LUIZ FELIPE LEMES DE ARAUJO

Ensaio para a produção de anticorpos de cadeia simples, do tipo VHH, como potencial ferramenta para a neutralização dos efeitos de fase aguda ocasionados por infecção do vírus Zika (ZIKV)

Versão Original

Dissertação de mestrado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, para obtenção de título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Guerino Stabeli

RIBEIRÃO PRETO

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudos e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Araujo, Luiz Felipe Lemes

Ensaio para a produção de anticorpos de cadeia simples, do tipo VHH, como potencial ferramenta para a neutralização dos efeitos de fase aguda ocasionados por infecção do vírus Zika (ZIKV). Luiz Felipe Lemes de Araujo; Orientador, Rodrigo Guerino Stabeli – 2020.

Quantidade de folhas 83f.: il. 30cm

Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Versão Original

1 – Arbovírus. 2 –ZIKV. 3 – Anticorpos VHH. 4 – Terapia de anticorpos.

Folha de Aprovação

Nome: Luiz Felipe Lemes de Araujo

Título: Ensaio para a produção de anticorpos de cadeia simples, do tipo VHH, como potencial ferramenta para a neutralização dos efeitos de fase aguda ocasionados por infecção do vírus Zika (ZIKV).

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, para obtenção de título de Mestre em Ciências.

Aprovado em ____ de _____ de 2020,

Banca Examinadora

Prof. Dr. Rodrigo Guerino Stabeli

Instituição: Universidade Federal de São Paulo

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____

Julgamento _____

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____

Julgamento _____

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____

Julgamento _____

*“Ninguém caminha sem aprender a caminhar, sem aprender a fazer o caminho caminhando,
refazendo e retocando o sonho pelo qual se pôs a caminhar. ”*

- Paulo Freire.

AGRADECIMENTOS

De coração, agradeço,

A minha amada mãe, que sempre me apoiou e incentivou a seguir meus sonhos, esta vitória também é sua.

A minha amada Vó Leda que mesmo distante sempre se preocupou comigo. E ao meu padrasto Cássio Rocha por sempre me prestar auxílio.

Aos meus amados avós, Rita e José Pedro e, tias, Marluce, Marlene e Jandira que sempre foram atenciosas comigo em toda a trajetória do mestrado.

Ao meu orientador e professor Rodrigo Guerino Stabeli, que depositou em mim sua confiança, me aceitando como seu primeiro aluno em Ribeirão Preto. Agradeço aos ensinamentos que me proporcionou ao longo desses dois anos.

Aos professores e funcionários do programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da FMRP, em especial à Ana Cristina, que sempre esteve presente e solícita nos momentos de necessidade.

Ao meu amigo Rafael Pontes, que desde a graduação acompanha meus passos na carreira acadêmica, obrigado por todo apoio e consideração.

As minhas amigas Caroline Galvão e Jéssica Placência, que mesmo distante fisicamente, sempre estiveram presentes na minha vida.

Aos amigos que Ribeirão Preto me proporcionou, Carolina Monteleone, Cícero Almeida, Danilo Machado, Letícia Penteado, Lucas Rocha, Marcos Rosa, Maynara Santana, Reginaldo Alves, Romário Mascarenhas e Vitor Floriano. Cada um à sua maneira tornou esses dois anos mais alegre.

Ao Dr. Carlos Alessandro Fuzo que sempre me auxiliou durante esses dois anos no campo da bioinformática e pesquisa.

Ao professor Dr. Arthur Henrique Cavalcante de Oliveira, que disponibilizou seu laboratório e sempre foi muito solícito. Aos meus colegas de laboratório Dham, Bruno, Elise, Leonardo e Cintya, que sempre me auxiliariam nas inúmeras vezes que precisei. E também ao técnico do laboratório, Dr. André Justino, obrigado pela ajuda.

A professora Dra. Soraya dos Santos Pereira e sua aluna Michelle Suelen, que tiveram papel essencial no projeto, meu muito obrigado.

Ao professor Dr. Luiz Tadeu Moraes de Figueiredo pela disponibilização do laboratório. Aos seus alunos, Marcílio Jorge Fumagalli, Danilo Machado e a técnica do laboratório Soraya agradeço a ajuda nos experimentos e a paciência.

Aos professores Dra. Vanessa Carregaro Pereira e Dr. João Santa Silva pela disponibilização do laboratório.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa (Processo 130277/2018-5) e apoio financeiro, que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

ARAÚJO, Luiz Felipe Lemes. **Ensaio para a produção de anticorpos de cadeia simples, do tipo VHH, como potencial ferramenta para a neutralização dos efeitos de fase aguda ocasionados por infecção do vírus Zika (ZIKV).** 2020. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

O vírus Zika (ZIKV) é um arbovírus responsável por inúmeros distúrbios, tal como, a síndrome de Guillain-Barré e defeitos congênitos em fetos, como microcefalia e aborto espontâneo. Apesar de um intenso aumento nas pesquisas relacionada ao vírus, nenhuma vacina ou tratamento está disponível. Camelídeos, produzem uma fração de anticorpos IgG funcionais desprovidos de cadeia leve e do primeiro domínio constante, os quais as regiões de ligação ao antígeno são denominadas VHHs. Tais anticorpos estão se mostrando a base de uma nova geração de ferramentas para diagnóstico e terapias. Assim, o presente estudo teve como objetivo a produção de anticorpos de cadeia simples, do tipo VHH, potencialmente neutralizantes como estratégia terapêutica para infecção por ZIKV. Para isso, foi realizado um levantamento de epítomos em regiões conservadas da proteína envelope (E) do ZIKV que são alvos de anticorpos neutralizantes e se encontram expostas sobre a superfície do vírus. As análises apontam para uma epítopo conservado localizado no domínio II da proteína E do ZIKV, que foi avaliado por dinâmica molecular complexado com um anticorpo neutralizante apresentando baixas flutuações. Posteriormente a proteína recombinante contendo o epítopo foi expressa utilizando a cepa SHuffle e purificada em coluna HiTrap FF Crude (GE Healthcare), utilizando o sistema ÄKTA (GE Healthcare). A estrutura secundária da proteína recombinante foi determinada por difração de raios X, apresentando as estruturas previstas. Através de ELISA foi demonstrado a capacidade do soro de indivíduos infectados com ZIKV de reconhecer a proteína recombinante. Quando avaliada a capacidade da proteína recombinante em elicitar anticorpos neutralizantes em camundongos Balb/c, a mesma se apresentou sugestiva de neutralização. A partir da imunização de *Lamas glamas* foi possível obter uma biblioteca gênica de anticorpos VHH. Assim, foi possível expressar uma proteína recombinante do ZIKV em sua estrutura secundária e gerar uma biblioteca gênica de anticorpos VHH que poderá ser utilizada para desenvolvimento de terapias, vacinas e diagnósticos.

Palavras chaves: Arbovírus, ZIKV, Anticorpos VHH, Terapia de anticorpos.

ABSTRACT

ARAUJO, Luiz Felipe Lemes. **Single chain antibodies (VHH type) production assay as a potential neutralization tool against acute Zika virus infection effects.** 2020. Dissertation (Master Degree) – Basic and Applied Immunology Graduate School – Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Zika virus (ZIKV) is an arbovirus responsible for numerous disorders, such as Guillain-Barré syndrome, birth defects in fetuses, microcephaly, and spontaneous abortion. Despite an increase in research related to the virus, no vaccine or treatment is available. Camelids produce a functional fraction of IgG antibodies lacking the light chain and the first constant domain, and the antigen-binding regions are called VHHs. Such antibodies are proving to be the basis of a new generation of diagnostic and therapeutic tools. Thus, the present study aimed to produce single-chain antibodies, VHH type, potentially neutralizing as a therapeutic strategy for acute ZIKV infection. An epitope survey was carried in ZIKV envelope protein (E) conserved regions that are neutralizing antibodies targets and exposed on the virus surface. The analysis point to a conserved epitope located in domain II, which was evaluated with the complexed neutralizing antibody by molecular dynamics showing low fluctuations. Afterward, the recombinant protein containing the epitope was expressed using the SHuffle strain and purified on a HiTrap HP column (GE Healthcare), using the ÄKTA system (GE Healthcare). The predicted secondary structure of the recombinant protein was confirmed by circular dichroism. Serum from individuals infected with ZIKV demonstrated the ability of to recognize the recombinant protein in the ELISA assay. The recombinant protein was able to elicit antibodies in Balb/c mice and which was suggestive of neutralization activity. It was generated a gene library of VHH antibodies from Lamas glamas immunization. Therefore, it was possible to express a recombinant protein from ZIKV in its secondary structure and produce a gene library of VHH antibodies that can be used for the development of therapies, vaccines, and diagnostics.

Keywords: Arbovirus, ZIKV, VHH antibodies, Antibody therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Organização genômica dos <i>Flavivírus</i>	18
Figura 2. Representação esquemática da estrutura dos <i>Flavivírus</i> imaturo e maduro.....	18
Figura 3. Demonstração esquemática do processo de associação das proteínas de envelope dos vírus do gênero <i>Flavivírus</i> com a membrana do hospedeiro.....	19
Figura 4. Ciclo de vida dos <i>Flavivírus</i>	20
Figura 5. Representação de diferentes tipos de imunoglobulinas.....	24
Figura 6. Complexos formados pela Z20 e ZIKV-117 sobre a proteína de envelope.....	31
Figura 7. Estrutura inicial do complexo utilizado nos estudos de simulação por dinâmica molecular.....	32
Figura 8. Vetor de expressão pET28a.....	34
Figura 9. Demonstração esquemática da membrana de nitrocelulose e seus respectivos pontos da expressão com cepa BL21 (DE3) pLysS.....	39
Figura 10. Resultados do cálculo para estimação do grau de conservação evolucionária realizado com o programa <i>Consurf</i>	48
Figura 11. Estrutura do modelo gerado mostrando o resultado da análise de conservação a partir do programa <i>Consurf</i>	49
Figura 12. Regiões da sE que estão em contato com anticorpos em estruturas dos complexos obtidas a partir do PDB.....	51
Figura 13. Superfícies moleculares mostrando a face externa da proteína de envelope solúvel (sE).....	52
Figura 14. Distâncias médias por resíduo até o centro geométrico do vírus calculadas para cada uma das cadeias da unidade assimétrica.....	53
Figura 15. Informações sobre conservação, alvos de anticorpo e distância até o centro geométrico do vírus.....	54
Figura 16. Comportamento estrutural do complexo e seus componentes ao longo da simulação mostrando os valores de RMSD em relação à estrutura experimental.....	55
Figura 17. Regiões na estrutura do complexo que apresentam as maiores flutuações na estrutura ao longo da simulação a partir do cálculo do RMSDres.....	57
Figura 18. Análise dos plasmídeos extraídos de <i>E. coli</i> DH5α.....	58
Figura 19. Sequenciamento automático do DNA plasmidial.....	60
Figura 20. Eletroforese em gel desnaturante da proteína recombinante comparando diferentes cepas em dois grupos de temperatura.....	61

Figura 21. Eletroforese em gel desnaturante comparando variações do indutor em dois grupos de temperaturas em culturas com cepas BL21 (DE3) pLysS.....	62
Figura 22. Eletroforese em gel desnaturante das frações de expressão da proteína recombinante expressa a partir da fração insolúvel da cepa BL21 (DE3) pLysS.....	63
Figura 23. Cromatograma de purificação da proteína recombinante expressa a partir da fração insolúvel da cepa BL21 (DE3) pLysS.....	64
Figura 24. Dot blot para confirmação da presença da proteína nas frações solúveis e insolúveis da cepa BL21 (DE3) pLysS.....	64
Figura 25. Cromatograma de purificação da proteína recombinante expressa a partir da fração solúvel da cepa SHuffle.....	66
Figura 26. Eletroforese em gel desnaturante das frações de expressão da proteína recombinante expressa a partir da cepa SHuffle.....	67
Figura 27. Espectro de dicroísmo circular UV-distante da estrutura secundária da proteína recombinante expressa.....	68
Figura 28. Predição da estrutura secundária de cada resíduo de aminoácido em solução ao longo da simulação analisados pelo programa gmx do_dssp.....	69
Figura 29. Avaliação da resposta sérica de IgG de pacientes infectados com ZIKV à proteína recombinante expressa e a proteína total do envelope de ZIKV.....	71
Figura 30. Teste de neutralização por redução de plaque a partir do soro de camundongos Balb/c imunizados com a proteína recombinante expressa.....	72
Figura 31. Monitoramento da resposta imunológica do camelídeo após hiperimunização com a proteína expressa.....	73
Figura 32. Amplificação do repertório gênico de VHH por PCR.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. <i>Screening</i> de cepas BL21 em dois grupos de temperatura.....	37
Tabela 2. <i>Screening</i> de concentrações do indutor IPTG em cepas BL21 (DE3) pLysS.....	38
Tabela 3. Oligonucleotídeos genes específicos utilizados na reação de PCR.....	45
Tabela 4. Identificação das estruturas dos complexos no PDB, nome do anticorpo, localização do epítopo e acessibilidade na superfície do vírus.....	50
Tabela 5. Porcentagens da estrutura secundária obtida a partir da espectroscopia do dicroísmo circular.....	69
Tabela 6. Porcentagens da estrutura secundária obtida a partir da espectroscopia do dicroísmo circular em comparação com a predição gerada pelo programa gm do_dssp.....	70

