



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

MARCO ANTONIO TURIAH MACHADO DA GAMA

**DESENVOLVIMENTO DE UMA PLATAFORMA BASEADA NA LEVEDURA
Pichia pastoris PARA ENTREGA DE VACINA DE DNA PROFILÁTICA
PARA O ZIKA VÍRUS**

Recife

2025

MARCO ANTONIO TURIAH MACHADO DA GAMA

**DESENVOLVIMENTO DE UMA PLATAFORMA BASEADA NA LEVEDURA
Pichia pastoris PARA ENTREGA DE VACINA DE DNA PROFILÁTICA
PARA O ZIKA VÍRUS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Microbiologia, bioprocessos e bioprodutos.

Orientador: Antonio Carlos de Freitas

Coorientadora: Anna Jéssica Duarte Silva

Recife

2025

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Gama, Marco Antonio Turiah Machado da.

Desenvolvimento de uma plataforma baseada na levedura *Pichia pastoris* para entrega de vacina de DNA profilática para o Zika vírus / Marco Antonio Turiah Machado da Gama. - Recife, 2025.
80f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2025.

Orientação: Antonio Carlos de Freitas.

Coorientação: Anna Jéssica Duarte Silva.

Inclui referências.

1. Vacinas DNA; 2. ZIKV; 3. Prevenção; 4. Leveduras. I. Freitas, Antonio Carlos de. II. Silva, Anna Jéssica Duarte. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

MARCO ANTONIO TURIAH MACHADO DA GAMA

**DESENVOLVIMENTO DE UMA PLATAFORMA BASEADA NA LEVEDURA
Pichia pastoris PARA ENTREGA DE VACINA DE DNA PROFILÁTICA
PARA O ZIKA VÍRUS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Microbiologia, bioprocessos e bioprodutos.

Aprovado em: 21 / 02 / 2025.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **ANTONIO CARLOS DE FREITAS**
Data: 24/02/2025 13:20:41-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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

Documento assinado digitalmente
 **WILL DE BARROS PITA**
Data: 24/02/2025 18:30:59-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Will de Barros Pita
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Documento assinado digitalmente
 **ANDRE LUIZ SANTOS DE JESUS**
Data: 26/02/2025 11:50:21-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

André Luiz Santos de Jesus
Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de Mato Grosso - IFMT

RESUMO

O Zika vírus (ZIKV) é um arbovírus que surgiu inesperadamente entre 2014 e 2015 no Brasil, causando uma epidemia e surtos de microcefalia. A infecção pelo ZIKV está associada a duas síndromes graves: congênita e Guillain-Barré. O controle do mosquito vetor e o desenvolvimento de vacinas profiláticas, são os principais métodos para combater a infecção. Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de uma plataforma vacinal utilizando a levedura *Pichia pastoris* como carreadora de vacinas de DNA contra o Zika vírus (ZIKV). A escolha de *P. pastoris* se baseou em vantagens como fácil manipulação genética, status GRAS (Geralmente Reconhecido Como Seguro) e propriedades adjuvantes intrínsecas, que potencializam a resposta imunológica. Essa abordagem busca contribuir para o controle da infecção por ZIKV, oferecendo uma alternativa inovadora de plataforma vacinal que combina segurança e eficácia, visando à redução dos impactos do vírus na saúde pública. Foi desenvolvido o vetor de transferência pLT-CMV(ARS), utilizando o cassete de expressão do vetor comercial pVAX1 (Invitrogen), no qual está contido o promotor CMV, responsável pela expressão do gene-alvo em células de mamíferos e uma cauda de poliadenilação derivada do hormônio de crescimento bovino (bgH). Além disso, foi incorporado uma região do vetor pPICZαA (Invitrogen) que inclui um marcador de seleção para zeocina e uma origem de replicação que permite sua replicação em sistemas procariotos e uma sequência de replicação autônoma (ARS) para leveduras. Nesse vetor, foi inserido um antígeno sintético contendo epítomos das proteínas Envelope e NS1 do ZIKV. O vetor recombinante foi então utilizado para inserção em *P. pastoris* e as análises para confirmação da transformação foram feitas por PCR. Em seguida, foi avaliado o perfil de citocinas liberadas por células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) após estímulo com as leveduras recombinantes. Os resultados obtidos demonstraram a secreção de citocinas imunomoduladoras pelas PBMCs, com destaque para a produção significativa de TNF- α . No entanto, estudos adicionais, incluindo imunofenotipagem para a caracterização da resposta imune celular, ensaios pré-clínicos e testes de neutralização serão necessários para uma avaliação mais abrangente do potencial profilático da vacina.

Palavras-chave: Vacina DNA; ZIKV; Prevenção; Leveduras.

ABSTRACT

The Zika virus (ZIKV) is an arbovirus that emerged unexpectedly between 2014 and 2015 in Brazil, causing an epidemic and outbreaks of microcephaly. ZIKV infection is associated with two serious syndromes: congenital and Guillain-Barré. Control of the mosquito vector and development of prophylactic vaccines are the main methods to combat the infection. This study aimed to develop a vaccine platform using the yeast *Pichia pastoris* as a carrier of DNA vaccines against the Zika virus (ZIKV). The choice of *P. pastoris* was based on advantages such as easy genetic manipulation, GRAS (Generally Recognized As Safe) status and intrinsic adjuvant properties, which enhance the immune response. This approach seeks to contribute to the control of ZIKV infection, offering an innovative alternative vaccine platform that combines safety and efficacy, aiming to reduce the impacts of the virus on public health. The pLT-CMV(ARS) transfer vector was developed using the expression cassette of the commercial vector pVAX1 (Invitrogen), which contains the CMV promoter responsible for the expression of the target gene in mammalian cells and a polyadenylation tail derived from bovine growth hormone (bgH). In addition, a region of the pPICZαA vector (Invitrogen) was incorporated that includes a selection marker for zeocin and an origin of replication that allows its replication in prokaryotic systems and an autonomous replication sequence (ARS) for yeast. A synthetic antigen containing epitopes of the ZIKV Envelope and NS1 proteins was inserted into this vector. The recombinant vector was then used for insertion into *P. pastoris* and the analyses to confirm the transformation were performed by PCR. Then, the profile of cytokines released by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) after stimulation with recombinant yeasts was evaluated. The results obtained demonstrated the secretion of immunomodulatory cytokines by PBMCs, with emphasis on the significant production of TNF-α. However, additional studies, including immunophenotyping to characterize the cellular immune response, preclinical trials and neutralization tests will be necessary for a more comprehensive evaluation of the prophylactic potential of the vaccine.

Keywords: DNA vaccine; ZIKV; Prevention; Yeasts

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Panorama da circulação do ZIKV em alguns países da América do Sul (2024)	18
Figura 2	Estrutura de dímero da proteína E	20
Figura 3	Estrutura da proteína NS1	22
Figura 4	Ciclo viral do Zika vírus	24
Figura 5	Vias de apresentação de antígenos após transfecção celular por vacinas de DNA	28
Figura 6	Sistemas de entrega comumente utilizados para vacinas de DNA.	29
Figura 7	Estrutura básica de um vetor plasmidial.	32
Figura 8	Genes Env e NS1 utilizados na construção vacinal contra o ZIKV.	40
Figura 9	Mapa vetorial do pVAX1 e cassete de expressão utilizado para construção de vetor plasmidial.	42
Figura 10	Esquema da etapa de mutação sítio dirigida para remoção de sítio de restrição <i>Bam</i> HI.	43
Figura 11	Região do pPICZαA (Invitrogen) utilizada para a construção do vetor plasmidial pLT-CMV(ARS)	44
Figura 12	Esquema de sequência pan-ARS para replicação autônoma de vetor plasmidial em leveduras.	46
Figura 13	Plasmídeo CMV-bGH/TEF1-ori	47
Figura 14	Vetor pLT-CMV(ARS)	47
Figura 15	Plasmídeo recombinante pLT-CMV(ARS)_EnvNS1	49
Figura 16	Co-cultivo de PBMC e leveduras	52
Figura 17	Amplificações dos genes multiepítopos Env, NS1 e EnvNS	53
Figura 18	Etapas do processo de mutação sítio dirigida no MCS do pVAX	54
Figura 19	PCR de colônias transformadas com construções pGEM-T-Easy + amplicons	55
Figura 20	Digestões de construções pGEM-T-Easy + amplicons	56
Figura 21	Digestão da construção CMV-bGH/TEF1-ori com as enzimas <i>Bgl</i> II e <i>Bsp</i> HI.	57

Figura 22	Confirmação da da construção do vetor vacinal pLT-CMV(ARS	58
Figura 23	Digestões do vetor pLT-CMV(ARS) e sequência EnvNS1 com as enzimas <i>HindIII</i> e <i>EcoRI</i> .	59
Figura 24	Digestão dupla do plasmídeo pLT-CMV(ARS)_EnvNS1 com <i>NheI</i> e <i>NotI</i>	60
Figura 25	Extração plasmidial de leveduras carreando o vetor vacinal recombinante pLT-CMV(ARS)_EnvNS1 e pLT-CMV(ARS	61
Figura 26	Amplificação de PCR anterior para nova amplificação do gene EnvNS1	62
Figura 27	Análise de citometria de fluxo de sobrenadante de co-cultura para as citocinas IL-6, IL-10 e TNF- α	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Proteínas virais do ZIKV e suas respectivas funções.	19
Tabela 2	Vacinas de DNA em testes clínicos para profilaxia do ZIKV	26
Tabela 3	Alguns dos promotores utilizados para expressão heteróloga de genes.	33
Tabela 4	Alguns dos principais promotores utilizados em vetores plasmidiais para expressão em células de mamíferos.	34
Tabela 5	Marcadores de seleção utilizados em vetores plasmidiais para seleção de bactérias e leveduras.	36
Tabela 6	Sequências e alvos dos epítomos Env e NS1.	40
Tabela 7	<i>Primers</i> utilizados para amplificação de sequências Env e NS1.	41
Tabela 8	<i>Primers</i> utilizados para amplificação do cassete de expressão.	43
Tabela 9	<i>Primers</i> utilizados para amplificação de sequência do pPICZ α A (Invitrogen)	45
Tabela 10	Sítios de restrição inseridos nos <i>primers</i> para amplificação da sequência multiepítopo.	49
Tabela 11	Perfil de secreção de citocinas das PBMCs após incubação com leveduras.	67

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 GERAL.....	16
2.2 ESPECÍFICOS.....	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
3.1 ZIKA VÍRUS.....	17
3.1.1 Cenário Epidemiológico Do ZIKV.....	17
3.1.2 Organização Genômica.....	19
3.1.3 Proteína E.....	20
3.1.4 Proteína NS1.....	21
3.1.5 Aspectos Gerais Da Infecção.....	23
3.1.6 Aspectos Imunológicos.....	25
3.1.7 Estudos Vacinais Para o ZIKV.....	26
3.2 VACINAS DE DNA.....	27
3.2.1 Aspectos Gerais.....	27
3.2.2 Sistemas De Entrega Para Vacinas De DNA.....	28
3.3 LEVEDURAS COMO SISTEMA DE ENTREGA VACINAL.....	29
3.3.1 Construção De Vetores Para Carreamento De Ácidos Nucleicos Por Leveduras.....	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1 MATERIAIS.....	38
4.1.1 Linhagens De Microrganismos E Condições De Cultivo.....	38
4.1.2 Soluções E Tampões.....	38
4.1.3 Gel Para Eletroforese de DNA.....	39
4.1.4 Sequências Env e NS1.....	39
4.2 MÉTODOS.....	41
4.2.1 Amplificação / Obtenção Das Sequências.....	41
4.2.1.1 Sequência multiepítopo EnvNS1.....	41

4.2.1.2 Cassete de Expressão Derivado do Vetor pVAX1.....	41
4.2.1.3 Região Contendo Origem de Replicação e Marcador de Seleção para Zeocina.....	44
4.2.1.4 Sequência de Replicação Autônoma.....	45
4.2.2 Construção do vetor vacinal para carreamento em levedura.....	46
4.2.3 Clonagem da Sequência Multiepítipo EnvNS1 no Vetor Plasmidial pLT-CMV(ARS).....	48
4.2.4 Obtenção das Leveduras Recombinantes.....	49
4.2.4.1 Transformação das Leveduras.....	49
4.2.4.2 Confirmação das Leveduras Transformantes.....	50
4.2.5 Análises imunológicas in vitro.....	51
4.2.5.1 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs).....	51
4.2.5.2 Co-cultivo de PBMCs com leveduras.....	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
5.1 AMPLIFICAÇÃO DO MULTIEPÍTOPO EnvNS1.....	53
5.2 OBTENÇÃO DO VETOR pVAX1 Δ BamHI POR MUTAÇÃO SÍTIO DIRIGIDA E AMPLIFICAÇÃO DO CASSETTE DE EXPRESSÃO.....	53
5.3 CLONAGEM DOS AMPLICONS NO VETOR pGEM-T-Easy E DIGESTÕES ENZIMÁTICAS.....	54
5.4 LIGAÇÃO DE SEQUÊNCIAS OBTIDAS PARA OBTENÇÃO DE VETOR VACINAL.....	56
5.5 OBTENÇÃO DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE pLT-CMV(ARS)_EnvNS1.....	59
5.6 CONFIRMAÇÃO DAS LEVEDURAS RECOMBINANTES.....	60
5.7 ANÁLISES IMUNOLÓGICAS IN VITRO.....	63
6. CONCLUSÃO.....	67

1 INTRODUÇÃO

Arbovirus são vírus transmitidos por artrópodes hematofágos a vertebrados suscetíveis, o que permite a sua manutenção na natureza. Dentre estes, o Zika vírus (ZIKV) é um arbovírus que se introduziu de forma inesperada no Brasil entre 2014-2015, onde causou surtos de infecções e microcefalia (Musso *et al.* 2022). Desde então, o controle do mosquito-vetor e o desenvolvimento de drogas antivirais e vacinas profiláticas seguem como principais métodos de controle da infecção.

Frente a essa série de implicações graves, o combate ao vírus se tornou uma questão de interesse mundial. Diversas vacinas, que se utilizam de diferentes tecnologias, vêm sendo desenvolvidas ao redor do mundo. Muitas delas se utilizam da proteína de membrana (M), envelope (E) e proteína não-estrutural 1 (NS1) como estratégia para produção de anticorpos neutralizantes (Morabito e Graham, 2017; LI *et al.*, 2018).

Abordagens tecnológicas empregadas no desenvolvimento de vacinas contra o ZIKV variam de vacinas de DNA (a exemplo da GLS-5700, vacina de DNA que codifica as regiões antigênicas das proteínas prM e E), mRNA (vacinas de mRNA encapsuladas em nanopartículas lipídicas), de subunidade (proteínas estruturais virais, como a proteína E e a EDIII), vírus atenuado, vetor viral, entre outras (Zhou *et al.*, 2021). Apesar da importância dessas tecnologias, há inconvenientes ligados às mesmas, como limitação de imunogenicidade para as vacinas de DNA (Lee *et al.*, 2018), efeito imunológico insatisfatório e proporção relativamente alta de efeitos colaterais para as vacinas de mRNA, e em alguns casos as vacinas de subunidade não permitem apresentação via MHC de classe I e não são capazes de produzir efetivamente células T citotóxicas. Além disso, as vacinas de vírus atenuado podem restaurar a virulência viral (Han *et al.*, 2021).

Dentro dessas abordagens, as vacinas de DNA possuem vantagens no uso, como: não requerer vírus vivos, o processo de fabricação do DNA plasmidial é relativamente simples, e as moléculas de DNA de fita dupla serem mais estáveis que o vírus com possibilidade de liofilização para armazenamento a longo prazo (Han *et al.*, 2021). Levando em conta o inconveniente da baixa imunogenicidade ligada às vacinas de DNA, como citado anteriormente, alguns sistemas de entrega são estudados para melhorar a entrega e imunogenicidade, como vetores virais, lipossomas e nanopartículas biológicas ou sintetizadas (Kozak e Hu, 2024) . Nesse

mesmo sentido, a levedura *P. pastoris* tem a capacidade de carrear plasmídeos vacinais e possui uma parede celular composta por glucanos, os quais possuem efeitos imunoestimuladores (Silva *et al.*, 2021), o que pode compensar o problema relativo à baixa estimulação do ácido nucleico.

Para além da escolha do imunógeno, é necessário avaliar a melhor forma de apresentação do mesmo para o sistema imune, a fim de se aprimorar as respostas induzidas. Nesse sentido, inúmeros estudos têm demonstrado a utilização de leveduras como carreadoras de antígenos, sejam eles ácidos nucleicos ou proteínas (Pino *et al.*, 2022; Go *et al.*, 2021; Lei *et al.*, 2016). As vantagens de se utilizar tais vacinas consistem na fácil manipulação genética e produção em larga escala, fortes propriedades adjuvantes, estabilidade do antígeno carreado a longo prazo e capacidade modificações pós-traducionais de proteínas, quando utilizadas como sistema de expressão (Liu *et al.*, 2021; Goh *et al.*, 2021).

O presente estudo teve como objetivo desenvolver um vetor plasmidial para expressão em células de mamíferos e estabelecer uma plataforma vacinal para a entrega de uma vacina de DNA utilizando a levedura *Pichia pastoris*. O vetor inclui sequências gênicas de epítomos das proteínas do envelope e NS1 do ZIKV. A levedura transformada com o vetor plasmidial foi capaz de estimular a secreção de citocinas imunomoduladoras por células mononucleares de sangue periférico, com destaque para a produção significativa de TNF- α .

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Desenvolvimento e caracterização de uma plataforma vacinal profilática para a infecção causada pelo ZIKV utilizando a levedura *Pichia pastoris* como carreadora de vacina de DNA.

2.2 ESPECÍFICOS

- Construir um vetor de expressão para vacinas de DNA contendo antígenos sintéticos multi-epítomos derivado das proteínas do Envelope e NS1 do ZIKV.
- Estabelecer linhagens de *P. pastoris* carreando as vacinas de DNA.
- Analisar *in vitro* o potencial imunogênico das vacinas propostas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ZIKA VÍRUS

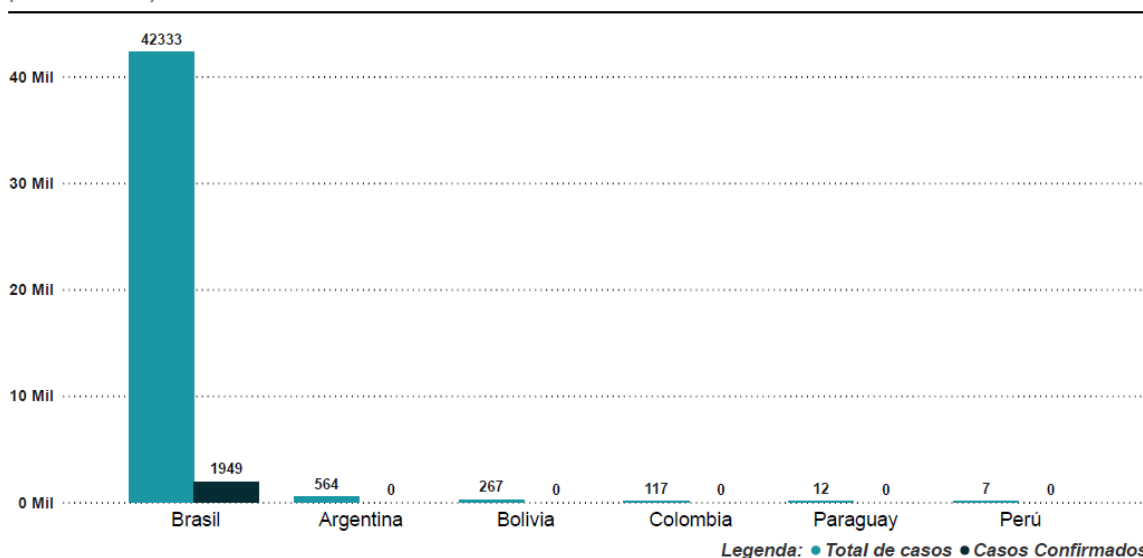
3.1.1 Cenário Epidemiológico Do ZIKV

O ZIKV foi primeiramente isolado de macacos Rhesus na Uganda em 1947. Em 1952 os primeiros casos de infecção pelo vírus em humanos foram reportados na Tanzânia e em Uganda. A partir de então, o vírus se espalhou por diversos países da África, chegando posteriormente a outros continentes, como Ásia, Oceania e Américas (Sharma *et al.*, 2020; Pielnaa *et al.*, 2022). Até 2007, a infecção pelo ZIKV ainda era limitada a algumas regiões da África e Ásia, porém, no mesmo ano, um grande número de pessoas, cerca de 73% da população, em Yap, região da Micronésia, foram infectadas. Seguiu-se para outra grande epidemia na Polinésia Francesa e outras ilhas vizinhas. Nas Américas, os primeiros casos foram observados no Brasil em 2015 (Lee e Ng, 2018; Duong, Dussart e Buchy, 2017). De acordo com a Organização Pan-Americana de Saúde, dez países foram responsáveis por 89% dos casos de zika registrados entre 2014 e 2023 e o Brasil, Colômbia e Venezuela lideraram a lista (PAHO, 2023). A Figura 1 mostra um panorama da circulação do vírus em alguns países da América do Sul no ano de 2024. Em um outro estudo de Ryan *et al.* (2020), foi demonstrado que cerca de 1.3 bilhões de pessoas podem se expor ao vírus até 2050 em consequência das mudanças climáticas.

