA, A. J. D.; **LEAL, L. R. S.**; SILVA, A. C.; MACEDO, L. S.; JESUS, A. L. S.; FREITAS, A. C.

YEAST PICHIA PASTORIS FOR THE PRODUCTION OF ZIKA VIRUS VLPS In: XXVIII Congresso Brasileiro de Virologia, 2017, Belo Horizonte.

Anais do XXVIII Congresso Brasileiro de Virologia. , 2017. p.1 - 440

Apresentação de trabalho e palestra

1. FREITAS, A. C.; SILVA, A. J. D.; **LEAL, L. R. S.**; INVENCAO, M. C. V.

Desenvolvimento de Estratégia vacinal contra a Covid-19 em Pernambuco: como as leveduras podem nos ajudar a combater a Covid-19?, 2020. (Seminário, Apresentação de Trabalho)

2. **LEAL, L. R. S.**; SILVA, A. J. D.; JESUS, A. L. S.; FREITAS, A. C.

DESENVOLVIMENTO DE CANDIDATOS A VACINAS DE DNA PROFILÁTICAS CONTRA ZIKA VÍRUS, 2018. (Outra, Apresentação de Trabalho)

3. SILVA, A. J. D.; Silva, G.A.S.; **LEAL, L. R. S.**; Aguiar, L.M.S; JESUS, A. L. S.; MELO, C. M. L.; PENA, L. J.; FREITAS, A. C.

Pichia Pastoris as a vacinal platform for the Zika virus, 2018.

(Congresso,Apresentação de Trabalho)

4. SILVA, A. J. D.; **LEAL, L. R. S.**; JESUS, A. L. S.; FREITAS, A. C.
Ancoragem de proteínas do Zika vírus na superfície de Pichia pastoris como plataforma diagnóstica e vacinal., 2017. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

5. **LEAL, L. R. S.**
Construção de candidatos a vacinas de DNA baseados nos genes prM e Envelope do Zika vírus., 2017. (Seminário,Apresentação de Trabalho)

Produção técnica

Demais produções técnicas

1. **LEAL, L. R. S.**; SILVA, A. J. D.; Campos, A.P.F.
Produção de proteínas heterólogas em E.coli para fins diagnósticos e vacinais., 2018. (Outro, Curso de curta duração ministrado)

Educação e Popularização de C&T

Apresentação de trabalho e palestra

1. FREITAS, A. C.; SILVA, A. J. D.; **LEAL, L. R. S.**; INVENCAO, M. C. V.
Desenvolvimento de Estratégia vacinal contra a Covid-19 em Pernambuco: como as leveduras podem nos ajudar a combater a Covid-19?, 2020. (Seminário,Apresentação de Trabalho)

2. SILVA, A. J. D.; **LEAL, L. R. S.**; JESUS, A. L. S.; FREITAS, A. C.
Ancoragem de proteínas do Zika vírus na superfície de Pichia pastoris como plataforma diagnóstica e vacinal., 2017. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

3. **LEAL, L. R. S.**
Construção de candidatos a vacinas de DNA baseados nos genes prM e Envelope do Zika vírus., 2017. (Seminário,Apresentação de Trabalho)

Curso de curta duração ministrado

1. **LEAL, L. R. S.**; SILVA, A. J. D.; Campos, A.P.F.
Produção de proteínas heterólogas em E.coli para fins diagnósticos e vacinais., 2018. (Outro, Curso de curta duração ministrado)

Demais produções técnicas

1. **LEAL, L. R. S.**; SILVA, A. J. D.; Campos, A.P.F.
Produção de proteínas heterólogas em E.coli para fins diagnósticos e vacinais., 2018. (Outro, Curso de curta duração ministrado)

Orientações e Supervisões

Orientações e supervisões concluídas

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. MYLENNÁ MÁYRA GOIS DE SOUSA. **CONSTRUÇÃO DE VETORES DE DNA COMO CANDIDATOS A VACINA CONTRA ZIKA VÍRUS**. 2021. Curso (Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco
Inst. financiadora: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Iniciação científica

1. Mylenna Máyla Gois de Sousa. **CONSTRUÇÃO DE VETORES DE DNA PARA CANDIDATOS A VACINA CONTRA ZIKA VÍRUS**. 2018. Iniciação científica (Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco

Orientações e supervisões em andamento

Iniciação científica

1. Nathália Lima de Queiroz. **ANCORAGEM DE PROTEÍNAS DO PAPILOMAVIRUS HUMANO NA SUPERFÍCIE DE Pichia pastoris**. 2020. Iniciação científica (Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco
Inst. financiadora: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Bancas

Participação em banca de trabalhos de conclusão

Graduação

1. HATZLHOFER, B. L. D.; **LEAL, L. R. S.**
Participação em banca de Ana Carine de Miranda Rios. **Utilização de células dendríticas na produção de vacinas anti-HPV - uma revisão de literatura.**, 2018 (Farmácia) Universidade Federal de Pernambuco

2. **LEAL, L. R. S.**; FONTES, K. F. L. P.
Participação em banca de Gabriel Henrique de Arruda Cardozo. **Construção de vetor de expressão para o gene sintético E5 multiepítomos de HPV-16 em Escherichia coli**, 2017 (Biomedicina) Universidade Federal de Pernambuco

3. **LEAL, L. R. S.**; JESUS, A. L. S.

Participação em banca de Larissa Silva de Macêdo. **Produção das proteínas estruturais do Zika vírus em células de levedura *Pichia pastoris* como plataforma para produção de VLPs.**, 2017
(Biomedicina) Universidade Federal de Pernambuco

Participação em banca de comissões julgadoras

Outra

1. **2ª Sepec - Semana de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura da Universidade Federal de Pernambuco**, 2018
Universidade Federal de Pernambuco
2. **1ª Sepec - Semana de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura da Universidade Federal de Pernambuco**, 2017
Universidade Federal de Pernambuco