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

cDNA	DNA complementar
CDR	Determinantes de complementariedade hipervariáveis
CH1	Primeiro domínio constante
CMC	Carboximetilcelulose
Cryo-EM	<i>Cryogenic electron microscopy</i>
DENV	Vírus da <i>Dengue</i>
DC	Dicroísmo circular
DC-SIGN	Lectina do tipo-C
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dNTP	Desoxido Nucleotídeo Difosfato
DO ₍₆₀₀₎	Densidade óptica em 600 nm
Dsb A	<i>Disulfide bond A</i>
Dsb C	<i>Disulfide bond C</i>
DSSP	<i>Dictionary of Secondary Structure of Proteins</i>
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EJ	Vírus da encefalite japonesa
ETC	Vírus da encefalite transmitida por carrapatos
endA1	Endonuclease I
Fabs	Fragmentos de ligação ao antígeno
FA	Febre amarela
Fc	Fragmento cristalizável
FL	<i>Fusion loop</i>
FR	Framework
FPLC	<i>Fast protein liquid-chromatography</i>
Grx	<i>Glutaredoxin</i>
HCAb	Anticorpos de cadeia pesada
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IPTG	<i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i>
kDa	Quilo Daltons

LB	Luria Bertani
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mmol	Milimol
NaCl	Cloreto de sódio
nm	Nanômetro
OD600	Densidade ótica em 600 nm
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação de polimerase em cadeia
pET	Plasmídeo para expressão pela T7 RNA polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
pmol	Picomol
PRNT	Teste de neutralização por redução das placas virais
rpm	Rotações por minuto
RMSD	<i>Root-mean-square deviation</i>
recA1	Proteína de recombinação homóloga
scFv	<i>Single Chain Variable Fragment</i>
SDS-PAGE	Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida
sE	Região solúvel da proteína de envelope
SFB	Soro fetal bovino
TAM	<i>Tyros3, Axl, e Mer receptors</i>
TIM	<i>T cell immunoglobulin mucin domain protein 1</i>
Tris	Tris-hidróximetil aminometano
TGN	<i>Trans-Golgi network</i>
TM	Âncora transmembrana

Trx	<i>Thioredoxin</i>
TYRO3	<i>Tyrosine protein kinase receptor 3</i>
UV	Ultravioleta
ViPR	<i>Virus Pathogen Database and Analysis Resource</i>
VH	Região variável pesada
VL	Região variável leve
ZIKV	<i>Zika vírus</i>
WNV	<i>Vírus do West Nile</i>
μg	Micrograma
μL	Microlitro
Å	Angstrom

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Arbovírus	17
1.2 Flaviviridae	17
1.3 Genoma e Estrutura do <i>Flavivírus</i>	17
1.4 Ciclo de Vida	19
1.5 Zika vírus	21
1.6 Anticorpos e terapias	22
1.7 Anticorpos do tipo VHH	23
2. OBJETIVOS	25
2. Objetivo Geral	26
2.1 Objetivos específicos	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Mapeamento dos epítomos miméticos e avaliação por modelos de simulação	28
3.1.1 Busca e análise das sequências	28
3.1.2 Modelagem da estrutura terciária a partir da sequência consenso	29
3.1.3 Busca por estruturas dos complexos	29
3.1.4 Cálculo das distâncias até o centro do vírus	29
3.1.5 Construção das superfícies moleculares a partir das informações levantadas	30
3.2 Estudo da interação do epítopo alvo com anticorpo convencional por simulação de dinâmica molecular	30
3.2.1 Estrutura inicial do complexo	31
3.2.2 Definição dos CDRs	32
3.2.3 Detalhes da simulação	32
3.2.4 Análise de trajetória	33
3.2.5 Predição da estrutura secundária a partir da simulação	33
3.3 Expressão da proteína recombinante	34
3.3.1 Vetor de expressão	34
3.3.2 Transformação em <i>E. coli</i> DH5 α	35
3.3.3 Sequenciamento automático dos plasmídeos	36
3.3.4 Expressão da proteína recombinante	36
3.3.5 Dot Blot	38
3.3.6 Dicroísmo circular	39
3.4 Avaliação Sorológica	40
3.4.1 Avaliação da resposta sérica de IgG de pacientes infectados com ZIKV frente a proteína recombinante	40

3.4.2	Imunização dos camundongos BALB/c	40
3.4.3	Teste de Neutralização por Redução de Plaque (PRNT)	41
3.4.4	Aspectos éticos e imunização.....	41
3.4.5	Avaliação da resposta imune por Elisa	42
3.5	Construção da biblioteca gênica de nanocorpos de camelídeos	43
3.5.1	Isolamento de linfócitos periféricos	43
3.5.2	Extração de RNA	43
3.5.3	Síntese de fita de DNA complementar (cDNA).....	44
3.5.4	Amplificação da região variável da cadeia pesada (VHH) por Reação em Cadeia da Polimerase	44
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1	Busca por epítomos	47
4.1.1	Mapeamento dos epítomos miméticos e avaliação por modelos de simulação.....	47
4.1.2	Modelagem.....	48
4.1.3	Localização dos epítomos a partir das estruturas dos complexos	49
4.1.4	Seleção de regiões alvos.....	53
4.1.5	Comportamento estrutural do complexo	55
4.2	Expressão e caracterização estrutural	58
4.2.1	Transformação em <i>E. coli</i> DH5 α	58
4.2.2	Sequenciamento dos plasmídeos	59
4.2.3	Expressão da proteína recombinante	60
4.2.4	Dicroísmo circular em comparação com a predição da estrutura secundária a partir da simulação por DSSP	67
4.3	Avaliação sorológica.....	70
4.3.1	Avaliação da resposta sérica de IgG de pacientes infectados com ZIKV a proteína recombinante expressa	70
4.3.2	Teste de Neutralização por Redução de Plaque (PRNT)	71
4.3.3	Acompanhamento da resposta imunológica do espécime <i>Lama glama</i> induzida por imunização	72
4.3.4	Construção da biblioteca gênica de VHH de camelídeos	73
5.	CONCLUSÃO.....	75
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

1. Introdução

1.1 Arbovírus

Os vírus que tem sua transmissão por meio de artrópodes são conhecidos como arbovírus, cujo o processo de transmissão ocorre por meio de insetos hematófagos durante o repasto sanguíneo, principalmente mosquitos (Diptera: *Culicidae*), sendo descritos mais de 140 arbovírus como causadores de doenças humanas e aproximadamente 50 arbovírus causadores de doenças em animais selvagens e/ou domésticos. A maioria dos arbovírus pertencem as famílias *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Peribunyaviridae*, *Nairoviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* e *Orthomyxoviridae*, dos quais os gêneros mais prevalentes classificados como patógenos aos humanos são os vírus pertencentes às famílias *Flaviviridae* e *Togaviridae* (Ciota, 2019; Singh *et al.*, 2016; Weaver e Reisen, 2010).

1.2 Flaviviridae

A família Flaviviridae compreende quatro gêneros: *Flavivirus* (53 espécies), *Hepacivirus* (14 espécies), *Pegivirus* (11 espécies) e *Pestivirus* (11 espécies) reconhecidas pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)*, sendo os mesmos definidos como, vírus envelopados, icosaédricos, com uma fita única de RNA não segmentada de senso positivo, com aproximadamente ~11.000 pares de bases em seu genoma. O gênero *Flavivirus* compreende cerca de 53 espécies e, apesar do grande número de vírus pertencentes, apenas uma pequena parcela são patogênicos aos humanos. As doenças ocasionadas pelo gênero com implicações na saúde humana em escala global, são causadas pelas espécies, *West Nile* (WNV), Febre amarela (FA), Encefalite japonesa (EJ), Encefalite transmitida por carrapatos (ETC), Dengue (DENV) e Zika (ZIKV). A transmissão é ocasionada por artrópodes, tais como, carrapatos e mosquitos. O gênero *Aedes* destaca-se como principal vetor, estando distribuído entre as regiões tropicais e subtropicais do globo com potencial de rápida propagação (Al-Qahtani *et al.*, 2016; Hasan *et al.*, 2018; Lindenbach, Thiel e Rice, 2006).

1.3 Genoma e Estrutura do *Flavivirus*

O genoma dos *Flavivirus* contém apenas uma região aberta de leitura ORF (*Open Reading Frame*) que codifica uma única poliproteína, a qual é posteriormente clivada por proteases virais e celulares e glicosilada por glicosiltransferases do hospedeiro. Após a clivagem são geradas três proteínas estruturais, capsídeo (C), membrana (prM/M) e envelope (E) e sete não estruturais (NS), sendo a proteína de envelope (E) composta por três domínios: um domínio

Fonte: Adaptado Heinz e Stiasny, 2017.

1.4 Ciclo de Vida

Após a infecção, as partículas virais circulantes se ligam a superfície das células do hospedeiro, tais quais, células dendríticas encontradas na pele, monócitos, macrófagos da placenta (células de Hofbauer), trofoblastos, células progenitoras neurais humana, células testiculares e fibroblastos uterinos. Apesar do processo de infecção da célula não estar completamente elucidado, é descrito que a associação das partículas virais ocorre primeiramente com os fatores de adesão que são necessários para sua “parada” na superfície celular, tais como a glicosaminoglicanos (GAGs), seguido por interações com receptores secundários, mediando assim a adesão para posterior internalização das partículas virais (Perera-Lecoin *et al.*, 2013).

Alguns desses receptores ou fatores de adesão foram descritos para o gênero, sendo eles: lectina do tipo-C (também conhecida como DC-SIGN); receptor de manose; membros do TIM (*T cell immunoglobulin mucin domain protein 1*) e TAM (*tyrosine protein kinase receptor 3* (*TYRO3*) –*AXL*–*MER*) da família dos receptores da fosfatidilserinas, os quais facilitam a entrada do ZIKV em células da placenta, fibroblastos teciduais e células da glia. Os vírus do gênero *Flavivírus* predominantemente internalizam-se nas células dos hospedeiros via clatrina, os quais são expostos ao compartimento endossomal com pH ácido e desencadeiam mudanças conformacionais nas glicoproteínas do envelope (Neufeldt *et al.*, 2018). Tal mudança é irreversível, convertendo a proteína E de um estado de dímero para um trímero. Neste estado de conformação, a proteína E adota uma estrutura de “grampo de cabelo”, a partir da relocação de DIII e da reorganização de DII em trímero, resultando na justaposição do *Fusion loop* (FL) com o âncora transmembrana (TM). Assim, o trímero formado associa-se a membrana endossomal formando um canal que permite a liberação do RNA viral no citosol.

Figura 3- Demonstração esquemática do processo de associação das proteínas de envelope dos vírus do gênero *Flavivírus* com a membrana do hospedeiro.

Fonte: Heinz e Stiasny, 2017.

O RNA é então reconhecido pelo ribossomo, iniciando o processo de tradução na membrana do retículo endoplasmático rugoso, obtendo como produto uma única poliproteína. Posteriormente, proteases virais e celulares catalisam a clivagem da poliproteína em três proteínas estruturais e sete não estruturais, enquanto as proteínas estruturais são constituintes do vírion, as não estruturais são essenciais no processo de replicação e escape viral. O processo de brotamento permanece parcialmente definido, o que se tem descrito é a formação de uma partícula imatura, não infecciosa, com o heterodímero prM-E associados em seu envelope. Tal partícula recém-formada é então transportada através da via exocítica da célula até alcançar a *trans-Golgi network* (TGN). Neste estágio um importante evento ocorre, devido a acidificação sutil do pH a reorganização da proteína do envelope é desencadeada, clivando prM através de proteases (furina) em dois fragmentos (pr e M). O fragmento pr permanece associado a partícula enquanto em pH ácido, porém, desassocia-se em pH neutro do ambiente extracelular, por fim, vírions maduros infecciosos são formados e secretados para parte extracelular (Heinz e Stiasny, 2017; Neufeldt *et al.*, 2018).

Figura 4- Ciclo de vida dos *Flavivírus*.

Fonte: Adaptado Heinz e Stiasny, 2017

1.5 Zika vírus

A infecção por Zika vírus (ZIKV) era associada a uma doença branda, sendo os sintomas mais descritos na fase aguda: erupção cutânea, febre, artralgia e conjuntivite (Al-Qahtani *et al.*, 2016; Heang *et al.*, 2012). O primeiro caso humano de infecção por ZIKV foi relatado em 1952 em Uganda (Dick, 1952). Desde então, o vírus se espalhou para o Sudeste Asiático e as ilhas do Pacífico de Yap, nos Estados Federados da Micronésia, onde o primeiro grande surto de ZIKV em seres humanos foi declarado em 2007. Nesta epidemia, 49 casos foram confirmados, junto com 59 casos suspeitos, estima-se que 73% dos residentes das ilhas Yap estavam infectados, porém apresentavam a infecção de forma assintomática (Duffy *et al.*, 2009; Kucharski *et al.*, 2016). Em maio de 2015, a disseminação do ZIKV no Brasil foi confirmada laboratorialmente, primeiro nos estados da região do Nordeste, depois em outros estados das regiões Centro-Oeste e Sudeste (Zanluca *et al.*, 2015). Estudos demonstram que o ZIKV reemergiu como uma significativa ameaça à saúde humana, sendo responsável por inúmeros distúrbios, tais como a síndrome de Guillain-Barré, meningoencefalite e uma variedade de defeitos congênitos em fetos, como, microcefalia, calcificações intracranianas e aborto espontâneo (Cao-Lormeau *et al.*, 2016; Mlakar *et al.*, 2016). Esta ameaça se tornou ainda mais relevante quando constatado que a picada do mosquito não era o único meio de transmissão, evidências clínicas mostraram que ZIKV possui a capacidade de transmissão entre humanos através de rota sexual (Foy *et al.*, 2011; Turmel *et al.*, 2016), bem como por transfusão de sangue infectado e via materno-fetal (Petersen *et al.*, 2016).