Figura 1 - Panorama da circulação do ZIKV em alguns países da América do Sul (2024). Nota: N° de casos incluem casos suspeitos, prováveis, confirmados, descartados e mortes.

N° de Casos e Casos confirmados do ZIKV na América do Sul (2024)

(Fonte: PLISA - OPS)



Fonte: Adaptado de PLISA - OPS (2025).

Considerando a infecção pelo ZIKV, os principais sintomas são: febre, erupção cutânea, conjuntivite, artralgia, mialgia, cefaleia, disestesia, dor retroorbitária, astenia, artrite e também está associada à síndrome congênita devido à transmissão vertical, que se caracteriza por microcefalia, encefalite, desproporção craniofacial, paralisia cerebral, perda auditiva, disfunções do tronco cerebral, espasticidade, deformidades articulares, pé torto e doenças oculares inflamatórias e de desenvolvimento (Madewell, 2020).

O Brasil confirmou a maioria dos casos de microcefalia e malformações do sistema nervoso central (SNC) relacionadas à infecção pelo vírus entre 2015 e 2016 e foi o país com maiores registros da doença durante o período inicial da doença no continente americano, isso se deve ao fato de o país ter uma condição climática que favorece o desenvolvimento do mosquito *Aedes aegypti*, principal vetor do ZIKV (Giovanetti *et al.*, 2022; Yakob, 2022; Sáfadi, Almeida e Kfourir, 2021). O mesmo mosquito serve como vetor para outras arboviroses de importância endêmica, como o vírus da Dengue, Chikungunya e Febre Amarela, os quais fazem parte do gênero *Flavivirus* e da família *Flaviviridae* (Sáfadi, Almeida e Kfourir, 2021).

3.1.2 Organização Genômica

O ZIKV tem sua organização filogenética similar ao de outros membros do gênero *Flavivirus*, como os vírus do Nilo Ocidental (WNV), Encefalite Japonesa (JEV), Febre Amarela (YFV) e da Dengue (DENV). Seu genoma apresenta 10.794 nucleotídeos em uma molécula de RNA de sentido positivo de fita simples, a qual codifica uma poliproteína de 3424 aminoácidos e 10 proteínas que participam do ciclo de vida viral (Boyer *et al.*, 2018; Nava *et al.*, 2022; Menezes *et al.*, 2022).

O seu material genético codifica três genes estruturais e sete não estruturais em um único quadro de leitura aberta, é limitado na região 5' e não possui cauda poli-A (Wang *et al.*, 2018; Javed *et al.*, 2017; Lin *et al.*, 2018). Ele produzirá uma poliproteína que será clivada por proteases do hospedeiro e virais em proteínas do capsídeo (C), envelope (E) e membrana (M), correspondentes às proteínas estruturais, responsáveis pela montagem de novos compartimentos virais e várias outras proteínas não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5, responsáveis pela replicação do material genético (Tan *et al.*, 2020; Ferreira *et al.*, 2021). A tabela 1 esquematiza as proteínas virais do ZIKV e suas funções.

Tabela 1 - Proteínas virais do ZIKV e suas respectivas funções.

PROTEÍNA	FUNÇÃO
Proteína C	Encapsidação do genoma
Proteína E	Entrada e fusão viral
Proteína M	Empacotamento de partículas virais Chaperona para E Proteção do peptídeo de fusão
NS1	Replicação viral e montagem
NS2A	Replicação viral e montagem
NS2B	Cofator da protease NS3
NS3	RNA Helicase Serina protease Nucleosídeo 5' Trifosfatase 5' RNA trifosfatase
NS4A	Remodelamento da membrana

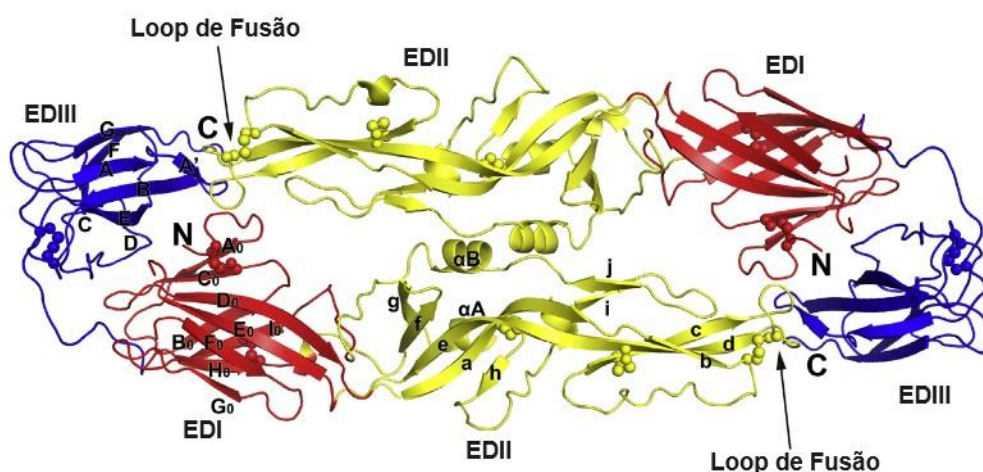
NS4B	Antagonismo imune
NS5	Metiltransferase RNA polimerase dependente de RNA

Fonte: Adaptado de Sihori e Kuhn (2017); Christian, Song e Ming (2019).

3.1.3 Proteína E

A proteína do Envelope (E) do Zika vírus é a principal responsável pela entrada do vírus nas células humanas e é capaz, também, de modular a infecção e isso ocorre através de interações entre a proteína e receptores celulares (Malekshashi *et al.*, 2020; Kau *et al.*, 2023). Ela consiste em três ectodomínios: domínio beta-barril central I (EDI), um domínio de dimerização semelhante a dedo estendido (EDII) e um domínio semelhante à imunoglobulina (EDIII), responsável pela ligação ao receptor (Figura 2) (Lin *et al.*, 2018; Dai *et al.*, 2016; Lunardelli *et al.*, 2023).

Figura 2 - Estrutura de dímero da proteína E: Ectodomínios EDI, EDII e EDIII e *loop* de fusão que faz parte do EDII, responsável pela ligação com a membrana endossomal da célula hospedeira.



Fonte: Adaptado de Dai *et al.* (2016).

A capacidade de cada domínio provocar resposta imune humoral e a importância desta proteína no ciclo de vida do vírus, a qualifica como importante alvo para anticorpos monoclonais neutralizantes (mABs), como são os casos do mAB 2A10G6, que é direcionado à alça de fusão e impede sua ligação com a membrana endossomal, o Z004 e Z006, direcionados ao epítipo EDIII-LR e capazes de

fornecer proteção contra o ZIKV e o vírus da dengue e mABs direcionados a epítomos dependentes de dímero E, que geralmente bloqueiam o dímero E na pré-fusão e impedem a sua trimerização, passo essencial para fusão da membrana (Yang, Gong e De Val, 2019).

Ao observar essas características, vacinas contendo regiões da proteína E estão em desenvolvimento para avaliação de resposta imune. Em um trabalho de In *et al.* (2020), com a utilização de engenharia genética, 6 vacinas de DNA foram desenvolvidas e 2 delas, uma contendo a proteína EDIII em tandem 3x e uma contendo a proteína E sem o domínio STEM foram capazes de provocar alto nível de imunidade humoral e celular, proteger camundongos da infecção pelo ZIKV e aumentar o nível de IFN- γ e promover capacidade protetora efetiva, respectivamente. Outro estudo de Xiong *et al.* (2022), se baseou na construção de 4 vacinas de DNA, em que duas continham a proteína E e uma o domínio EDIII e foi observado que a proteína E, sozinha, foi capaz de induzir respostas imunes humorais e celulares altamente eficientes e promover o aumento de células CD4+ e CD8+ secretoras de IFN- γ e a vacina contendo EDIII e NS1 promoveram resposta humoral elevada em camundongos. Além disso, 2 vacinas de DNA em fase 1 de testes clínicos contendo a proteína E foram avaliadas, as quais foram a VCR5283, que apresentou resposta robusta de anticorpos neutralizantes e de células T e avançou para estudos clínicos de fase 2 e a GLS-5700, que após a imunização permitiu o desenvolvimento de anticorpos neutralizantes em 62% dos participantes e a transferência passiva do soro pós imunização para camundongos knockout do receptor α / β de interferon (IFN) (IFNAR -/-) protegeu 92% deles de uma dose letal do ZIKV (Gaudinski *et al.*, 2017; Tebas *et al.*, 2019).

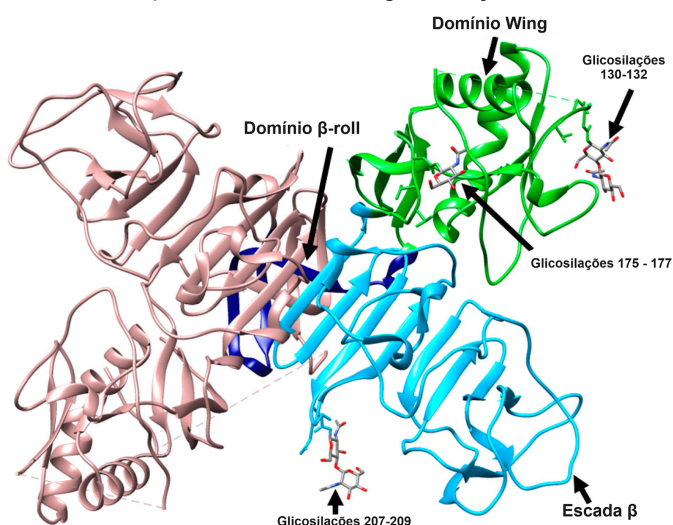
3.1.4 Proteína NS1

A proteína NS1 dos flavivírus é a única proteína não estrutural secretada pelas células hospedeiras e é uma proteína altamente conservada, a qual apresenta cerca de 352 aminoácidos e varia em seu peso molecular entre 46 a 55 kDa, dependendo do seu estado de glicosilação (Perera *et al.*, 2024). Ela se apresenta em duas formas oligoméricas: um dímero ligado à membrana (mNS1), envolvida na infecção viral e replicação do genoma, e a forma secretada (sNS1), a qual

desempenha um papel na evasão viral do sistema imune e usado como marcador sorológico da infecção pelo flavivírus (Hu e Sun, 2019).

A NS1 do ZIKV tem dois locais de glicosilação, ligados ao N da asparagina 130 e da 207 e possui 3 domínios: um domínio β -roll, compreendendo os aminoácidos 1 - 29 e com dois grampos β utilizados para a dimerização da proteína, um domínio wing, uma das regiões mais imunodominantes da proteína, que compreende os aminoácidos 30 - 180 e contendo o potencial local de glicosilação Asn130 e o domínio escada β , formada pela região C-terminal, com o potencial local de glicosilação Asn207 (Carpio e Barrett, 2021) (Figura 3).

Figura 3 - Estrutura da proteína NS1, contendo os domínios β -roll, wing, escada β e possíveis locais de glicosilação.



Fonte: Adaptado de Carpio e Barrett (2021).

A proteína NS1 dos flavivírus é considerada imunogênica e já demonstrou induzir respostas imunes protetoras, além de ser expressa fora da célula e na superfície celular, o que a qualifica como um potencial antígeno vacinal (Pattnaik, Sahoo e Pattnaik, 2020). Grubor-Bauk *et al.* (2019) produziram uma vacina de DNA capaz de codificar uma forma secretada da NS1 do ZIKV e demonstraram que ela foi capaz de conferir proteção a camundongos Balb/c imunocompetentes contra a infecção pelo vírus. Além disso, foi induzida uma forte resposta de linfócitos T citotóxicos e T helper.

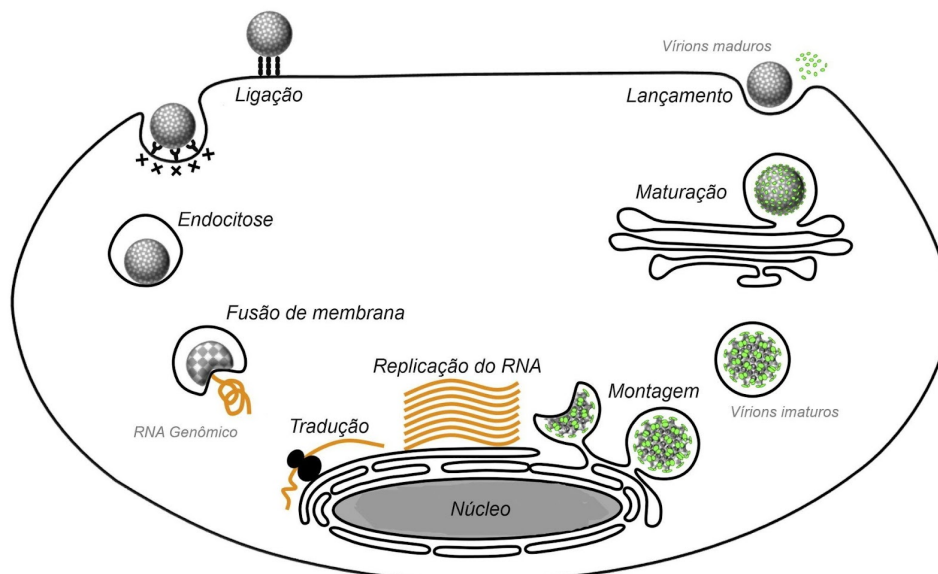
3.1.5 Aspectos Gerais Da Infecção

O principal meio utilizado pelo vírus para infectar humanos é através da picada da fêmea do mosquito, principalmente a da espécie *Aedes aegypti*, podendo ocorrer também pela picada do *Aedes albopictus* (Ferraris, Yssel e Missé, 2019). A proteína E do ZIKV é a principal responsável pela entrada do vírus na célula hospedeira, adaptação do hospedeiro, reconhecimento imunológico e patogênese viral, além de ser importante na indução de anticorpos neutralizantes durante a infecção viral. A proteína NS1 apresenta uma forma exócrina que garante a entrada do vírus em outros locais imunoprivilegiados, pois induz a permeabilidade em células endoteliais do cordão umbilical e causam disfunção placentária pelo aumento da permeabilidade da placenta (Muo *et al.*, 2021).

Após a picada do mosquito, os primeiros alvos do vírus serão os macrófagos e células dendríticas, o qual garante a entrada através da ligação da proteína E ao receptor DC-SIGN e se espalham através do sangue para outras partes do corpo conseguindo, através de outros receptores, como as proteínas receptoras de fosfatidilserina (TYRO 3, AXL, TIM e TAM), infectar células neurais, monócitos e células fetais (Mwaliko *et al.*, 2020; Shaily e Upadhya, 2019). A entrada do vírus é mediada por endocitose e à medida em que o ambiente interno do endossoma baixa o seu pH, o envelope viral se funde com a membrana do endossoma e libera o capsídeo, que se desfaz e expõe o RNA para início da tradução. O RNA será traduzido pelos ribossomos do hospedeiro da superfície do retículo endoplasmático (RE) e o resultado da tradução do RNA será uma poliproteína que será clivada por proteases para formar as proteínas estruturais e não estruturais. No interior do RE, o RNA será empacotado para produção de novos vírions imaturos, que irão amadurecer após a clivagem da prM em M na rede trans-Golgi e serão liberados por complexos através de exocitose (Vue e Tang, 2021; Sharma e Lal, 2017) (Figura 4).

Figura 4 - Ciclo viral do Zika vírus. A entrada do vírus é mediada por endocitose após interação do vírus com receptores celulares. Após a fusão de membranas, o RNA viral é exposto no citosol celular, onde será replicado e traduzido em uma poliproteína que será clivada por proteases do hospedeiro.

No interior do RE, o RNA será empacotado para produção de novos vírions imaturos, que irão amadurecer após a clivagem da prM em M na rede trans-Golgi e serão liberados por complexos através de exocitose.



Fonte: Adaptado de Song et al. (2017).

Há também evidências que sugerem outros tipos de transmissão, como: transmissão sexual, transmissão vertical, seja ela da mãe para o feto durante a gestação ou para o bebê durante a amamentação, através de transfusão sanguínea e transplante de órgãos (Besnard *et al.*, 2014; Sakkas *et al.*, 2018; Colt *et al.*, 2017; Khaiboullina *et al.*, 2019; Levi, 2017). Cerca de 80% dos pacientes apresentam a infecção assintomática e ela é geralmente autolimitada, com período de incubação variando de 3 a 14 dias e geralmente apresenta os seguintes sinais e sintomas: febre baixa, erupção cutânea, conjuntivite, dor muscular e articular (Karkhah *et al.*, 2018; Bhardwaj *et al.*, 2021).

Outra situação associada à infecção pelo ZIKV é a síndrome congênita do Zika, a qual é caracterizada por uma série de malformações em neonatos e dá ao vírus um perfil de microrganismo teratogênico. Isso é possível devido à capacidade do vírus infectar as células da placenta e a romperem e atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) do feto. Dentre as manifestações presentes nesta síndrome, há alterações na retina, contraturas congênitas, hipertonia precoce e a microcefalia, que se apresenta como principal característica. (Crisanto-López *et al.*, 2023; Giraldo, Gonzalez-Orozco, Rajsbaum, 2023; Komarasamy *et al.*, 2022).

Além disso, já foram associadas à infecção manifestações graves em adultos, como falência de órgãos, meningite, encefalite, trombocitopenia e síndrome de Guillain-Barré, uma polineuropatia associada ao vírus (Pierson, Diamond, 2018).

3.1.6 Aspectos Imunológicos

A imunidade inata se dá principalmente por macrófagos e células dendríticas que fagocitam antígenos e elaboram uma resposta imune. Interferons produzidos participam da resposta inata restringindo a patogênese do ZIKV diretamente ou ativando outros genes responsáveis por interferir na replicação viral (Culshaw, Mongkolsapaya e Sreaton, 2018; Lee *et al.*, 2021). A expressão desses interferons se dá a partir do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) por receptores de reconhecimento de padrão (PRR). Os interferons tipo I, II e III são os principais responsáveis pela defesa contra vírus e pelo menos 3 tipos de PRRs são capazes de ativar respostas contra o ZIKV, como os receptores Toll Like (TLR), receptores semelhantes ao gene I (RIG-I) e GMP-AMP sintase cíclica (cGAS) (Serman e Gack, 2019; Ngono e Shresta, 2018).

Quanto à imunidade adaptativa frente ao ZIKV, há as respostas humorais e celulares. Na resposta humoral, anticorpos neutralizantes irão impedir a ligação e fusão viral nas células do hospedeiro (Shi *et al.*, 2018). Anticorpos do tipo IgM são detectados na fase aguda da doença, assim como IgA. Já IgGs aparecem no momento de recuperação (Tonnerre *et al.*, 2019). A imunidade adaptativa ainda conta com as células T, que são ativadas pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) como macrófagos e células dendríticas após essas fagocitarem patógenos, processarem antígenos e apresentá-los através de complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Em camundongos, foi observado que células T CD8+ apareceram em maior quantidade que células TCD4+. As proteínas virais capazes de promover a liberação de citocinas por células CD4+ foram a NS1, NS3 e NS5 do capsídeo e a proteína do envelope viral. Já as células T CD8+ foram ativadas pelas proteínas NS3, NS4B e NS5 (Sekaran *et al.*, 2022; Pardy *et al.*, 2017)

3.1.7 Estudos Vacinais Para o ZIKV

Não há vacinas em uso para profilaxia contra o ZIKV, contudo, há vários candidatos vacinais em desenvolvimento e em ensaios clínicos que se utilizam de diferentes tecnologias para controle da infecção (Diamond, Ledgerwood e Pierson, 2019). Cinco vacinas para o ZIKV estão em testes clínicos e, destas, três são vacinas de DNA (GLS-5700, VRC-5288 e VRC-5283), uma é baseada no vírus inativado e a outra se utiliza da tecnologia de vetor viral (Yeasmin *et al.*, 2023). Uma lista com as vacinas de DNA em estudos clínicos para profilaxia do ZIKV está disponível na tabela 2.

Tabela 2 - Vacinas de DNA em testes clínicos para profilaxia do ZIKV.

