



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ISA RENATA DE SOUZA SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA DE PROTEÍNA SINTÉTICA
BIOMARCADORA DE SEVERIDADE DA INFECÇÃO POR
ZIKA VÍRUS**

RECIFE

2023

ISA RENATA DE SOUZA SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA DE PROTEÍNA SINTÉTICA
BIOMARCADORA DE SEVERIDADE DA INFECÇÃO POR
ZIKA VÍRUS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Farmácia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Roberto Dias Lins Neto

Coorientadora: Lícyá Samara da Silva Xavier

RECIFE

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Santos, Isa Renata de Souza.

Caracterização biofísica de proteína sintética biomarcadora de severidade da
infecção por Zika vírus / Isa Renata de Souza Santos. - Recife, 2023.
42 : il.

Orientador(a): Roberto Dias Lins Neto

Cooorientador(a): Lícyá Samara da Silva Xavier

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Farmácia - Bacharelado, 2023.

1. Diagnóstico. 2. Proteína sintética. 3. Zika vírus. I. Lins Neto, Roberto Dias.
(Orientação). II. Xavier, Lícyá Samara da Silva. (Coorientação). III. Título.

610 CDD (22.ed.)

ISA RENATA DE SOUZA SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA DE PROTEÍNA SINTÉTICA BIOMARCADORA
DE SEVERIDADE DA INFECÇÃO POR ZIKA VÍRUS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Farmácia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Roberto Dias Lins Neto (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo (Presidente da banca)
Universidade Federal de Pernambuco

MSc. Tayná Evily de Lima (Examinadora)
Fundação Oswaldo Cruz

MSc. Bruno Henrique de Sousa Leite (Suplente)
Fundação Oswaldo Cruz

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Adalberto e Miriam, que me deram todo incentivo e apoio para a realização de um de meus maiores sonhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu propósito de vida, que me sustenta e ama diariamente e que, como se não fosse o suficiente, me tornou livre; tudo isso sem eu merecer.

Aos meus pais, Miriam e Adalberto, por todo amor, aconselhamentos, incentivo e inspiração ao longo de todos esses anos.

Aos meus amigos universitários, que tornaram a caminhada mais leve. Posso afirmar, com segurança, que fiz amigos para toda a vida e em um lugar que nunca imaginei que fosse possível.

Ao meu orientador, Dr. Roberto Lins, e à Dra. Isabelle Viana por me receberem tão bem em seu grupo de pesquisa, sendo sempre solícitos e atenciosos.

À minha Coorientadora, MSc. Lícy Xavier, que me ensinou as técnicas para realização do trabalho e que esteve presente em todos os momentos da construção deste trabalho. Muito obrigada!

E ao grupo dos experimentais, que me acolheram como parte da equipe.

À UFPE pela abertura dos mais amplos campos de conhecimento técnico-profissional.

À Fiocruz pela oportunidade de realizar o trabalho em uma instituição referência em saúde e pela estrutura e materiais utilizados durante a pesquisa.

RESUMO

O vírus Zika (*Zika virus* – ZIKV) pertence ao gênero *Flavivirus* tal qual o vírus da Dengue (DENV), e devido a isso pode apresentar sintomas semelhantes ao DENV nas infecções não graves, gerando incerteza no diagnóstico clínico. Outro fenótipo relacionado com o ZIKV está interligado com sintomas neurológicos - que são a forma grave da doença e a Síndrome Congênita do vírus Zika (SCZ). Este trabalho tem por objetivo realizar a caracterização biofísica da proteína sintética 1NH9-NS2B, carreadora de um epítipo de NS2B, que pode ser utilizada como biomarcador da severidade de infecções por ZIKV. Para esse fim, a proteína previamente elaborada foi expressa em *Escherichia coli* (*E. coli*), purificada por cromatografia de afinidade e caracterizada pelo método biofísico de espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) para avaliação da estrutura secundária e determinação da temperatura de desnaturação proteica. Os processos de produção e purificação obtiveram como rendimento 151 μM de 1NH9-NS2B, que se refere à 0,96 g por litro de cultura de *E. coli*. Com relação ao espectro de Dicroísmo Circular, foram observados picos negativos em 209 nm e 222 nm, indicando a presença de α -hélice, assim como um pico positivo em 196 nm, indício de β -folha. Os resultados foram comparados com os dados preditos *in silico*, apresentando um RMSD (*Root Mean Square Deviation*) de 3,44 $\Delta\epsilon$ (delta épsilon). A temperatura de desnaturação proteica foi determinada a partir de um ponto em que o sinal do eixo das ordenadas se diferencia do sinal inicial, neste caso em 75,18°C. Portanto, os dados deste trabalho foram condizentes com o predito teoricamente e a elevada temperatura de desenovelamento sugere que o transporte e manuseio da proteína podem ser feitos sem necessidade de uma cadeia fria.

Palavras-chave: diagnóstico; proteína sintética; Zika vírus.

ABSTRACT

Zika virus (ZIKV) belongs to the genus Flavivirus like Dengue virus (DENV), and due to this it can present DENV-like symptoms in non-severe infections, generating uncertainty in clinical diagnosis. Another phenotype related to ZIKV is interconnected with neurological symptoms - which are the severe form of the disease and the Congenital Zika Virus Syndrome (SCZ). This work aims to perform the biophysical characterization of the synthetic protein 1NH9-NS2B, carrying an epitope of NS2B, which can be used as a biomarker of the severity of ZIKV infections. To this end, the previously elaborated protein was expressed in *Escherichia coli* (*E. coli*), purified by affinity chromatography and characterized by the biophysical method of Circular Dichroism (CD) spectroscopy to evaluate the secondary structure and determine the protein denaturation temperature. The production and purification processes obtained as yield 151 μM of 1NH9-NS2B, which refers to 0.96 g per liter of *E. coli* culture. Regarding the spectrum of Circular Dichroism, negative peaks were observed at 209 nm and 222 nm, indicating the presence of α -helix, as well as a positive peak at 196 nm, indicative of β -sheet. The results were compared with *in silico* predicted data, showing an RMSD (Root Mean Square Deviation) of 3.44 $\Delta\epsilon$ (delta epsilon). The protein denaturation temperature was determined from a point at which the sign on the ordinate axis differs from the initial sign, in this case at 75.18°C. Therefore, the data from this work were consistent with the theoretical prediction and that the high denaturing temperature suggests that transport and handling of the protein can be done without the need for a cold chain.

Keywords: diagnosis; synthetic protein; Zika virus.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Países com transmissões atuais ou anteriores de ZIKV.....	13
Figura 2. Representação das proteínas virais e suas funções no genoma de <i>Flavivirus</i>	15
Figura 3. Representação do ciclo de replicação viral do ZIKV.....	17
Figura 4. Esquema da leitura de amostra por Dicroísmo Circular, gerando um espectro representativo de estruturas secundárias de proteínas	20
Figura 5. Demonstração da proteína sintética 1NH9-NS2B.....	22
Figura 6. Cromatograma referente à etapa de purificação da proteína sintética 1NH9-NS2B	28
Figura 7. Gel de eletroforese para identificação da proteína sintética 1NH9-NS2B	29
Figura 8. Espectro de dicroísmo circular da proteína sintética 1NH9-NS2B.....	30
Figura 9. Curva de desnaturação da proteína sintética 1NH9-NS2B.....	31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 História do ZIKV	12
2.2 Epidemiologia do ZIKV	12
2.3 Sintomatologia e diferentes fenótipos de ZIKV	13
2.4 Estrutura viral	14
2.4.1 Proteína não estrutural NS2B	15
2.5 Ciclo de replicação viral do ZIKV	16
2.6 Resposta imunológica à infecção por ZIKV	17
2.7 Diagnóstico	18
2.8 Dicroísmo circular	19
2.9 Importância da proteína sintética 1NH9-NS2B	21
3 OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo geral	23
3.2 Objetivos específicos	23
4 METODOLOGIA	24
4.1 Preparo de meio de cultura LB - Luria Bertani	24
4.2 Expressão proteica	24
4.3 Purificação de proteínas	25
4.4 Eletroforese de proteínas	25
4.5 Troca de tampão, concentração e quantificação de proteínas	25
4.6 Dicroísmo Circular e temperatura de desnaturação proteica	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1 Precipitado bacteriano de E. coli BL21	27
5.2 Purificação e eletroforese da proteína 1NH9-NS2B	27
5.3 Rendimento da expressão proteica de 1NH9-NS2B	29
5.4 Espectro de Dicroísmo Circular da proteína 1NH9-NS2B	30
5.5 Temperatura de desenovelamento da proteína 1NH9-NS2B	30
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

Em 2016 nas Américas, foi registrada a maior incidência de casos da infecção causada pelo vírus Zika (*Zika virus* - ZIKV) no continente, sendo 651.470 ocorrências, logo após a chegada do vírus ao continente no ano de 2015 (Organização Pan-Americana da Saúde, 2023). A infecção por ZIKV pode ser assintomática, ter sintomas semelhantes aos dos arbovírus dengue e chikungunya (dor muscular e articular, febre, fadiga, conjuntivite, cefaleia), como também evoluir para graves manifestações neurológicas e Síndrome Congênita pelo ZIKV – microcefalia e malformações fetais (Organização Mundial da Saúde, 2022).

O Ministério da Saúde (2022) informa que a transmissão do ZIKV no Brasil ocorre, majoritariamente, através da picada do mosquito *Aedes aegypti* – também responsável pela inoculação de dengue e chikungunya. No entanto, outras formas de transmissão foram relatadas, como a materno-fetal, por transfusão sanguínea ou de órgãos e por contato sexual (MUSSO; GUBLER, 2016). Além disso, os gêneros de mosquitos *Aedes spp.*, *Culex spp.*, *Anopheles spp.*, *Eretmapodites spp.* e *Mansonia sp.* são responsáveis pela transmissão de ZIKV nos continentes africano, asiático e americano (GUTIÉRREZ-BUGALLO *et al.*, 2019).

O diagnóstico dos flavivírus a princípio é clínico, mas os resultados observados pelos exames são inespecíficos, não sendo suficientes para diferenciação entre os vírus Zika e Dengue, por exemplo. Para identificação do agente causador da infecção podem ser realizados exames laboratoriais sorológicos, de biologia molecular e de inibição da hemaglutinação (Organização Mundial da Saúde, 2009; Ministério da Saúde, 2022).

Apesar dos exames sorológicos terem o intuito de diferenciar os vírus, pode haver reação cruzada entre anticorpos de ZIKV e Dengue (DENV), devido a sua similaridade estrutural por pertencerem à mesma família, neste caso *Flaviviridae* (DUSSUPT *et al.*, 2020). Então, as proteínas estruturais e não estruturais têm sido estudadas com o intuito de encontrar epítopos que identifiquem o ZIKV de forma específica e com alta afinidade (SIROHI; KUHN, 2017; BAILEY *et al.*, 2018; MISHRA *et al.*, 2020).