Em fevereiro de 2016, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a infecção por ZIKV como uma emergência de saúde pública de interesse internacional. Antes desse anúncio, não havia nenhum esforço para o desenvolvimento de uma vacina contra o mesmo. Em 2017, foi evidenciado a transmissão do vírus Zika (ZIKV) por mosquitos em 84 países e territórios. A falta de vacinas e agentes terapêuticos adequados, dificultou o controle e facilitou a propagação do vírus. As opções de tratamento atualmente disponíveis são de natureza suporte, tais como, acetaminofeno para combater a febre e dor, anti-histamínicos para as erupções na pele, aplicados em conjunto com soro para evitar desidratação (Singh *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2017). Segundo o Ministério da Saúde, em 2019 foram reportados no país 10,768 casos prováveis de ZIKV (taxa de incidência de 5.1 casos por 100 mil habitantes), três mortes e duzentos casos confirmados por diagnóstico molecular. Devido aos efeitos graves da doença, incluindo defeitos congênitos durante a gravidez, agentes terapêuticos e vacinas eficazes se fazem necessários.

1.6 Anticorpos e terapias

Imunoglobulinas são proteínas em formato de “Y”, composta por dois fragmentos de ligação ao antígeno (Fabs) e um fragmento cristalizável (Fc), dos quais os fragmentos Fabs estão ligados ao Fc através de uma região de dobradiça, que permite uma grande flexibilidade para as regiões de ligação ao antígeno. As imunoglobulinas também possuem duas cadeias denominadas leves e pesadas sendo ambas idênticas. O pareamento de uma cadeia leve com uma cadeia pesada, associado com outro heterodímero idêntico forma sua estrutura padrão. As cadeias leves e pesadas dos heterodímeros são ligadas através de pontes dissulfeto, da mesma forma as cadeias pesadas dos heterotetrâmeros. As cadeias leves em humanos podem possuir uma ou duas classes, sendo elas κ ou λ , ambas as classes possuem dois domínios, um constante e um variável. Da mesma forma as cadeias pesadas. Os anticorpos desempenham duas atividades na resposta humoral a um vírus, sendo o primeiro na comunicação, alertando sobre a presença de patógenos invasores nas células infectadas para as células efectoras e, segundo, na interferência nos processos essenciais ao ciclo de vida viral, principalmente na entrada da célula hospedeira. Para indivíduos que se curam da infecção, os anticorpos remanescentes podem fornecer vigilância e proteção ao longo da vida contra futuras infecções (Chiu *et al.*, 2019; Murin, Wilson e Ward, 2019). De tal forma a compreensão da resposta mediada por anticorpos humanos a vírus é fundamental para o desenvolvimento de vacinas, sorodiagnósticos e agentes terapêuticos eficazes, bem como o conhecimento da morfologia do vírus (Marston *et al.*, 2016).

Anticorpos ou fragmentos de anticorpos são amplamente aplicados em terapia humana e diagnósticos (Schubert *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2018). Devido a tal fator, a busca por novos anticorpos terapêuticos é continua. Na literatura já se tem descrito anticorpos neutralizantes para ZIKV, sendo eles monoclonais (mAbs) isolados de camundongos ou indivíduos infectados. Foi demonstrado também que o alvo destes anticorpos são o domínio II ou III da proteína E (Dai *et al.*, 2016; Sapparapu *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2016). No entanto, a aplicação de anticorpos monoclonais em larga escala sofre uma série de limitações técnicas e desvantagens devido ao alto custo de produção e potencial imunogenicidade quando administrado em grandes quantidades em seres humanos (Chames *et al.*, 2009; Smolarek, Bertrand e Czerwinski, 2012). Outro obstáculo encontrado no uso dos mAbs é a limitação do acesso em tecidos crípticos, como publicado por Abbink *et al.*, em 2018 o qual demonstra que um anticorpo específico para o dímero E (EDE) do vírus da Dengue neutraliza de forma cruzada o ZIKV e proporciona uma terapia eficaz em macacos rhesus. Contudo, sua ação é eficaz somente na periferia, sendo sua ação incompleta em determinados sítios de infecção devido a

sua incapacidade de penetração nos mesmos.

1.7 Anticorpos do tipo VHH

Em 1993 Hamers-Casterman *et al.*, descobriram um novo tipo de anticorpo IgG, denominado anticorpos de cadeia pesada (HCAb - *Heavy chain antibody*) presentes no soro de camelídeos. Este anticorpo é menos complexo quando comparado aos anticorpos clássicos, também presente (isotipo IgG1) no soro do animal, devido à ausência das cadeias leves e do primeiro domínio constante (CH1) (isotipo IgG2 e IgG3). As regiões variáveis destes anticorpos de cadeia simples, denominada VHHs ou nanocorpos, consistem em cadeias polipeptídicas únicas ligadas através de uma haste a região Fc com tamanho aproximado de ~15 kDa. Similar aos domínios variáveis dos anticorpos convencionais, VHHs consistem em quatro constantes *framework* (FR1-4) separados por três regiões determinantes de complementariedade hipervariáveis (CDR1-, -2 e - 3). Uma distinta característica da região FR2 dos VHHs é a presença de uma região hidrofílica, que provavelmente evoluiu para compensar a ausência da cadeia leve e auxiliar na estabilidade da molécula. Os CDR1 e 3 são normalmente maiores que os dos anticorpos convencionais, provendo uma maior superfície de interação com antígeno que compensa a ausência da região variável leve (VL). Esta diferença é observada principalmente no CDR3 que possui uma média de 18 resíduos de aminoácidos nos VHHs, em contraste com os 14 resíduos presentes na região variável pesada (VH) dos anticorpos convencionais. Pontes de dissulfeto adicionais são frequentemente formadas entre CDR3 e CDR1 ou FR2 restringindo a flexibilidade do *loop*, garantindo assim uma maior estabilidade para a molécula.

Em 1997, Arbabi Ghahroudi e colaboradores demonstraram que VHHs quando comparado com scFv (*Single Chain Variable Fragment*) ou fragmentos de anticorpos estabilizados com pontes dissulfeto, em condições de variações de temperaturas, apresentam maior estabilidade, mantendo sua capacidade de ligação ao antígeno em torno de 80 a 100%. Em altas temperaturas, fragmentos de anticorpos convencionais expõem seus resíduos de aminoácidos hidrofóbicos presentes na interface entre as regiões variáveis pesada e variáveis leve, o que induz a uma agregação e precipitação dos mesmos. Os VHHs estão sob análise intensiva como potenciais ferramentas diagnóstica e terapêuticas (Fatima *et al.*, 2014; Shali *et al.*, 2018), devido a possuírem características que os tornam mais adequados ao uso na terapia quando comparados aos anticorpos convencionais e seus fragmentos. Os VHHs possuem clonagem fácil, tamanho pequeno, que permite a penetração nos tecidos densos e alta eficiência de expressão em

bactérias, diminuindo o custo quando aplicado em larga escala (Czerwiński e Krop-Watorek, 2005). Assim, os VHH com sua versatilidade estrutural e funcional formam a base de uma nova geração de anticorpos para o uso em diagnóstico e tratamento de doenças infecciosas, devido sua capacidade de ligação em antígenos pequenos e escondidos em fendas

Figura 5- Representação de diferentes tipos de imunoglobulinas.

Fonte: Adaptado Fernandes *et al.*, 2017

(A) Imunoglobulina convencional (IgG) e anticorpo de cadeia pesada (HCAb); (B) Comparação de resíduos de aminoácidos entre os domínios VH e VHH. (C) unidade monovalente VHH.

2. Objetivo

2. Objetivo Geral

Produzir anticorpos de cadeia simples, do tipo VHH, potencialmente neutralizantes como estratégia terapêutica para infecção por ZIKV.

2.1 Objetivos específicos

- ✓ Analisar a conservação dos aminoácidos da proteína de envelope e mapear os potenciais epítomos para uso na neutralização do ZIKV;
- ✓ Avaliar o comportamento da proteína definida como alvo molecular em solução por dinâmica molecular;
- ✓ Produzir a proteína recombinante em sistema heterólogo;
- ✓ Analisar a conformação da estrutura secundária por dicroísmo circular;
- ✓ Avaliar o reconhecimento de soro de pacientes infectados com ZIKV a proteína recombinante expressa;
- ✓ Avaliar a neutralização *in vitro* dos anticorpos gerados a partir da imunização de camundongos Balb/c com a proteína recombinante expressa;
- ✓ Imunizar as *Lama glama* com a proteína recombinante expressa e avaliar a soroconversão.

3. Material e métodos

3.1 Mapeamento dos epítomos miméticos e avaliação por modelos de simulação

Os peptídeos miméticos de epítomos sobre o ZIKV que serão alvos de estudo deste projeto são resultantes do projeto intitulado “*Busca por novos epítomos conformacionais voltada para o desenvolvimento de soroterapia a partir de nanocorpos do tipo VHH para tratamento de doenças virais agudas tropicais com especial foco em zika, chikungunya e febre amarela*”, processo CNPq 118449/2017-6. O alvo inicial é a proteína de envelope que forma a superfície do vírus, ou seja, busca-se a neutralização do vírus antes que ocorra o processo de infecção. A escolha das regiões para a construção dos peptídeos miméticos foi realizada a partir do levantamento de múltiplos fatores como regiões expostas sobre a superfície do vírus que são conservadas, regiões que são alvos de epítomos e outras propriedades estruturais obtidas a partir de simulações da superfície do vírus. Estes estudos indicaram que um alvo inicial seria uma região inter-dímero no domínio II. Esta região é alvo de um anticorpo recentemente descoberto denominado como ZIKV-117 (Sapparapu *et al.*, 2016) que foi encontrado como importante para neutralização frente a um painel de anticorpos monoclonais humanos de indivíduos previamente infectados pelo ZIKV, os quais reconheceram diversos epítomos da proteína de envelope e exibiram uma potente atividade neutralizadora. A partir da análise de todos os dados demonstrados acima, chegou-se a região pertencente ao domínio II da proteína do envelope no qual foi modelada para que seja possível sua expressão.

3.1.1 Busca e análise das sequências

Os genomas do vírus do Zika foram obtidos a partir do banco de dados *Virus Pathogen Database and Analysis Resource* (ViPR) (Pickett *et al.*, 2012) de onde foram extraídas as sequências para a região solúvel da proteína de envelope (sE) entre os resíduos 1-403 (Premkumar *et al.*, 2018). Estas sequências foram filtradas para remoção de sequências incompletas, duplicatas e com baixa qualidade para minimização de viés e obtenção de resultados mais consistentes nas análises subsequentes. Estas análises foram realizadas utilizando para alinhamento das sequências o pacote MAFFT (Katoh e Standley, 2013) a partir do programa Jalview (Waterhouse *et al.*, 2009). O programa *Guidance 2* foi utilizado para o controle de qualidade da matriz de alinhamento resultante (Sela *et al.*, 2015). O alinhamento resultante foi utilizado para estimar o grau de conservação evolucionária a partir do programa *ConSurf 2016* (Ashkenazy *et al.*, 2016). O algoritmo do programa *ConSurf* determina um *score* de conservação relativo para cada resíduo e normaliza estes *scores* de forma que a média fique

igual a zero e valores relativos negativos e positivos denotam o grau de conservação e variação, respectivamente. Os valores relativos para cada score de conservação são então convertidos para valores que variam de 1 até 9 (1 para mais variável, 5 para valores medianos e 9 para mais conservado) de forma a gerar um *heatmap* que foi utilizado para indicar na superfície molecular as regiões de maior conservação e variação.

3.1.2 Modelagem da estrutura terciária a partir da sequência consenso

A sequência consenso foi obtida a partir dos alinhamentos e foi utilizada para a busca por sequências que possuem estrutura tridimensional conhecida para construção de uma estrutura por modelagem por homologia empregando o programa SWISS-MODEL (Ashkenazy *et al.*, 2016). No entanto, foi observado que a sequência consenso para sE é igual as de algumas estruturas depositadas no bando de dados e a etapa de modelagem por homologia não foi necessária. Esta estrutura foi utilizada como referência para as análises posteriores como a definição e visualização do grau de conservação na superfície proteica e construção da estrutura quaternária.