	GLS-5700	VRC-5288	VRC-5283
Resultados	Desenvolvimento de anticorpos anti-ZIKV; Células T secretoras de IFN específicas; Amostra do soro neutralizam a infecção em 50%.	Variação de 60 a 89% de respostas positivas de anticorpos, dependendo do número e intervalo de doses; Resposta e titulações de anticorpos maiores após 3 doses.	A divisão de doses melhorou a resposta geral de anticorpos.
Vantagens	Bom custo benefício, quimicamente estável, fácil produção, respostas imunes inatas e adaptativas fortes e de longo prazo.		
Desvantagens	Baixo número de participantes nos estudos clínicos, dificultando conclusões sobre imunogenicidade, efeitos colaterais sistêmicos, como mialgia, náusea, dor nas articulações.		
Antígenos utilizados	prM-Envelope (E)		

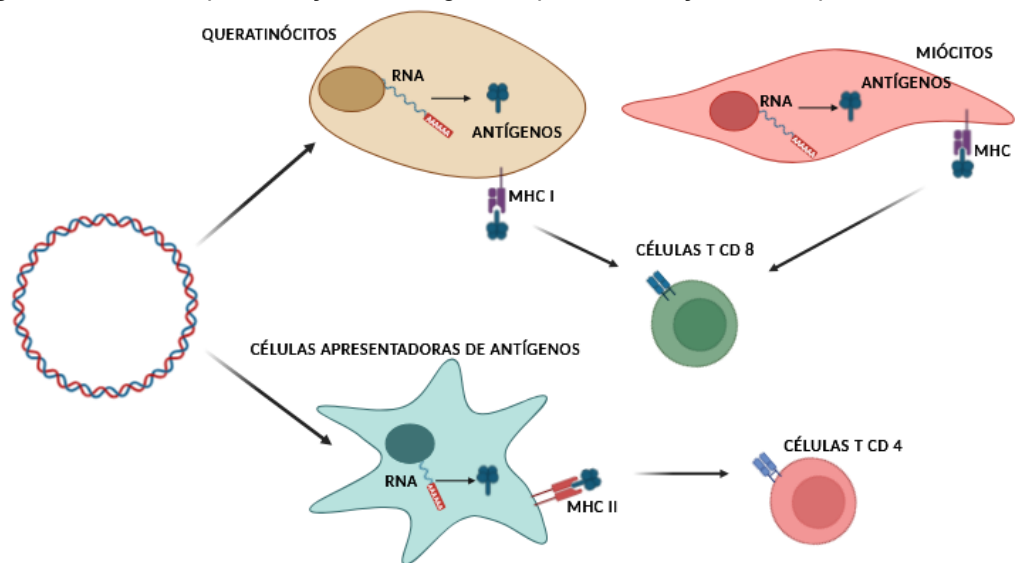
Fonte: Adaptado de Yeasmin *et al.* (2023).

3.2 VACINAS DE DNA

3.2.1 Aspectos Gerais

As vacinas desempenham um importante papel na história da saúde mundial e tecnologias relacionadas às suas produções vêm avançando. Porém, há vários desafios relacionados à produção de novas abordagens, como custo elevado, que repele a produção para maiores demandas e um cronograma lento para testes clínicos (Gary e Weiner; 2020). As vacinas são geralmente classificadas em três gerações: a primeira geração inclui vacinas atenuadas e inativadas, que utilizam patógenos vivos enfraquecidos ou mortos para induzir a resposta imune. A segunda geração engloba vacinas de subunidade, conjugadas e recombinantes, que contêm apenas componentes específicos do patógeno, como proteínas estruturais, aumentando a segurança e a precisão da imunização (Tahamtan *et al.*, 2017). As vacinas de DNA são vacinas de terceira geração e se utilizam da tecnologia de DNA recombinante em sua produção. Já se provaram seguras e há a possibilidade de aumentar sua imunogenicidade através do uso de adjuvantes e sistemas de delivery adequados. Para essas vacinas, são utilizadas bactérias que serão transformadas com vetor plasmidial contendo uma sequência de DNA codificadora de antígenos dos patógenos de interesse e que em seguida, irão expandir o número de cópias do vetor recombinante para posterior purificação dos plasmídeos e obtenção da vacina (Gaffarifar, 2018; Lee *et al.*, 2018). Comparando-as com vacinas de subunidades, elas são mais estáveis, seguras, econômicas e de fácil produção. Contudo, há uma baixa imunogenicidade intrínseca a essa tecnologia que se cria a necessidade de otimizações em seu desenho. Alguns parâmetros capazes de otimizar a construção vacinal são: utilização de um promotor híbrido viral/eucarioto para impedir o silenciamento da transcrição, uso de sequências antigênicas separadas por ligantes para indução de resposta celular, uso de adjuvantes e utilizar um sistema de entrega capaz de proteger a vacina de DNA contra a degradação por DNases e outras enzimas e direcioná-la para locais específicos e aumentar a resposta imune (Hobernik e Bros, 2018). A Figura 5 ilustra o mecanismo de ação de vacinas de DNA após transfecção de células, sejam essas apresentadoras de antígenos ou somáticas.

Figura 5 - Vias de apresentação de antígenos após transfecção celular por vacinas de DNA.



Fonte: Adaptado de Ghaffarifar (2018).

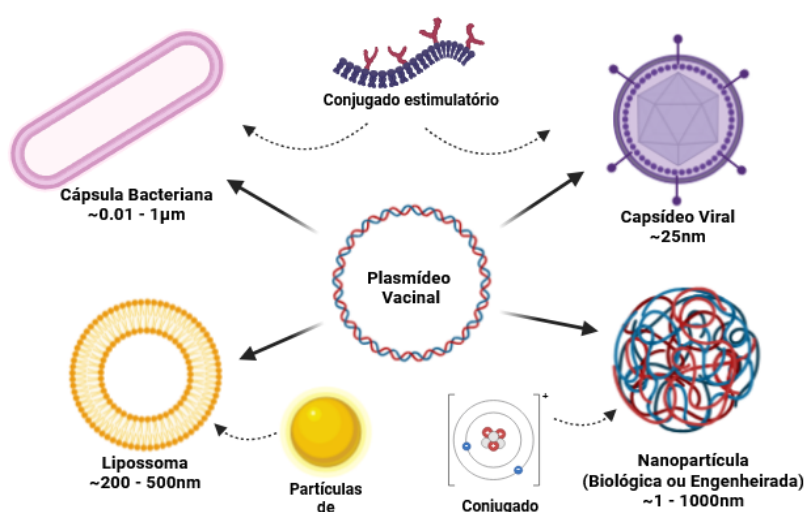
3.2.2 Sistemas De Entrega Para Vacinas De DNA

A baixa imunogenicidade associada à ineficiente transfecção das vacinas de DNA nas células do hospedeiro limitou o uso dessa tecnologia. Dessa forma, desenvolver sistemas de entrega baseados em nanopartículas lipídicas, usar eletroporação (a qual aumenta a permeabilidade das membranas celulares), uso de injeção a jato capaz de injetar a vacina de DNA com força no tecido do hospedeiro, uso de bactérias como carreadoras e ainda o uso de leveduras, vem a ser uma boa estratégia para aumentar a eficiência vacinal dessa abordagem (Lim *et al.*, 2020; Park *et al.*, 2021; Yurina *et al.*, 2018; Tan *et al.*, 2022).

O uso de nanopartículas lipídicas tem servido como uma alternativa para delivery de ácidos nucleicos, contudo, algumas limitações, como citotoxicidade, pseudoalergia associada ao complemento e choque anafilático, assim como necessidade de otimizações em sua estrutura para se tornar um bom sistema de entrega, podem dificultar o seu uso (Samaridou, Heyes e Lutwyche, 2020). O uso de injeção a jato, mesmo que substitua a injeção padrão com agulha e evite fobias e desconfortos, não está bem definida quanto à resposta imune e longevidade da mesma após vacinação (Jiang *et al.*, 2019). A eletroporação, apesar de ser eficiente para delivery de DNA para dentro das células e melhorar a resposta imune, pode ao mesmo tempo diminuir a eficiência da transfecção devido à necrose e morte do

tecido muscular após a aplicação (Sokołowska e Błachnio-Zabielska, 2019). Além disso, de um modo geral, há o problema do armazenamento e distribuição das vacinas, em que altas temperaturas, assim como baixas, influenciam a potência das formulações. Dessa forma, as vacinas que utilizam leveduras como sistema de entrega aparecem para contornar esses problemas, visto que são termoestáveis e naturalmente se apresentam com adjuvantes em sua parede celular (Kumar e Kharbikar, 2021). Alguns possíveis sistemas de entrega utilizados para delivery de DNA estão ilustrados na Figura 6.

Figura 6 - Sistemas de entrega comumente utilizados para vacinas de DNA.



Fonte: Adaptado de Kozak e Hu (2024).

3.3 LEVEDURAS COMO SISTEMA DE ENTREGA VACINAL

As vacinas disponíveis atualmente, mesmo que úteis para o controle de diversas doenças de importância epidemiológica, ainda apresentam algumas desvantagens, seja em sua preparação ou em sua aplicação e resposta imune. Algumas dessas limitações são o regime de doses e o uso de adjuvante para garantir uma resposta imune robusta. Além disso, há o número crescente de reações alérgicas associadas às atuais plataformas vacinais convencionais, a preocupação de patógenos atenuados ou vivos em vacinas utilizados em pessoas imunocomprometidas e as condições de armazenamento e transporte. Dessa forma, faz-se necessário o desenvolvimento de vacinas que fujam dessas limitações. Foi

observado que as leveduras têm potencial em se tornar um modelo ideal ou alternativo para esse caso (Kumar e Kumar, 2019).

Algumas leveduras, devido ao status GRAS (geralmente reconhecido como seguro) e às propriedades adjuvantes e estimulatórias de sua parede celular, podem e já são utilizadas para fornecer drogas, materiais genéticos e vacinas para o organismo de um hospedeiro mamífero (Silva *et al.*, 2021). Em estudos *in vitro* com células humanas, já foram observados resultados promissores de resposta imune em leveduras carreando DNA e mRNA (Alexander, 2021). Uma das espécies de levedura com tais características e investigada quanto ao potencial de carrear vacinas é a *Saccharomyces cerevisiae*. Walch *et al.* 2012 avaliou a capacidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae* entregar DNA e mRNA para células apresentadoras de antígenos de mamíferos. Os plasmídeos avaliados no estudo continham promotores CMV, constitutivo em células de mamíferos, PGK, promotor constitutivo em leveduras e MLS1 e ICL1, promotores constitutivos em leveduras após fagocitadas por APCs e continham como gene de estudo a proteína fluorescente verde (eGFP). Foi observado por microscopia que o co-cultivo de leveduras com macrófagos IC21 permitiu a fagocitose das leveduras pelas células e após 16h de cultura, foram observados macrófagos eGFP positivos por citometria de fluxo. Para confirmar que a expressão do gene modelo foi realizada pelos macrófagos e não pelas leveduras, foi realizado um northern blot, em que foi observado que o gene eGFP sob controle do promotor CMV não é transcricionalmente ativo em leveduras. Além disso, Zakria *et al.* (2019) produziram uma levedura recombinante carreando uma vacina terapêutica de DNA contendo os genes da miostatina e short hairpin RNA direcionada para IL21 (shIL21), em que foi observado a inibição da proteína miostatina em camundongos e supressão da IL21 após administração oral da levedura. Em outro estudo, Han *et al.* (2019) desenvolveram uma vacina de DNA carregada por *Saccharomyces cerevisiae* contendo os genes *ompG* e *omp48* da *Aeromonas hydrophila* para profilaxia da infecção causada pela mesma em peixes da espécie *Carassius auratus*, o qual obtiveram resposta imune humoral específica contra os antígenos testados.

Outra espécie de levedura com características semelhantes é a *P. pastoris*, a qual se apresenta como uma plataforma viável para a produção de vacinas, devido a também possuir status GRAS, crescimento rápido, fácil manipulação genética e

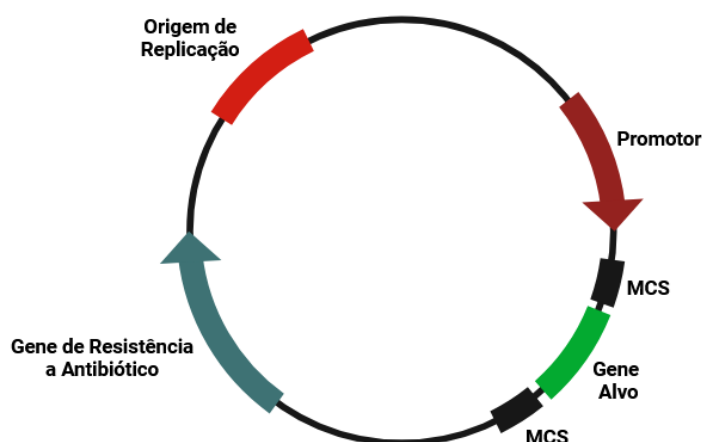
características adjuvantes de sua parede celular (De Sá Magalhães e Keshavarz-Moore, 2021).

3.3.1 Construção De Vetores Para Carreamento De Ácidos Nucleicos Por Leveduras

Os plasmídeos se tornaram um importante objeto na área da biotecnologia nas últimas décadas e vêm sendo utilizados para a produção de fármacos, transgenia e criação de vacinas devido à possibilidade de edição em sua estrutura e capacidade de atuar como vetores para entrega de DNA estranho a células hospedeiras (Nora *et al.*, 2019; Williams, 2013).

Os plasmídeos de DNA tradicionais usados para vacinação são oriundos de bactérias e possuem características que permitem a sua transformação, replicação e seleção do organismo hospedeiro, como uma origem de replicação, capaz de ser reconhecida pelo maquinário de replicação celular para fabricar cópias do plasmídeo, um marcador de seleção que garanta uma vantagem seletiva para as células transformantes (como um gene de resistência a antibiótico) e um sítio de clonagem múltipla (MCS) sob controle de algum promotor, o qual contém sequências capazes de serem reconhecidos por enzimas de restrição para clonagem de genes alvo (Ledesma-Feliciano *et al.*, 2023; Nora *et al.*, 2019). A estrutura básica de um vetor plasmidial de DNA está indicada na Figura 7. Para manipulação genética, geralmente são usados “*shuttle vectors*”, ou vetores de transporte, capazes de transportar DNA entre dois organismos diferentes, como uma bactéria e levedura, isso, devido a origens de replicação e marcadores de seleção para ambos na estrutura do plasmídeo (Smith *et al.*, 2024). Além disso, Murakami *et al.* (2023) construíram um sistema de clonagem direta de plasmídeos para expressão gênica em células procarióticas e de mamíferos. Esse sistema consiste basicamente em um plasmídeo contendo uma unidade de expressão para *Escherichia coli*, com operador e promotor lac, códon de iniciação (ATG) e MCS, além de uma região contendo unidade de expressão em mamífero, com o promotor CMV e cauda poli-A.

Figura 7 - Estrutura básica de um vetor plasmidial.



Fonte: O autor (2025).

As origens de replicação atuam como a região que marca início da replicação do plasmídeo por recrutar o complexo de reconhecimento de origem (ORC) e outras proteínas que irão duplicar o genoma a cada ciclo celular, contudo, as origens de levedura atuam como sequências de replicação autônoma (ARSs), as quais irão promover a replicação e manutenção de plasmídeos episomais (Liachko *et al.*, 2012). Para *Pichia pastoris*, já foram descritas e identificadas diferentes ARSs. Um estudo de Liachko *et al.* (2014) identificou 311 ARSs na levedura e observou que 35% deles contém motivos rico em G/C, os quais se replicam mais cedo e com melhor eficiência que as sequências com sítios A/T, embora haja exceções. Porém, Camattari *et al.* (2016) compararam duas ARSs endógenas de *P. pastoris* (A76 e A937) com uma sequência ARS de amplo espectro (panARS). Para isso, colônias contendo plasmídeos que expressam proteína azul fluorescente (BFP) baseada em A76, A937 ou panARS foram testadas quanto à emissão de fluorescência após 48h de cultivo, em que foi observado maior expressão de BFP em leveduras transformantes panARS. Além disso, foi analisado se a posição da sequência no plasmídeo interferia no nível de expressão e foi observado que a sequência panARS, quando colocada em downstream à jusante da sequência terminadora de tradução, melhora a expressão da BFP.

Para a transcrição do gene alvo, é necessário um promotor dentro da estrutura do plasmídeo, visto que é um elemento regulador capaz de controlar a expressão espacial e temporal de um gene, os quais podem ser indutíveis ou constitutivos (Öztürk, Ergün e Çalik, 2017). Promotores indutíveis são utilizados para

a produção de um produto gênico sob condições específicas em um determinado intervalo de tempo e podem ser regulados quimicamente com a utilização de agentes químicos como álcoois, antibióticos, hormônios ou fontes de carbono ou fisiologicamente, determinada por fatores ambientais abióticos, como estresse osmótico, temperatura e luz (Kluge, Terfehr e Kück, 2018). Já os promotores constitutivos irão garantir a expressão contínua do gene de interesse sem a necessidade de indutores, que eventualmente são tóxicos tanto para humanos, quanto para as células, como o metanol (Ahmad *et al.*, 2014). Alguns dos promotores mais utilizados para a expressão de genes alvo para a produção de proteínas em leveduras estão listados na Tabela 3.

Tabela 3 - Principais promotores utilizados para expressão heteróloga de genes em leveduras.

	Promotores	Gene correspondente	Regulação
Indutíveis	<i>AOX1</i>	Álcool oxidase 1	Metanol
	<i>DAS</i>	Diidroxiacetona sintase	Metanol
	<i>FLD1</i>	Formaldeído desidrogenase 1	Metanol ou Metilamina
	<i>ICL1</i>	Isocitrato liase	Reprimido por glicose e induzido na ausência de glicose / adição de etanol
	<i>ENO1</i>	Enolase	Reprimido por glicose, metanol e etanol e induzido com glicerol
	<i>GUT1</i>	Glicerol quinase	Reprimido por metanol e induzido em glicose, glicerol e etanol
Constitutivos	<i>GAP</i>	Gliceraldeído-3-P desidrogenase	Expressão constitutiva sobre a glicose e em menor grau sobre glicerol e metanol
	<i>TEF1</i>	Fator de alongamento de	Expressão

	tradução 1	constitutiva sobre glicerol e glicose
<i>PGK1</i>	3-fosfoglicerato quinase	Expressão constitutiva sobre a glicose e em menor grau sobre glicerol e metanol

Fonte: Adaptado de Türkanoğlu Özçelik, Yılmaz e Inan (2019).

Contudo, as vacinas de DNA devem conter genes heterólogos inseridos sob um promotor eucariótico que permita sua expressão em células de mamíferos (Garmory, Brown e Titball, 2003). Como descrito por Saade e Petrovsky (2012), após a injeção intramuscular do plasmídeo contendo o gene alvo, ele será absorvido por monócitos e miócitos que irão expressar o antígeno contido no vetor recombinante, o qual será apresentado a células efectoras pelos MHC de classe I ou II. Um dos promotores mais utilizados para a fabricação de vacinas de DNA é o CMV, derivado do Citomegalovírus humano, visto que gera altos níveis de expressão de forma constitutiva em vários tecidos de mamíferos, além da possibilidade de modificações em sua sequência para melhorar a expressão e imunogenicidade (Saade e Petrovsky, 2012; Galvin, Muller e Khan, 2000). Alguns promotores empregados em vetores comerciais para transfecção em células de mamíferos estão listados na tabela 4.

Tabela 4 - Principais promotores utilizados em vetores plasmidiais para expressão em células de mamíferos.

Promotor	Vetor	Características
<i>hCMV (Promotor do Citomegalovírus humano)</i>	pVAX1	Cada vetor utiliza diferentes variantes do promotor hCMV
	pcDNA	
	pCI/neo	
	phCMV	
	pFLAG-CMV	
<i>mCMV (Promotor do Citomegalovírus murino)</i>	GS	Íntron incluído à jusante do promotor
<i>SV40 (Promotor do Vírus</i>	pcDNA 3.1	Geralmente utilizado para

<i>Símio 40)</i>	pcDNA3.3-TOPO GS	expressão de genes de seleção
<i>HEF1α (Promotor do gene do fator de alongamento humano 1α)</i>	pFUSE2-CLlg-hk pFUSE-CHlg-hG1	Presentes em vetores construídos para expressar regiões constantes de cadeia leve e pesadas de Imunoglobulinas

Fonte: Adaptado de Ho e Yang (2014).