Dentre as proteínas não estruturais, já foi observado que a proteína NS2B do ZIKV gera, em infecções não graves, uma resposta humoral de memória mediada por IgG, que está ausente em pacientes com fenótipos graves de Zika. Portanto, uma proteína sintética carregando um epítipo específico da NS2B do ZIKV foi previamente desenvolvida *in silico* de forma a apresentar o epítipo em uma conformação favorável para formação do complexo antígeno-anticorpo. Essa proteína, aqui denominada 1NH9-NS2B, foi também avaliada *in vitro*,

provando ser possível distinguir a severidade da doença a partir da presença ou ausência de anticorpos anti-NS2B (LOEFFLER *et al.*, 2021).

A proteína sintética 1NH9-NS2B previamente elaborada *in silico* pelo grupo de pesquisa se mostrou *in vitro* capaz de identificar especificamente a infecção por ZIKV através de anticorpos anti-NS2B produzidos, como também de apontar a severidade da infecção (LOEFFLER *et al.*, 2021). Então, devido a sua importância diagnóstica, este trabalho visou verificar a estabilidade dessa proteína frente à variação de temperatura, um parâmetro fundamental na manutenção da função proteica, assim como avaliar se sua estrutura secundária estava de acordo com os dados preditos *in silico*.

1 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 HISTÓRIA DO ZIKV

Na floresta africana Zika, na Uganda, o ZIKV foi descrito pela primeira vez quando seu ciclo viral se restringia aos mosquitos selvagens e aos primatas. Em Uganda, foi feito o primeiro isolamento de ZIKV, em 1947, em um macaco rhesus e em 1948 ocorreu o isolamento do vírus em um vetor, na espécie *Aedes (Stegomyia) africanus*. A infecção em humanos foi registrada pela primeira vez em 1952, na Nigéria (HASAN *et al.*, 2018).

Seis décadas após a descoberta do ZIKV, em 2007, ocorreu o primeiro surto nos Estados Federados da Micronésia, mais precisamente no estado de Yap. Onde, por pesquisa sorológica, foi confirmada a infecção de 73% da população (DUFFY *et al.*, 2009 *apud* PETERSSON *et al.*, 2016). Em meados de 2013 a 2014, na Polinésia Francesa, ocorre um surto de ZIKV, onde o vírus foi relacionado com sintomas neurológicos como a Síndrome Congênita do Vírus Zika (SCZ) e a síndrome de Guillain-Barré (SGB). Além disso, foi também relatado outros tipos de transmissão como materno-fetal, sexual e pós-transfusão (OEHLER *et al.*, 2014).

O ZIKV surgiu nas Américas em 2015 e no início de 2016 estava presente em 20 países do continente. Logo após, o ZIKV foi declarado como emergência de saúde pública pela Organização Mundial da Saúde (OMS) devido à alta incidência de sintomas neurológicos causados pelo vírus (WIMALASIRI-YAPA *et al.*, 2020).

2.2 EPIDEMIOLOGIA DO ZIKV

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2022), até o momento 89 países e territórios relataram transmissão recente ou anterior por ZIKV (Figura 1). Após os surtos que ocorreram no continente asiático, surgiram hipóteses que o vírus já circulava em humanos no continente africano, mas devido a inespecificidade da doença, nunca foi realizada a busca por um novo agente etiológico (HILLS; FISCHER; PETERSEN, 2017). Estudos de coortes retrospectivos, detecção do vírus nos vetores e o relato de viajantes infectados confirmaram a hipótese levantada sobre a circulação do genótipo africano do ZIKV (BERTHET *et al.*, 2014; HERRERA *et al.*, 2017).

Em 2007 foi notificado o primeiro surto de ZIKV no mundo, na ilha de Yap – Micronésia, na Ásia. Entretanto, assim como na África, suspeitou-se de anterior circulação viral, que foi comprovada por estudos retrospectivos sorológicos e de biologia molecular

artralgia. Levando à dificuldade no diagnóstico clínico diferencial (HILLS; FISCHER; PETERSEN, 2017).

Outros sintomas podem ser apresentados na forma grave da doença, que envolvem distúrbios neurológicos, sendo o principal a síndrome de Guillain-Barré (SGB), em casos raros a infecção severa por ZIKV está ligada à mielite, encefalopatia e meningoencefalite (COUNOTTE *et al.*, 2018). Em casos relatados, os pacientes inicialmente tinham sintomas semelhantes a gripe e em poucos dias evoluíam para quadros de formigamento, paralisia e/ou dor nos membros superiores ou inferiores, e nos últimos casos apresentavam baixo nível de consciência e convulsões (CARTEAUX *et al.*, 2016; MÉCHARLES *et al.*, 2016; OEHLER *et al.*, 2014; ROZÉ *et al.*, 2016).

Os relatos mais conhecidos causados pelo vírus em questão fazem parte da Síndrome Congênita do ZIKV, anteriormente associada apenas à microcefalia. No entanto, a síndrome está relacionada com uma variedade de malformações congênitas, que inclui abortos espontâneos, anomalias cerebrais, musculoesqueléticas e oculares, restrição de crescimento intrauterino, convulsões e atraso no desenvolvimento neurológico (MARBÁN-CASTRO *et al.*, 2021). A SCZ ocorre devido a infecção sintomática ou assintomática por ZIKV durante a gravidez e está relacionada com 5 a 14% dos casos de infecções maternas (MUSSO; KO; BAUD, 2019). Interessante notar que a ausência de anomalias clínicas e radiológicas ao nascer não exclui a possibilidade de comprometimento posterior do neurodesenvolvimento (RICE *et al.*, 2018).

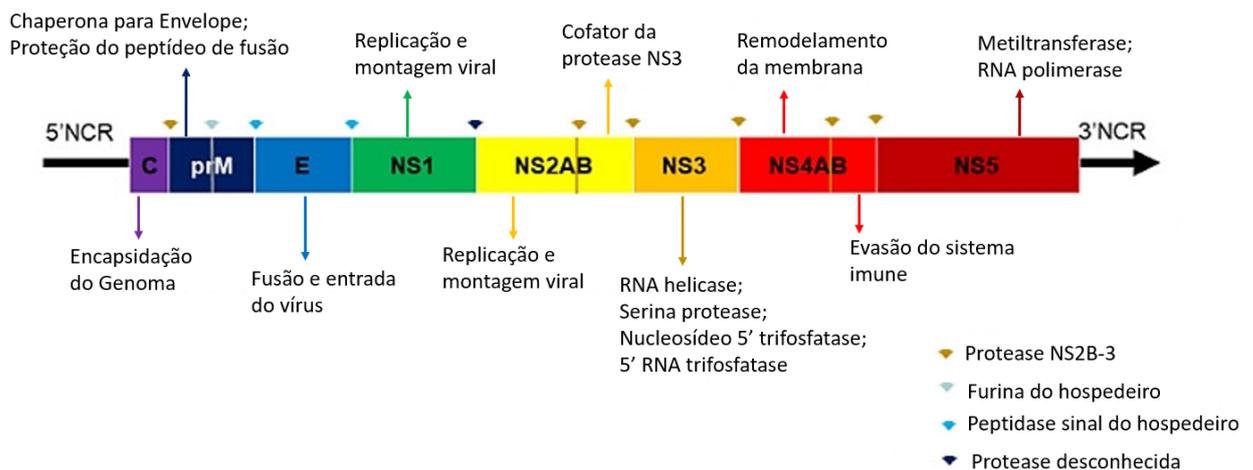
2.4 ESTRUTURA VIRAL

O ZIKV pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus* – composto por 70 tipos de vírus de fita RNA de cadeia simples de sentido positivo e cujo genoma possui aproximadamente 11 kilobases (kb) (DETHOFF *et al.*, 2018). A tradução dos genes forma uma única poliproteína que é clivada pela protease viral NS2B-NS3 e pelas peptidase sinal e furina do hospedeiro, além de uma protease desconhecida (HASAN, *et al.*, 2018).

As clivagens da poliproteína dão origem a três proteínas estruturais e sete não estruturais (Figura 2). As proteínas estruturais se referem as proteínas do envelope, capsídeo e membrana, que formam a partícula viral e medeiam a entrada do vírus na célula (SIROHI; KUHN, 2017). As proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) estão relacionadas com a alteração das vias bioquímicas do hospedeiro em favor do vírus, com a evasão do sistema imune, com a replicação e empacotamento do genoma (ZHAO *et al.*, 2021). A proteína NS1

está envolvida com a replicação do RNA viral, com a maturação do vírus através da interação com as proteínas estruturais prM e E e com a evasão imune, interagindo com os receptores semelhantes a RIG-I, receptores citosólicos de RNA viral que induzem a produção de interferons do tipo I (AMORIM *et al.*, 2014). O complexo proteico NS2B-NS3 tem a porção N-terminal associada com o processamento proteolítico da poliproteína viral, por ser um domínio serina protease e a porção C-terminal está relacionada com a replicação de RNA. A proteína NS5 é responsável pela síntese de RNA viral e está envolvido na tradução e evasão da resposta imune do hospedeiro (LEE *et al.*, 2021). A proteína NS4B replicação viral e na resposta à resposta imune do hospedeiro. (LI; KANG, 2022).

Figura 2 – Representação das proteínas virais e suas funções no genoma de *Flavivirus*



Nota: A poliproteína está separada por cor, que são relativas às futuras proteínas individuais pós-clivagem. As setas da mesma cor que as proteínas individuais levam à informação da função de cada uma delas. Os triângulos demonstram os pontos em que cada enzima cliva a poliproteína. **Fonte:** Adaptado de Zhao *et al.*, 2021.

2.4.1 Proteína não estrutural NS2B

A proteína não estrutural NS2B em flavivírus atua na replicação viral como cofator enzimático da protease NS3 (NITSCHKE *et al.*, 2014). Além disso, o complexo NS2B-NS3 está relacionado com a evasão imune, por agir na cascata de ativação do interferon-3 (SILVA-JÚNIOR; ARAÚJO-JÚNIOR, 2019).

Os flavivírus apresentam as mesmas proteínas não estruturais, só que no caso da NS2B do ZIKV existem epítomos que o identificam especificamente. Estão entre eles os peptídeos formados pela sequência de aminoácidos GDITWEKDAEVTGNS, GDITWEKDAEITGNS,

TWEKDAEVTGNSPRL, TWEKDAEITGNSPRL, KDAEVTGNSPRLDVA e KDAEITGNSPRLDVA, esses peptídeos possuem a sequência KDAEV(I)TGNS em comum, que, por ser uma região específica do ZIKV, pode ser utilizada para diferenciá-lo de outros flavivírus, como também distinguir as formas graves e não graves de ZIKV (LOEFFLER *et al.*, 2021).

2.5 CICLO DE REPLICAÇÃO VIRAL DO ZIKV

A replicação viral do ZIKV é iniciada através da endocitose e este processo pode ser facilitado por conta do tipo de receptor celular envolvido. Entre eles estão os receptores transmembranares da família TIM e TAM, que se ligam à fosfatidilserina – PS, que é expressa em células apoptóticas, levando a sua remoção pelos fagócitos. No entanto, o ZIKV também possui PS em seu envelope e por meio desse artifício consegue infectar as células hospedeiras. Outro receptor que facilita a entrada do ZIKV nas células é o DC-SIGN (presente nas células dendríticas, nos macrófagos e nos neutrófilos), onde a ele se ligam glicoproteínas do envelope do ZIKV e promove a endocitose mediada por clatrina (MEERTENS *et al.*, 2012; GARCIA-VALLEJO *et al.*, 2013 *apud* LEE *et al.*, 2021).