3.1.3 Busca por estruturas dos complexos

As estruturas dos complexos entre a proteína de envelope do ZIKV ou qualquer um de seus fragmentos que estão complexados com anticorpos foram buscadas no *Protein Data Bank* (PDB) (Berman *et al.*, 2002) pelo termo Zika em *Source Organism Browser* seguida pela inspeção manual de cada entrada. Estas estruturas foram então filtradas para remoção de estruturas idênticas e duplicadas em um mesmo arquivo. Posteriormente, os resíduos da proteína de envelope que estavam a pelo menos 0.5 nm de qualquer átomo do anticorpo nestas estruturas foram considerados como constituintes dos respectivos epítomos. Estas análises foram realizadas com o programa *Pymol* (Schrodinger, 2015) e de um *script* em *bash* que foi construído para extração da lista de resíduos. Posteriormente, o conjunto de resíduos encontrados foram mapeados na estrutura de referência gerada para visualização das regiões sobre a proteína sE.

3.1.4 Cálculo das distâncias até o centro do vírus

As distâncias médias de cada resíduo da sE até o centro geométrico do vírus foram calculadas com a finalidade de mapear as regiões mais expostas da sE sobre o vírus. O cálculo foi realizado utilizando como referência a estrutura 5IRE (Sirohi *et al.*, 2016) cujas coordenadas foram utilizadas para o cálculo de centro geométrico. Posteriormente, a estrutura obtida a partir

da modelagem por homologia foi sobreposta a cada uma das cadeias do trîmero que forma a unidade assimétrica e sobre estas cadeias foram realizados os cálculos das distâncias médias de cada resíduo até o centro geométrico para cada uma das cadeias da unidade assimétrica.

3.1.5 Construção das superfícies moleculares a partir das informações levantadas

Os valores obtidos para cada uma das propriedades determinadas ao longo das análises foram visualizados sobre a superfície do vírus utilizando como referência a estrutura sE. Para visualização de certa propriedade o respectivo valor para cada resíduo foi inserido na coluna que corresponde ao fator B de temperatura do arquivo no formato do PDB a partir do programa *gmx editconf* do pacote GROMACS (Abraham *et al.*, 2015). Foi utilizado o programa *Pymol* para visualização, onde as respectivas cores que correspondem às propriedades foram mapeadas com a função *spectrum b*.

3.2 Estudo da interação do epítipo alvo com anticorpo convencional por simulação de dinâmica molecular (DM)

As análises anteriores levaram a uma região importante para a construção de epítopos localizada na extremidade do domínio DII onde foram identificados o sítio de ligação de dois anticorpos a partir de informações estruturais. Estes anticorpos são denominados como ZIKV-117 e Z20 e foram isolados de pessoas infectadas com o ZIKV. No caso do ZIKV-117 os resíduos Asp67, Gln89 e Lys118 foram caracterizados como principais responsáveis pela ligação e foram denominados como resíduos críticos a partir de estudos de metagênese sítio dirigida (Sapparapu *et al.*, 2016). Em outro estudo, foi determinada a posição deste anticorpo na superfície do vírus a partir de cryo-EM, porém utilizando a estrutura de um anticorpo para dengue como modelo (Hasan *et al.*, 2017). Estes trabalhos não contêm informações sobre a sequência e estrutura deste anticorpo. O Z20 tem sequência e estrutura determinada por RX e encontra-se na mesma posição em relação à proteína E observada para o ZIKV-117 (Wang *et al.*, 2016), porém com uma troca entre as cadeias L e H da região Fab do anticorpo como pode ser observado na **Figura 6**. Estes resultados indicam que se deve tratar do mesmo anticorpo, porém no caso do ZIKV-117 a orientação é diferente devido à reconstrução da estrutura a partir das densidades obtidas por cryo-EM. Portanto, o objetivo principal desta etapa do trabalho foi estudar a estrutura do complexo Z20/E que tem estrutura com uma boa resolução com a finalidade de buscar informações detalhadas sobre as estruturas e interações para a formação do complexo. As informações obtidas foram confrontadas com os resultados descritos na

literatura para ZIKV-117 e mostraram que os resíduos críticos são também críticos para a interação com Z20. Este estudo permitiu também a construção de uma metodologia para avaliação dos miméticos que serão propostos.

Figura 6– Complexos formados pela Z20 e ZIKV-117 sobre a proteína de envelope.

Complexos formados pela Z20 (verde) e ZIKV-117 (ciano) sobre a proteína de envelope do ZIKV mostrando a sobreposição somente da proteína E (A) e da região Fab (B) indicando os dois anticorpos estão em orientações diferentes sobre o epítipo na proteína E.

3.2.1 Estrutura inicial do complexo

A estrutura Fab do anticorpo Z20 obtida a partir de pacientes infectados com o vírus complexada com a proteína de envelope encontra-se depositada no PDB sob o código 5GZO (Wang *et al.*, 2016). Como o interesse do estudo está nas interações específicas antígeno/anticorpo foi utilizado somente o domínio II da proteína de envelope, que é formada por dois trechos (Met53- Pro132 e Ser199-Ser286) que corresponde à cadeia A, enquanto que as cadeias leve e pesada do anticorpo correspondem às cadeias L e H (Figura 12). Os resíduos

que estavam faltando na estrutura tridimensional do anticorpo (Cys214 e Ser215 da cadeia H e Lys135, Ser136, Thr137, Ser138, Gly139) foram inseridos com o programa Modeller (Webb e Sali, 2016). Os estados de protonação foram determinados a partir do programa H++ em pH 7 e força iônica de 150 mM (Anandakrishnan, Aguilar e Onufriev, 2012). A estrutura inicial do complexo foi inserida em uma caixa periódica dodecaédrica, dimensionada com uma distância mínima de 1,5 nm entre qualquer borda de caixa e átomos do complexo, que foi solvatada e posteriormente neutralizada com contra-íons líquida do sistema.

3.2.2 Definição dos CDRs

A predição dos CDRs para definição destas regiões foi realizada pelo método de Chotia utilizando o programa SAbPred (Dunbar *et al.*, 2016), onde os intervalos dos resíduos de Gly26-Asn33 (HCDR1), Tyr53-Ser57 (HCDR2) e Asp99-Tyr108 (HCDR3) da cadeia H correspondem aos 3 CDRs da cadeia pesada e os intervalos de Arg24-Trp35 (LCDR1), Ala50-Ser56 (LCDR2) e Leu89-Thr97 (LCDR3) da cadeia L correspondem aos 3 CDRs da cadeia leve (**Figura 7**).

Figura 7 – Estrutura inicial do complexo utilizado nos estudos de simulação por dinâmica molecular.

Duas visões laterais a partir de uma rotação de 90° no eixo principal do complexo. O domínio II da proteína de envelope que correspondem aos dois intervalos dos resíduos Met53-Pro132 e Ser199-Ser286 é mostrada na cor verde enquanto que as cadeias pesada e leve são mostradas em ciano e magenta, respectivamente, onde as respectivas alças CDRs estão indicadas para cada uma.

3.2.3 Detalhes da simulação

A simulação por DM foi realizada com o programa GROMACS-5.1.4 (Abraham *et al.*, 2015). As proteínas e íons foram modelados com o campo de força Amber 99SB-ILDN (Lindorff-Larsen *et al.*, 2010) e as moléculas de água com o modelo TIP3P (Jorgensen *et al.*,

1983). As ligações com átomos de hidrogênio das proteínas foram restringidas com o algoritmo LINCS (Hess *et al.*, 1997), enquanto que o algoritmo SETTLE (Miyamoto e Kollman, 1992) foi usado para manter a estrutura das moléculas de água. A temperatura igual a 310.15 K e a pressão de 1 atm foram reguladas pelos algoritmos de Berendsen's (Postma *et al.*, 1984). As interações foram calculadas considerando um raio de corte de 1.0 nm onde o método *particle mesh Ewald summation* (Darden, York e Pedersen, 1993) foi usado para calcular a contribuição de longo alcance das interações eletrostáticas. As equações de movimento foram integradas utilizando o algoritmo *leap-frog* (Hockney, Goel e Eastwood, 1974) com tempo de integração de 2 fs. As simulações foram iniciadas através de uma fase de minimização de energia com o algoritmo *steepest descent* seguida por uma fase de simulação por 100 ps com restrições para os átomos do complexo no ensemble NVT. Posteriormente, a termalização do sistema no ensemble NpT foi realizada a partir de simulações curtas de 10 ps com um aumento sucessivo da temperatura de 60.15 K até 310.15 K em intervalos de temperatura de 50 K. A simulação de produção para posterior análise da trajetória foi realizada no ensemble NpT por 200 ns.

3.2.4 Análise de trajetória

As coordenadas de todos os átomos foram gravadas a cada 50 ps para as análises que foram realizadas com programas de análise do GROMACS-5.1.4 e programas escritos especificamente para necessidades variadas. As ligações de hidrogênio (HB) foram calculadas utilizando critérios geométricos com uma distância entre o par doador-receptor menor do que 0.35 nm e um ângulo entre os vetores doador-hidrogênio e doador-receptor menor do que 30°. As pontes salinas foram determinadas a partir de critério de distância entre átomos de resíduos com cargas opostas inferiores a 0.4 nm (Barlow e Thornton, 1983) e os contatos hidrofóbicos entre cadeias laterais que tem pares de átomos de carbono em distância inferior a 0.39 nm (Wallace, Laskowski e Thornton, 1995). A energia livre de ligação do complexo e sua decomposição por resíduo foram estimadas usando o método *Molecular Mechanics-Poisson-Boltzmann Surface Area* usando o programa MMPBSA.py do AmberTools16 com *Generalized Born (GB) implicit-solvent model* (Miller *et al.*, 2012). Os cálculos foram realizados considerando a trajetória de 100 até 200 ns a cada 1 ns resultando num total de 100 snapshots. Os gráficos foram construídos com o programa *ggplot2* do *Rstudio* (Wickham, 2009).

3.2.5 Predição da estrutura secundária a partir da simulação molecular

O programa *gmx do_dssp* (*Dictionary of Secondary Structure of Proteins*) desenvolvido por Wolfgang Kabsch e Chris Sander (Kabsch e Sander, 1983), permite definir a conformação da

estrutura secundária, características geométricas e comportamento dos aminoácidos quando expostos a solventes, a partir das coordenadas atômicas das ligações de hidrogênio entre os átomos. O programa trabalha calculando a conformação da estrutura secundária mais provável dado a sua estrutura 3D, o qual lê a posição dos átomos na proteína e, posteriormente, calcula a energia de ligação de hidrogênio entre os mesmos. Assim, o algoritmo define qual melhor ligação de hidrogênio para cada átomo, determinando a classe mais provável de estrutura secundária para cada resíduo na proteína. A partir 200 ns gerados pela simulação realizada anteriormente, foi possível definir avaliar os aminoácidos em solução utilizando-se o programa gmx do_dssp e definir as porcentagens das estruturas secundárias.

3.3 Expressão da proteína recombinante

3.3.1 Vetor de expressão

A sequência nucleotídica da proteína do domínio II do envelope do ZIKV (Tabela 1) foi sintetizada e clonada no vetor de expressão pET-28a (**Figura 8**) pela empresa Genone© (BR). O plasmídeo foi entregue liofilizado, posteriormente ressuspensionado em 20µl de água ultrapura (autoclavada), conforme recomendações do fabricante.

Figura 8- Vetor de expressão pET28a.

O vetor possui uma calda de Histidina (His-tag) na porção N-terminal, um sítio de trombina e uma sequência T7. XhoI e NdeI foram escolhidas como enzimas de restrição para inserção da sequência da proteína recombinante de ZIKV. ORI – Origem de replicação do bacteriana; KanR – Gene de resistência ao antibiótico Kanamicina; Promotor – LacI; f1 origin- Origem de replicação do bacteriófago. Imagem gerada no software SnapGene© Copyright 2018 GSL Biotech LLC.