Um outro elemento regulatório importante é a sequência Kozak, que está próxima ao códon iniciador (AUG) do mRNA (Garmory, Brown e Titball, 2003). Essa sequência é crítica para orientar os ribossomos de onde deve se começar a tradução a partir dos transcritos eucarióticos e a sequência GCCGCCRCC das posições -9 a -1 é comum em todos os vertebrados e a sequência -6 a -1 GCCRCC proporciona tradução eficiente (Macclements *et al.*, 2021). Além disso, utiliza-se uma região de poliadenilação (polyA) no final do cassete de expressão para aumentar a estabilidade do mRNA transcrito e permitir uma maior resistência do plasmídeo a exonucleases e endonucleases que estarão presentes no plasma e citosol celular (Azzoni *et al.*, 2007). Azzoni *et al.* em 2007, modificaram a região polyA do vetor pVAX1GFP com 4 sequências distintas, como a sequência polyA do SV40, polyA do hormônio de crescimento bovino (bGH), bGH mutante e uma polyA sintética, e foi demonstrado que os plasmídeos contendo a polyA SV40 e a sintética aumentaram a resistência dos plasmídeos à degradação por nucleases, porém, os níveis de transfecção e de expressão foram menores em células CHO com a utilização desses plasmídeos mais resistentes. Em um outro estudo de Waltch *et al.* (2012), eles testaram o terminador PGK derivado de levedura (tPGK) e o terminador polyA SV40 para a entrega de ácidos nucleicos por leveduras, e foi observado uma melhora na estabilidade do mRNA e maior eficácia de tradução no plasmídeo que continha a polyA SV40. Além disso, também foi observado que células dendríticas incubadas com as leveduras contendo os plasmídeos modificados com o terminal SV40, foram capazes de aumentar a estimulação de células T após interação intercelular.

Os marcadores de seleção geralmente se utilizam de genes de resistência a antibiótico para controlar a manutenção dos plasmídeos pela eliminação de células que não os absorveram (Tolmachov, 2009). Eles são necessários para garantir a

persistência do plasmídeo através de gerações e alguns dos marcadores de resistência a antibióticos mais utilizados em leveduras são ao cloranfenicol, Geneticina™ (G418 sulfato) e Zeocina™ (Baghban *et al.*, 2019). Para *Pichia pastoris*, uma tabela de plasmídeos com marcadores de seleção para a levedura está disponível na tabela 5. Para evitar o uso de antibióticos que podem ser tóxicos e caros, podem ser utilizados marcadores auxotróficos, que são genes que complementam as necessidades nutricionais específicas das leveduras, como por exemplo o gene *URA3*, que codifica a orotidina-5-fosfato descarboxilase, enzima que participa da síntese de pirimidina em *Saccharomyces cerevisiae*, assim como os genes *HIS3*, *LEU2*, *TRP1* e *MET15* que codificam enzimas essenciais para a síntese dos aminoácidos respectivos: histidina, leucina, triptofano e metionina (Pronk, 2002). Algumas linhagens de *Pichia pastoris* já foram desenvolvidas para o uso da seleção por auxotrofia. Betancur *et al.* (2017) desenvolveram uma linhagem de *Pichia pastoris* auxotrófica para leucina, assim como um vetor de expressão contendo o gene *leu2-d*, que participa da síntese do aminoácido leucina. Além disso, Nett *et al.* (2005) desenvolveram uma linhagem de *Pichia pastoris* auxotrófica para arginina e histidina, através da interrupção de sete genes envolvidos na biossíntese de ambos os aminoácidos, como *ARG1*, *ARG2*, *ARG3*, *HIS1*, *HIS2*, *HIS5* e *HIS6*, além disso, criaram plasmídeos contendo os mesmos genes para seleção auxotrófica.

Tabela 5 - Marcas de seleção utilizadas em vetores plasmidiais para seleção de bactérias e leveduras.

Plasmídeo	Marcador de seleção em levedura	Marcador de seleção em bactéria
DNA 2.0	Zeocina™, Geneticina™	Zeocina™, Ampicilina
Life Technologies™	Blasticidina, Geneticina™, Zeocina™, <i>HIS4</i>	Zeocina™, Ampicilina, Blasticidina
Life Technologies-PichiaPink™	ADE2	Ampicilina
Life Technologies-pPICZα-Echo™	Zeocina™	Kanamicina

BioGrammatics

Zeocina™,
Geneticina™,
Nourseotricina

Ampicilina

BioGrammatics
GlycoSwitch®

Zeocina™,
Geneticina™,
Higromicina, *HIS4*,
Nourseotricina

Ampicilina, Kanamicina
Zeocina™, Nourseotricina

Fonte: Adaptado de Baghban et al. (2019).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Linhagens De Microrganismos E Condições De Cultivo

A *Escherichia coli* Top10 [(F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (ara leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG)] foi utilizada como organismo hospedeiro para os experimentos de clonagem. Nas etapas de transformação em *E. coli*, repique e inóculo foi utilizado o meio de cultura Luria-Bertani (LB), que apresenta a seguinte composição: triptona 1%, extrato de levedura 0.5% e NaCl 1%, adicionado 100 μ g/mL Ampicilina. Para meio sólido, foi acrescentado 2% de ágar. O cultivo das colônias foi realizado a 37°C, por 16-18h. Para o cultivo de células transformadas com o vetor pLT-CMV(ARS) (vetor não comercial, construído no presente trabalho), foi utilizado meio LB *low salt* na seguinte composição: triptona 1%, extrato de levedura 0.5% e NaCl 0.5%, adicionando 25 μ g/mL de Zeocina (Invitrogen).

O carreamento dos vetores plasmidiais foram avaliados na levedura *P. pastoris* GS115 (*his4*). O meio empregado nas placas para transformação foi o YPD composto por extrato de levedura 1%, peptona 2% e dextrose 2%. Para seleção dos transformantes, foi utilizado Zeocina numa concentração de 100 μ g/mL. As culturas foram incubadas a 29°C.

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

4.1.2 Soluções E Tampões

Soluções para extração de DNA plasmidial em *E. coli*, segundo protocolo descrito por Maniatis *et al.* (1989): Solução I: Tris-HCl 25 mM, EDTA (Ácido Tetracético Etilendiamina) 10mM, glicose 50mM, água destilada estéril; Solução II: NaOH 0,4N, SDS 2%; Solução III: Acetato de Potássio 5M, Ácido Acético Glacial, água destilada estéril.

Soluções para extração de DNA plasmidial em leveduras: Tampão de lise: Triton X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100mM, Tris-HCl (pH8,0) 10mM e EDTA (pH 8,0) 1mM; Mistura fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (PCI - 25:24:1).

Solução salina balanceada: Solução A - Glicose $5,5 \times 10^{-3}$ M, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5×10^{-5} M, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $9,8 \times 10^{-4}$ M, KCl $5,4 \times 10^{-3}$ M, Tris 0,145 m; solução B - NaCl 0,14 M.

Soluções para extração de RNA de células mononucleares: TRIzol® LS Reagent (Life Technologies) e clorofórmio.

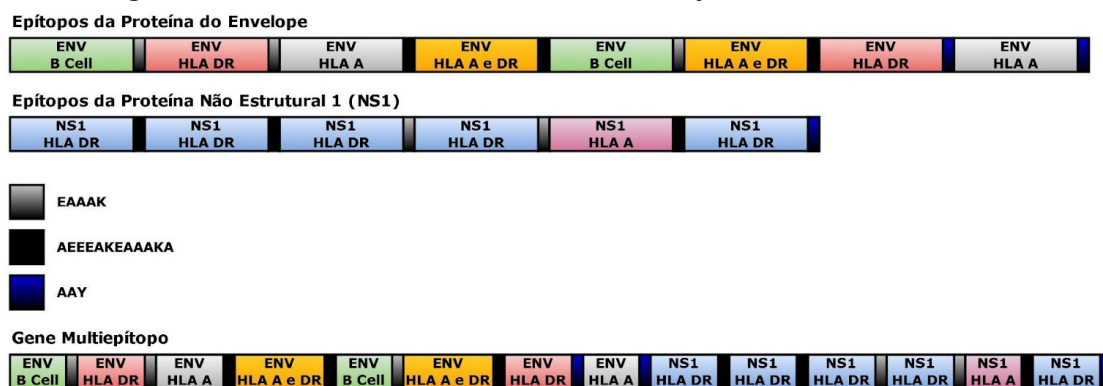
Tampão de corrida para eletroforese de DNA: TAE 10x: Tris base 400mM, Ácido Acético 190mM, EDTA 10mM pH 7.6.

4.1.3 Gel Para Eletroforese de DNA

Para realização de eletroforese para DNA foram utilizados geis de agarose com concentração de 1 e 1,5% com o tampão TAE 1X. Os geis foram corados com solução de brometo de etídeo (0,5 µg/ml) para promover a visualização das bandas de DNA por meio de um transluminador com luz ultravioleta. O material foi aplicado junto com tampão de amostra (Loading Dye 6X), tendo como referencial o marcador comercial (Thermo Scientific) de 1Kb (GeneRuler DNA Ladder, 6x TriTrack DNA Loading Dye e água ultra pura).

4.1.4 Sequências Env e NS1

Os genes que codificam os epítomos imunogênicos específicos para as proteínas do Envelope e NS1 do ZIKV. O isolado viral utilizado como sequência de referência foi o ZIKV_{PE243} (ZIKV/H.sapiens/Brasil/PE243/2015; GenBank: KX197192.1) (Silva *et al.*, 2021). São oito epítomos da proteína do envelope, as quais têm como alvo células B e moléculas do HLA I e II. Já para a proteína NS1, foram selecionados seis epítomos, que estão associados ao HLA I e II. Além disso, conectores estão associados entre os epítomos, com o objetivo de auxiliar na conformação e bioatividade (EAAAK e AEEEEAKEAAKA) e servir como sítio de clivagem proteossomal e/ou lipossomal (AAY) (Figura 8).

Figura 8 - Genes Env e NS1 utilizados na construção vacinal contra o ZIKV.

Fonte: O autor (2025).

Na tabela 6 estão listados sequências e alvos dos epítopos selecionados.

Tabela 6 - Sequências e alvos dos epítopos Env e NS1.

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

Fonte: Silva *et al.*, 2021.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Amplificação / Obtenção Das Sequências

4.2.1.1 Sequência multiepítopo EnvNS1

O gene que codifica o antígeno sintético foi obtido por PCR a partir de uma construção pClone_EnvNS1 sintetizada pela GenOne Biotechnologies (Silva *et al.*, 2021). O vetor pClone contém marcador de seleção para ampicilina, e um tamanho de 2,9 Kb. Os *primers* utilizados para amplificação das sequências estão listados na tabela 7. As condições da reação de amplificação se resumiram em uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos e 30 ciclos de desnaturação a 95° C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 2 minutos e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. A amplificação foi realizada utilizando FIREPol® Master Mix. Após a amplificação, as amostras foram purificadas utilizando EasyPure® Purification PCR Kit (Transgen Biotech), para remoção de impurezas como enzimas, íons de sais inorgânicos, compostos orgânicos, proteínas e *primers*. Em seguida, a sequência EnvNS1 foi armazenada a -20°C para posterior ligação ao vetor pLTCMV(ARS). O tamanho da sequência obtida é de 858 pb.

Tabela 7 - *Primers* utilizados para amplificação de sequências Env e NS1.

Primers	Sequência
PF _{Env}	AAGCTTGGATCCATCATGGCGCTGGATAAACAGTC
PR _{Env}	TCTAGAGAATTCTTAGTAGGCAGCCAAACTCCTC
PF _{NS1}	AAGCTTGGATCCATCATGGCGTTCAACTGACAGTG
PR _{NS1}	TCTAGAGAATTCTTAATAAGCAGCCAACTCTTCAG

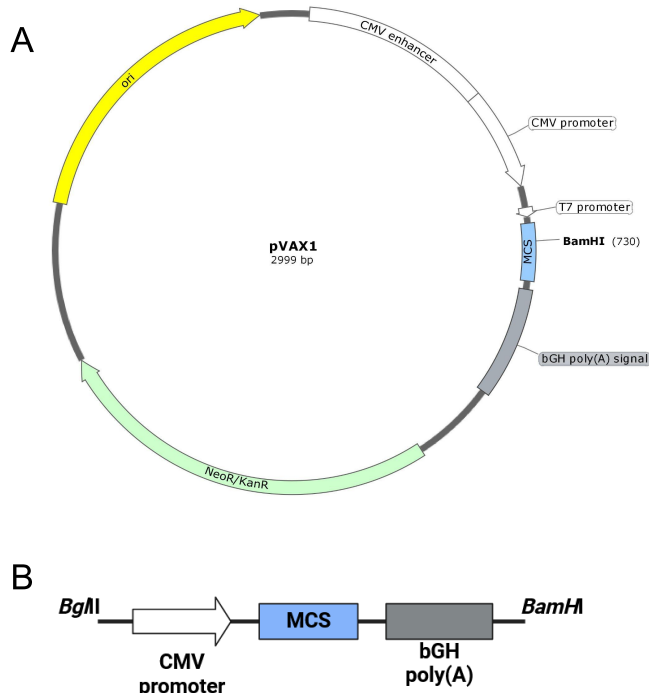
Fonte: O autor (2025).

4.2.1.2 Cassete de Expressão Derivado do Vetor pVAX1

O cassete de expressão utilizado na construção do vetor vacinal foi derivado do vetor comercial pVAX1 (Invitrogen), que compreende o promotor CMV, uma região de múltipla clonagem e o sinal de poliadenilação final derivado do bGH

(hormônio de crescimento bovino) (Figura 9). Foi necessário adicionar sítios de restrição para *Bgl*II e *Bam*HI nas extremidades da sequência com o auxílio de *primers* e amplificação por PCR para permitir a ligação desta região com outras sequências.

Figura 9 - Mapa vetorial do pVAX1 (Invitrogen) e cassete de expressão utilizado para construção do vetor plasmidial. A - Mapa vetorial do pVAX1 (Invitrogen); B - Cassete de expressão utilizado na construção do vetor vacinal.

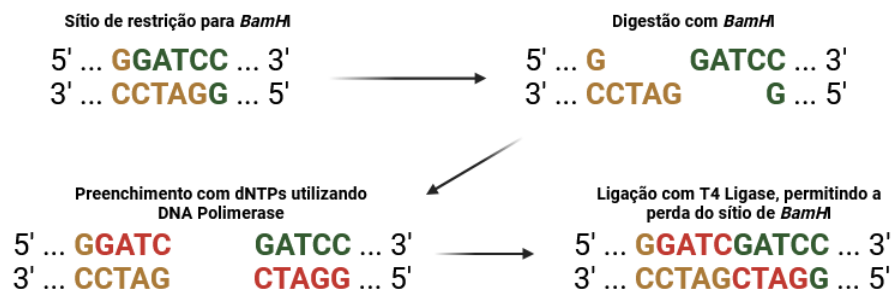


Fonte: O autor (2025). Mapa vetorial criado no SnapGene®.

Antes da amplificação, foi necessário remover um sítio de restrição para *Bam*HI que estava contido no MCS do cassete de expressão do pVAX1 (Invitrogen) (Figura 8) a partir de uma mutação sítio dirigida, visto que seriam necessárias digestões posteriores com a enzima e a presença deste sítio no MCS inviabilizaria a montagem do vetor.

Essa etapa consistiu em digerir o vetor com *Bam*HI, preencher as extremidades coesivas com dNTPs utilizando DNA polimerase (Thermo Scientific™), seguindo orientações do fabricante, e religar o vetor com T4 DNA ligase (Promega) (Promega) (Figura 10). Após a religação do vetor com a DNA ligase, foi formado o vetor pVAX1Δ*Bam*HI (vetor sem sítio de restrição para *Bam*HI no MCS), o qual foi utilizado para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* Top 10 (Invitrogen).

Figura 10 - Esquema da etapa de mutação sítio-dirigida planejada para remoção de sítio de restrição *Bam*HI.



Fonte: O autor (2025).

Em seguida, foi realizada extração plasmidial do vetor pVAX1Δ*Bam*HI seguindo protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989) e a região do cassete de expressão sem sítio de restrição para *Bam*HI foi obtida por amplificação (PCR) utilizando FIREPol® Master Mix. Os *primers* utilizados estão listados na tabela 8. As condições da reação de amplificação se resumiram em desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos e 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 2 minutos e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. O amplicon obtido apresenta cerca de 1Kb e foi clonado no vetor de passagem pGEM-T-Easy (Promega). A construção foi utilizada para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* Top 10 (Invitrogen) e a confirmação das clonagens se deu por PCR de colônia utilizando FIREPol® Master Mix, utilizando os *primers* correspondentes, seguido de extração plasmidial e digestão enzimática com *Bam*HI e *Bgl*II para confirmação da clonagem. As bandas correspondentes ao cassete de expressão foram purificadas a partir do gel de agarose utilizando o kit EasyPure® Quick Gel Extraction Kit (Transgen Biotech) e armazenadas a -20°C até o momento de uso.

Tabela 8 - *Primers* utilizados para amplificação do cassete de expressão.

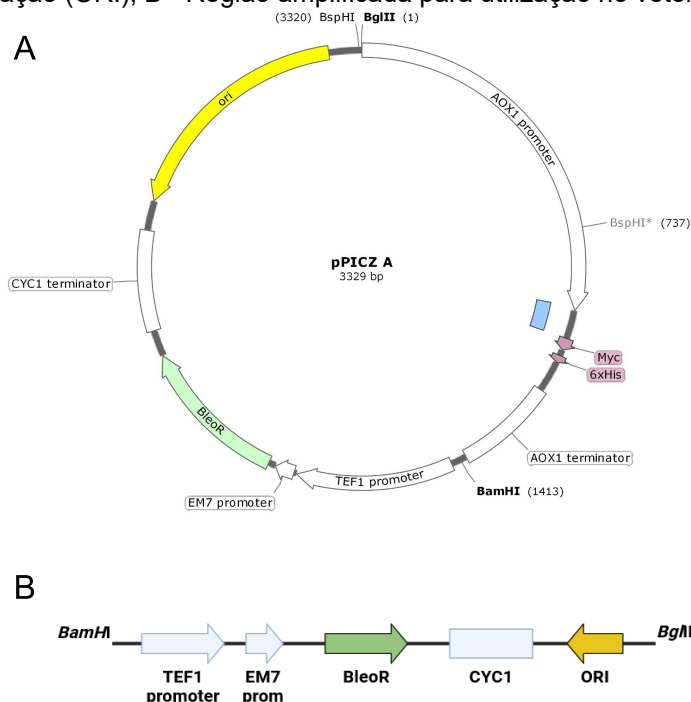
<i>Primers</i>	Sequência
PF _{pVAX1}	AGATCTGTTGACATTGATTATTGACTA
PR _{pVAX1}	GGATCCCGCCCGAGTAGAAGCCATAGAGCCC

Fonte: O autor (2025).

4.2.1.3 Região Contendo Origem de Replicação e Marcador de Seleção para Zeocina

Outra região do vetor vacinal foi derivada do vetor pPICZαA (Invitrogen) (3,3Kb), utilizado para expressão de proteínas recombinantes em *Pichia pastoris* (Figura 11). Essa região possui um marcador de seleção para Zeocina e uma origem de replicação (ori) bacteriana, a qual permite a manutenção e replicação do plasmídeo nas células *E. coli* Top 10, utilizadas nos processos de clonagem. A região de interesse é flanqueada com sítios de restrição para *Bgl*II e *Bam*HI.

Figura 11 - Região do pPICZαA (Invitrogen) utilizada para a construção do vetor plasmidial pLT-CMV(ARS). A - Mapa do vetor; há nele um marcador de seleção para Zeocina (BleoR) e origem de replicação (ORI); B - Região amplificada para utilização no vetor vacinal.



Fonte: O autor (2025). Mapa vetorial criado no SnapGene®.

Os *primers* sintetizados para amplificar a região de interesse estão listados na tabela 9. As condições da reação de amplificação se resumiram em uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos e 30 ciclos de desnaturação a 95° C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 2 minutos e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. A amplificação foi realizada utilizando utilizando FIREPol® Master Mix. O amplicon gerado é uma sequência de 1913pb. Esse amplicon foi ligado ao vetor pGEM-T-Easy e a construção foi utilizada para

transformar células quimiocompetentes de *E. coli* Top 10. A confirmação das clonagens se deu por PCR de colônia utilizando FIREPol® Master Mix utilizando os *primers* correspondentes, seguido de extração plasmidial e digestão enzimática com *Bam*HI e *Bgl*II para visualização de padrões de banda. As bandas correspondentes à região derivada do pPICZαA (Invitrogen) foram purificadas a partir do gel de agarose utilizando o kit EasyPure® Quick Gel Extraction Kit (Transgen Biotech) e armazenadas a -20°C até o momento de uso.

Tabela 9 - *Primers* utilizados para amplificação de sequência do pPICZαA (Invitrogen), contendo origem de replicação e marcador de seleção para Zeocina.