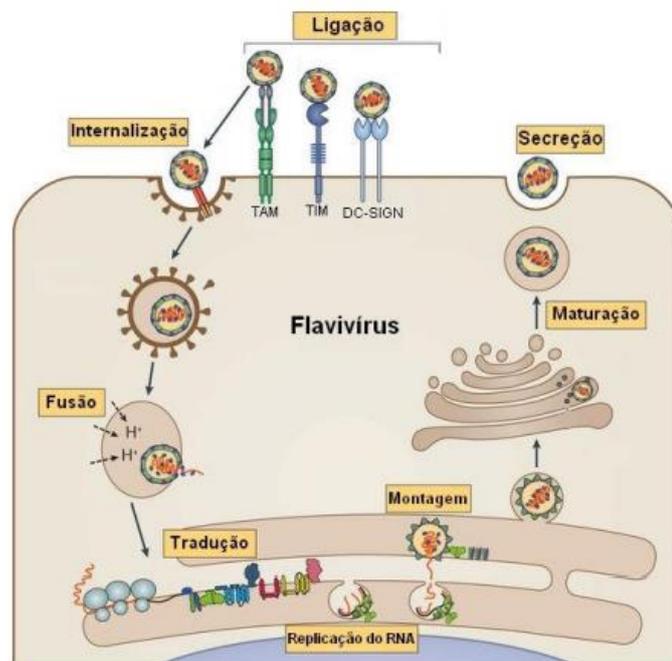
Com a endocitose é formado o endossomo com a partícula viral em seu interior. Aos poucos íons H⁺ são inseridos no endossomo, tornando o ambiente ácido, o que proporciona a alteração da estrutura do envelope viral, que se funde com a membrana do endossomo e libera o material genético no citoplasma da célula hospedeira, iniciando, assim, a tradução da poliproteína (PERSAUD *et al.*, 2018).

A tradução da poliproteína inicia no citoplasma e é direcionada para o Retículo Endoplasmático – RE, onde é translocada para o interior do RE por peptidases sinal, oligotransferases e complexos de membrana do RE. Com isso, a poliproteína é clivada por peptidases sinal e pela protease viral NS2B-NS3, liberando proteínas individuais que passam a executar suas funções dentro da célula, fazendo com que *vírions* sejam produzidos (ROPIDI *et al.*, 2020).

Após a liberação inicial da poliproteína, o ZIKV remodela a arquitetura do RE, expandindo-o, contorcendo as membranas, formando pacotes de vesículas e membranas convolutas, que tem aparência esponjosa e estão associadas à síntese e processamento de proteínas. Nesse processo, é conhecida a atividade das proteínas não estruturais NS4A (atua na curvatura da membrana durante a invaginação de vesículas no lúmen do RE) e NS2A, que recruta o RNA do genoma viral, a protease NS2B-NS3 e complexos C-prM-Env não

processados para o RE (CORTESE *et al.*, 2017; AKTEPE *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2019). Com o remodelamento, há o aumento da replicação do genoma viral, da montagem e do transporte das partículas virais para o Complexo de Golgi – CG, que é responsável por processos de maturação, como a transformação por furinas do hospedeiro das proteínas prM em M maduras. Por fim, vesículas advindas do CG contendo ZIKV se fundem com a membrana plasmática celular e liberam os *virions* maduros no espaço extracelular (SIROHI; KUHN, 2017).

Figura 3 – Representação do ciclo de replicação viral do ZIKV



Nota: O ZIKV se liga a um dos receptores (TAM, TIM e DC-SIGN) e internaliza na célula por endocitose, ao formar o endossomo ocorre a fusão do envelope viral com a membrana do endossomo devido à diminuição do pH pela entrada de íons H^+ no endossomo, liberando o genoma viral. Logo após, ocorre a tradução do RNA viral em poliproteína. Com a clivagem da poliproteína em proteínas individuais ocorre o aumento da replicação viral, que ocorre, em sua maioria, no Retículo Endoplasmático (onde ocorre remodelamento da organela por parte do vírus, para melhorar a replicação viral) e por fim, no Complexo de Golgi a partícula viral é maturada e secretada no exterior celular por vesículas advindas do Complexo de Golgi. **Fonte:** Adaptado de Neufeldt *et al.*, 2018.

2.6 RESPOSTA IMUNOLÓGICA À INFECÇÃO POR ZIKV

Ao ultrapassar as barreiras físicas, o ZIKV passa a infectar as células, dando início à replicação viral. Esse processo começa com a inibição da ação dos interferons (IFN) I e III, como os $IFN\alpha$ e $IFN\beta$, citocinas importantes na sinalização do sistema imune inato (PIERSON; DIAMOND, 2018). Apesar das tentativas de evasão do sistema imune, é observada a ação do

sistema imune inato, pela presença das células Natural Killer (NK) e de quatro a sete dias depois do início da infecção, dos linfócitos T e plasmócitos (ALIOTA *et al.*, 2016).

Indivíduos infectados anteriormente por outros flavivírus ou os que foram vacinados têm chances de apresentar reação cruzada de anticorpos e ADE (aprimoramento dependente de anticorpos), podendo neutralizar ou aumentar a infecção por ZIKV. Em certos casos a reação cruzada teve ação protetiva contra o ZIKV (GORDON *et al.*, 2019; RODRIGUEZ-BARRAQUER *et al.*, 2019). Essa proteção pode estar relacionada com a quantidade de anticorpos contra outros flavivírus, como demonstrado por Bardina *et al.* (2017), onde testes em camundongos demonstraram que a quantidade de anticorpos anti-DENV em uma infecção por ZIKV atua como papel protetor, em altas quantidades, ou tem efeito deletério, em baixas quantidades. No entanto, outros estudos apontam que devido às condições subótimas da ligação entre antígenos do ZIKV e anticorpos anti-DENV ocorre o fenômeno de ADE, aumentando a infecciosidade do ZIKV, porque após a ligação dos anticorpos à partícula viral, seguida de fagocitose através da porção Fc dos anticorpos, o vírus, ao invés de ser destruído, passa a infectar a célula por conta da baixa afinidade com os anticorpos (ROGERS *et al.*, 2017; BROWN *et al.*, 2019).

É sugerido que o desenvolvimento de anticorpos contra o ZIKV segue um padrão temporal semelhante ao de infecções por outros flavivírus, onde os anticorpos IgM desapareçam do organismo no tempo médio de quatro meses após a infecção, mesmo com a presença de IgG (PAZ-BAILEY *et al.*, 2017).

Nos sintomas neurológicos do ZIKV, é sugerido que os linfócitos TCD8+ estejam relacionados com a remoção do vírus do sistema nervoso, agindo como protetores. No entanto, como a ação do TCD8+ é a morte celular por apoptose, há um possível papel patogênico pela destruição do tecido nervoso por conta da infecção (RIVINO; LIM, 2017).

Estudos com outros flavivírus evidenciam que as células T-CD8+ são os principais mediadores da remoção viral nos tecidos do sistema nervoso (REYNOLDS *et al.*, 2018). Portanto, devido ao comportamento neurotrópico do ZIKV, possivelmente os linfócitos T-CD8+ têm participação na prevenção ou diminuição do agravamento das manifestações neurológicas.

2.7 DIAGNÓSTICO

Para o diagnóstico de ZIKV é preconizado pela OMS, pelo Center for Disease Control (CDC) dos Estados Unidos e pelo Ministério da Saúde os testes de PCR e testes sorológicos,

como a busca por anticorpos IgM e IgG e o PRNT - Teste por neutralização de redução de placas (Agência Nacional de Saúde Suplementar, 2016). Na fase aguda da infecção o PCR é utilizado, normalmente, até sete primeiros dias após início dos sintomas, do quarto dia até a 12^a semana é preconizada a busca por IgM, que se for positiva deve ser confirmada pelo PRNT, porque há reação cruzada entre anticorpos dos flavivírus, seja por infecções anteriores ou pela vacinação (MUSSO; GUBLER, 2016).

O plasma ou soro é a amostra empregada para detecção de ZIKV. No entanto, estudos apontam que o ZIKV pode ser detectado por períodos mais longos em amostras de sangue total, urina, saliva e sêmen. Com isso, novas alternativas de diagnóstico são propostas, como testes rápidos para pesquisa de anticorpos ou do genoma viral (LANDRY; ST. GEORGE, 2017; PETERS; STEVENSON, 2019). A proteína alvo deste trabalho tem como intenção ser uma nova proposta de detecção específica dos anticorpos produzidos por causa do ZIKV, trazendo como adicional a diferenciação da severidade da doença, indicando antecipadamente se o prognóstico é neurológico ou não (LOEFFLER *et al.*, 2021).

2.8 DICROÍSMO CIRCULAR

A espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) é utilizada para analisar as estruturas de moléculas quirais (opticamente ativas) e possui diversos fins, como a elucidação de estrutura secundária, dobramento e conformação de proteínas, descrição de estruturas de produtos naturais e sintéticos para uso farmacêutico e determinação dos enantiômeros de fármacos (NUGROHO; MORITA, 2013; SHARMA *et al.*, 2019; LÓPEZ-SANMARTÍN *et al.*, 2023). O método de dicroísmo circular se baseia na absorção diferencial, pelo cromóforo quiral das moléculas de interesse, dos componentes circular à direita/dextrógiro e circular à esquerda/levógiro que formam a luz plano polarizada. As moléculas quirais que geram sinal de CD ocorrem de três maneiras: sua estrutura é naturalmente quiral, como no caso de um átomo de carbono com quatro substituintes diferentes ou com relação à ligação dissulfeto, devido dos ângulos diedros formados ou forma ligação covalente com um centro quiral ou a estrutura tridimensional adotada pela molécula a coloca em um ambiente assimétrico (DU *et al.*, 2015).