3.3.2 Transformação em *E. coli* DH5α

As células competentes da linhagem DH5α foram utilizadas para transformação com vetor mais o inserto – pET28amodel3-W101H, com a finalidade de aumentar a quantidade de plasmídeo disponível para as futuras expressões. Foram adicionados 98 uL de bactérias DH5α a 2uL do plasmídeo ressuspendido em água autoclavada, a solução foi incubada por 20 minutos a uma temperatura de 0°C, e posteriormente, submetida a choque térmico, por 90 segundos, á 42°C para inserção do DNA a bactéria. Após o choque térmico, a solução retornou a temperatura de 0°C por 2 minutos. Para regeneração das bactérias em solução, foi adicionado 1 mL de meio de cultura Luria Bertani (LB) (Tryptona: 10g.L⁻¹; NaCl 10g.L⁻¹, extrato de levedura 5g.L⁻¹) acrescidos de MgCl₂ e 10 mmo/L de glicose, mantidos em agitação de 180rpm á 37°C por 1 hora. As células transformadas foram submetidas a centrifugação 5000xg por 3 minutos, 900 µL do sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspendido no meio LB restante. Posteriormente, as bactérias transformadas foram inoculadas em placa de Petri com meio LB sólido (15g/L) contendo 35µg/mL de canamicina (Sigma) e acondicionadas em estufa de cultura a 37°C por 12 horas. As colônias crescidas após a incubação foram lançadas em 6 tubos com 5 mL de meio LB líquido e 100 µ.mL⁻¹ de canamicina, em seguida, incubadas a 37°C em agitação de 180 rpm *overnight*. No dia seguinte, a cultura foi submetida a centrifugação por 3 min á 4°C 4000xg em eppendorf DNase *free* de 2 mL, o sobrenadante foi descartado e o processo foi repetido por cima do *pellet* formado. Posteriormente, o *pellet* foi ressuspendido em 35 µL tampão GET (50 mM glicose, 10mM EDTA, 25 mM Tris-HCl pH 8) e 200µL de tampão de lise (200 mM/L de NaOH, 1% SDS) que, após mistura por inversão, ficou incubada por cinco minutos. Após a lise, foi adicionado 150 µL de 3 mol/L acetato de potássio na solução, incubada por cinco minutos. A solução foi centrifugada por 5 minutos 10000xg a 4°C e o sobrenadante foi precipitado com 100% etanol, lavado com 70% etanol, seco e incubado por duas horas a 37°C em solução 200 µg/mL de RNase A (Sigma). Após o tratamento com RNase A, o DNA foi extraído com fenol (dois volumes de fenol, centrifugação por 5 minutos 10000xg a 4°C, coleta da fase aquosa) e precipitado (10% 3mol/L acetato de sódio, dois volumes de 100% etanol, centrifugação por 5 minutos 10000xg a 4°C, lavagem com 70% etanol, seco e ressuspendido em 20 µL de água ultrapura (autoclavada). Para verificar a purificação do

plasmídeo foi realizado gel de agarose 1%, corado com Brometo de Etídio, como controle positivo foi utilizado o plasmídeo comercial.

3.3.3 Sequenciamento automático dos plasmídeos

Os plasmídeos foram preparados para a reação de sequenciamento (SANGER, NICKLEN; COULSON, 1977), utilizando as instruções do kit Big Dye® Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems). As amostras foram sequenciadas no Laboratório de Sequenciamento de Ácidos Nucleicos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Após o sequenciamento, os eletroferogramas gerados foram analisados com o auxílio do programa Chromas (Technelysium Pty Ltd) e o alinhamento comparado com a sequência original utilizando a plataforma CLUSTALW (Kyoto University Bioinformatics Center).

3.3.4 Expressão da proteína recombinante

O vetor contendo a sequência da proteína recombinante, fusionada a uma cauda N-terminal His-tag, foi transformado em cepas de *E. coli* Shuffle através do método de choque térmico em uma proporção de 2 µL de plasmídeo para 98 µL de bactérias competentes. Em seguida, a regeneração das bactérias foi feita por uma hora a 37° C em 1 mL de meio de cultura LB, acrescidos de 10 mmol/L de MgCl₂ e glicose. As células foram posteriormente centrifugadas (centrífuga Eppendorf, modelo 5415 R) a 5000xg por 3 minutos a 25 °C. O *pellet* foi ressuspensionado em 100 µL de meio de cultura e plaqueadas em meio LB (meio de cultura LB enriquecido, composto por triptona: 25g/L; extrato de levedura 15g/L; Ágar bacteriológico 15g/L em pH: 7,8) sólido seletivo (contendo 34µg/mL de Streptamicina e 35µg/mL kanamicina) a 37°C por 24 horas, posteriormente uma das colônias isoladas foi lançada em um tubo de ensaio contendo 5 mL de LB líquido acrescidos de 34µg/mL de Streptamicina, 35µg/mL kanamicina. Os tubos foram colocados sob agitação de 180 rpm em temperatura de 37°C. Após 12 horas de crescimento, os inóculos foram passados para 400 mL de meio LB líquido contendo 34µg/mL de Streptamicina e 35µg/mL de canamicina, colocados sob agitação de 180 rpm em temperatura de 30°C. O aumento da expressão foi induzido com 0.6 mmol/L de *isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside* (IPTG, Promega) quando a cultura atingiu uma OD 0.6 a 600 nm e a temperatura mudada para 16°C. Após 24 horas, as células foram centrifugadas a 5000x g por 10 minutos a 4°C. O *pellet* foi então ressuspensionado em 20 mL de tampão de lise (50 mmol/L fosfato de sódio, 300 mmol/L NaCl, 40 mmol/L imidazol pH 8.0) contendo 4 mmol/L *phenylmethylsulfonyl fluoride* (PMSF, Sigma) e 1% (v/v) Triton X-100. Após a

completa dissolução do *pellet*, foi realizado um gradiente de sonicação (Sonicador de sonda, Fisher Scientific) por 7 x 30s com intervalos de 30s entre cada pulso e posteriormente centrifugados a 10000xg por 30 min a 4°C. A fração solúvel foi purificada diretamente. Antecedendo ao início da expressão em grande escala um *screening* foi realizado a fim de avaliar quais eram as melhores condições para expressão da proteína. Variáveis como cepas, temperatura e concentrações de IPTG foram avaliados, como demonstrado na **tabela 1** e **2**.

Tabela 1 – *Screening* de cepas BL21 em dois grupos de temperatura.

Cepas	Temperatura (°C)	Concentração IPTG (mmol/L)	Tempo de expressão (horas)	Visualização da expressão*
BL21 Roseta	20°	0,6	5	Não
	37°			Sim
BL21 Códon Plus	20°	0,6	5	Não
	37°			Sim
BL21 (DE3) pLysS	20°	0,6	5	Não
	37°			Sim

*Visualização da banda de expressão em SDS-PAGE 15% após 5 horas de indução com IPTG.

Posteriormente, baseando-se nas bandas de expressão definiu-se a cepa BL21 (DE3) pLysS como a melhor dentre as testadas para prosseguir com os testes subsequentes de variação do indutor IPTG, como demonstrado na **tabela 2**. A cepa SHuffle não estava incluída nos testes iniciais em conjunto com as demais cepas devido sua aquisição ocorrer posteriormente. Não houve necessidade de padronização na expressão da mesma.

Tabela 2 – *Screening* de concentrações do indutor IPTG em cepas BL21 (DE3) pLysS.

Cepa	Temperatura (°C)	IPTG (mmol/L)	Tempo (horas)	Visualização da expressão*
BL21 (DE3) pLysS	37°	0,2	5	Sim
		0,4		Sim
		0,8		Sim
	20°	0,2	24	Sim
		0,4		Sim
		0,8		Sim

*Visualização da banda de expressão em SDS-PAGE 15% após 5 horas de indução com IPTG.

Após definido as variáveis de expressão, as frações solúveis e insolúveis da cultura com cepa BL21 (DE3) pLysS, bem como a solúvel da cepa SHuffle, foram submetidas a purificação similar em sistema *ÄKTA fast protein liquid-chromatography* (FPLC) (GE Healthcare) com colunas HiTrap FF Crude 5 mL (GE Healthcare). A fração ligada a coluna foi eluída usando um gradiente linear de imidazol (0 a 0.5 M), sendo a proteína majoritária resultante analisada por SDS-PAGE 15% e coradas com *Coomassie brilliant blue* R-250 (Sigma-Aldrich).

3.3.5 Dot Blot

A partir de uma membrana de transferência de nitrocelulose Amersham™ Hybond™ - ECL (GE Healthcare) com pontos pré-determinados (**Figura 8 –A**), as respectivas amostras (**Figura 8 –B**) foram pipetadas em cada ponto e, posteriormente, a membrana foi reservada para secagem e fixação da amostra durante uma hora e meia. O bloqueio da membrana foi realizado durante duas horas e meia com tampão TBS (500 mM Tris, 1,5 M NaCl pH 7,4) + 5% de leite desnatado em agitação. Posteriormente, dilui-se o anticorpo anti-histag (1/4500) em tampão TBS+ 5% de leite desnatado e aplicou sobre as amostras, encubou-se *overnight* sob agitação. No dia seguinte, lavou-se três vezes com tampão TBS+ 5% de leite desnatado e, em seguida, mais três vezes com tampão TBS sem leite. O anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo) foi diluído (1/2500) e incubado por três horas e meia, sob agitação. Em seguida, lavou-se a membrana três vezes com tampão TBS e aplicou-se o revelador por 15 minutos.

Figura 9 – Demonstração esquemática da membrana de nitrocelulose e seus respectivos pontos da expressão com cepa BL21 (DE3) pLysS.

	Amostra	Volume (μL)
1	Extrato Solúvel	5
2	Wash	5
3	Anti-histag	0,5
4	flow-through	5
5	Extrato Insolúvel	5
6	T5	5
7	C+	2

3.3.6 Dicroísmo circular (DC)

Os espectros de DC da proteína recombinante advindos da fração solúvel e insolúvel foram obtidos em um espectropolarímetro JASCO810 (JASCO Inc., Tokyo, Japan - alocado no Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP), em uma cubeta de quartzo de 0,1 cm. Cada espectro de DC acumula quatro varreduras a 50 nm/min com uma fenda de 1 nm de largura e com uma resposta de 1 segundo. Os espectros de UV distante da proteína recombinante (0,2 mg/mL) foram coletados entre 190-250 nm para o monitoramento da estrutura secundária em tampão 20 mmol/L fosfato/citrato, pH 7, dialisado por 12 horas, para certificar o a completa remoção de sais. Utilizou-se também como método alternativo de remoção de sais da fração insolúvel o Amicon® Ultra centrifugal Ultra 3K, sete rotações a 4000g por 10 minutos a 4°C. Como branco foi utilizado o tampão da diálise. O espectro foi corrigido para as contribuições dos tampões e convertidos para MRE (mean residue ellipticity) em deg.cm².mol⁻¹, definido como:

$$MRE = \frac{M\theta_{\lambda}}{10dcr}$$

O qual M é a massa molecular da proteína, θ_{λ} é o valor obtido a partir do aparelho em milidegree, d é o caminho óptico em cm, c é a concentração da amostra de proteína em mg/mL e r é o número estimado de resíduos de aminoácidos na proteína analisada (Kelly e Price, 1997). Posteriormente, o resultado gerado foi plotado na plataforma online DICHROWEB (Lobley, Whitmore e Wallace, 2002), afim de verificar a porcentagem de cada estrutura secundária. A

base de dados escolhida foi SP175 (Lees *et al.*, 2006) e CONTIN (Provencher e Glöckner, 1981) como programa de análise de dados.

3.4 Avaliação Sorológica

3.4.1 Avaliação da resposta sérica de IgG de pacientes infectados com ZIKV frente a proteína recombinante

A avaliação da ligação sérica de IgG de pacientes confirmados com infecção por ZIKV frente ao peptídeo mimético foi realizado através do teste de ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto. Placas de 96 poços *high binding* foram sensibilizadas com 50µL/poço da proteína recombinante em diferentes concentrações (1, 5 e 10 µg/mL em triplicatas), *overnight* em temperatura ambiente. Como controle positivo foi utilizado a proteína do envelope do ZIKV nas mesmas concentrações. Nos poços controles negativos foi utilizado tampão carbonato. Passada as 24 horas, a placa foi lavada três vezes com PBS *Tween* 5 para a remoção dos não ligantes. O bloqueio foi realizado por 1 hora com 200µL de PBS BSA 1%. Posteriormente, foi realizado 3 lavagens com PBS *Tween* 5. Quatro soros diferentes (A02, D20, D21, D38) de pacientes infectados com Zika (50µL/poço -Diluição 1/200) foram aplicadas e incubadas em câmara úmida por 2 horas a 37°C e posteriormente por 24 horas a 4°C. No dia seguinte, foi realizada 6 lavagens com PBS *Tween* 5 para remoção dos anticorpos não específicos. A ligação do soro foi avaliada utilizando 50µL/poço de anticorpos anti-IgG humana de cabras conjugada com HRP, na proporção de 1:2000, incubados por 1 hora a temperatura ambiente e sob agitação. No controle negativo, sem anticorpos secundários, foi utilizado PBS BSA 1%. Efetuou-se 6 lavagens consecutivas com PBS *Tween* 5 para remoção dos anticorpos não ligados. A revelação procedeu-se com 50µL de TMB, seguida de 25µL de *stop solution* para finalização da reação. A leitura foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 450 nm. Ressalva-se que uma curva de ligação da proteína recombinante a placa de ELISA foi realizada com anti-histag com protocolo semelhante ao descrito anteriormente, afim de confirmar a aderência da mesma a placa, resultado não demonstrado.

3.4.2 Imunização dos camundongos BALB/c

O soro foi obtido a partir de camundongos Balb/c, imunizados via intraperitoneal, semanalmente. A primeira imunização foi realizada com 30µg de proteína recombinante junto com adjuvante de Freund's completo. As demais três imunizações foram feitas com a mesma quantia de proteína recombinante, porém com adjuvante de Freund's incompleto. Os soros

advindos dos animais imunizados foram aquecidos a 56°C por 1 hora para inativação de proteínas do sistema complemento.