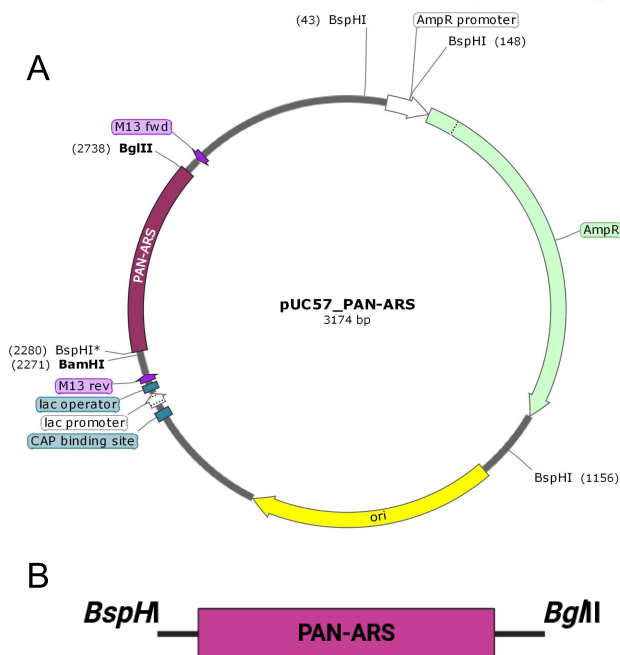
<i>Primers</i>	<i>Sequência</i>
PF _{pPICZαA} (Invitrogen)	GGATCCCCCACACACCATAGC
PR _{pPICZαA} (Invitrogen)	AGATCTGGCGGCTCATGACCAAATCCC

Fonte: O autor (2025).

4.2.1.4 Sequência de Replicação Autônoma

Um outro elemento adicionado ao vetor consiste em uma sequência de replicação autônoma pan-ARS, com 452 pb derivada da levedura *Kluyveromyces lactis*, que mantém sua função em outras leveduras, como a *Pichia pastoris* (Liachko e Dunhan, 2014). O objetivo dessa modificação é promover uma melhor manutenção dos plasmídeos e replicação mais eficiente nas células de levedura. A sequência foi obtida a partir do plasmídeo pUC57_PAN-ARS, produzido pela GenOne Biotech. A região pan-ARS é flanqueada na extremidade 5’ por sítios de restrição para *Bam*HI e *Bsp*HI e na extremidade 3’ pelo sítio de restrição para *Bgl*II (Figura 12).

Figura 12 - Esquema de sequência pan-ARS para replicação autônoma de vetor plasmidial em leveduras. A - Vetor pUC57_PAN-ARS produzido pela GenOne Biotech; B - Região ARS utilizada na construção do vetor vacinal.



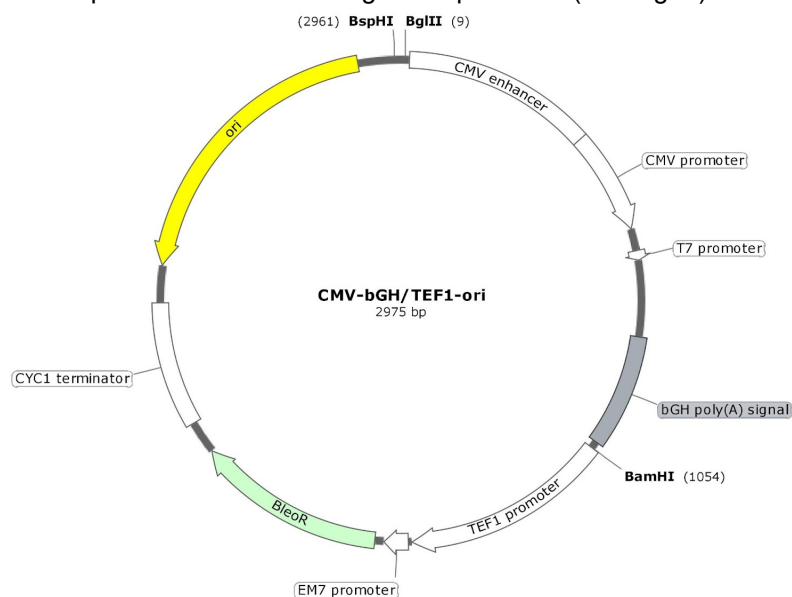
Fonte: O autor (2025). Mapa vetorial criado no SnapGene®.

4.2.2 Construção do vetor vacinal para carregamento em levedura

Após obtenção dos amplicons derivados do vetor pVAX1Δ*BamHI* e do pPICZαA (Invitrogen) e digestão de ambos com as enzimas *BglII* e *BamHI*, eles foram utilizados numa reação de ligação. O produto obtido da reação foi o plasmídeo CMV-bGH/TEF1-ori (Figura 13), utilizado para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* Top 10.

Uma vez confirmada a clonagem por extração plasmidial e digestão enzimática com as enzimas *BglII* e *BspHI*, foi realizada a ligação da sequência pan-ARS no plasmídeo. Para isso, o plasmídeo CMV-bGH/TEF1-ori foi digerido com as enzimas de restrição *BspHI* e *BglII* e o produto da reação foi purificado utilizando o kit EasyPure® Purification PCR Kit (Transgen Biotech). O material obtido foi então ligado à sequência ARS purificada e previamente digerida com as mesmas enzimas utilizando T4 DNA ligase (Promega).

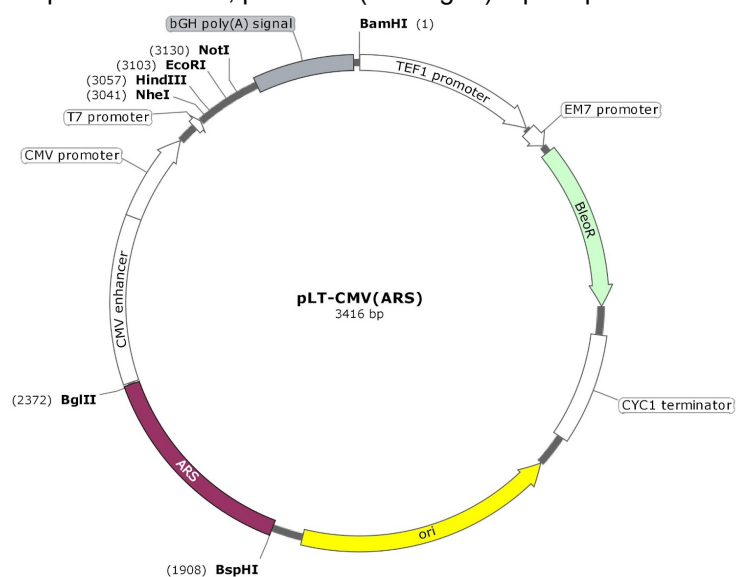
Figura 13 - Plasmídeo CMV-bGH/TEF1-ori obtido após ligação do cassete de expressão derivado do pVAX1Δ*Bam*HI com região do pPICZαA (Invitrogen).



Fonte: O autor (2025). Mapa vetorial criado no SnapGene®.

Após a ligação de todas as regiões, o vetor apto, denominado como pLT-CMV(ARS), a ser utilizado para a transformação das leveduras está exposto na Figura 14. O vetor foi utilizado para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* Top 10.

Figura 14 - Vetor pLT-CMV(ARS) obtido após ligação de regiões purificadas derivadas do pVAX1Δ*Bam*HI, pPICZαA (Invitrogen) e pUC-pan-ARS.



Fonte: O autor (2025). Mapa vetorial criado no SnapGene®.

4.2.3 Clonagem da Sequência Multiepítopo EnvNS1 no Vetor Plasmidial pLT-CMV(ARS)

Confirmada a clonagem do vetor pLT-CMV(ARS) a partir de extração plasmidial e digestão enzimática, foi realizada a ligação da sequência multiepítopo no MCS do vetor. Para isso, foi realizada uma digestão enzimática com as enzimas *HindIII* e *EcoRI* em ambos. A sequência multiepítopo previamente amplificada e purificada foi obtida por PCR utilizando os *primers* PF_{Env} e PR_{NS1}, os quais inseriram à sequência sítios de restrição iniciais para *HindIII* e *BamHI* e sítios finais para *EcoRI* e *XbaI* (Tabela 10).

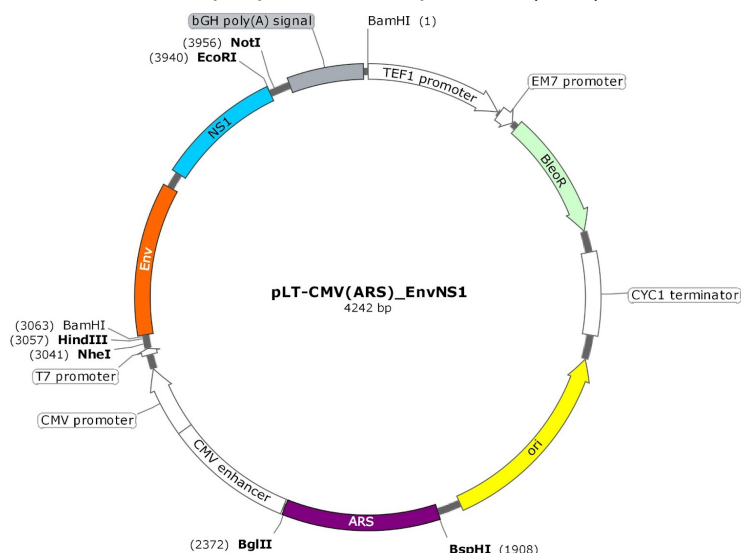
Tabela 10 - Sítios de restrição inseridos nos *primers* para amplificação da sequência multiepítopo. Em vermelho, sítio para *HindIII*, em verde, sítio para *BamHI*, em cinza, sítio para *XbaI* e em azul, sítio para *EcoRI*.

Primers	Sequência
PF _{Env}	AAGCTT GGATC ATCATGGCGCTGGATAAACAGTC
PR _{NS1}	TCTAGAG GAATTC TTAATAAGCAGCCAACTCTTCAG

Fonte: O autor (2025).

Para o vetor, os sítios de restrição estavam presentes no MCS (Figura 14). Após digestão, foi realizada uma eletroforese para observar a linearização do vetor e integridade da sequência EnvNS1. Uma vez confirmada a digestão do vetor e integridade da sequência, foram realizadas purificações dos produtos das digestões utilizando o kit EasyPure® Purification PCR Kit (Transgen Biotech). Em seguida, a sequência purificada, assim como o vetor, foram ligados com T4 DNA ligase (Promega) e a construção (Figura 15) foi utilizada para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* Top 10. A confirmação da clonagem se deu por meio de extração plasmidial seguida de digestão enzimática com as enzimas *NheI* e *NotI* para observar padrões de banda.

Figura 15 - Plasmídeo recombinante pLT-CMV(ARS)_EnvNS1 resultante após ligação da sequência multiépítipo com vetor pLT-CMV(ARS).



Fonte: O autor (2025). Mapa vetorial criado no SnapGene®.

4.2.4 Obtenção das Leveduras Recombinantes

4.2.4.1 Transformação das Leveduras

Uma vez confirmada a clonagem do vetor recombinante, a levedura *Pichia pastoris* da linhagem GS115 foi utilizada para carrear o plasmídeo vacinal e o vetor vazio (controle) a partir de transformação por eletroporação. Para obtenção do plasmídeo recombinante e do vetor vazio foi realizada uma extração Maxiprep utilizando o kit PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit (Invitrogen™) seguindo recomendações do fabricante.

Para a preparação das leveduras para a eletroporação seguiu-se o seguinte protocolo: células criopreservadas da linhagem GS115 foram inoculadas em 5 mL de meio YPD e cultivadas a 28°C por 18h sob agitação de 250 RPM. Em seguida, foram utilizados 250 µL dessa pré-cultura para fazer inóculo em 200 mL de meio YPD e foi feito o cultivo até a cultura atingir a densidade óptica de 1.3 - 1.5 em 600 nm. Após o cultivo, as células foram centrifugadas a 1500 g por 5 minutos a 4° C, seguido de lavagem em 50 mL de água estéril gelada, ressuspensão em 10 mL de sorbitol 1M gelado, centrifugação final e ressuspensão final em 0,5 mL de sorbitol 1M gelado.

Para a eletroporação, 80 µL células de levedura competentes foram misturadas com 2 µL do vetor pLT-CMV(ARS)_EnvNS1 (2.6 µg de DNA), enquanto

que para o grupo controle foi utilizado 2 µL do vetor pLT-CMV(ARS) (1.6 µg de DNA). Foi adicionado 320 µL de sorbitol 1M gelado na mistura, seguido da transferência do material para uma cubeta de eletroporação (0.4 cm), a qual foi acoplada no eletroporador (ECM® 399 Electroporation System, BTX™) e submetida a um pulso elétrico de 1500 V por 5 ms. Imediatamente após o pulso, foi adicionado à cubeta 1 mL de sorbitol 1M e a mistura foi transferida para um tubo cônico tipo Falcon (15 mL) seguido da adição de 1 mL de meio YPD e incubação a 29°C por 1h antes do semeio em placas de YPD com Zeocina (100 µg/mL). Como controle negativo foram utilizadas células GS115 eletroporadas sem plasmídeo. As colônias resistentes ao antibiótico foram repicadas em nova placa de YPD + Zeocina.

4.2.4.2 Confirmação das Leveduras Transformantes

Para confirmar a transformação das leveduras com os plasmídeos, foi realizada uma extração de DNA plasmidial das colônias repicadas e crescidas em meio YPD + Zeocina. O protocolo seguido para a extração foi o seguinte: colônias frescas foram inoculadas em 2 mL de meio YPD + Zeocina até atingirem uma D.O.₆₀₀ = 1.3. Em seguida, foi realizada uma centrifugação da cultura a 16000 g por 5 minutos e o sedimento celular obtido foi lavado com 1 mL de água estéril. Foi realizada uma nova centrifugação e o pellet obtido foi ressuspensionado em 200 µL de tampão de lise (Triton X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100mM, Tris-HCl (pH8,0) 10mM e EDTA) (pH 8,0) 1mM), adicionado de uma mistura de fenol:clorofórmio: álcool isoamílico PCI 25:24:1 e 300 mg de pérolas de vidro. A mistura foi agitada em vórtex por 5 minutos e centrifugada em seguida a 16000 g por 1 minuto. Após a centrifugação, 100 µL da fase aquosa obtida foi transferida para um microtubo e o mesmo volume de isopropanol foi adicionado, seguido de mistura por inversão. Em seguida, a mistura foi centrifugada novamente a 16000 g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 75% gelado. Após nova centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi posto na estufa a 37°C até secar. Após seco, o precipitado foi suspenso em 50 µL de água livre de nuclease. Após a extração, foi realizada uma eletroforese seguida de

quantificação da amostra e a confirmação do carreamento se deu por meio de PCR a partir da amplificação do gene multiepítipo.

4.2.5 Análises imunológicas *in vitro*

4.2.5.1 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs)

Com o objetivo de avaliar a imunogenicidade das leveduras, foi realizado um co-cultivo de células mononucleares de sangue periférico.

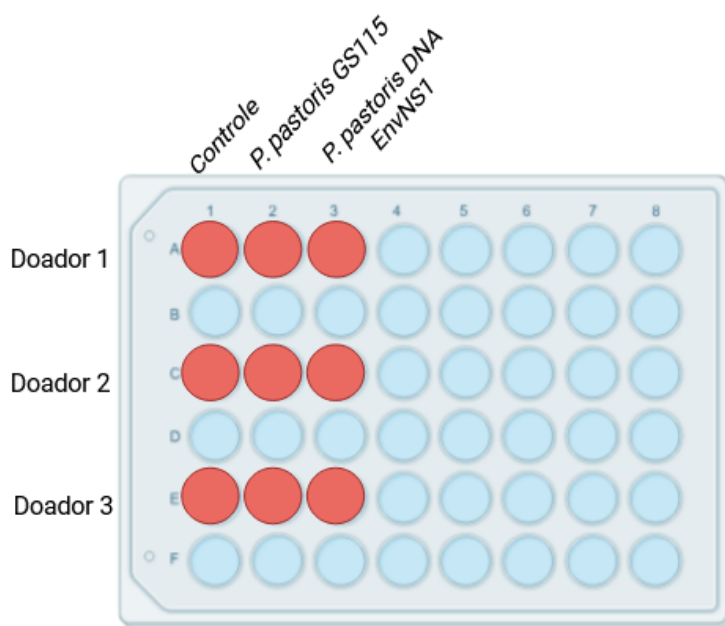
Para a obtenção das PBMCs, cerca de 8 mL de sangue de 3 doadores saudáveis foram coletados em tubos contendo EDTA. Em uma cabine de fluxo laminar, 4 mL de sangue foram realocados em tubo falcon de 15 mL e misturados na proporção 1:1 com solução salina balanceada por inversão. Em seguida, cuidadosamente foi adicionado 3 mL de Ficoll-paque™ PLUS (Cytiva) para não misturar e o tubo foi centrifugado a 400 g por 40 minutos com configuração sem freio após o término. Após essa etapa, formou-se um gradiente de plasma, células mononucleares, Ficoll e hemácias. Com o auxílio de uma pipeta pasteur, a camada de células mononucleares foi retirada e transferida para um novo tubo falcon, e seguiu-se para ressuspensão das mesmas com 3 volumes de solução salina. Foi realizada uma nova centrifugação a 400 g por 15 minutos, o sobrenadante obtido foi descartado e houve uma outra ressuspensão das PBMCs com 6 mL de solução salina. Em seguida foi realizada uma centrifugação final a 400 g por 10 minutos, seguido do descarte do sobrenadante e ressuspensão das células em 1 mL de meio RPMI. Para a contagem das células, 10 µL da ressuspensão foi misturada a 90 µL de solução de azul de Trypan 0,4% e cerca de 10 µL da mistura foi pipetada em uma lâmina reutilizável para contador automático de células Countess 3 Automated Cell Counter (Invitrogen). O cálculo utilizado pelo equipamento para padronizar o número de células segue abaixo:

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

4.2.5.2 Co-cultivo de PBMCs com leveduras

Após a obtenção das células mononucleares, elas foram cultivadas em placas de 48 poços a 37° C e CO₂ 5% numa concentração de 1 x 10⁵ células/poço. Foram estabelecidos 3 grupos experimentais como descrito na Figura 16. As leveduras utilizadas no experimento foram cultivadas por 48h, lavadas e ressuspensas em PBS 1x. As leveduras foram co-cultivadas numa concentração de 1 x 10⁵ célula por poço. Foram utilizadas duas placas de 48 poços, uma para período de cultura de 24h e outra para 48h. Após o período de incubação, o material dos poços foi coletado em microtubos, centrifugado a 10000 g por 5 minutos e o sobrenadante foi armazenado em microtubos novos a -20°C para análises posteriores de Cytometric Bead Array (CBA). Para o CBA, foi utilizado o BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit e a análise foi realizada em citômetro de fluxo utilizando o citômetro BD Accuri™ C6 Plus e o software BD Accuri C6 software. Para montagem de gráficos e análises estatísticas foi utilizado o software GraphPad Prism 10 para.

Figura 16 - Co-cultivo de PBMCs e leveduras. Controle - Células mononucleares de sangue periférico sem estímulo; *P. pastoris* GS115 - Levedura não recombinante; *P. pastoris* DNA EnvNS1 - Levedura recombinante carregando o plasmídeo vacinal.



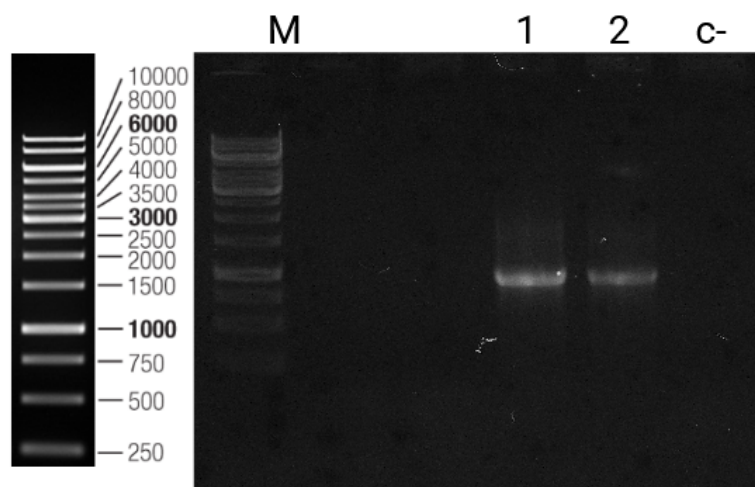
Fonte: O autor (2025).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AMPLIFICAÇÃO DO MULTIEPÍTOPO EnvNS1

A amplificação de sequências multiepítopos foi confirmada a partir de eletroforese em gel de agarose, onde foi possível observar bandas correspondentes aos genes (Figura 17). É possível identificar a banda correspondente à sequência EnvNS1, com o tamanho esperado de 858 pb, localizada nas amostras 1 e 2. Essa banda, quando comparada ao marcador, está posicionada entre as marcas de 750 pb e 1000pb confirmando sua presença e tamanho esperado.