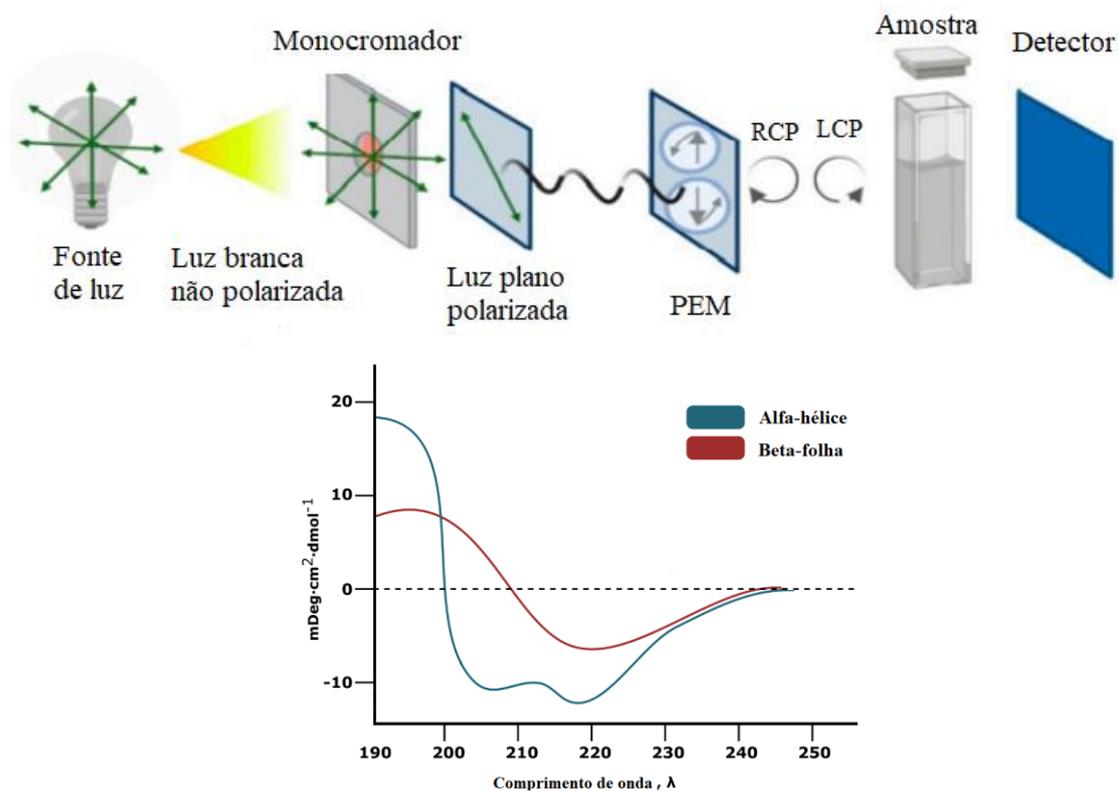
O espectro do CD pode ser medido pelo espectropolarímetro pelas formas de modulação, subtração direta e elipsométrica. Na modulação, a radiação incidente é continuamente alternada entre os componentes levógiro e dextrógiro; na subtração direta, a molécula é submetida separadamente aos dois componentes circulares e a absorbância obtida

em cada um é subtraída ao final, obtendo-se o resultado e na forma elipsométrica, a elipticidade da radiação transmitida é medida (KELLY; JESS; PRICE, 2005).

Para estudo da estrutura secundária de proteínas, o principal grupo cromóforo é a ligação peptídica, no grupamento amida, analisada no comprimento de onda de 160-240 nm. Outro grupo cromóforo são as cadeias laterais de aminoácidos aromáticos como tirosina, triptofano, fenilalanina, que absorvem na faixa de 260 a 320 nm. Também estão incluídas as ligações dissulfeto (bandas largas de absorção fracas centradas em torno de 260 nm) podem identificar a estrutura no comprimento de onda de aproximadamente 290 nm (SOUSA, 2021).

A partir do espectro de CD formado, é possível estimar as frações de cada estrutura secundária por conta da apresentação de forma e magnitude diferenciadas. Onde, normalmente, as α -hélices apresentam dois picos negativos em 222 e 208 nm e um único pico positivo em 193 nm, já as β - folhas têm um pico negativo em 218 nm e um pico positivo em 195 nm. A formação dos picos característicos de α -hélice e β - folha está relacionada, principalmente, à ligação peptídica, onde há uma transição $n \rightarrow \pi^*$ fraca, mas ampla, centrada em torno de 220 nm e uma transição $\pi \rightarrow \pi^*$ mais intensa, em torno de 190 nm (GREENFIELD, 2006 *apud* HARIDHASAPAVALAN, 2022).

Figura 4 – Esquema da leitura de amostra por Dicroísmo Circular, gerando um espectro representativo de estruturas secundárias de proteínas



Nota: A leitura no espectropolarímetro é realizada a partir da luz branca não polarizada, que passa pelo monocromador, gerando uma luz plano polarizada, que é transformada em luz circularmente polarizada à direita (RCP) e/ou à esquerda (LCP) por um modulador fotoelástico (PEM). O detector capta a absorção diferencial das luzes circularmente polarizadas pela amostra, gerando dados em mDeg. Então, os dados são colocados em um servidor, como o PDBMD2CD, que fornece um espectro formado a partir da leitura realizada no equipamento.

Fonte: Adaptado de Pignataro *et al.*, 2020 e de BitesizeBio, 2022.

2.9 IMPORTÂNCIA DA PROTEÍNA SINTÉTICA 1NH9-NS2B

A proteína NS2B é cofator da NS3, uma serina protease responsável pela clivagem em cinco pontos da poliproteína. Além dessa função, a NS2B é uma proteína transmembrana, o que favorece a ligação de anticorpos neutralizantes, já que o epítipo encontra-se na superfície viral (SILVA-JÚNIOR; ARAÚJO-JÚNIOR, 2019).

Para fins diagnósticos específicos para ZIKV, foi elaborada a proteína sintética 1NH9-NS2B (figura 5), base de estudo deste trabalho, que tem em sua estrutura o epítipo KDAEV(I)TGNS de ZIKV (LOEFFLER *et al.*, 2021). A escolha do epítipo KDAEV(I)TGNS entra em consenso com o estudo de Mishra *et al.* (2018), onde o epítipo escolhido para a proteína 1NH9-NS2B faz parte de sete dos dez epítipos triados e está presente no epítipo selecionado [DITWEKDAEV(I)TGNSPRLDVA] pelo grupo de pesquisa de Mishra *et al.*

O trabalho desenvolvido por Loeffler *et al.* (2021) realizou testes sorológicos com o epítipo em questão para ZIKV com soros de 120 pacientes nas fase aguda e convalescente, dividindo-os em oito grupos [Zika aguda sem histórico de infecção por dengue; Zika aguda com histórico de infecção por dengue; Zika aguda com baixos títulos de anticorpos contra a dengue; Zika convalescente sem histórico de infecção por dengue; Zika convalescente com histórico de infecção por dengue; Zika convalescente com baixos títulos de anticorpos contra dengue; Zika com sintomas neurológicos (NeuroZIKV) sem histórico de infecção por dengue; Zika com sintomas neurológicos (NeuroZIKV) com histórico de infecção por dengue]. Então, foi comprovado que os anticorpos anti-NS2B com o epítipo citado, estão presentes apenas nas infecções não graves cujo agente etiológico é o ZIKV.

Por fim, devido ao seu caráter inovador, presença de atividade inventiva e aplicação industrial, a Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz decidiu, em 2022, depositar a proteína sintética 1NH9-NS2B junto ao Instituto Nacional da Propriedade Intelectual – INPI através da patente de número BR 10 2022004271 3.

Figura 5 – Demonstração da proteína sintética 1NH9-NS2B



Nota: Imagem produzida no software VMD, que demonstra a presença de alfa-hélice e beta-folha. **Fonte:** A autora, 2023

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a caracterização biofísica da proteína sintética 1NH9-NS2B, utilizada como biomarcador da severidade de infecções por ZIKV.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir a proteína sintética 1NH9-NS2B;
- Determinar a estrutura secundária da proteína sintética 1NH9-NS2B;
- Determinar a temperatura de desnaturação da proteína sintética 1NH9-NS2B;
- Discutir futuras aplicações laboratoriais e clínicas da proteína sintética 1NH9-NS2B.

4 METODOLOGIA

4.1 Preparo de meio de cultura LB - Luria Bertani

Foram preparados 2 litros (L) de meio de cultura LB líquido para posterior cultivo bacteriano. O preparo foi feito conforme orientação do fabricante para o produto Luria Broth base (Invitrogen) cat n° 12795-084. A cada litro de água ultrapura foi adicionado 25g de meio desidratado, que foi solubilizado com auxílio de agitador magnético. Sendo esterilizado antes do uso.

4.2 Expressão proteica

A expressão *in vitro* da proteína sintética com epítipo de NS2B foi executada pela transformação de 20 µL de células competentes de *E. coli* BL21(DE3) pLysS One Shot® (Invitrogen™) com 0,2 µg do plasmídeo de expressão referente à proteína sintética, que também possui um gene de resistência ao antimicrobiano ampicilina. A transformação foi feita por choque térmico, iniciando com incubação em gelo por 30 minutos (min), depois por incubação a 42 °C por 2 min e novamente em gelo por 2 min. Logo após o processo de choque térmico/transformação, foram adicionados 500 µL de meio S.O.C (Invitrogen™) (2% de triptona; 0,5% de extrato de levedura; 10 mM de NaCl; 2,5 mM de KCl; 10 mM de MgCl₂; 10 mM de MgSO₄ e 20 mM de glicose) ao microtubo contendo as bactérias. Em sequência, as células bacterianas foram mantidas na incubadora por 1h à 37 °C e 225 rpm. Após incubação, o conteúdo foi centrifugado (5000 g; 5 min; 23 °C), o sobrenadante foi descartado e o precipitado colocado para crescimento na placa de Petri contendo meio Ágar LB, suplementado com 50 µg/mL de ampicilina (Cayman Chemical™) para crescimento das colônias a 37 °C por 16h. Posteriormente ao crescimento em placa, uma única colônia foi selecionada e inoculada em 100 mL de meio LB líquido (Invitrogen™) suplementado com 50 µg/mL de ampicilina (Cayman Chemical™) (LB-AMP). As células foram incubadas por 16h à 37 °C e 225 rpm. Após a incubação, retirou-se o volume necessário do pré-inóculo para expandir o crescimento celular para 1L de meio LB-AMP. Para tal procedimento, o volume deve apresentar densidade óptica inicial, no comprimento de onda de 600 nm (OD_{600nm}), de 0,15. A cultura permaneceu em crescimento (37 °C; 225 rpm) até atingir uma OD_{600nm} entre 0,5 e 0,8. Então, foi adicionado isopropiltiogalactosídeo (IPTG) a uma concentração final de 1 mM, assim, a cultura foi conduzida para a produção de proteínas por 16h à 22 °C e 225 rpm.

4.3 Purificação de proteínas

As culturas de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS expressando a proteína sintética foram centrifugadas (7.000 g; 30 min; 4°C), o sobrenadante foi descartado e o precipitado bacteriano ressuspendido com 50 mL de tampão de ligação (50 mM de Tris-HCl, 300 mM de NaCl, 20 mM de Imidazol, pH: 8,0), acrescido de inibidor de protease (Roche®) na concentração final de 1X.

A suspensão obtida foi submetida à sonicação (6 pulsos de 30 segundos e amplitude de 40%, com intervalo de 60 segundos entre pulsos) e centrifugação (10.000 g; 30 min; 4 °C). O sobrenadante foi purificado utilizando o cromatógrafo ÄKTA™ Pure 25M (Cytiva®) por cromatografia de afinidade em coluna de íons metálicos imobilizados (HisTrap™ HP), especificamente, resina de íons de níquel (Ni²⁺) funcionalizada, que tem capacidade de se ligar com alta afinidade ao grupamento imidazol presente na cadeia lateral do aminoácido histidina (que é adicionado à proteína para permitir a purificação). A eluição da proteína foi realizada por gradiente crescente de imidazol.