3.4.3 Teste de Neutralização por Redução de Plaque (PRNT)

O teste de neutralização por redução de 50% das placas virais (PRNT50) foi realizado. Para tanto, 1 dia antes da infecção, 4×10^5 células Vero foram semeadas em orifícios de placas com 24 poços. As diluições dos soros foram misturadas ao ZIKV em quantidade constante de $5,75 \times 10^5$ PFU, valor de vírus definido após titulação viral (resultado não apresentado). Para que ocorresse a neutralização, incubou-se as misturas soro-vírus por 1 hora a 37°C. Em seguida, 100µl das misturas soro-vírus foram inoculadas aos poços da placa, sobre a monocamada de células Vero e incubou-se por 1 hora a 37°C sob gentil agitação para que ocorresse infecção celular. Posteriormente, adicionou-se sobre as monocamadas celulares, 2ml de DMEM (Gibco – Life technologies™) pré-aquecido contendo 2% de carboximetilcelulose CMC e 2% de soro fetal bovino (SFB) (Vitrocell, Brasil) e incubou-se por 4 dias a 37°C em 5% de CO². Ao final, fixaram-se as células removendo o meio contendo ágar e adicionando 2ml de solução formaldeído a 10% em PBS, em seguida, incubou-se por 2 horas, desprezando o sobrenadante. As células foram coradas com 1ml de cristal violeta a 1% por 1 hora. As placas virais foram contadas, sendo as mesmas consideradas as áreas não coradas em meio à monocamada celular, e comparou-se este número ao obtido em orifício contendo o controle-negativo com vírus.

3.4.4 Aspectos éticos e imunização

O espécime *Lama glama* utilizado no estudo pertencem ao plantel de animais mantidas no biotério de manutenção da Fiocruz Rondônia, manejados pelos técnicos da Plataforma de Criação e Experimentação Animal (PCEA). Os procedimentos experimentais envolvendo o camelídeo foram realizados de acordo com as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovados pela Comissão de Ética institucional no Uso de Animais (CEUA) da Fiocruz Rondônia, sob o protocolo 2019/08.

Após verificação da sanidade animal por meio da avaliação clínica pelos técnicos PCEA e a realização de exames hematológicos e bioquímicos, o espécime *Lama glama* foi imunizado com 30% do peptídeo Zika, 70% de adjuvante *MONTANIDE™* ISA 61 VG e solução salina ajustadas para o volume final de 1000 µL. As imunizações se deram por via subcutânea, de acordo com protocolo adaptado de Delahau (2017). Visando a titulação dos anticorpos produzidos pelo animal, durante o período de imunização, foram realizadas coletas semanais para acompanhamento da resposta imune, a partir do dia zero.

3.4.5 Avaliação da resposta imune por ELISA

A resposta imune do animal dirigida por imunização com a proteína expressa foi monitorada por ensaio imunoenzimático do tipo ELISA. Para isso, placa 96 poços do tipo Nunc-MaxiSorp (eBioscienc -EUA) foi adsorvida com o a proteína expressa (0,18mg/ml) utilizando a concentração final por poço 0,5µg/100µl com tampão carbonato-bicarbonato a 0,05M com cm pH 9,6. A placa contendo a reação foi incubada a 4°C por 16 horas. Na sequência a placa foi lavada por 3 vezes com tampão PBS 1X pH= 7,4 + *Tween* 0,05% (350µL/well).

Em seguida, foram adicionados 200 µL de Solução Bloqueio 5% - SB (5% Leite desnatado – Molico + PBS 1X pH= 7,4). Submetida a incubação em câmara úmida por 4 horas a 4 °C. Após a incubação a placa foi novamente lavada 3X com PBS 1X pH= 7,4 + *Tween* 0,05% - (350µL/well). Os soros do animal pré e pós-imunizado foram diluídos de forma seriada em SB de 10³, 10⁴, e 10⁶ dispostos em duplicada na placa e submetido a incubação a 4°C *overnight*.

A placa foi lavada 3X com PBS 1X pH= 7,4 + *Tween* 0,05% - (350µL/well). Em seguida, foram adicionados 100 µL Anti-VHH produzido em llama na diluição 1:1000 (1µL Anti-VHH + 999 µL de SB 5%). O Anti-His foi adicionado na diluição 1:5000 (1µL Anti-His + 4.999 µL de SB 5%), e somente aplicado nos poços “CP His”. A placa contendo a reação foi incubada a 4°C *overnight*.

Para a adição dos anticorpos secundários (anti-IgG produzido em coelho c/ – e anti-mouse com peroxidase), a placa foi lavada 3X com PBS 1X pH= 7.4 + *Tween* 0,05% - (350µL/well). Em seguida, foram adicionados 100 µL Anti-IgG produzido em coelho na diluição 1:5000 (1µL Anti-IgG + 4.999 µL de SB 5%). O anticorpo anti-mouse conjugado com peroxidase foi adicionado na diluição 1:5000. Sendo que esse foi adicionado somente nos poços descritos como “CP His”. Em seguida, a placa foi armazenada em câmara úmida a 4°C por 4 horas.

Após as 4 horas, a placa foi lavada 3X com PBS 1X pH= 7,4 + *Tween* 0,05% - (350µL/well). Foram adicionados 100 µL de solução reveladora (TBM+DMSO+Tampão citrato fosfato pH 5,0 + H₂O₂ 30%) a temperatura ambiente em cada poço. A placa foi armazenada ao abrigo da luz, em temperatura ambiente por 30 minutos. Após os 30 minutos, foram adicionados à reação de cada poço 100 µL de H₂SO₄ 2M (Ácido Sulfúrico), e a leitura foi realizada imediatamente em leitor de placa na absorbância de 450nm.

3.5 Construção da biblioteca gênica de nanocorpos de camelídeos

3.5.1 Isolamento de linfócitos periféricos

Após avaliação do aumento de título dos anticorpos produzidos pelo espécime *Lama glama* mediante acompanhamento da resposta imune induzida pela imunização com o peptídeo Zika, foram coletados 25mL de sangue periférico em tubo contendo 2mL de EDTA 3M pH 6,7. O sangue total foi diluído na proporção 1:1 (v:v) de solução balanceadora (D- Glicose Anidra 0.1 %; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5.0×10^{-5} M; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 9.8×10^{-4} M; KCl 5.4×10^{-3} M, Tris Base 0.145 M e NaCl 0.14 M) e submetido à formação de gradiente de densidade um tubo 50 mL tipo Falcon sobre o *Ficoll-Paque PLUS®* (Amershan Biosciences).

Seguida por centrifugação por 400 *xg* por 30min a 20°C. Após centrifugação a interface formada contendo os linfócitos foi recuperada e foram adicionados 1:3 volumes de solução balanceadora e seguidos de uma nova centrifugação a 100 *xg* por 10min a 20 °C. Os linfócitos precipitados foram ressuspensos com um volume de 6 mL de solução balanceadora e centrifugados por 100 *xg* por 10 min a 20 °C, em seguida foi descartado o sobrenadante e as células foram solubilizadas em 1mL de solução balanceadora.

A contagem das células isoladas foi realizada em hemocitômetro com diluição 1:20 volumes em corante azul de tripan (0,1%), observadas em microscópio óptico na objetiva de 40X. O cálculo baseou-se na contagem dos linfócitos encontrados nos quatro quadrantes do hemocitômetro (4 mm²), levando em consideração para o cálculo o número de células/mL.

3.5.2 Extração de RNA

A extração de RNA foi realizada a partir do método de *TRIzol® Reagent* (Invitrogen™), onde para a lise celular foi utilizado 250µL de suspensão de células e 750µL de *TRIzol® Reagent* (Invitrogen™), homogeneizadas e incubadas durante 5 min à temperatura ambiente (TA). Seguindo para a etapa de separação foi adicionado 200µL de clorofórmio, homogeneizado vigorosamente por inversão por cerca de 15 segundos e submetido a incubação por 3 min a TA. Seguida por centrifugação por 12.000 *xg* por 15min a 4 °C.

A fase aquosa superior formada foi recuperada em um novo tubo para o procedimento de precipitação do RNA. Para isso foi adicionado 500µL de isopropanol (P.A) homogeneizado por inversão e incubado por 10 min a temperatura ambiente (TA). O precipitado foi obtido a partir de centrifugação a 12.000 *xg* por 10min a 4 °C e submetido a lavagem com 1mL de etanol a 75%, e subsequente centrifugação a 7500 *xg* por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, e sedimento foi solubilizado com 30 µL de água tratada DEPC, incubada a 55 °C por 15 min

para total solubilização, a concentração foi estimada por leitura em espectrofotometro Nanodrop® (Thermo Scientific) e armazenado a -80 °C.

3.5.3 Síntese de fita de DNA complementar (cDNA)

Para a síntese do cDNA foi utilizado o kit da enzima *SuperScript™ III First-Strand Synthesis System* (Invitrogen™), de acordo com as instruções do fabricante. Para a reação uma mistura contendo 1µg de RNA total, 1µL de 10 mM de dNTP mix, 1µL de iniciador Oligo (dT)₂₀ (50 µM), qsp 10µL água DEPC. A reação foi incubada a 65 °C por 5 min e após submetido a incubação no gelo por 1 minuto. Em seguida, 2µL de 10X RT tampão, 4µL de 25 mM MgCl₂, 2µL de 0,1M DTT, 1µL de RNaseOUT (40 U/µL) e 1µL de *SuperScript III RT* (200 U/µL) foram adicionados. A reação foi submetida a incubação por 50min a 50 °C. A reação foi finalizada por meio de uma incubação a 85 °C por 5 minutos. Ao final foi adicionado 1µL de RNase H (2U/µL), incubada por 20 min a 37 °C. O cDNA foi armazenado em *freezer* a -20 °C.

3.5.4 Amplificação da região variável da cadeia pesada (VHH) por Reação em Cadeia da Polimerase

A partir do cDNA foi realizada a amplificação das regiões codantes das cadeias variáveis das imunoglobulinas do tipo G, IgG2 e IgG3, correspondentes aos anticorpos de cadeia pesada dos camelídeos. A reação de polimerase em cadeia (PCR) foi realizada utilizando oligonucleotídeos genes específicos, descritos inicialmente por Ghahroudi e colaboradores (1997). Para a reação foi realizado um mix contendo 5µL de 10x HotMaster™ *Taq* tampão com Mg²⁺ (2,5mM Mg²⁺), 1µL 0.25 mM de dNTPs, 10pmol/µL de cada oligonucleotídeo VH BACK A6 e CH2FORTA4, 0,5µL de 2.5U HotMaster™ *Taq* DNA Polymerase e qsp 50 µL de água tratada com DEPC, onde foram testadas diferentes diluições do cDNA, a saber, diluídos 10¹, 10², 10³ e sem diluir, para determinar as melhores condições para amplificação. Para o controle negativo foi testado o mix com ausência de DNA e como controle positivo foi testado cDNA oriundo de bibliotecas gênicas do Laboratório de Engenharia de Anticorpos da Fiocruz Rondônia. A reação foi realizada em termociclador (*Applied Biosystems*) de acordo com os ciclos descritos na tabela 2.

Os fragmentos de DNA obtidos após a amplificação foram analisados a partir de eletroforese em gel de agarose 1,5% com amperagem fixa (150 mA) corados com GelRed™ 1X (*Biotium Glowing Products for Science™*), e visualizados com auxílio de transluminador por meio de luz UV em ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare). Os fragmentos de

aproximadamente 600 pares de bases (pb), correspondentes as regiões codantes da região hipervariável dos anticorpos de cadeia pesada, foram excisados do gel e submetidos a purificação utilizando o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean UpSystem* (Promega, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O produto da purificação foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1,5 % para visualização e quantificação, utilizando como referência o marcador *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen, EUA, visualizados com auxílio de transluminador por meio de luz UV.

Após purificação utilizando o produto da PCRI foi submetido a uma nested PCR utilizando os *primers* VHFOR36 e VHBACKA4 (GHAHROUDI et al.,1997), que é responsável por amplificar o fragmento gênico correspondente ao domínio VHH dos anticorpos de cadeia pesada de camelídeos, e se inserem nas regiões 5' e 3' das sequências, dos sítios para as endonucleases de restrição *SfiI* e *NotI*.

Tabela 3- Oligonucleotídeos genes específicos utilizados na reação de PCR.

PCRI	OLIGONUCLEOTÍDEOS GENES ESPECÍFICOS
VH BACK A6	5'-GAT GTG CAG CTG CAG GCG TCT GG(A\G) GGA GG-3'
CH2 FOR TA4:	5'-CGC CAT CAÁ GGT ACC AGT TGA-3'.
Reação de PCR:	35 ciclos: Desnaturação 94 °C - 30 seg Alinhamento 56 °C - 30 seg Extensão 72 °C - 45 seg 10 min a 72 °C para extensão final.
PCRII	
VHBACKA4:	5'-CAT GCC ATG ACT CGC GGC CCA GCC GGC CAT GGC CGA (GYT)GT (G\C)CA GCT-3'
VHFOR36:	5'-GG ACT AGT GCG GCC GCG TGA GGA GAC GGT GAC CTG-3'
Reação de PCR	35 ciclos Desnaturação: 94°C - 30 segs. Anelamento: 45 °C - 30 segs. Extensão: 72 °C - 45 segs. 10 min a 72 °C para extensão final.

Fonte: Ghahroudi e colaboradores (1997).