Figura 17 - Amplificações do gene multiepítopo EnvNS1. M - Marcador de peso molecular (1Kb) GeneRuler DNA Ladder (Thermo Scientific™); 1 e 2 - Amplificações do gene multiepítopo EnvNS1, com tamanho de 858 pb.

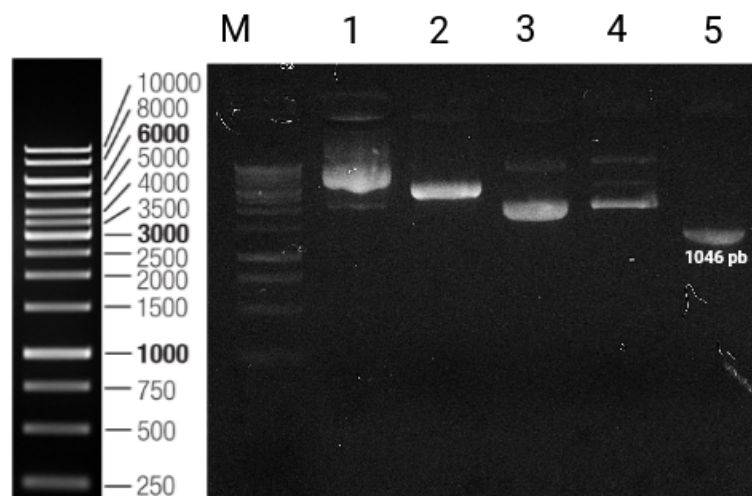


Fonte: O autor (2025).

5.2 OBTENÇÃO DO VETOR pVAX1 Δ BamHI POR MUTAÇÃO SÍTIO DIRIGIDA E AMPLIFICAÇÃO DO CASSETE DE EXPRESSÃO

O cassete de expressão utilizado na construção do vetor vacinal é derivado do plasmídeo pVAX1 Δ BamHI, o qual é uma modificação do vetor pVAX1 (Invitrogen), diferenciando deste por não conter um sítio de restrição para *Bam*HI no MCS. A Figura 18 apresenta os resultados de cada etapa a partir de eletroforese em gel de agarose.

Figura 18 - Etapas do processo de mutação sítio dirigida no MCS do pVAX1. M - Marcador de peso molecular (1Kb) GeneRuler DNA Ladder (Thermo Scientific™); 1 - Extração plasmidial do vetor pVAX1; 2 - Digestão do vetor com a enzima *Bam*HI; 3 - Extração do vetor pVAX1Δ*Bam*HI; 4 - Digestão do vetor com *Bam*HI; 5 - Amplificação do cassete de expressão sem sítio de restrição para *Bam*HI com tamanho esperado de 1046 pb.



Fonte: O autor (2015).

A confirmação do êxito nesta etapa está evidenciado na amostra 4, a qual está relacionada à digestão do produto de extração do vetor pVAX1Δ*Bam*HI com a enzima *Bam*HI, que demonstra o mesmo padrão de extração da amostra 3.

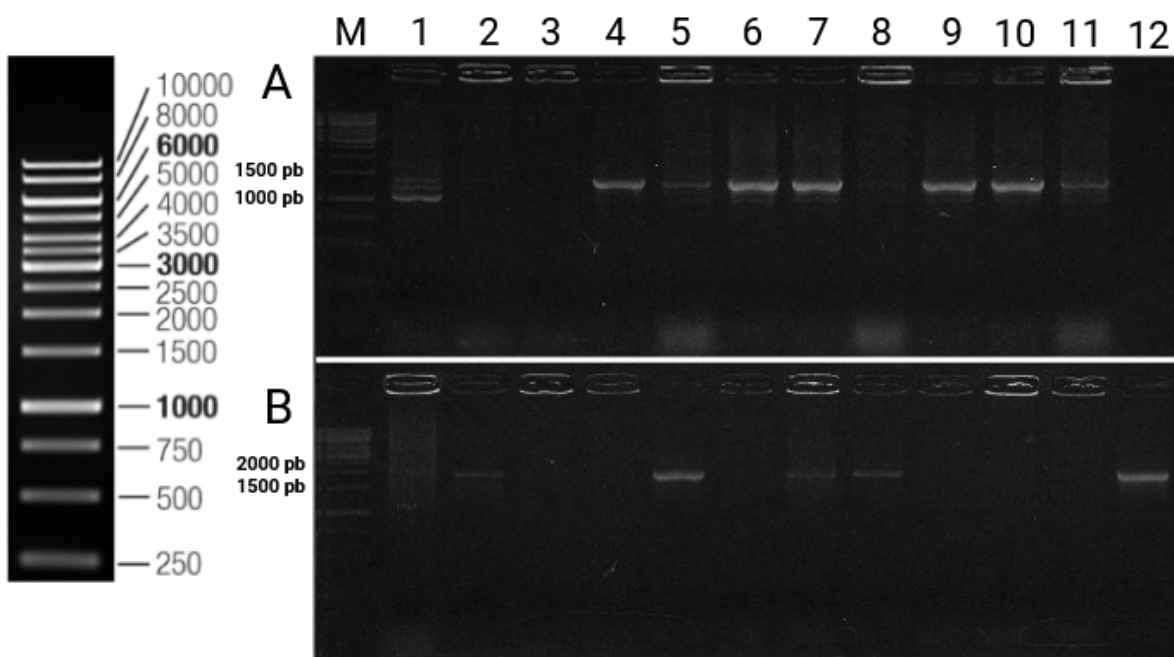
Essa etapa foi imprescindível para obtenção do vetor vacinal pLT-CMV(ARS), uma vez que seria necessária uma digestão com a enzima *Bam*HI para formação de uma extremidade coesiva que permitisse a ligação do cassete de expressão com a região derivada do pPICZαA (Invitrogen). A presença deste sítio no MCS causaria digestões indesejadas e consequentemente ligações incorretas. É importante ressaltar que essa mutação não alterou a integridade do vetor, como observado na amostra 5 (Figura 18) e nem a sua função, pois não ocasionou modificações em regiões importantes para a expressão gênica como o promotor CMV e cauda poly(A) bGH.

5.3 CLONAGEM DOS AMPLICONS NO VETOR pGEM-T-Easy E DIGESTÕES ENZIMÁTICAS

Com o objetivo de facilitar a manipulação dos amplicons relacionados às regiões do vetor pLT-CMV(ARS), eles foram ligados ao vetor de clonagem pGEM-T-Easy com T4 DNA ligase (Promega) e as construções foram utilizadas para

transformação de células quimiocompetentes de *E. coli* Top 10. Para confirmação de clones, foram realizadas PCR de colônia (Figura 19) seguida de extração e digestão enzimática.

Figura 19 - PCR de colônias transformadas com construções pGEM-T-Easy + amplicons. M - Marcador de peso molecular (1Kb) GeneRuler DNA Ladder (Thermo Scientific™); A - PCR de colônias transformadas com pGEM e cassete de expressão (1046 pb), a qual evidencia presença de clones em 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11; B - PCR de colônias transformadas com pGEM e região derivada do pPICZαA (Invitrogen) (1913 pb), a qual evidencia transformantes em 2, 5, 7, 8 e 12.



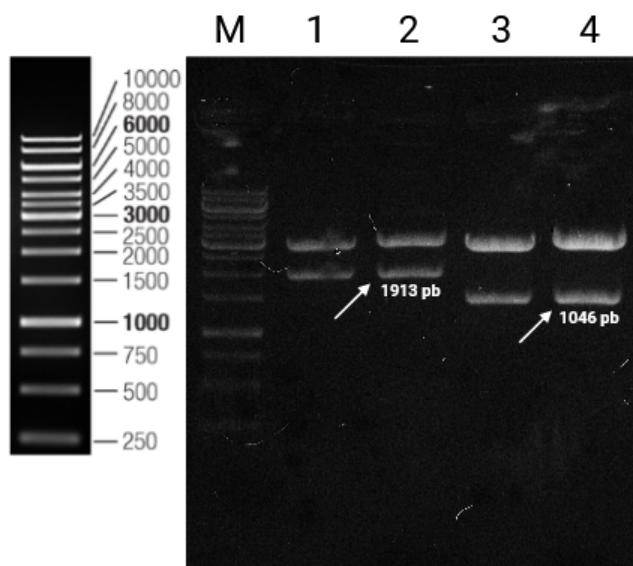
Fonte: O autor (2025).

Como observado, foram obtidos clones transformantes com o cassete de expressão derivado do pVAX1Δ*Bam*HI (Figura 19. A) e com a região contendo marcador de seleção do pPICZαA (Invitrogen) (Figura 19. B). As bandas relacionadas à amplificação do cassete de expressão (1046 pb) apresentam-se entre as bandas de 1000 pb e 1500 pb do marcador (1Kb), o que evidencia a correta amplificação da sequência e presença nas colônias. Já as bandas relacionadas à região derivada do pPICZαA (Invitrogen) (1913 pb) se mostram entre as bandas de 1500pb e 2000pb do marcador, o que confirma, também, o êxito na amplificação da sequência.

A colônia 10-A foi utilizada para a extração do plasmídeo contendo o cassete de expressão, enquanto a colônia 12-B foi escolhida para a extração do plasmídeo contendo a região derivada do pPICZαA (Invitrogen). Após a extrações, foram

realizadas digestões enzimáticas (Figura 20) para obtenção das sequências específicas necessárias para a montagem do vetor vacinal.

Figura 20 - Digestões de construções pGEM-T-Easy + amplicons. M - Marcador de peso molecular (1Kb) GeneRuler DNA Ladder (Thermo Scientific™); 2 - Digestão de construção pGEM-T-Easy + região derivada do pPICZαA (Invitrogen) com *Bam*HI e *Bgl*II; 4 - Digestão de construção pGEM-T-Easy + cassete de expressão com *Bam*HI e *Bgl*II. Setas - Bandas purificadas a partir do gel de agarose para posterior ligação, sendo a da amostra 2 relacionada à região derivada do vetor pPICZαA (Invitrogen) (1913 pb) e em 4 o cassete de expressão (1046 pb).



Fonte: O autor (2025).

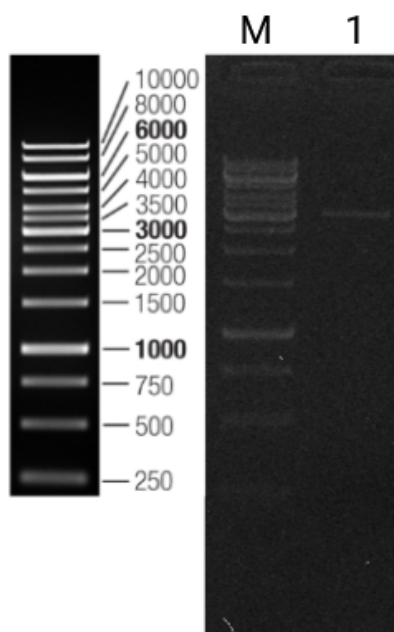
Como observado na Figura 20, as regiões amplificadas foram liberadas do vetor pGEM-T-Easy (3Kb) após digestões utilizando as enzimas descritas anteriormente. As bandas relacionadas à região derivada do pPICZαA (Invitrogen) (1913 pb) aparecem nas amostras 1 e 2 (Figura 20) entre as bandas relacionadas a 1500 pb e 2000 pb do marcador de peso molecular (1Kb), já as relacionadas ao cassete de expressão (1046 pb) aparecem nas amostras 3 e 4 (Figura 20) entre as bandas relacionadas a 1000 pb e 1500 pb do marcador.

As bandas apontadas pelas setas, ambas digeridas com *Bam*HI e *Bgl*II, foram utilizadas para purificação a partir do gel de agarose e os produtos obtidos desta etapa foram ligados com T4 DNA ligase (Promega).

5.4 LIGAÇÃO DE SEQUÊNCIAS OBTIDAS PARA OBTENÇÃO DE VETOR VACINAL

Após a purificação das sequências digeridas pelas enzimas *Bam*HI e *Bgl*II, elas foram ligadas usando T4 DNA ligase (Promega) e a construção (CMV-bGH/TEF1-ori) foi utilizada para transformação de células quimiocompetentes de *E. coli* Top 10. Para confirmação da construção, foi realizada uma extração e posterior digestão com as enzimas *Bgl*II e *Bsp*HI, o que deixaria, também, o vetor apto à ligação com a sequência ARS (Figura 21).

Figura 21 - Digestão da construção CMV-bGH/TEF1-ori com as enzimas *Bgl*II e *Bsp*HI para posterior inserção da sequência panARS. M - Marcador de peso molecular (1Kb) GeneRuler DNA Ladder (Thermo Scientific™); 1 - Amostra relacionada à digestão, a qual evidencia uma banda de tamanho relacionado à soma das duas sequências (~3Kb).



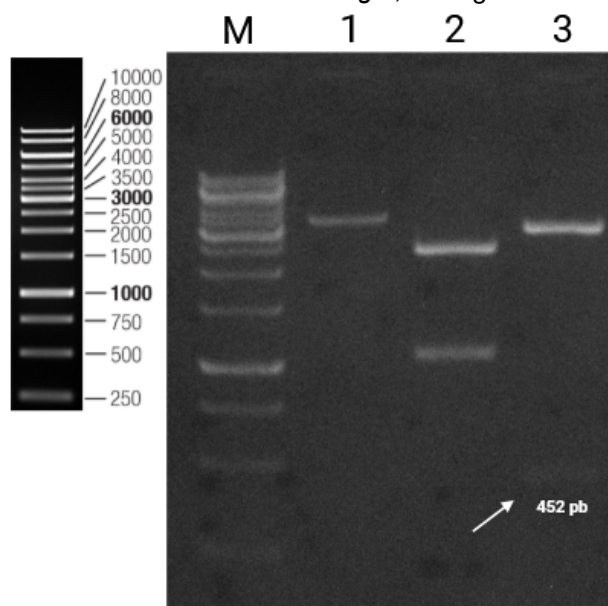
Fonte: O autor (2025).

Após a extração e digestão da construção CMV-bGH/TEF1-ori (Figura 13), foi possível observar no gel uma banda com tamanho de ~3Kb, tamanho esperado após ligação das sequências. Uma vez confirmada a obtenção da construção, ela foi purificada a partir da reação enzimática e armazenada a -20°C até o momento de ligação com a região ARS.

A região ARS utilizada neste trabalho é derivada de uma construção pUC57_PAN-ARS, construída pela GeneOne Biotech. O plasmídeo em questão possui 3.1 kB e gene de resistência à ampicilina. A sequência ARS é flanqueada com sítios de restrição para *Bsp*HI e *Bgl*II e foi digerida e purificada antes de ser utilizada em uma reação de ligação com a sequência CMV-bGH/TEF1/ori previamente digerida com as mesmas enzimas. A reação foi então utilizada para a

transformação de células quimiocompetentes de *E. coli* Top 10. Para confirmação da construção foi realizada uma extração plasmidial seguida de digestões enzimáticas (Figura 22).

Figura 22 - Confirmação da da construção do vetor vacinal pLT-CMV(ARS). M - Marcador de peso molecular (1Kb) GeneRuler DNA Ladder (Thermo Scientific™). 1 - Digestão do pLT-CMV(ARS) com a enzima *NheI*; 2 - Digestão do vetor com *BamHI* e *BglII*; 3 - Digestão de vetor com *BglII* e *BspHI*.



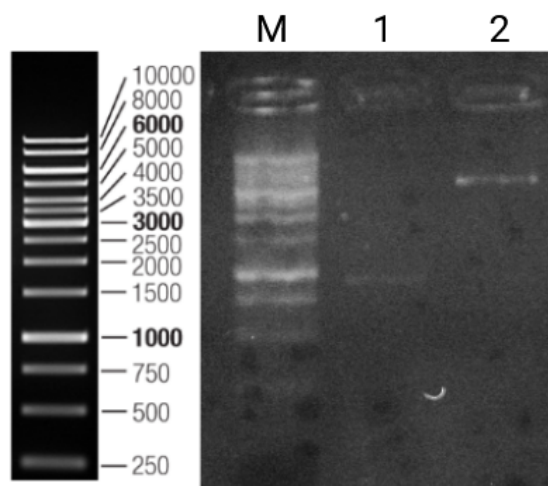
Fonte: O autor (2025)

Como observado na Figura 22, a digestão com *NheI* (amostra 1) foi capaz de linearizar o vetor e evidenciou a formação de uma banda de tamanho de ~3.4Kb, tamanho esperado após a ligação de todas as sequências. A amostra 2 é a reação de digestão do vetor vacinal com *BglII* e *BamHI*, a qual evidencia a presença do cassete de expressão, com tamanho de 1046 pb e a região derivada do pPICZαA (Invitrogen) ligada à sequência ARS, com tamanho de ~2.3 Kb. Já na amostra 3, o vetor foi digerido com as enzimas *BspHI* e *BglII*, a qual aponta a presença da sequência ARS de 452 pb (seta) e a região CMV-bGH/TEF1-ori de ~3Kb. Essas digestões confirmaram a construção do vetor vacinal, apto a ser usado nas etapas posteriores.

5.5 OBTENÇÃO DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE pLT-CMV(ARS)_EnvNS1

Uma vez obtido o vetor vacinal e a sequência multiepítopo EnvNS1, foram realizados experimentos para obtenção do vetor recombinante pLT-CMV(ARS)_EnvNS1. A princípio, tanto o vetor quanto a sequência multiepítopo previamente purificada foram digeridos com as enzimas *HindIII* e *EcoRI* (Figura 23). Uma alíquota da reação foi utilizada para verificar a integridade da sequência EnvNS1 e confirmação da digestão do vetor.

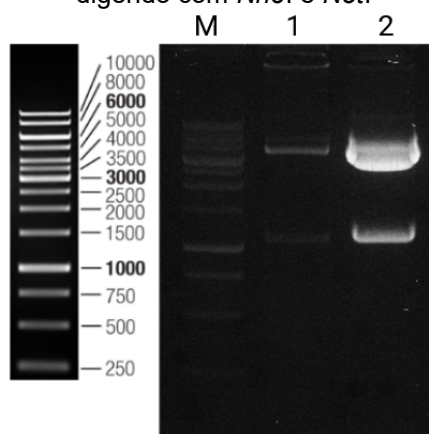
Figura 23 - Digestões do vetor pLT-CMV(ARS) e sequência EnvNS1 com as enzimas *HindIII* e *EcoRI*. M - Marcador de peso molecular (1Kb) GeneRuler DNA Ladder (Thermo Scientific™); 1 - Amostra relacionada à sequência EnvNS1 (858 pb) digerida com as enzimas, a qual evidencia a sua integridade; 2 - Digestão do vetor (3416 pb) com as enzimas, a qual evidencia a linearização do mesmo.



Fonte: O autor (2025)

A etapa seguinte compreendeu a purificação de ambas as sequências seguida de uma reação de ligação. O sucesso da ligação foi avaliado a partir de uma extração plasmidial seguida de digestão dupla utilizando as enzimas *NheI* e *NotI* (Figura 24).

Figura 24 - Digestão dupla do plasmídeo pLT-CMV(ARS)_EnvNS1 com *NheI* e *NotI*. M - Marcador de peso molecular (1Kb) GeneRuler DNA Ladder (Thermo Scientific™); 1 - Digestão de um outro vetor construído pelo grupo de pesquisa ligado ao multiepítipo EnvNS1; 2 - Vetor pLT-CMV(ARS)_EnvNS1 digerido com *NheI* e *NotI*



Fonte: O autor (2025).

Como observado na amostra 2, referente à digestão do vetor recombinante pLT-CMV(ARS)_EnvNS1 com as enzimas *NheI* e *NotI*, nota-se uma banda na altura aproximada de 1Kb referente ao marcador de peso molecular. Ao digerir o vetor recombinante com *NheI* e *NotI*, o inserto (EnvNS1) apresenta cerca de ~915 pb devido a adição de nucleotídeos flanqueados na sequência até os sítios de restrição para as enzimas em questão (Figura 15). Isso demonstra que a digestão enzimática ocorreu com êxito e que a sequência está contida no vetor vacinal, o que permitiu a próxima etapa do projeto, as transformações das leveduras.