4.4 Eletroforese de proteínas

As amostras de proteínas foram selecionadas a partir de frações advindas da etapa de purificação e foram diluídas, na proporção de 1:1, no tampão de corrida para proteínas Laemmli 2X (400 mM Glicina, 50mM Tris e 3,5mM SDS). A seguir, as amostras foram submetidas a temperatura de 95 °C por 5 min. Para eletroforese foi feito o gel a 17,5% de acrilamida (SIGMA®). Em seguida, foram aplicados 10 µL de cada amostra diluída por poço do gel e, como controle da corrida, foram utilizados 10 µL do marcador de peso molecular NEB®, Color Prestained Protein Marker, Broad Range #P7708S. As proteínas migraram no gel submetidas a uma corrente elétrica constante de 40 mA. Ao final da corrida, o gel foi corado a partir da imersão em solução corante azul de coomassie (10% de ácido acético, 45% de metanol, 0,5% de azul de coomassie) sob leve agitação e depois dessa etapa, para posterior visualização das bandas, foi descorado com solução composta por ácido acético glacial 7%, metanol 25% e água 68%. As imagens do gel foram capturadas através do fotodocumentador ImageQuant LAS 500 chemiluminescence CCD câmera.

4.5 Troca de tampão, concentração e quantificação das proteínas

A troca do tampão de eluição por PBS 1X foi realizada por diálise, onde utilizou-se a membrana de diálise Servapor[®] dialysis tubing, MWCO 12000 – 14000 RC diameter 29mm, que antes do uso foi deixada *overnight* em água ultrapura para hidratação. No dia seguinte, foram selecionadas as frações 29, 30 e 37 e também as frações 38 e 39 por estarem próximas a de número 37 que apresentou faixa significativa da presença da proteína sintética em foco. Logo após, as frações foram inseridas na membrana de diálise que foi colocada em um béquer e levado à agitação para permitir a troca de tampão. A membrana permaneceu *overnight* na solução em constante agitação. No outro dia, o conteúdo da membrana foi vertido em tubo com filtro de 3 kDa (Amicon[®] Ultra centrifugal filter) para concentração da amostra por centrifugação (3.260 g; 20 min; 10 °C). Para eliminar a agregação proteica, uma segunda centrifugação (10.000 g; 10 min) foi realizada. A quantificação da proteína ocorreu a partir da absorbância, no comprimento de onda de 280 nm no Nanodrop[™] OneC. Posteriormente, o valor de concentração foi ajustado pelo uso do coeficiente de extinção molar com uso da fórmula: $A = \epsilon \cdot C \cdot l$, onde, “A” é o valor obtido da absorbância a 280 nm, “ ϵ ” trata-se do coeficiente de extinção molar da proteína, “C” representa a concentração da proteína (em unidade molar) e “l” é o caminho óptico percorrido em centímetros.

4.6 Dicroísmo Circular e temperatura de desnaturação proteica

Com a concentração obtida a solução foi diluída para alcançar a concentração alvo de 15 μ M. A avaliação da estrutura secundária da proteína se deu pela medição do espectro nos comprimentos de onda de 190 nm – 260 nm. Após a definição do espectro de dicroísmo circular, o resultado experimental foi comparado com a predição teórica do espectro utilizando o servidor online PDBMD2CD.

A curva de desnaturação proteica foi mensurada em 222 nm com uma faixa de temperatura de 10 a 100°C, com variações a cada 2°C, na velocidade de 10°C/min. Ambos os experimentos tiveram como branco o PBS 1X e foram executados em triplicata no espectrofotômetro de Dicroísmo Circular J-1100 (Jasco[®]).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Precipitado bacteriano de *E. coli* BL21

Na fase de expansão do crescimento da bactéria o pré-inóculo apresentou OD_{600nm} de 1,8 - equivalente a $14,4 \times 10^8$ UFC. Ao final, foi coletado 14,88g de precipitado bacteriano.

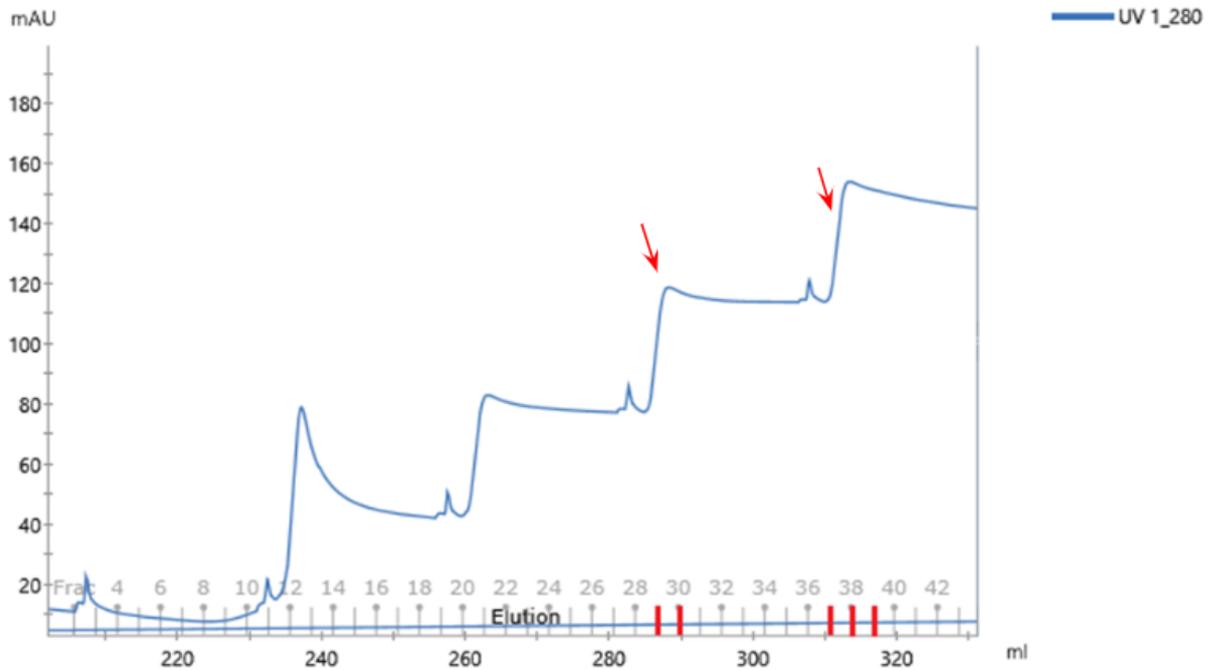
As cepas de *E. coli* são amplamente utilizadas para expressão proteica heteróloga que não necessitam de modificações pós-traducionais por apresentarem rápido crescimento nos mais diversos meios de cultura (LI *et al.*, 2022; VYAS *et al.*, 2012). No entanto, certos problemas podem acontecer na produção de proteínas heterólogas, como agregação proteica, morte celular devido a citotoxicidade das proteínas expressas, diminuição no rendimento final (BHATWA *et al.*, 2021; TEROL *et al.*, 2021). Então, cepas de *E. coli* geneticamente modificadas foram desenvolvidas com a finalidade de melhorar a expressão das proteínas heterólogas. Um dos exemplos é a cepa de *E. coli* BL21(DE3) pLysS empregada neste estudo (GOPAL *et al.*, 2013).

A escolha da OD_{600nm} entre 0,5 e 0,8 em *E. coli* no pré-inóculo ocorre pelo fato de as bactérias se apresentarem na fase de crescimento logarítmico, onde a maioria das células estão em funcionamento bioquímico pleno (PLA *et al.*, 2015).

5.2 Purificação e eletroforese da proteína 1NH9-NS2B

O resultado da purificação das proteínas pode ser observado no cromatograma da figura 3. O aumento da leitura de absorbância a 280 nm indica a presença de proteínas.

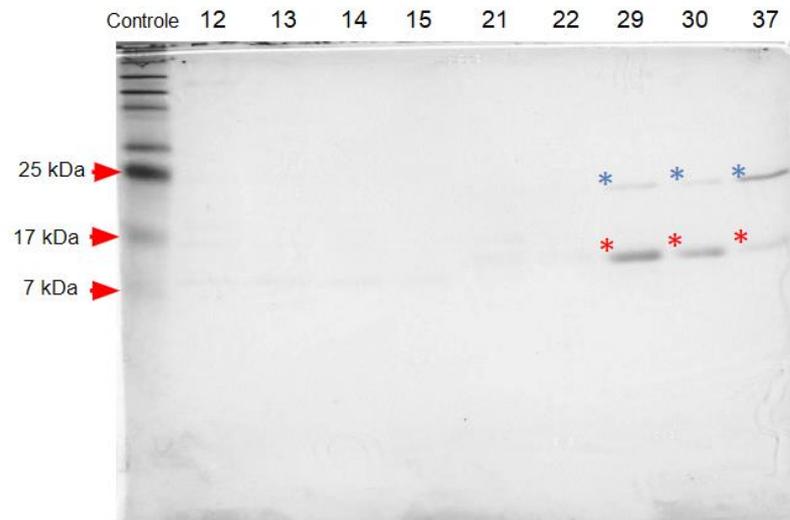
Figura 6 – Cromatograma referente à etapa de purificação da proteína sintética 1NH9-NS2B



Nota: O cromatograma foi formado a partir de cromatografia de afinidade em coluna de íons metálicos imobilizados, especificamente, resina de íons de níquel (Ni^{2+}) funcionalizada, que tem capacidade de se ligar com alta afinidade ao grupamento imidazol, presente na tag de Histidinas da proteína 1NH9-NS2B e na solução de eluição. O início da formação dos picos nos pontos 12, 21, 29 e 37 ocorreu devido ao aumento das concentrações de imidazol em 25, 50, 75 e 100%, respectivamente. Os números marcados na abscissa e apontados pelas setas são referentes às frações que apresentam a proteína 1NH9-NS2B. **Fonte:** A autora, 2023.

O gel de eletroforese da figura 4 indica as frações selecionadas a partir do cromatograma formado. Na imagem, os asteriscos em vermelho destacam as bandas correspondentes à proteína 1NH9-NS2B, que possui peso molecular de 11kDa e os asteriscos em azul destacam bandas com o peso molecular em torno de 25 kDa, que sugerem a formação de dímeros da proteína alvo.

Figura 7 – Gel de eletroforese para identificação da proteína sintética 1NH9-NS2B



Nota: A imagem da eletroforese em gel de poliacrilamida apresenta em sua parte superior a identificação dos poços através dos números das frações da etapa de purificação por cromatografia de afinidade da proteína 1NH9-NS2B, além do controle, o marcador de peso molecular Color Prestained Protein Standard, Broad Range da NEB[®]. **Fonte:** A autora, 2023.

A cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados foi desenvolvida a partir das afinidades conhecidas de histidina e cisteína na coordenação de metais de transição. Desse modo, foi decidido imobilizar metais de transição, como o Níquel, na coluna de cromatográfica para purificar peptídeos e proteínas com resíduos expostos dos aminoácidos citados (Hearon, 1948 *apud* Glover; Tommos, 2019). Como aprimoramento, passaram a adicionar à proteína recombinante uma cauda de poli-histidina, porque elementos carregados positivamente, tal qual proteínas próprias da bactéria, podem ser co-purificadas com as proteínas recombinantes (BLOCK, 2019). Devido a isso, no gel de eletroforese também são visualizadas bandas diferentes das estabelecidas para a proteína com o epítipo de NS2B.