4. Resultados e Discussão

4.1 Busca por epítomos

4.1.1 Mapeamento dos epítomos miméticos e avaliação por modelos de simulação

O desenvolvimento de respostas humorais se baseia no reconhecimento de epítomos lineares e conformacionais. Estes últimos constituem um desafio, pois sua funcionalidade depende da sua conformação nativa (Regenmortel, Van, 2009). Contudo, o conhecimento de toda a estrutura da proteína é necessário para auxiliar no planejamento racional de imunógenos direcionadas aos epítomos de células B conformacionais (Purcell *et al.*, 2003), assim o mapeamento de epítomos através de ferramentas de bioinformática auxiliam na produção de moléculas que possam mimetizar a estrutura e a função de um epítomo nativo, diminuindo o tempo de desenvolvimento e o custo do processo (Sun *et al.*, 2013).

A partir do ViPR foram obtidas 915 sequências para a proteína E. Após as etapas de remoção de sequências incompletas, remoção de sequências redundantes e seleção da região que corresponde a sE restaram apenas 70 sequências. Estas sequências foram submetidas à avaliação de qualidade com o programa Guidance, resultando em um score igual 1.0 tanto para cada uma das sequências geradas como para o score global, que indica que o alinhamento gerado é confiável, logo que o valor máximo é igual a 1. A matriz de alinhamento gerada foi utilizada como entrada para estimar o grau de conservação evolucionária de cada aminoácido das 70 sequências resultantes da região 1-403 da proteína de envelope do ZIKV, como demonstrado na - **Figura 10**. As análises evidenciam que há uma porção de aminoácidos variáveis distribuídas ao longo da sequência, porém há também sequências contínuas de resíduos conservados, sendo estas maiores do que as regiões que apresentam variabilidade.

Dentro de uma mesma espécie diferentes genes codificadores de proteínas variam amplamente em suas taxas de evolução. Explorar as diferenças de taxa evolutiva é útil em vários estudos biológicos, incluindo análise estrutural (Gu *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2015) e identificação de peptídeos (Toporik *et al.*, 2014). Proteínas que são altamente expressas ou que desempenham funções críticas tendem a evoluir mais lentamente do que outras proteínas (Zhang e Yang, 2015), buscar essas regiões garantem a não evasão do patógeno a uma possível terapia. Esta informação é importante porque, se estas regiões estiverem presentes na superfície e expostas para a ligação com anticorpos, serão alvos preferenciais.

Figura 10 – Resultados do cálculo para estimação do grau de conservação evolucionária realizado com o programa *Consurf*.

As barras correspondem aos scores normalizados. As cores são resultado da aplicação de um gradiente ciano-branco-marrom entre os números 1 e 9 com o ponto médio em 5 sob os dados gerados a partir da transformação realizada pelo algoritmo do *Consurf* para visualização da superfície molecular gerando índices entre 1 (variável) e 9 (conservado). Os intervalos da estrutura primária que correspondem aos domínios estão anotados como vermelho para DI, amarelo para DII e azul para DIII.

4.1.2 Modelagem

Os resultados da análise de conservação foram então utilizados para visualização na estrutura e superfície molecular utilizada como referência (**Figura 11**). A partir do mapa gerado para as estruturas secundárias é observado que a maioria dos resíduos e/ou sequências contínuas conservadas tem como vizinhos também resíduos e/ou sequências contínuas conservadas. O mesmo é observado para resíduos ou regiões variáveis.

É importante levar em consideração essas informações ao escolher as regiões alvo, pois a conservação desses complexos podem ser, em termos evolutivos, o resultado da seleção purificadora/negativa, onde a taxa de variação e conservação é orientada pela necessidade de manter, por exemplo, certas interações moleculares para que as proteínas sejam adequadamente dobradas e estáveis em sua conformação ativa (Echave, Spielman e Wilke, 2016).

Quando comparado o mapa da superfície molecular com o gerado para as estruturas secundárias é visto que a maioria das regiões conservadas e que estão na superfície, são formadas por sequência descontínuas. Portanto, observa-se que os potenciais epítomos alvos serão conformacionais, que está de acordo com o estudo de (Barlow, Edwards e Thornton, 1986), em que a quantidade de epítomos conformacionais é superior à de epítomos lineares.

Figura 11 – Estrutura do modelo gerado mostrando o resultado da análise de conservação a partir do programa *Consurf*.

Estruturas secundárias (acima) e superfície (abaixo). Regiões que apresentam maior conservação (marrom) e variação (azul). A proteína está orientada de forma que a face visível corresponde à face que está exposta no envelope viral.

4.1.3 Localização dos epítomos a partir das estruturas dos complexos

As estruturas obtidas no PDB que contém a proteína de envelope ou fragmentos complexados com anticorpos, como também seus fragmentos, foram utilizadas para determinação da região do epítipo a partir de critérios geométricos e também para inferir algumas propriedades dos respectivos epítomos e anticorpos a partir das informações descritas nas respectivas referências descritas na **Tabela 4**. Foram obtidas 17 estruturas de complexos nos quais oito deles, o epítipo é inacessível na forma madura do vírus e nove são acessíveis na forma madura do vírus.

Tabela 4 - Identificação das estruturas dos complexos no PDB, nome do anticorpo, localização do epítipo e acessibilidade na superfície do vírus.

PDB ID	Nome	Epítipo	Acesso à superfície	Referência
5KVD	ZV-2	DIII	Inacessível	(Zhao <i>et al.</i> , 2016)
5KVE	ZV-48	DIII	Inacessível	(Zhao <i>et al.</i> , 2016)
5KVF	ZV-64	DIII	Inacessível	(Zhao <i>et al.</i> , 2016)
5KVG	ZV-67	DIII	Inacessível	(Zhao <i>et al.</i> , 2016)
5VIG	Z006	DIII	Inacessível	(Zhao <i>et al.</i> , 2016)
5GZN	-	DI-DII ¹	Acessível	(Wang <i>et al.</i> , 2016)
5GZO	Z20	DII-DII ³	Acessível	(Wang <i>et al.</i> , 2016)
5GZR	Z23-Fab	DIII	Acessível	(Wang <i>et al.</i> , 2016)
5H30	C10 em pH 6.5	DIII-DII ²	Acessível	(Zhang <i>et al.</i> , 2016)
5H32	C10 em pH 5.0	DIII-DII ²	Acessível	(Zhang <i>et al.</i> , 2016)
5H37	C10 em pH 8.0	DIII-DII ²	Acessível	(Zhang <i>et al.</i> , 2016)
5LBS	-	DIII	Inacessível	(Barba-Spaeth <i>et al.</i> , 2016)
5LCV	-	DII	Acessível	(Barba-Spaeth <i>et al.</i> , 2016)
5UHY	ZIKV-117	DII-DIII ³	Acessível	(Hasan <i>et al.</i> , 2017)
5JHL	-	DII	Inacessível	(Dai <i>et al.</i> , 2016)
5VIC	Z004	DIII	Inacessível	(Robbiani <i>et al.</i> , 2017)
5Y0A	ZKA190	DIII	Acessível	(Wang <i>et al.</i> , 2017)

¹posicionado entre DI e DII num mesmo monômero; ²posicionado entre DII e DIII no dímero;

³posicionado entre DII e DII inter-dímeros.

Os resíduos que estão na interface em cada uma das estruturas foram selecionados conforme descrito nos métodos utilizando critério de distância, formando uma lista que foi utilizada para visualização sobre a estrutura e superfície molecular (**Figura 12**). Os resultados dessa análise mostram que certas regiões são preferencialmente alvos de anticorpos.

Figura 12 – Regiões da sE que estão em contato com anticorpos (em marrom) em estruturas dos complexos obtidas a partir do PDB.

Estruturas secundárias (A) onde também estão indicados os limites do DI, DII e DIII assim como o peptídeo de fusão (FL – do inglês: *fusion loop*). A superfície molecular é mostrada para face externa (B) e interna (C) da sE onde a posição do resíduo N154 que é um sítio de glicosilação é indicada.

As informações combinadas relativas à análise de conservação e de alvos preferenciais de anticorpos estão demonstradas na **Figura 13**, a qual é possível avaliar de forma analítica quais regiões apresentaram melhores características para os estudos subsequentes. Existem regiões conservadas ao longo de toda a superfície que coincidem com os epítomos que são alvos de anticorpos neutralizantes. Dentre as regiões destacam-se o resíduo N154, o qual tem alto *score* de conservação e é alvo de anticorpos. Regiões ao longo do DIII também apresentam

estas características como também nos demais domínios. O domínio II apresenta uma extensa região que é alvo de anticorpos e se estende até o FL, além de possuir resíduos conservados em sua superfície.

As glicoproteínas virais desempenham diversas funções nos processos de infecção e replicação de vírus, pois estão envolvidas na adesão, internalização e fusão do vírus, bem como no desenvolvimento de imunidade neutralizante. Em geral, pequenas moléculas que interferem na função de qualquer proteína viral do ZIKV devem ter o potencial de restringir a replicação do vírus e impedir o progresso da patogênese do ZIKV (Basak *et al.*, 2019).

Figura 13 – Superfícies moleculares mostrando a face externa da proteína de envelope solúvel (sE).

Resultados da análise de conservação (verde/marrom) e de regiões alvos de anticorpos a partir das estruturas conhecidas para os complexos (branco/marrom).

A superfície do vírus representa uma composição antigênica contínua de epítomos potenciais com diferentes complexidades estruturais. Esses epítomos podem abranger resíduos apenas em domínios individuais (Dai *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2016), ou estarem localizados na junção entre os domínios no monômero E (Fibriansah *et al.*, 2014), além dos que podem estar em estruturas quaternárias mais complexas que dependem do dímero E (Barba-Spaeth *et al.*,

2016; Fibriansah *et al.*, 2015). A topografia da superfície do vírus e suas propriedades provêm informações como exposição dos aminoácidos e sua flexibilidade. Uma vez que a estrutura da superfície do vírus, que corresponde ao arranjo das 180 proteínas E (Sirohi *et al.*, 2016), foi construída a partir da repetição de uma única unidade assimétrica, assim não tendo informações detalhadas sobre o real comportamento de cada um dos monômeros sobre a superfície do vírus. Dependendo da posição, um monômero experimenta uma vizinhança diferente e isso pode resultar em rearranjos que modificam as estruturas locais, a flexibilidade e exposição. Estes são fatores que podem influenciar diretamente no comportamento dos epítomos. Com isso, o cálculo das distâncias médias de cada um dos resíduos até o centro geométrico do vírus é ligeiramente diferente para cada uma das cadeias que formam a unidade assimétrica (**Figura 14**). Observa-se que as cadeias A e B da unidade assimétrica apresentam distâncias médias parecidas enquanto que a cadeia C está deslocada para o interior do vírus, principalmente para os domínios DI e DII. Estas e outras diferenças, como vizinhança, podem levar a comportamentos diferentes de monômeros ao longo da superfície do vírus.

Figura 14 – Distâncias médias por resíduo até o centro geométrico do vírus calculadas para cada uma das cadeias da unidade assimétrica.

Os intervalos da estrutura primária que correspondem aos domínios estão anotados como vermelho para DI, amarelo para DII e azul para DIII.

4.1.4 Seleção de regiões alvos

Quando os dados levantados são mostrados sobre a superfície do vírus é possível observar que determinadas regiões apresentam extensões na superfície conservadas, são alvos de anticorpos. Dentre estes, destaca-se o monômero até a unidade assimétrica que se repete sobre a superfície do vírus (**Figura 15**). Analisada a superfície exposta da interface formada entre dois monômeros observa-se que as regiões conservadas se estendem ao longo das mesmas. As regiões do DII próximas a esta interface são alvos de anticorpos e que também estão mais expostas sobre a superfície do vírus.

Figura 15 – Informações sobre conservação, alvos de anticorpo e distância até o centro geométrico do vírus.

Do monômero até o trímero (esquerda para direita mostrando a cadeia A, A+B e A+B+C) que constitui a unidade assimétrica que se repete 60 vezes formando a superfície do vírus. Os eixos C3 e C5 são indicados pelas formas em triângulo e pentágono, respectivamente, enquanto que a posição dos resíduos N154 que são pontos de glicosilação estão indicados por uma estrela.

Estas informações destacam uma região da unidade assimétrica como alvo para o desenho de moléculas miméticas entre as cadeias A e B da unidade assimétrica como indicado na **Figura 15**. A região apresenta resíduos conservados, alvos de anticorpos e também se encontra exposta sobre a superfície do vírus. Tal região distingue-se devido ser única na unidade assimétrica, ou seja, se a neutralização via esta região for efetiva, será necessário um domínio de ligação do anticorpo para neutralizar uma unidade assimétrica e 60 anticorpos serão suficientes para neutralizar uma partícula viral. Isso traz grandes vantagens, uma vez que há diminuição na concentração necessária para neutralizar o vírus frente a anticorpos que se ligam em mais de uma região da unidade assimétrica.

A busca de anticorpos que se ligam a esta região a partir das estruturas dos complexos indicou dois anticorpos Z20 e ZIKV-117 (**Tabela 4**). As informações da literatura apontam estes anticorpos como potenciais neutralizantes frente a outros anticorpos (Hasan *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2016). O anticorpo Z20 tem sequência e estrutura definida enquanto que ZIKV-117 tem somente sua localização e resíduos importantes da proteína E para sua ligação

determinados. Portanto, frente às informações levantadas, o respectivo epítopo destes anticorpos, será o alvo dos estudos subsequentes.