5.6 CONFIRMAÇÃO DAS LEVEDURAS RECOMBINANTES

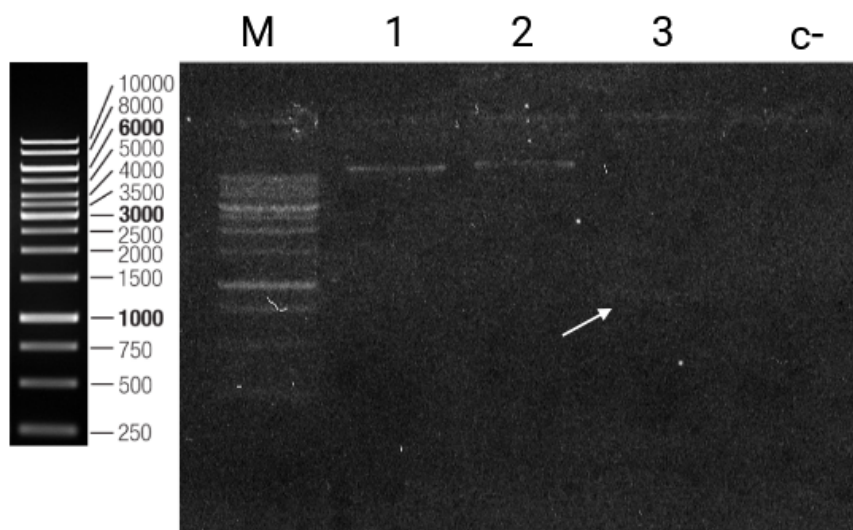
A levedura utilizada neste trabalho foi a *Pichia pastoris* GS115. Essa levedura é bastante utilizada para produção de proteínas recombinantes, sobretudo, se apresenta como interessante biofábrica para a expressão de vacinas de subunidade (Karbalaei, Rezaee e Farsiani, 2020). Alguns estudos já avaliaram a capacidade de produção de antígenos virais recombinantes pela levedura. Kaushik *et al.* (2016) produziram o antígeno EDIII do vírus da Dengue com eficiente capacidade de produzir anticorpos neutralizantes. Bazan *et al.* (2009) conseguiram desenvolver VLPs baseados na proteína L1 do capsídeo viral do HPV 16. Já Silva *et al.* (2023) avaliou o uso da *Pichia pastoris* carreando os mesmos antígenos vacinais do ZIKV do presente estudo ancorado na parede celular da levedura, onde foi

observado ativação de linfócitos T CD4+ e T CD8+, produção de citocinas efetoras e imunoglobulinas em modelo murino.

Aqui, demonstramos uma nova aplicabilidade da levedura *Pichia pastoris*, referente à utilização da mesma como carreadora antigênica para uma vacina de DNA contendo epítomos das proteínas do envelope e NS1 do ZIKV.

Neste estudo, a levedura *Pichia pastoris* GS115 foi utilizada para carrear o plasmídeo recombinante pLT-CMV(ARS)_EnvNS1. Para a transformação das leveduras com o plasmídeo, foi utilizada eletroporação. Foram consideradas transformantes as leveduras que cresceram em meio contendo Zeocina, antibiótico relacionado ao marcador de seleção presente no vetor. Foi realizado um repique da colônia crescida e para análise de carregamento foi realizada uma extração plasmidial seguida de PCR para amplificação do gene EnvNS1 (Figura 25).

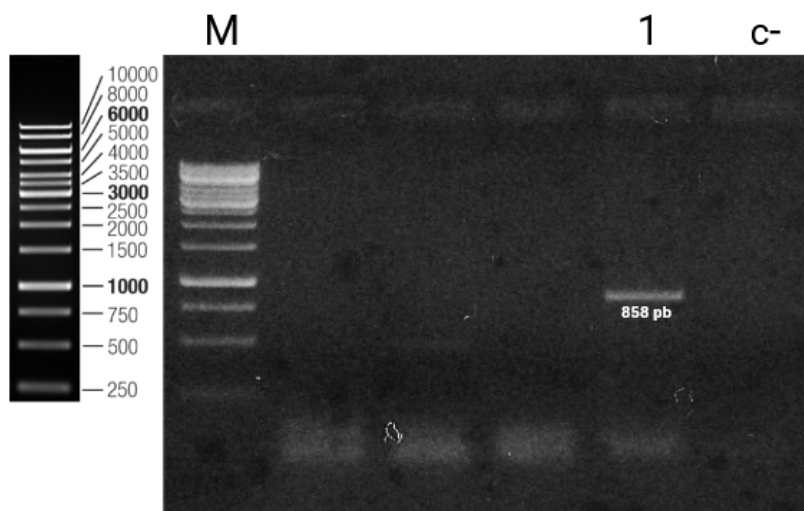
Figura 25 - Extração plasmidial de leveduras carreando o vetor vacinal recombinante pLT-CMV(ARS)_EnvNS1 e pLT-CMV(ARS). M - Marcador de peso molecular (1Kb) GeneRuler DNA Ladder (Thermo Scientific™); 1 - Extração plasmidial do vetor pLT-CMV(ARS)_EnvNS1; 2 - Extração plasmidial do vetor pLT-CMV(ARS); 3 - Amplificação por PCR do gene EnvNS1 (858 pb).



Fonte: O autor (2025).

Como observado na Figura 25, é possível observar bandas nas amostras 1 e 2 relacionadas à extração plasmidial e uma discreta banda na amostra 3 relacionada à amplificação do gene EnvNS1. Após a amplificação, foi realizada uma nova PCR com o produto da reação anterior (amostra 3) para que fosse possível observar de uma melhor forma o carregamento (Figura 26).

Figura 26 - Amplificação de PCR anterior para nova amplificação do gene EnvNS1; M - Marcador de peso molecular (1Kb) GeneRuler DNA Ladder (Thermo Scientific™); 1 - Amplificação do gene EnvNS1 a partir de reação de PCR anterior evidenciada na figura 26.



Fonte: O autor (2025).

Uma possível razão para a baixa eficiência da amplificação por PCR pode ter sido a técnica utilizada para transformar as leveduras. Todos os trabalhos citados neste estudo, relacionados à transformação de leveduras com plasmídeos, empregaram protocolos baseados no uso de acetato de lítio para tal finalidade e a levedura avaliada foi a *Saccharomyces cerevisiae* (Han *et al.*, 2019; Zakria *et al.*, 2019; Kiflmarim, Yang e Zhang, 2013; Walch *et al.*, 2011). Ito *et al.* (1982) estudaram a influência de cátions alcalinos no processo de transformação de leveduras com plasmídeos de DNA. Foi observado que a utilização do acetato de lítio, nitrato de lítio e sulfato de lítio renderam uma maior quantidade de leveduras transformantes (~4.000) a cada 10 µg de plasmídeo. Em seguida, se sucederam as transformações com cloreto de lítio (2.300 transformantes/10 µg de DNA), cloreto de cério (590 transformantes/10 µg de DNA) e cloreto de sódio (540 transformantes/10 µg de DNA). Embora o protocolo utilizado neste trabalho não tenha empregado cátions alcalinos e apresente diferenças metodológicas em relação ao descrito por Ito *et al.*, é possível observar a influência dos cátions alcalinos e da concentração de DNA no sucesso da transformação. Neste trabalho, foi utilizado 1.6 - 2.6 µg de DNA.

O protocolo utilizado neste estudo foi adaptado de Rosenfeld (1999) e consiste em eletroporação com proteção osmótica de sorbitol sem tratamento com cátions. Para *Pichia pastoris*, já foi descrito que o pré tratamento com acetato de lítio e ditioneitol (DTT) antes do pulso elétrico da eletroporação aumenta a eficiência de

transformação em 150x em comparação com o não tratamento (Wo e Letchworth, 2004). Este pré tratamento descrito poderá ser incluído em experimentações futuras do presente trabalho a fim de melhorar a eficiência da transformação das leveduras. Além desse, outro método descrito por Cregg *et al.* (1985) para a transformação de *Pichia pastoris* envolve um pré-tratamento enzimático com zimoliase visando degradar a parede celular e gerar esferoplastos, seguido de sonicação das células sem parede celular na presença de plasmídeos de DNA. O motivo pela qual a eficiência da eletroporação sozinha seja baixo para a transformação de leveduras pode ser explicado pela parede celular composta de quitina, quitosanas e outros glucanos, os quais oferecem mais resistência a um fenômeno denominado ruptura elétrica reversível (REB), que induz poros na membrana celular após o pulso elétrico e sem esse efeito, há a dificuldade de entrada de material exógeno na célula (Rivera *et al.*, 2014).

5.7 ANÁLISES IMUNOLÓGICAS *IN VITRO*

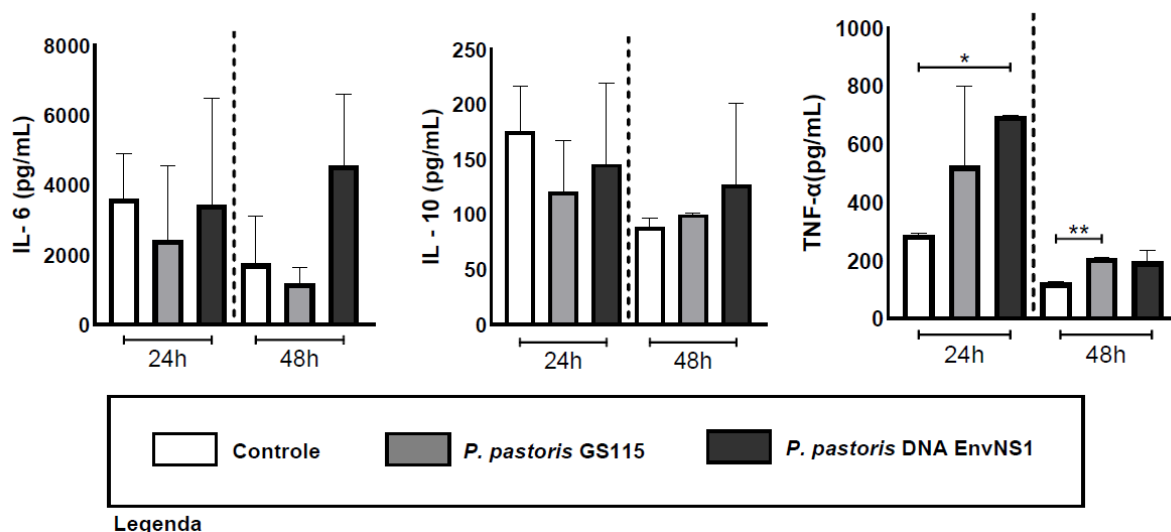
Algumas características da levedura como imunogenicidade intrínseca, reforçam a possibilidade de utilização da mesma como imunobiológico. Bazan *et al.* (2018) avaliaram a capacidade da *Pichia pastoris* GS115 de ativar células dendríticas frente a outras espécies de levedura. Foi observado que a incubação da levedura com células dendríticas imaturas foi capaz de aumentar a expressão do marcador de maturação CD83+, o marcador coestimulatório CD80 e moléculas de apresentação de antígenos HLA I e HLA II em comparação com outras espécies, como *S. cerevisiae*, *Sz. pombe*, *K. lactis*, *H. polimorpha*, *Y. lipolytica* e *C. glabrata*. Aqui, foi avaliada a capacidade da levedura *Pichia pastoris* GS115 não recombinante, bem como da levedura carreando o plasmídeo vacinal pLT-CMV(ARS)_EnvNS1, de estimular células mononucleares do sangue periférico, analisando-se as citocinas liberadas por essas células. Foram avaliadas as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN e TNF- α a partir de sobrenadantes de co-culturas de 24 e 48h.

A análise por citometria revelou que a levedura recombinante carreando o plasmídeo vacinal estimulou a secreção da citocina TNF- α por PBMCs em níveis significativamente superiores após 24 horas, em comparação ao grupo controle. (Figura 27). Um efeito semelhante foi observado em um estudo do grupo em que foi avaliado o antígeno EnvNS1 carreado na parede da levedura *Pichia pastoris* quando

incubado com esplenócitos de camundongos (Silva *et al.*, 2021). Nesse estudo, os níveis de TNF- α foram aproximadamente cinco vezes maiores em relação ao grupo controle após 24 horas de incubação, com um aumento ainda mais expressivo após 48 horas, em contraste com os achados do presente trabalho. A TNF- α é uma citocina pleiotrópica conhecida por sua atividade contra patógenos virais, bacterianos, fúngicos e parasitários e está associada à ativação de células T CD4 e T CD8, além de atuar como mediador pró-inflamatório (Mehta, Gracias e Croft, 2019; Akdis *et al.*, 2016).

Neste estudo, foi observado uma tendência de aumento nos níveis das citocinas IL-6 (interleucina 6) e IL-10 (interleucina 10). No estudo do grupo utilizando a proteína EnvNS1 ancorada na parede da levedura, os níveis das interleucinas IL-6 e IL-10 apresentaram aumentos significativos após 48 horas de co-cultivo, com elevações de cerca de três e seis vezes, respectivamente, em comparação ao controle. É importante ressaltar que há diferenças entre ambos os trabalhos, como os modelos experimentais (esplenócitos de camundongos x PBMCs humanas), a apresentação do antígeno e condições de co-cultivo. Além disso, apesar de não ser observada significância estatística, a tendência de aumento das interleucinas IL-6 e IL-10 neste estudo sugere um possível estímulo imunológico que poderia ser melhor observado em um maior tempo de co-cultivo. A interleucina 6 é uma citocina pleiotrópica capaz de atuar como fator de crescimento para células B, ao promover sua maturação e diferenciação em células plasmáticas, estimular a produção de IgG e pode agir em sinergia com IL-7 e IL-15 para aumentar a diferenciação de células T e sua capacidade citolítica (Grebenciucova e VanHaerents, 2023). Já a IL-10, atua modulando a produção de citocinas e quimiocinas pró inflamatórias e regulam a expressão de moléculas do MHC I e II em células apresentadoras de antígenos (Richter *et al.*, 2013).

Figura 27 - Análise de citometria de fluxo de sobrenadante de co-cultura para as citocinas IL-6, IL-10 e TNF- α . Foi utilizado o teste ANOVA e foram aplicadas comparações múltiplas pelo teste de Mann-Whitney para avaliar diferenças estatísticas entre os grupos. As amostras que apresentaram diferenças significativas estão indicadas com (*). * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$.



Fonte: O autor (2025).

Foi observado que citocinas como IL-6, IL-10 estão expressas em quantidades significativas na infecção aguda pelo ZIKV, assim como uma discreta aparição do TNF- α (Tappe *et al.*, 2015). Os resultados aqui sugerem que há um estímulo imunológico semelhante à infecção natural pelo vírus. Contudo, é necessária uma melhor avaliação de resposta imune, como perfil celular e produção de anticorpos para estimar o potencial profilático da vacina.

Apesar de a proteína E ser o principal alvo antigênico para o ZIKV, já foi visto que a adição da NS1 no construto vacinal pode melhorar significativamente a resposta protetora (Liu *et al.*, 2018; Kurup *et al.*, 2022). Em um estudo de Li *et al.* (2018) foi observado que esplenócitos de camundongos vacinados com um vírus recombinante da estomatite vesicular expressando as proteínas E e NS1 do ZIKV, quando estimulados com a proteína E, foram capazes de expressar quantidades significativas de IL-10 em comparação com esplenócitos de camundongos imunizados com o vírus expressando somente a proteína E.

Como visto no gráfico relacionado à secreção de TNF- α pelas PBMCs, a levedura não recombinante foi capaz de estimular a secreção desta citocina de forma significativa. Isto se deve à capacidade das moléculas de β -glucanos da parede da levedura estimular receptores do tipo Dectina-1 de macrófagos e ativar a

produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α (Goodridge, Wolf e Underhill; 2019).

Na tabela 11 estão expostas outras interleucinas dosadas no experimento em questão, mas que não apresentaram diferenças marcantes quando comparadas ao controle.

Tabela 11 - Perfil de secreção de citocinas das PBMCs após incubação com leveduras.

		Controle	<i>P. pastoris</i> GS115	<i>P. pastoris</i> DNA EnvNS1
IL-4	24h	371 $\pm$ 1.0	350 $\pm$ 4.8	344 $\pm$ 0.2
	48h	346 $\pm$ 1.5	373 $\pm$ 1.9	363 $\pm$ 27
IL-2	24h	157 $\pm$ 0.7	159 $\pm$ 4.5	157 $\pm$ 0.8
	48h	159 $\pm$ 2.3	157 $\pm$ 0.03	160 $\pm$ 4.4
IL-17	24h	134 $\pm$ 0.3	134 $\pm$ 1.2	133 $\pm$ 0.4
	48h	133 $\pm$ 0.1	134 $\pm$ 1.4	134 $\pm$ 1.8
IFN	24h	891 $\pm$ 81.5	884 $\pm$ 1.7	919 $\pm$ 46.5
	48h	831 $\pm$ 11.1	849 $\pm$ 11.3	861 $\pm$ 37.8

Fonte: O autor (2025).

6. CONCLUSÃO

Neste estudo, a levedura *Pichia pastoris* foi utilizada como carreadora de uma vacina de DNA contendo um gene sintético correspondente a regiões das proteínas do Envelope e NS1 do Zika vírus. O trabalho contribui para a ampliação do uso dessa levedura em estratégias de imunização e aumenta a versatilidade da mesma como ferramenta biotecnológica. Esse é um trabalho que descreve a utilização da levedura *Pichia pastoris* como carreadora de plasmídeo vacinal de forma inédita. Além disso, o vetor vacinal construído neste trabalho pode ser utilizado em construções vacinais visando a profilaxia de outros patógenos.

Os resultados indicam que a levedura recombinante estimulou de forma significativa a secreção da citocina pró-inflamatória TNF- α por PBMCs. Além disso, observou-se uma tendência de aumento para a secreção de interleucinas imunomoduladoras como IL-6 e IL-10. Contudo, outros experimentos são necessários para confirmar essa tendência e avaliar de uma melhor forma o potencial profilático desta plataforma vacinal, como avaliação da expressão do antígeno *in vitro*, direcionamento antigênico e futuros testes *in vivo*.

REFERÊNCIAS

AHMAD, M. et al. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 12, p. 5301–5317, jun. 2014.

AKDIS, M. et al. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β , and TNF- α : Receptors, functions, and roles in diseases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 138, n. 4, p. 984–1010, out. 2016.

ALEXANDER, E. Yeasts in nanotechnology-enabled oral vaccine and gene delivery. **Bioengineered**, v. 12, n. 1, p. 8325–8335, 1 jan. 2021.

AZZONI, A. R. et al. The impact of polyadenylation signals on plasmid nuclease-resistance and transgene expression. **The Journal of Gene Medicine**, v. 9, n. 5, p. 392–402, maio 2007.

BAGHBAN, R. et al. Yeast Expression Systems: Overview and Recent Advances. **Molecular Biotechnology**, v. 61, n. 5, p. 365–384, maio 2019.

BAZAN, S. B. et al. Maturation and cytokine pattern of human dendritic cells in response to different yeasts. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 207, n. 1, p. 75–81, fev. 2018.

BAZAN, S. B. et al. Uptake of various yeast genera by antigen-presenting cells and influence of subcellular antigen localization on the activation of ovalbumin-specific CD8 T lymphocytes. **Vaccine**, v. 29, n. 45, p. 8165–8173, out. 2011.

BERNARDO-MENEZES, L. C. et al. An overview of Zika virus genotypes and their infectivity. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 55, p. e0263-2022, 2022.

BERNATCHEZ, J. A. et al. Drugs for the Treatment of Zika Virus Infection. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, n. 2, p. 470–489, 23 jan. 2020.

BESNARD, M. et al. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 13, 3 abr. 2014.

BETANCUR, M. O. et al. Multicopy plasmid integration in *Komagataella phaffii* mediated by a defective auxotrophic marker. **Microbial Cell Factories**, v. 16, n. 1, p. 99, dez. 2017.

BHARDWAJ, U. et al. Gist of Zika Virus pathogenesis. **Virology**, v. 560, p. 86–95, ago. 2021.

BOYER, S. et al. An overview of mosquito vectors of Zika virus. **Microbes and Infection**, v. 20, n. 11–12, p. 646–660, dez. 2018.

CAMATTARI, A. et al. Characterization of a panARS-based episomal vector in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* for recombinant protein production and synthetic biology applications. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 139, dez. 2016.

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.

CHRISTIAN, K. M.; SONG, H.; MING, G. Pathophysiology and Mechanisms of Zika Virus Infection in the Nervous System. **Annual Review of Neuroscience**, v. 42, n. 1, p. 249–269, 8 jul. 2019.

COLT, S. et al. Transmission of Zika virus through breast milk and other breastfeeding-related bodily-fluids: A systematic review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 4, p. e0005528, 10 abr. 2017.

CREGG, J. M. et al. *Pichia pastoris* as a Host System for Transformations. **Molecular and Cellular Biology**, v. 5, n. 12, p. 3376–3385, 1 dez. 1985.