5.3 Rendimento da expressão proteica de 1NH9-NS2B

O volume final obtido foi de 150 μ L, cuja quantificação, mediante absorvância no comprimento de onda de 280 nm, foi de 0,45 – equivalente à 151 μ M, que se refere à 0,96 g por litro de cultura de *E. coli* ou 129mg de proteína 1NH9-NS2B por grama de células úmidas.

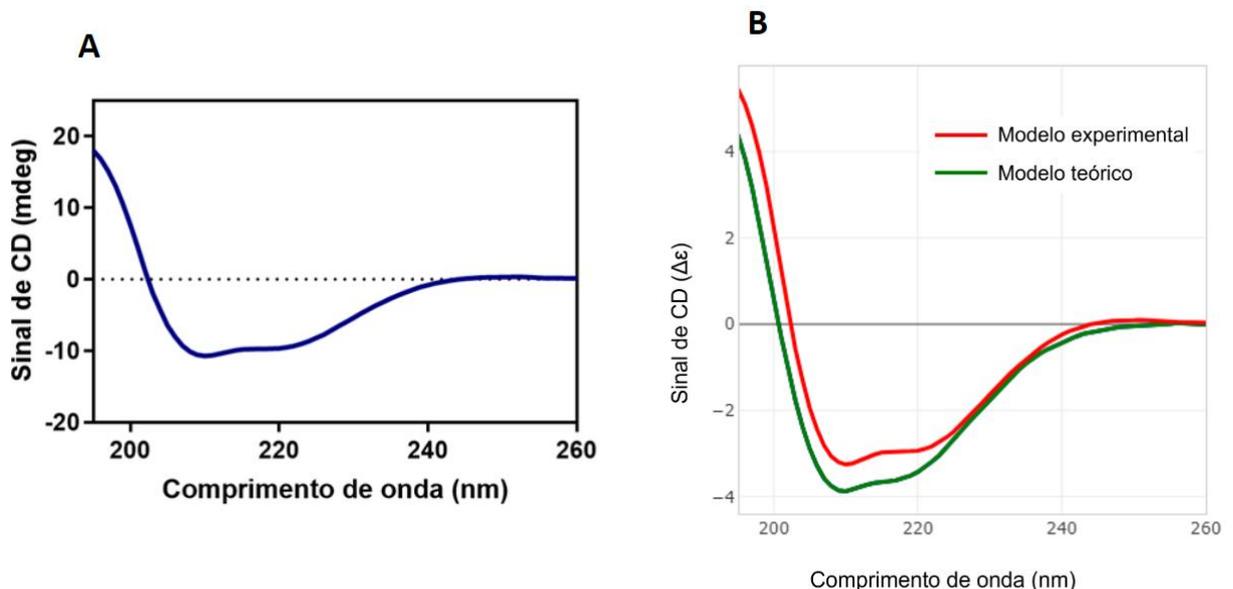
O rendimento de 0,96g/L ou de 129mg/g foi alto quando comparado com estudos que realizaram expressão proteica em *E. coli* BL21, como no caso de Haridhasapavalan *et al.*

(2022) que obteve valores de 0,87 e 0,60 mg de proteínas de um fator de transcrição HAND2 por grama de células úmidas, nas temperaturas de indução de 37 e 18°C, respectivamente, e também para o estudo de Khairat *et al.* (2017), que obteve 2,5 mg/L de proteína SEPT5. O rendimento também foi comparado com o de Tripathi *et al.* (2018) que expressou uma proteína recombinante de um flavivírus, o domínio III do envelope do vírus do Nilo Ocidental, em *E. coli* BL21, cujos rendimentos foram de aproximadamente 5,78 mg/g de peso celular úmido, sendo inferior aos valores encontrados para proteína sintética 1NH9-NS2B.

5.4 Espectro de Dicroísmo Circular da proteína 1NH9-NS2B

Com relação às estruturas secundárias, de acordo com o espectro gerado, foram observados picos negativos à 209 nm e 222 nm, indicando a presença de α -hélices, assim como um pico positivo à 196 nm, indício de β -folhas (Figura 5A), que foi comparado com os dados *in silico*. A comparação apresentou um RMSD (*Root Mean Square Deviation*) de 3,44 $\Delta\epsilon$ (Figura 5B), que quando mais próximo de 1, maior a similaridade entre os dados teórico e experimental.

Figura 8 – Espectro de dicroísmo circular da proteína sintética 1NH9-NS2B

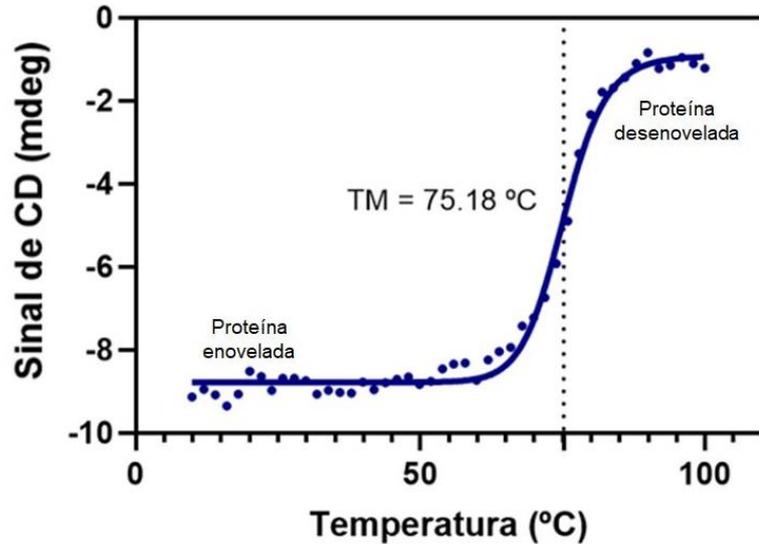


Nota: (A): Espectro experimental da proteína que indica a presença de α -hélice com picos negativos em 222nm e 209nm e β -folha como pico positivo em 196nm. (B): Comparação entre os modelos experimental e teórico da proteína sintética, com RMSD de 3,44 $\Delta\epsilon$. **Fonte:** A autora, 2023.

5.5 Temperatura de desenovelamento da proteína 1NH9-NS2B

A temperatura de desnaturação proteica foi determinada a partir de um ponto em que o sinal do eixo das ordenadas se diferencia do sinal inicial, neste caso em 75,18°C.

Figura 9 – Curva de desnaturação da proteína sintética 1NH9-NS2B



Nota: TM: Temperatura de melting (temperatura de desenovelamento). **Fonte:** A autora, 2023.

A temperatura é uma das constantes que alteram a estrutura proteica e com isso, sua função. Por isso é importante determinar a termoestabilidade da proteína trabalhada devido ao uso desejado, seja para adequar o local em que ela será aplicada ou para melhorar a proteína de acordo com a aplicação. De acordo com o resultado da temperatura de desenovelamento proteico obtida neste trabalho, sugerimos que o transporte por longas distâncias e o manuseio da proteína 1NH9-NS2B podem ser realizados sem a necessidade do uso de uma cadeia fria.

A temperatura de desenovelamento de 75,18°C é superior aos dados encontrados para as proteínas NS5 da dengue, cuja maior temperatura de estabilidade foi de 44°C (LIM *et al.*, 2013), para proteínas recombinantes do Envelope dos vírus dengue e zika, onde os valores de desnaturação variaram de 46 a 53 °C (KUDLACEK *et al.*, 2018) e para a partícula viral de ZIKV, que se tornou indetectável a partir de 57°C e perdeu sua infectividade acima dos 60°C (MÜLLER *et al.*, 2016; FARCET; KREIL, 2016).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A proteína sintética 1NH9-NS2B, com o epítopo KDAEV(I)TGNS, foi produzida corretamente pela célula procarionte de *E. coli* e foi possível caracterizá-la através do método biofísico de espectroscopia de Dicroísmo Circular, que forneceu informações para comparação com a proteína elaborada *in silico* e para verificar a estabilidade térmica frente aos usos futuros. Sendo assim, foi possível observar que a proteína estudada manteve a estrutura secundária esperada, assim como apresentou uma temperatura de desenovelamento compatível com o manuseio e transporte sem necessidade de uso de cadeia fria.

REFERÊNCIAS

ABAANDOU, Laura; QUAN, David; SHILOACH, Joseph. Affecting HEK293 Cell Growth and Production Performance by Modifying the Expression of Specific Genes. **Cells**. [S.L.], v. 10, n. 7, p. 1-21, 2jul. 2021. <https://doi.org/10.3390/cells10071667>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8304725/>. Acesso em: 22 abr. 2023.

Agência Nacional de Saúde Suplementar. **VÍRUS ZIKA: DIAGNÓSTICO**. Brasília, 2016. Color. Disponível em: https://www.gov.br/ans/pt-br/arquivos/aceso-a-informacao/participacao-da-sociedade/camaras-e-grupos-tecnicos/camaras-e-grupos-tecnicos-anteriores/grupo-tecnico-virus-zika/gt_viruszika_1_reuniao_apresentacaocosaude.pdf. Acesso em: 24 abr. 2023.

AKTEPE, Turgut E. *et al.* The Host Protein Reticulon 3.1A Is Utilized by Flaviviruses to Facilitate Membrane Remodelling. **Cell Reports**, [S.L.], v. 21, n. 6, p. 1639-1654, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.055>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29117567/>. Acesso em: 16 maio 2023.

ALIOTA, Matthew T. *et al.* Heterologous Protection against Asian Zika Virus Challenge in Rhesus Macaques. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 10, n. 12, p. 1-22, 2 dez. 2016. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0005168>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5135040/>. Acesso em: 24 abr. 2023.

AMORIM, Jaime Henrique *et al.* The dengue virus non-structural 1 protein: risks and benefits. **Virus Research**, [S.L.], v. 181, n. 1, p. 53-60, mar. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2014.01.001>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24434336/>. Acesso em: 08 maio 2023.

BAILEY, Mark J. *et al.* Human antibodies targeting Zika virus NS1 provide protection against disease in a mouse model. **Nature Communications**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 1-11, 1 nov. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-07008-0>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-018-07008-0>. Acesso em: 03 abr. 2023.

BARDINA, Susana V. *et al.* Enhancement of Zika virus pathogenesis by preexisting anti-flavivirus immunity. **Science**, [S.L.], v. 356, n. 6334, p. 175-180, 14 abr. 2017. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.aal4365>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5714274/>. Acesso em: 11 maio 2023.

BERTHET, Nicolas *et al.* Molecular Characterization of Three Zika Flaviviruses Obtained from Sylvatic Mosquitoes in the Central African Republic. **Vector-Borne And Zoonotic Diseases**, [S.L.], v. 14, n. 12, p. 862-865, dez. 2014. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2014.1607>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25514122/>. Acesso em: 18 abr. 2023.

BHATWA, Arshpreet *et al.* Challenges associated with the formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli* and strategies to address them for industrial applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, p. 65, 2021.

BLOCK, H. *et al.* Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC). **Guide to Protein Purification**, Alemanha: Elsevier Inc., 2009. p. 439-473. doi:10.1016/s0076-6879(09)63027-5

- BROWN, Julia A. *et al.* Dengue Virus Immunity Increases Zika Virus-Induced Damage during Pregnancy. **Immunity**, [S.L.], v. 50, n. 3, p. 751-762, mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2019.01.005>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6947917/>. Acesso em: 11 maio 2023.
- BUATHONG, Rome *et al.* Detection of Zika Virus Infection in Thailand, 2012–2014. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, [S.L.], v. 93, n. 2, p. 380-383, 5 ago. 2015. American Society of Tropical Medicine and Hygiene. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.15-0022>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4530765/>. Acesso em: 18 abr. 2023.
- CARTEAUX, Guillaume *et al.* Zika Virus Associated with Meningoencephalitis. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 374, n. 16, p. 1595-1596, 21 abr. 2016. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmc1602964>. Disponível em: https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMc1602964?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%200www.ncbi.nlm.nih.gov. Acesso em: 20 abr. 2023.
- CATALDI, Catarina. **SOP-3.001: Protein expression in *E. coli***. Recife: Fiocruz, 2019. 5 p.
- CORTESE, Mirko *et al.* Ultrastructural Characterization of Zika Virus Replication Factories. **Cell Reports**, [S.L.], v. 18, n. 9, p. 2113-2123, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.014>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5340982/>. Acesso em: 16 maio 2023.
- COUNOTTE, Michel Jacques *et al.* Zika virus infection as a cause of congenital brain abnormalities and Guillain-Barré syndrome: from systematic review to living systematic review. **F1000Research**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 196-215, 15 fev. 2018. F1000 Research Ltd. <http://dx.doi.org/10.12688/f1000research.13704.1>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6290976/>. Acesso em: 20 abr. 2023.
- DETHOFF, Elizabeth A. *et al.* Pervasive tertiary structure in the dengue virus RNA genome. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 115, n. 45, p. 11513-11518, 19 out. 2018. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1716689115>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6233125/>. Acesso em: 13 abr. 2023.
- DU, Luping *et al.* Broadband chirality-coded meta-aperture for photon-spin resolving. **Nature Communications**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 1-7, 2 dez. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms10051>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ncomms10051.pdf>. Acesso em: 11 maio 2023.
- DUFFY, Mark R. *et al.* Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 360, n. 24, p. 2536-2543, 11 jun. 2009. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa0805715>. Disponível em: https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa0805715?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%200www.ncbi.nlm.nih.gov. Acesso em: 16 abr. 2023.
- DUONG, Veasna *et al.* Low Circulation of Zika Virus, Cambodia, 2007–2016. **Emerging Infectious Diseases**, [S.L.], v. 23, n. 2, p. 296-299, fev. 2017. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). <http://dx.doi.org/10.3201/eid2302.161432>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5324809/>. Acesso em: 18 abr. 2023.

DUSSUPT, Vincent *et al.* Potent Zika and dengue cross-neutralizing antibodies induced by Zika vaccination in a dengue-experienced donor. **Nature Medicine**, [S.L.], v. 26, n. 2, p. 228-235, fev. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41591-019-0746-2>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41591-019-0746-2>. Acesso em: 03 abr. 2023.

FARCET, Maria R.; KREIL, Thomas R.. Zika virus is not thermostable: very effective virus inactivation during heat treatment (pasteurization) of human serum albumin. **Transfusion**, [S.L.], v. 57, n. 32, p. 797-801, 17 dez. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/trf.13953>.

GARCIA-VALLEJO, Juan J. *et al.* The physiological role of DC-SIGN: a tale of mice and men. **Trends In Immunology**, [S.L.], v. 34, n. 10, p. 482-486, out. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2013.03.001>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23608151/>. Acesso em: 08 maio 2023.

GLOVER, Starla D.; TOMMOS, Cecilia. A quick and colorful method to measure low-level contaminations of paramagnetic Ni²⁺ in protein samples purified by immobilized metal ion affinity chromatography. **Methods Enzymol.** v. 614, p. 87-106, 27 set. 2019. doi: 10.1016/bs.mie.2018.08.037.

GORDON, Aubree *et al.* Prior dengue virus infection and risk of Zika: a pediatric cohort in nicaragua. **Plos Medicine**, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 1-16, 22 jan. 2019. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.1002726>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6342296/>. Acesso em: 11 maio 2023.

GOPAL, Gopal Jee; KUMAR, Awanish. Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. **The protein journal**, v. 32, n. 6, p. 419-425, 2013.

GUTIÉRREZ-BUGALLO, Gladys *et al.* Vector-borne transmission and evolution of Zika virus. **Nature Ecology & Evolution**, [S.L.], v. 3, n. 4, p. 561-569, 18 mar. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41559-019-0836-z>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41559-019-0836-z>. Acesso em: 03 abr. 2023.

HARIDHASAPAVALAN, Krishna Kumar *et al.* Generation of a recombinant version of a biologically active cell-permeant human HAND2 transcription factor from *E. coli*. **Sci Rep.** [S.L.], v. 12, p. 16129-16144. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19745-w>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-022-19745-w#citeas>. Acesso em: 22 abr. 23.

HASAN, S. Saif *et al.* Structural biology of Zika virus and other flaviviruses. **Nature Structural & Molecular Biology**, [S.L.], v. 25, n. 1, p. 13-20, jan. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41594-017-0010-8>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41594-017-0010-8/>. Acesso em: 12 abr. 2023.

HERRERA, Bobby Brooke *et al.* Continued Transmission of Zika Virus in Humans in West Africa, 1992–2016. **The Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 215, n. 10, p. 1546-1550, 8 abr. 2017. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jix182>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5853591/>. Acesso em: 18 abr. 2023.

HILGENFELD, Rolf; LEI, Jian; ZHANG, Linlin. The Structure of the Zika Virus Protease, NS2B/NS3pro. **Advances In Experimental Medicine And Biology**, [S.L.], v. 1062, p. 131-145, 2018. Springer Singapore. http://dx.doi.org/10.1007/978-981-10-8727-1_10.

HILLS, Susan L; FISCHER, Marc; PETERSEN, Lyle R. Epidemiology of Zika Virus Infection. **The Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 216, n. 10, p. 868-874, 15 dez. 2017. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jix434>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5853392/#CIT0048>. Acesso em: 15 abr. 2023.

KELLY, Sharon M.; JESS, Thomas J.; PRICE, Nicholas C.. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Proteins And Proteomics**, [S.L.], v. 1751, n. 2, p. 119-139, ago. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.06.005>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1570963905001792#aep-section-id26>. Acesso em: 08 maio 2023.

KHAIRAT, Jasmine Elanie *et al.* Interaction of Recombinant Gallus gallus SEPT5 and Brain Proteins of H5N1-Avian Influenza Virus-Infected Chickens. **Proteomes**, [S.L.], v. 5, n. 4, p. 23-39, 12 set. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/proteomes5030023>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5620540/>. Acesso em: 08 maio 2023.

KUDLACEK, Stephan T. *et al.* Physiological temperatures reduce dimerization of dengue and Zika virus recombinant envelope proteins. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 293, n. 23, p. 8922-8933, jun. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.ra118.002658>. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(20\)37205-7/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)37205-7/fulltext). Acesso em: 10 maio 2023.

LANDRY, Marie Louise; GEORGE, Kirsten St. Laboratory Diagnosis of Zika Virus Infection. **Archives Of Pathology & Laboratory Medicine**, [S.L.], v. 141, n. 1, p. 60-67, 20 out. 2016. Archives of Pathology and Laboratory Medicine. <http://dx.doi.org/10.5858/arpa.2016-0406-sa>. Disponível em: <https://meridian.allenpress.com/aplm/article/141/1/60/65749/Laboratory-Diagnosis-of-Zika-Virus-Infection>. Acesso em: 24 abr. 2023.

LEE, Lim Jack *et al.* Hide and Seek: the interplay between zika virus and the host immune response. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 1-13, 21 out. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2021.750365>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8566937/#B1>. Acesso em: 07 maio 2023.

LEITE, Bruno. **SOP-3.004: Protein Electrophoresis**. Recife: Fiocruz, 2018. 7 p.

LI, Lele *et al.* Expression and purification of soluble recombinant β -lactamases using Escherichia coli as expression host and pET-28a as cloning vector. **Microb Cell Fact.** [S.L.], v. 21, p. 244, 2022. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01972-5>. Acesso em: 22 abr. 2023.

LI, Qingxin; KANG, Congbao. Dengue virus NS4B protein as a target for developing antivirals. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 1-14, 9 ago. 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2022.959727>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9398000/>. Acesso em: 08 maio 2023.

LIM, Siew Pheng *et al.* A Crystal Structure of the Dengue Virus Non-structural Protein 5 (NS5) Polymerase Delineates Interdomain Amino Acid Residues That Enhance Its Thermostability and de Novo Initiation Activities. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 288, n. 43, p. 31105-31114, out. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m113.508606>. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(20\)48711-3/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)48711-3/fulltext). Acesso em: 09 maio 2023.

LOEFFLER, Felix F. *et al.* Identification of a Zika NS2B epitope as a biomarker for severe clinical phenotypes. **Rsc Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 12, n. 9, p. 1525-1539, jul. 2021. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/d1md00124h>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34671736/>. Acesso em: 30 jan. 2023

LÓPEZ-SANMARTÍN, Monserrat *et al.* D-amino acid peptides as antimicrobial agents against vibrio-associated diseases in aquaculture. **Aquaculture**, [S.L.], v. 569, n. 1, p. 1-9, maio 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739362>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848623001357?via%3Dihub>. Acesso em: 11 maio 2023.

MARBÁN-CASTRO, Elena *et al.* Zika virus infection in pregnant women and their children: a review. **European Journal Of Obstetrics & Gynecology And Reproductive Biology**, [S.L.], v. 265, n. 1, p. 162-168, out. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejogrb.2021.07.012>. Disponível em: [https://www.ejog.org/article/S0301-2115\(21\)00347-X/fulltext#secst045](https://www.ejog.org/article/S0301-2115(21)00347-X/fulltext#secst045). Acesso em: 19 abr. 2023.

MÉCHARLES, Sylvie *et al.* Acute myelitis due to Zika virus infection. **The Lancet**, [S.L.], v. 387, n. 10026, p. 1481, abr. 2016. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(16\)00644-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(16)00644-9). Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(16\)00644-9/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(16)00644-9/fulltext). Acesso em: 20 abr. 2023.

MEERTENS, Laurent *et al.* The TIM and TAM Families of Phosphatidylserine Receptors Mediate Dengue Virus Entry. **Cell Host & Microbe**, [S.L.], v. 12, n. 4, p. 544-557, out. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2012.08.009>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3572209/>. Acesso em: 08 maio 2023.

Ministério da Saúde. **Dengue**. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/z/zika-virus>. Acesso em: 11 abr. 2023.

Ministério da Saúde. **Microcefalia**. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/m/microcefalia>. Acesso em: 18 abr. 2023.

Ministério da Saúde. **Zika Vírus**. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/z/zika-virus>. Acesso em: 11 abr. 2023.