CRISANTO-LÓPEZ, I. E. et al. Congenital Zika syndrome. **Boletín Médico del Hospital Infantil de México**, v. 80, n. 1, p. 9780, 3 mar. 2023.

CULSHAW, A.; MONGKOLSAPAYA, J.; SCREATON, G. The immunology of Zika Virus. **F1000Research**, v. 7, p. 203, 19 fev. 2018.

DAI, L. et al. Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. **Cell Host e Microbe**, v. 19, n. 5, p. 696–704, maio 2016.

DE MOURA, I. A. et al. Enhancing the Effect of Nucleic Acid Vaccines in the Treatment of HPV-Related Cancers: An Overview of Delivery Systems. **Pathogens**, v. 11, n. 12, p. 1444, 30 nov. 2022.

DE SÁ MAGALHÃES, S.; KESHAVARZ-MOORE, E. *Pichia pastoris* (Komagataella phaffii) as a Cost-Effective Tool for Vaccine Production for Low- and Middle-Income Countries (LMICs). **Bioengineering**, v. 8, n. 9, p. 119, 31 ago. 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, n. 1, p. 121–135, 27 jan. 2019.

DUMAN-SCHEEL, M. *Saccharomyces cerevisiae* (Baker's Yeast) as an Interfering RNA Expression and Delivery System. **Current Drug Targets**, v. 20, n. 9, p. 942–952, 11 jun. 2019.

DUONG, V.; DUSSART, P.; BUCHY, P. Zika virus in Asia. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 54, p. 121–128, jan. 2017.

ELONG NGONO, A.; SHRESTA, S. Immune Response to Dengue and Zika. **Annual Review of Immunology**, v. 36, n. 1, p. 279–308, 26 abr. 2018.

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

FERREIRA, G. et al. SARS-CoV-2, Zika viruses and mycoplasma: Structure, pathogenesis and some treatment options in these emerging viral and bacterial infectious diseases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1867, n. 12, p. 166264, dez. 2021.

GALVIN, T. A.; MULLER, J.; KHAN, A. S. Effect of different promoters on immune responses elicited by HIV-1 gag/env multigenic DNA vaccine in *Macaca mulatta* and *Macaca nemestrina*. **Vaccine**, v. 18, n. 23, p. 2566–2583, maio 2000.

GARMORY, H. S.; BROWN, K. A.; TITBALL, R. W. DNA vaccines: improving expression of antigens. **Genetic Vaccines and Therapy**, v. 1, n. 1, p. 2, 2003.

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

GAUDINSKI, M. R. et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of two Zika virus DNA vaccine candidates in healthy adults: randomised, open-label, phase 1 clinical trials. **The Lancet**, v. 391, n. 10120, p. 552–562, fev. 2018.

GHAFFARIFAR, F. Plasmid DNA vaccines: where are we now? **Drugs of Today**, v. 54, n. 5, p. 315, 2018.

GIOVANETTI, M. et al. A Retrospective Overview of Zika Virus Evolution in the Midwest of Brazil. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 2, p. e00155-22, 27 abr. 2022.

GIRALDO, M. I.; GONZALEZ-OROZCO, M.; RAJSBAUM, R. Pathogenesis of Zika Virus Infection. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 18, n. 1, p. 181–203, 24 jan. 2023.

GOH, S. et al. Development of a Potential Yeast-Based Vaccine Platform for *Theileria parva* Infection in Cattle. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 674484, 8 jul. 2021.

GOODRIDGE, H. S.; WOLF, A. J.; UNDERHILL, D. M. β -glucan recognition by the innate immune system. **Immunological Reviews**, v. 230, n. 1, p. 38–50, jul. 2009.

GOODRIDGE, H. S.; WOLF, A. J.; UNDERHILL, D. M. β -glucan recognition by the innate immune system. **Immunological Reviews**, v. 230, n. 1, p. 38–50, jul. 2009.

GREBENCIUCOVA, E.; VANHAERENTS, S. Interleukin 6: at the interface of human health and disease. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1255533, 28 set. 2023.

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, 6 dez. 2019.

GUO, M. et al. ZIKV viral proteins and their roles in virus-host interactions. **Science China Life Sciences**, v. 64, n. 5, p. 709–719, maio 2021.

HAN, B. et al. Oral yeast-based DNA vaccine confers effective protection from *Aeromonas hydrophila* infection on *Carassius auratus*. **Fish e Shellfish Immunology**, v. 84, p. 948–954, jan. 2019.

HAN, X.; XU, P.; YE, Q. Analysis of COVID-19 vaccines: Types, thoughts, and application. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 35, n. 9, set. 2021.

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.

HU, Y.; SUN, L. Systematic Analysis of Structure Similarity between Zika Virus and Other Flaviviruses. **ACS Infectious Diseases**, v. 5, n. 7, p. 1070–1080, 12 jul. 2019.

IN, H. J. et al. Enhanced effect of modified Zika virus E antigen on the immunogenicity of DNA vaccine. **Virology**, v. 549, p. 25–31, out. 2020.

ITO, H. et al. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. **Journal of Bacteriology**, v. 153, n. 1, p. 163–168, jan. 1983.

JAVED, F. et al. Zika virus: what we need to know? **Journal of Basic Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 3–16, jan. 2018.

JIANG, J. et al. Integration of needle-free jet injection with advanced electroporation delivery enhances the magnitude, kinetics, and persistence of engineered DNA vaccine induced immune responses. **Vaccine**, v. 37, n. 29, p. 3832–3839, jun. 2019.

KARBALAEI, M.; REZAEE, S. A.; FARSIANI, H. *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. **Journal of Cellular Physiology**, v. 235, n. 9, p. 5867–5881, set. 2020.

KARKHAH, A. et al. Zika virus: epidemiology, clinical aspects, diagnosis, and control of infection. **European Journal of Clinical Microbiology e Infectious Diseases**, v. 37, n. 11, p. 2035–2043, nov. 2018.

KAUR, G. et al. Zika virus E protein modulates functions of human brain microvascular endothelial cells and astrocytes: implications on blood-brain barrier properties. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 17, p. 1173120, 20 jul. 2023.

KHAIBOULLINA, S. F. et al. Zika Virus Transmission Through Blood Tissue Barriers. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1465, 4 jul. 2019.

KIFLMARIAM, M. G.; YANG, H.; ZHANG, Z. Gene delivery to dendritic cells by orally administered recombinant *Saccharomyces cerevisiae* in mice. **Vaccine**, v. 31, n. 10, p. 1360–1363, fev. 2013.

KLUGE, J.; TERFEHR, D.; KÜCK, U. Inducible promoters and functional genomic approaches for the genetic engineering of filamentous fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 15, p. 6357–6372, ago. 2018.

KOMARASAMY, T. V. et al. Zika Virus Neuropathogenesis: The Different Brain Cells, Host Factors and Mechanisms Involved. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 773191, 16 mar. 2022.

KUMAR, R.; KHARBIKAR, B. N. Lyophilized yeast powder for adjuvant free thermostable vaccine delivery. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 8, p. 3131–3143, abr. 2021.

KUMAR, R.; KUMAR, P. Yeast-based vaccines: New perspective in vaccine development and application. **FEMS Yeast Research**, v. 19, n. 2, 1 mar. 2019.

KURUP, D. et al. Measles-based Zika vaccine induces long-term immunity and requires NS1 antibodies to protect the female reproductive tract. **npj Vaccines**, v. 7, n. 1, p. 43, 19 abr. 2022.

LEDESMA-FELICIANO, C. et al. Improved DNA Vaccine Delivery with Needle-Free Injection Systems. **Vaccines**, v. 11, n. 2, p. 280, 28 jan. 2023.

LEE, C. Y.-P.; NG, L. F. P. Zika virus: from an obscurity to a priority. **Microbes and Infection**, v. 20, n. 11–12, p. 635–645, dez. 2018.

LEE, J. et al. Engineering DNA vaccines against infectious diseases. **Acta Biomaterialia**, v. 80, p. 31–47, out. 2018.

LEE, L. J. et al. Hide and Seek: The Interplay Between Zika Virus and the Host Immune Response. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 750365, 21 out. 2021.

LEI, H. et al. Yeast Surface-Displayed H5N1 Avian Influenza Vaccines. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, p. 1–12, 2016.

LEVI, M. E. Zika virus: a cause of concern in transplantation? **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 30, n. 4, p. 340–345, ago. 2017.

LI, A. et al. A Zika virus vaccine expressing premembrane-envelope-NS1 polyprotein. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 3067, 3 ago. 2018.

LIACHKO, I. et al. GC-Rich DNA Elements Enable Replication Origin Activity in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 3, p. e1004169, 6 mar. 2014.

LIACHKO, I. et al. High-resolution mapping, characterization, and optimization of autonomously replicating sequences in yeast. **Genome Research**, v. 23, n. 4, p. 698–704, abr. 2013.

LIM, M. et al. Engineered Nanodelivery Systems to Improve DNA Vaccine Technologies. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 1, p. 30, 1 jan. 2020.

LIN, H.-H. et al. Zika virus structural biology and progress in vaccine development. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 1, p. 47–53, jan. 2018.

LIU, B. et al. A Vaccine Based on the Receptor-Binding Domain of the Spike Protein Expressed in Glycoengineered *Pichia pastoris* Targeting SARS-CoV-2 Stimulates Neutralizing and Protective Antibody Responses. **Engineering**, v. 13, p. 107–115, jun. 2022.

LIU, X. et al. Incorporation of NS1 and prM/M are important to confer effective protection of adenovirus-vectored Zika virus vaccine carrying E protein. **npj Vaccines**, v. 3, n. 1, p. 29, 24 jul. 2018.

LUNARDELLI, V. A. S. et al. Diagnostic and vaccine potential of Zika virus envelope protein (E) derivatives produced in bacterial and insect cells. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1071041, 16 mar. 2023.

MADEWELL, Z. J. Arboviruses and Their Vectors. **Southern Medical Journal**, v. 113, n. 10, p. 520–523, out. 2020.

MALEKSHAHI, Z. et al. Interference of the Zika Virus E-Protein With the Membrane Attack Complex of the Complement System. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 569549, 28 out. 2020.

MALIK, S. et al. Advances in Zika virus vaccines and therapeutics: A systematic review. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 17, n. 3, p. 97–109, mar. 2024.

MCCLEMENTS, M. E. et al. An analysis of the Kozak consensus in retinal genes and its relevance to gene therapy. **Molecular Vision**, v. 27, p. 233–242, 2021.

MEHTA, A. K.; GRACIAS, D. T.; CROFT, M. TNF activity and T cells. **Cytokine**, v. 101, p. 14–18, jan. 2018.

MORABITO, K. M.; GRAHAM, B. S. Zika Virus Vaccine Development. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. suppl_10, p. S957–S963, 16 dez. 2017.

MUSSO, D.; ROUSSET, D.; PEYREFITTE, C. Special Issue “Endemic Arboviruses”. **Viruses**, v. 14, n. 3, p. 645, 21 mar. 2022.

MWALIKO, C. et al. Zika virus pathogenesis and current therapeutic advances. **Pathogens and Global Health**, v. 115, n. 1, p. 21–39, 2 jan. 2021.

NETT, J. H. et al. Cloning and disruption of the *Pichia pastoris* *ARG1*, *ARG2*, *ARG3*, *HIS1*, *HIS2*, *HIS5*, *HIS6* genes and their use as auxotrophic markers. **Yeast**, v. 22, n. 4, p. 295–304, mar. 2005.

NORA, L. C. et al. The art of vector engineering: towards the construction of next-generation genetic tools. **Microbial Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 125–147, jan. 2019.

ÖZTÜRK, S.; ERGÜN, B. G.; ÇALIK, P. Double promoter expression systems for recombinant protein production by industrial microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 20, p. 7459–7475, out. 2017.

PAGLIARI, S. et al. DNA Vaccines: History, Molecular Mechanisms and Future Perspectives. **Journal of Molecular Biology**, v. 435, n. 23, p. 168297, dez. 2023.

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.

PARK, K. S. et al. Non-viral COVID-19 vaccine delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 169, p. 137–151, fev. 2021.

PERERA, D. R. et al. Roles of NS1 Protein in Flavivirus Pathogenesis. **ACS Infectious Diseases**, v. 10, n. 1, p. 20–56, 12 jan. 2024.

PIELNAA, P. et al. Zika virus-spread, epidemiology, genome, transmission cycle, clinical manifestation, associated challenges, vaccine and antiviral drug development. **Virology**, v. 543, p. 34–42, abr. 2020.

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.

PINO, M. et al. A yeast-expressed RBD-based SARS-CoV-2 vaccine formulated with 3M-052-alum adjuvant promotes protective efficacy in non-human primates. **Science Immunology**, v. 6, n. 61, p. eabh3634, 29 jul. 2021.

PRONK, J. T. Auxotrophic Yeast Strains in Fundamental and Applied Research. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2095–2100, maio 2002.

REGLA-NAVA, J. A. et al. A Zika virus mutation enhances transmission potential and confers escape from protective dengue virus immunity. **Cell Reports**, v. 39, n. 2, p. 110655, abr. 2022.

RICHTER, K. et al. Macrophage and T Cell Produced IL-10 Promotes Viral Chronicity. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 11, p. e1003735, 7 nov. 2013.

ROSENFELD, S. A. [9] Use of *Pichia pastoris* for expression of recombinant proteins. Em: **Methods in Enzymology**. [s.l.] Elsevier, 1999. v. 306p. 154–169.

RYAN, S. J. et al. Warming temperatures could expose more than 1.3 billion new people to Zika virus risk by 2050. **Global Change Biology**, v. 27, n. 1, p. 84–93, jan. 2021.

SÁFADI, M. A. P.; ALMEIDA, F. J.; ÁVILA KFOURI, R. Zika virus outbreak in Brazil—Lessons learned and perspectives for a safe and effective vaccine. **The Anatomical Record**, v. 304, n. 6, p. 1194–1201, jun. 2021.

SAKKAS, H. et al. An Update on Sexual Transmission of Zika Virus. **Pathogens**, v. 7, n. 3, p. 66, 3 ago. 2018.

SAMARIDOU, E.; HEYES, J.; LUTWYCHE, P. Lipid nanoparticles for nucleic acid delivery: Current perspectives. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 154–155, p. 37–63, 2020.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3rd ed ed. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SEKARAN, S. D. et al. Host immune response against DENV and ZIKV infections. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 975222, 8 set. 2022.

SERMAN, T. M.; GACK, M. U. Evasion of Innate and Intrinsic Antiviral Pathways by the Zika Virus. **Viruses**, v. 11, n. 10, p. 970, 22 out. 2019.

SHAILY, S.; UPADHYA, A. Zika virus: Molecular responses and tissue tropism in the mammalian host. **Reviews in Medical Virology**, p. e2050, 16 maio 2019.

SHARMA, A.; LAL, S. K. Zika Virus: Transmission, Detection, Control, and Prevention. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 3 fev. 2017.

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.

SHI, Y. et al. Structures of Zika Virus E e NS1: Relations with Virus Infection and Host Immune Responses. Em: HILGENFELD, R.; VASUDEVAN, S. G. (Eds.). **Dengue and Zika: Control and Antiviral Treatment Strategies**. Advances in Experimental Medicine and Biology. Singapore: Springer Singapore, 2018. v. 1062p. 77–87.

SIEWERS, V. An Overview on Selection Marker Genes for Transformation of *Saccharomyces cerevisiae*. Em: MAPELLI, V.; BETTIGA, M. (Eds.). **Yeast Metabolic Engineering**. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer US, 2022. v. 2513p. 1–13.

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, abr. 2021.

SILVA, A. J. D. et al. Yeasts as a promising delivery platform for DNA and RNA vaccines. **FEMS Yeast Research**, v. 21, n. 3, p. foab018, 7 abr. 2021.

SILVA, A. J. D.; ROCHA, C. K. D. S.; DE FREITAS, A. C. Standardization and Key Aspects of the Development of Whole Yeast Cell Vaccines. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 12, p. 2792, 14 dez. 2022.

SIROHI, D.; KUHN, R. J. Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. suppl_10, p. S935–S944, 16 dez. 2017.

SMITH, J. et al. Auxotrophy-Independent Plasmid Shuttle Vectors for Applications in Diverse Yeasts. **Applied Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 453–469, 28 fev. 2024.

SOKOŁOWSKA, E.; BŁACHNIO-ZABIELSKA, A. U. A Critical Review of Electroporation as A Plasmid Delivery System in Mouse Skeletal Muscle. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 11, p. 2776, 6 jun. 2019.

SONG, B.-H. et al. Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. **Journal of Neuroimmunology**, v. 308, p. 50–64, jul. 2017.

SONG, W. et al. Repurposing clinical drugs is a promising strategy to discover drugs against Zika virus infection. **Frontiers of Medicine**, v. 15, n. 3, p. 404–415, jun. 2021.
TAHAMTAN, A. et al. An Overview of History, Evolution, and Manufacturing of Various Generations of Vaccines. **Journal of Archives in Military Medicine**, v. In Press, n. In Press, 26 set. 2017.

TAN, T. Y. et al. Capsid protein structure in Zika virus reveals the flavivirus assembly process. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 895, 14 fev. 2020.

TAN, Y. et al. Yeast as carrier for drug delivery and vaccine construction. **Journal of Controlled Release**, v. 346, p. 358–379, jun. 2022.

TAPPE, D. et al. Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to convalescent phase. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 205, n. 3, p. 269–273, jun. 2016.

TOLMACHOV, O. Designing Plasmid Vectors. Em: WALTHER, W.; STEIN, U. S. (Eds.). **Gene Therapy of Cancer**. Methods in Molecular Biology™. Totowa, NJ: Humana Press, 2009. v. 542p. 117–129.

TONNERRE, P. et al. Evolution of the innate and adaptive immune response in women with acute Zika virus infection. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 76–83, 2 dez. 2019.

TÜRKANOĞLU ÖZÇELİK, A.; YILMAZ, S.; INAN, M. Pichia pastoris Promoters. Em: GASSER, B.; MATTANOVICH, D. (Eds.). **Recombinant Protein Production in Yeast**. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York, 2019. v. 1923p. 97–112.

VUE, D.; TANG, Q. Zika Virus Overview: Transmission, Origin, Pathogenesis, Animal Model and Diagnosis. **Zoonoses**, v. 1, n. 1, 7 dez. 2021.

WACH, A. et al. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 10, n. 13, p. 1793–1808, dez. 1994.

WALCH, B. et al. Delivery of functional DNA and messenger RNA to mammalian phagocytic cells by recombinant yeast. **Gene Therapy**, v. 19, n. 3, p. 237–245, mar. 2012.

WALCH-RÜCKHEIM, B.; SCHMITT, M. J.; BREINIG, F. Schizosaccharomyces pombe: A novel transport vehicle of functional DNA and mRNA into mammalian antigen-presenting cells. **Vaccine**, v. 32, n. 46, p. 6029–6033, out. 2014.

WANG, B. et al. Structure and function of Zika virus NS5 protein: perspectives for drug design. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 75, n. 10, p. 1723–1736, maio 2018.

WILLIAMS, J. Vector Design for Improved DNA Vaccine Efficacy, Safety and Production. **Vaccines**, v. 1, n. 3, p. 225–249, 25 jun. 2013.

WU, B.; QI, Z.; QIAN, X. Recent Advancements in Mosquito-Borne Flavivirus Vaccine Development. **Viruses**, v. 15, n. 4, p. 813, 23 mar. 2023.

WU, S.; LETCHWORTH, G. J. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. **BioTechniques**, v. 36, n. 1, p. 152–154, jan. 2004.

XIONG, G. et al. Evaluation of Zika virus DNA vaccines based on NS1 and domain III of E. **International Immunopharmacology**, v. 113, p. 109308, dez. 2022.

YAKOB, L. Zika Virus after the Public Health Emergency of International Concern Period, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 28, n. 4, p. 837–840, abr. 2022.

YANG, C.; GONG, R.; DE VAL, N. Development of Neutralizing Antibodies against Zika Virus Based on Its Envelope Protein Structure. *Virologica Sinica*, v. 34, n. 2, p. 168–174, abr. 2019.

YEASMIN, M. et al. Safety and immunogenicity of Zika virus vaccine: A systematic review of clinical trials. **Reviews in Medical Virology**, v. 33, n. 1, p. e2385, jan. 2023.

YURINA, V. Live Bacterial Vectors—A Promising DNA Vaccine Delivery System. **Medical Sciences**, v. 6, n. 2, p. 27, 23 mar. 2018.

ZAKRIA, H. M. et al. Significant body mass increase by oral administration of a cascade of shIL21-MSTN yeast-based DNA vaccine in mice. **Biomedicine e Pharmacotherapy**, v. 118, p. 109147, out. 2019.

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