MISHRA, Nischay *et al.* Diagnosis of Zika Virus Infection by Peptide Array and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Mbio**, [S.L.], v. 9, n. 2, p. 1-16, 2 maio 2018. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/mbio.00095-18>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5844993/>. Acesso em: 16 abr. 2023.

MISHRA, Nischay *et al.* “Zika virus peptide ELISA (ZIKV-NS2B-Concat ELISA) for detection of IgG antibodies to zika virus infection,” **Methods Mol. Biol.**, v. 2142, p. 113–122, 2020.

MÜLLER, Janis A. *et al.* Inactivation and Environmental Stability of Zika Virus. **Emerging Infectious Diseases**, [S.L.], v. 22, n. 9, p. 1685-1687, set. 2016. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). <http://dx.doi.org/10.3201/eid2209.160664>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4994368/>. Acesso em: 09 maio 2023.

MUSSO, Didier; GUBLER, Duane J. Zika Virus. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 29, n. 3, p. 487-524, jul. 2016. American Society for Microbiology.

<http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00072-15>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4861986/>. Acesso em: 03 abr. 2023.

MUSSO, Didier; KO, Albert I.; BAUD, David. Zika Virus Infection — After the Pandemic. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 381, n. 15, p. 1444-1457, 10 out. 2019. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmra1808246>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31597021/>. Acesso em: 20 abr. 2023.

NEUFELDT, Christopher J. *et al.* Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 16, n. 3, p. 125-142, 12 fev. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2017.170>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrmicro.2017.170>. Acesso em: 16 maio 2023.

NITSCHKE, Christoph *et al.* Biochemistry and Medicinal Chemistry of the Dengue Virus Protease. **Chemical Reviews**, [S.L.], v. 114, n. 22, p. 11348-11381, 30 set. 2014. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/cr500233q>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr500233q>. Acesso em: 14 abr. 2023.

NUGROHO, Alfarius Eko; MORITA, Hiroshi. Circular dichroism calculation for natural products. **Journal Of Natural Medicines**, [S.L.], v. 68, n. 1, p. 1-10, 7 abr. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11418-013-0768-x>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23564068/>. Acesso em: 08 maio 2023.

OEHLER, E *et al.* Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome – case report, French Polynesia, December 2013. **Eurosurveillance**, [S.L.], v. 19, n. 9, p. 1-3, 6 mar. 2014. European Centre for Disease Control and Prevention (ECDC). <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.es2014.19.9.20720>. Disponível em: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES2014.19.9.20720>. Acesso em: 16 abr. 2023.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Zika - Reporte de Casos Acumulados**. Disponível em: <https://www3.paho.org/data/index.php/es/temas/zika-weekly-es/>. Acesso em: 18 abr. 2023.

PAZ-BAILEY, Gabriela *et al.* Persistence of Zika Virus in Body Fluids — Final Report. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 379, n. 13, p. 1234-1243, 27 set. 2018. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa1613108>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5831142/>. Acesso em: 25 abr. 2023.

PERSAUD, Mirjana *et al.* Infection by Zika viruses requires the transmembrane protein AXL, endocytosis and low pH. **Virology**, [S.L.], v. 518, n. 1, p. 301-312, maio 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2018.03.009>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7299306/>. Acesso em: 08 maio 2023.

PETERS, R.; STEVENSON, M. Zika virus diagnosis: challenges and solutions. **Clinical Microbiology And Infection**, [S.L.], v. 25, n. 2, p. 142-146, fev. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2018.12.002>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X18307742?via%3Dihub#bib27>. Acesso em: 24 abr. 2023.

PETTERSSON, John H.-O. *et al.* How Did Zika Virus Emerge in the Pacific Islands and Latin America? **Mbio**, [S.L.], v. 7, n. 5, p. 1-6, 2 nov. 2016. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/mbio.01239-16>. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5061869/pdf/mBio.01239-16.pdf>. Acesso em: 16 abr. 2023.

PIERSON, Theodore C.; DIAMOND, Michael S.. The emergence of Zika virus and its new clinical syndromes. **Nature**, [S.L.], v. 560, n. 7720, p. 573-581, ago. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-018-0446-y>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41586-018-0446-y>. Acesso em: 03 abr. 2023.

PLA, Maria-Leonor *et al.* Comparison of primary models to predict microbial growth by the plate count and absorbance methods. **Biomed Res.** [S.L.], v. 2015, p. 1-14, 2015. Doi: 10.1155/2015/365025.

RICE, Marion E. *et al.* Vital Signs: zika-associated birth defects and neurodevelopmental abnormalities possibly associated with congenital zika virus infection : u.s. territories and freely associated states, 2018. **Mmwr. Morbidity And Mortality Weekly Report**, [S.L.], v. 67, n. 31, p. 858-867, 10 ago. 2018. Centers for Disease Control MMWR Office. <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm6731e1>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6089332/>. Acesso em: 20 abr. 2023.

RIVINO, Laura; LIM, Mei Qiu. CD4+ and CD8+ T-cell immunity to Dengue – lessons for the study of Zika virus. **Immunology**, [S.L.], v. 150, n. 2, p. 146-154, 27 nov. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/imm.12681>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5214511/>. Acesso em: 18 abr. 2023.

RODRIGUEZ-BARRAQUER, Isabel *et al.* Impact of preexisting dengue immunity on Zika virus emergence in a dengue endemic region. **Science**, [S.L.], v. 363, n. 6427, p. 607-610, 8 fev. 2019. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.aav6618>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8221194/>. Acesso em: 11 maio 2023.

ROGERS, Thomas F. *et al.* Zika virus activates de novo and cross-reactive memory B cell responses in dengue-experienced donors. **Science Immunology**, [S.L.], v. 2, n. 14, p. 1-25, 4 ago. 2017. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/sciimmunol.aan6809>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5892203/>. Acesso em: 11 maio 2023.

ROPIDI, Muhammad Izzuddin Mohd *et al.* Endoplasmic reticulum: a focal point of Zika virus infection. **J Biomed Sci.**, [S.L.], v. 27, n. 1, p. 1-13, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6971992/>. Acesso em: 08 maio 2023.

ROZÉ, Benoît *et al.* Zika virus detection in cerebrospinal fluid from two patients with encephalopathy, Martinique, February 2016. **Eurosurveillance**, [S.L.], v. 21, n. 16, p. 1-639, 21 abr. 2016. European Centre for Disease Control and Prevention (ECDC). <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.es.2016.21.16.30205>. Disponível em: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.16.30205>. Acesso em: 20 abr. 2023.

SHARMA, Vaibhav *et al.* Characterization of protein extracts from different types of human teeth and insight in biomineralization. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 1-9, 27 jun. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-44268-2>.

Disponível em: <https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0-85068057842&origin=resultslist&zone=contextBox>. Acesso em: 11 maio 2023.

SILVA-JÚNIOR, Edeildo Ferreira da; ARAÚJO-JÚNIOR, João Xavier de. Peptide derivatives as inhibitors of NS2B-NS3 protease from Dengue, West Nile, and Zika flaviviruses. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 27, n. 18, p. 3963-3978, set. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2019.07.038>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089619310491?via%3Dihub#b0240>. Acesso em: 12 abr. 2023.

SIROHI, Devika; KUHN, Richard J. Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors. **J Infect Dis.**, [S.L.], v. 216, n. 10, p. 935-944, 16 dez. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5853281/>. Acesso em: 06 abr. 2023.

SOUSA, Victor Klein de. **Aplicações da espectroscopia de dicroísmo circular e da tensiometria em monocamadas de Langmuir no estudo de proteínas e peptídeos antimicrobianos**. 2021. 132 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Física, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/43/43134/tde-05082021-152747/publico/DissertacaoVictorKleinSousa.pdf>. Acesso em: 26 abr. 2023.

TEROL, Gema Lozano *et al.* Impact of the expression system on recombinant protein production in *Escherichia coli* BL21. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 2021.

TRAN, Anthony; THEEL, Elitza S. The role of serologic testing for Zika virus infection. **Reviews In Medical Microbiology**, [S.L.], v. 29, n. 1, p. 1-7, jan. 2018. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/mrm.0000000000000122>. Disponível em: https://journals.lww.com/revmedmicrobiol/Abstract/2018/01000/The_role_of_serologic_testing_for_Zika_virus.1.aspx. Acesso em: 24 abr. 2023.

TRIPATHI, Nagesh K. *et al.* Enhanced production and immunological characterization of recombinant West Nile virus envelope domain III protein. **New Biotechnology**, [S.L.], v. 46, n. 1, p. 7-13, nov. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2018.05.002>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29768182/>. Acesso em: 08 maio 2023.

VIANA, Isabelle. **SOP-2.002: Heat-shock Transformation of Chemically Competent Bacteria**. Recife: Fiocruz, 2017. 4 p.

VIANA, Isabelle. **SOP-3.002: Cell disruption using sonicator**. Recife: Fiocruz, 2018. 5 p.

VIANA, Isabelle. **SOP-3.005: Protein purification by automated affinity chromatography**. Recife: Fiocruz, 2021. 8 p.

VYAS, Vinay V. *et al.* Clinical Manufacturing of Recombinant Human Interleukin 15. I. Production Cell Line Development and Protein Expression in *E. coli* with Stop Codon Optimization. **Biotechnol Prog.** [S.L.], v. 28, n. 2, p. 497-507, mar. 2012. doi: 10.1002/btpr.746. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7465077/>. Acesso em: 22 abr. 2023.

WIMALASIRI-YAPA, B.M.C.R. *et al.* Zika Virus and Arthritis/Arthralgia: a systematic review and meta-analysis. **Viruses**, [S.L.], v. 12, n. 10, p. 1137-1150, 7 out. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/v12101137>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7599580/>. Acesso em: 11 abr. 2023.

World Health Organization. **Laboratory diagnosis and diagnostic tests**. In: WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control**. Geneva: World Health Organization, 2009. p. 1-160. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241547871>. Acesso em: 11 abr. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **SITUATION REPORT - ZIKA VIRUS MICROCEPHALY, GUILLAIN-BARRÉ SYNDROME**. [S.L.]: World Health Organization, 2016. 8 p. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/246180/zikasitrep7Jul16-eng.pdf;jsessionid=0D216305285DBE16C485415464BF6117?sequence=1>. Acesso em: 18 abr. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Zika epidemiology update - February 2022**. 2022. Disponível em: <https://www.who.int/publications/m/item/zika-epidemiology-update---february-2022>. Acesso em: 17 abr. 2023.

World Health Organization. **Zika vírus**. 2022. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus>. Acesso em: 11 abr. 2023.

ZHANG, Xianwen *et al.* Zika Virus NS2A-Mediated Virion Assembly. **Mbio**, [S.L.], v. 10, n. 5, p. 1-21, 29 out. 2019. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/mbio.02375-19>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6819661/>. Acesso em: 16 maio 2023.

ZHAO, Rong *et al.* Flavivirus: from structure to therapeutics development. **Life**, [S.L.], v. 11, n. 7, p. 615-639, 25 jun. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/life11070615>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8303334/>. Acesso em: 12 abr. 2023.