4.1.5 Comportamento estrutural do complexo

As mudanças na estrutura global do complexo, anticorpo e antígeno, foram avaliadas ao longo da simulação a partir de medidas de RMSD (**Figura 16**). O RMSD (*root-mean-square deviation*) é utilizado para quantificar diferenças entre duas estruturas, bem como analisar suas trajetórias em dinâmicas moleculares, estabelecendo o período de equilíbrio e a qualidade das simulações moleculares (Sargsyan, Grauffel e Lim, 2017). Os perfis mostram um comportamento inicial com um brusco aumento no valor de RMSD para valores em torno de 0.2 nm, que correspondem a flutuações e não a grandes mudanças estruturais. Até 100 ns são observados leves aumentos nos perfis de RMSDs com posteriores flutuações que não são maiores do que os valores previamente atingidos, que indicam que existem movimentos, mas que não levam a grandes desvios em relação à estrutura inicial. O anticorpo apresenta valores menores de RMSD dos que o complexo e o antígeno uma vez que os valores de RMSD para o antígeno são muito próximos a do complexo. Este comportamento é nítido no brusco decréscimo no RMSD em torno de 180 ns e que levou à busca pelos detalhes estruturais e flutuações das regiões que dão origem à estas flutuações assim como as regiões que são mais estáveis. Com base nos perfis de RMSD discutidos, as análises posteriores foram realizadas considerando o intervalo de tempo entre 100 e 200 ns.

Figura 16 - Comportamento estrutural do complexo e seus componentes ao longo da simulação mostrando os valores de RMSD em relação à estrutura experimental.

Os pontos correspondem às medidas realizadas a cada 50 ps e as linhas foram calculadas utilizando a função *smooth* do programa *ggplot2* com o método *loess* com *span* = 0.05.

Como o complexo mostrou-se bastante estável pelos baixos valores de RMSD (próximos à 0.2 nm) e o anticorpo apresentou-se mais estável ainda, os desvios médios por resíduo (RMSDres) a partir da sobreposição do anticorpo foram calculados para determinação das regiões específicas de maior flutuação estrutural (**Figura 17**). Observa-se que grande parte dos resíduos apresentam valores de RMSDres baixos e próximos a 0.1 nm porém, algumas regiões apresentam maiores valores, como é o caso extremidade do DII que estaria ligada ao domínio I da proteína de envelope que foi retirada para a construção do modelo chegando a valores de RMSDres próximos a 1.25 nm para o resíduo G179, todavia estas regiões, e outras que apresentam valores de RMSDres não tão extremos, levam às maiores flutuações observadas nos RMSDs. Na interface antígeno/anticorpo duas regiões apresentam maiores desvios principalmente na alça do DII da proteína E que contém o resíduo G232 e o CDRL2. Estas regiões em posições opostas, indica que as mudanças observadas não são decorrentes da interação direta entre estas regiões.

Figura 17 – Regiões na estrutura do complexo que apresentam as maiores flutuações na estrutura ao longo da simulação a partir do cálculo do RMSDres.

Cadeia (A) calculados a partir da sobreposição do anticorpo sobre a estrutura inicial. A estrutura média do complexo com os respectivos valores de RMSD como fator B é mostrada (B) como *ribbon* onde quanto maior a largura da linha com cores mais quentes corresponde a um maior valor de RMSDres.

4.2 Expressão e caracterização estrutural

4.2.1 Transformação em *E. coli* DH5 α

A sequência nucleotídica da proteína da região do domínio II do envelope do ZIKV definido como alvo a ser expresso, foi sintetizado e clonado no vetor de expressão pET-28a (**Figura 18**) obtido de forma comercial pela empresa Genone© (BR). Devido a quantidade enviada pela empresa ser ressuspensa em apenas 20 μ L de água ultrapura e o processo de padronização e expressão demandar grande quantidade do mesmo, um aumento na quantidade do vetor se fez necessário. De tal forma utilizou-se cepas de *E. coli* DH5 α , crescidas em meio LB, das quais o DNA foi extraído obtendo como produto final seis alíquotas com 25 μ L de plasmídeo puro. A cepa de *E. coli* DH5 α construída por Douglas Hanahan, é uma das cepas mais utilizadas em pesquisa na área de biotecnologia devido ser facilmente adquirida comercialmente e apresentar uma variedade de características que a tornam referência em aplicações de clonagem, tais características são: alta eficiência no processo de transformação; alta qualidade e estabilidade dos plasmídeos resultantes devido à ausência da endonuclease I (endA1) e os baixos níveis da proteína de recombinação homóloga (recA1) (Anton e Raleigh, 2016). Posteriormente, os plasmídeos foram analisados comparativamente com o plasmídeo comercial em gel de agarose 1% (**Figura 18**).

Figura 18 - Análise dos plasmídeos extraídos de *E. coli* DH5 α .

(1) Marcador de massa molecular 1 kb DNA Ladder; (2) Plasmídeo comercial; (3-8) Plasmídeos clonados em DH5 α . SC: *supercoiled*. L: *linear*.

Vetores na sua forma circular, *supercoiled*, tendem a sofrer uma tensão diferencial quando comparado com sua forma linear em eletroforese, o que leva a torções na busca da sua posição com menor gasto de energia, sendo possível visualizar em um gel de eletroforese mais de uma banda e que a mesma não corresponda ao seu tamanho na forma linear (Mattos, De *et al.*, 2004). De forma semelhante, as bandas do plasmídeo na sua forma circular apresentaram altura menor do que era esperado quando na sua forma linear de 5604pb. A visualização da forma linear, apesar de fraca, também foi confirmada próximo a 6000pb. O plasmídeo comercial quando comparado de forma analítica aos demais plasmídeos clonados apresentaram quantidade de pares de base semelhante, confirmando a clonagem.

4.2.2 Sequenciamento dos plasmídeos

O plasmídeo obtido anteriormente foi preparado para o sequenciamento afim de confirmar a clonagem. Por meio dos eletroferogramas gerados, foi possível obter a sequência de nucleotídeos (sequenciado), no formato FASTA, a qual foi comparada com o gene da proteína recombinante do envelope do ZIKV (model3-W101H) utilizando-se da plataforma CLUSTAW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>), como demonstrado na **Figura 19**. As sequências de nucleotídeos foram comparadas com início no sítio de restrição *NdeI* (CATATG) e com final no sítio de restrição *XhoI* (CTCGAG), compreendendo assim a região codificante da proteína, os asteriscos ilustram os nucleotídeos que possuíam paridade. Assim, os resultados confirmam que a clonagem ocorreu corretamente e o DNA pôde ser utilizado para posterior expressão em sistema heterólogo.

Figura 19 - Sequenciamento automático do DNA plasmidial.

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

model3-W101H
sequenciado      -----
                  GAAAAATTCCCCTCTAGGAATAATTTGTTTACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGCAG

model3-W101H
sequenciado      -----CATATGTGGCA
                  CAGCCATCATCATCATCATCAGCAGCGGCTGGTGCCGCGGCAGCCATATGTGGCA
                  *****

model3-W101H
sequenciado      CGCTGGTGCAGATACTGGTACTCCGCATTGGAACAACAAGGAAGCTCTGGTTGAGTTCAA
                  CGCTGGTGCAGATACTGGTACTCCGCATTGGAACAACAAGGAAGCTCTGGTTGAGTTCAA
                  *****

model3-W101H
sequenciado      AGACGCTCACGCGAAACGTCAAGCCGTAGTTGTTCTGGGTTCTGGTTCCGGTTATGAGGC
                  AGACGCTCACGCGAAACGTCAAGCCGTAGTTGTTCTGGGTTCTGGTTCCGGTTATGAGGC
                  *****

model3-W101H
sequenciado      AAGCATCTCTGACATGGCTTCTGATTCCCGTTGTCCGACTCAGGGTGAAGCCTACCTGGA
                  AAGCATCTCTGACATGGCTTCTGATTCCCGTTGTCCGACTCAGGGTGAAGCCTACCTGGA
                  *****

model3-W101H
sequenciado      CAAACAGTCCGATACCCAGTATGTTTGCAAGCGTACCCTGGTGGACCGTGGTCATGGCAA
                  CAAACAGTCCGATACCCAGTATGTTTGCAAGCGTACCCTGGTGGACCGTGGTCATGGCAA
                  *****

model3-W101H
sequenciado      CGGTTGTGGTCTGTTTCGGTAAAGGTTCTCTGGTGACCTGTGCGAAGTTCGCTTGCGACAA
                  CGGTTGTGGTCTGTTTCGGTAAAGGTTCTCTGGTGACCTGTGCGAAGTTCGCTTGCGACAA
                  *****

model3-W101H
sequenciado      GTAACCTGAG-----
                  GTAACCTGAGCACCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGA
                  *****

model3-W101H
sequenciado      -----
                  AGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAA

```

Análise comparativa da sequência obtida no formato FASTA com a sequência do gene da proteína recombinante do envelope do ZIKV. O alinhamento realizado na plataforma CLUSTALW (Kyoto University Bioinformatics Center).

4.2.3 Expressão da proteína recombinante

Devido a sua facilidade de manipulação e seu longo uso no ramo da biotecnologia *Escherichia coli* tornou-se a mais bem estabelecida e primeira opção de organismo para expressão de proteínas. Contudo, a expressão de proteína é bem conhecida por não ser um processo simples, o qual estabelecer padrões ótimos nas condições de cultivo são desafios dos quais todos aqueles que iniciam o trabalho na área enfrentam. Condições padronizadas para expressão de uma proteína podem não necessariamente servir para outra, mesmo que de proteínas semelhantes, portanto a produção de proteínas continua sendo uma tarefa altamente empírica (Tegel *et al.*, 2010). Buscando assim definir uma padronização, o vetor contendo a sequência da proteína recombinante, fusionada a uma cauda N-terminal his-tag, foi inicialmente transformado em diferentes cepas de *E. coli*, em duas temperaturas diferente, como demonstrado na **tabela 1**, através do método de choque térmico, afim de realizar um teste inicial, para posterior expressão em maior escala e purificação. Inicialmente, foi avaliado somente qualitativamente a expressão da proteína, após decorrido o tempo de expressão com indução do IPTG por meio da visualização da banda acima de 14kDa em SDS-PAGE 15%.

Como resultado do primeiro ensaio é possível verificar na **figura 20**, uma maior expressão da proteína no grupo de 37°C, nas três cepas testadas, quando comparado com o grupo de 20°C. Quando comparado o grupo de 37°C entre si, a BL21 (DE3) pLysS apresenta uma maior expressão, sendo a mesma escolhida para testes subsequentes de variação de temperatura e IPTG.

Figura 20 - Eletroforese em gel desnaturante da proteína recombinante comparando diferentes cepas em dois grupos de temperatura.

Gel de SDS-PAGE 15% corado com *Coomassie Brilliant Blue*. (1) Marcador de peso molecular LMW-SDS Marker Kit - GE Healthcare Protein and Peptide Molecular Weight Markers Run (14.4 -97 KDa); (2) Meio antes da indução com IPTG - 20°C; (3) Alíquota BL21 (DE3) pLysS após 5 horas de incubação com IPTG; (4) Alíquota da BL21 Roseta após 5 horas de incubação com IPTG; (5) Alíquota da BL21 Códon plus após 5 horas de incubação com IPTG; (6) Meio antes da indução com IPTG - 37°C; (7) Alíquota BL21 (DE3) pLysS após 5 horas de incubação com IPTG; (8) Alíquota da BL21 Roseta após 5 horas de incubação com IPTG; (9) Alíquota da BL21 Códon plus após 5 horas de incubação com IPTG.

Um grande número de cópias do plasmídeo pode levar a sobrecarga das células e induzir a um colapso metabólico, resultando em baixa produtividade ou até mesmo na morte das mesmas. Assim, encontrar o balanço entre o crescimento da biomassa das bactérias e a formação do produto/proteína, associando o estresse celular do processo, constitui o equilíbrio necessário para alcançar uma expressão com boa produtividade. Uma estratégia comumente utilizada na expressão de proteína heteróloga baseia-se em avaliar a influência de cada fator por vez, assumindo que cada variável seja independente da outra (Larentis *et al.*, 2014; Mühlmann *et al.*, 2017). A partir dos resultados preliminares gerados do teste inicial, optou-se pela continuação da padronização com a cepa BL21 (DE3) pLysS, devido a visualização de uma

maior expressão na região de peso molecular da proteína recombinante. Conforme demonstrado na **tabela 2**, dois grupos de temperatura com três diferentes concentrações de indutor IPTG foram avaliados.

A redução da temperatura do cultivo é uma das abordagens mais utilizadas na tentativa de previr corpos de inclusão e obter um correto enovelamento da proteína expressa (Schein e Noteborn, 1988). Outra abordagem muito utilizada em sistemas de *E. coli* T7 sobre controle do *operon lac* presente em pET, quando em processo de padronização da expressão da proteína é a variação do indutor IPTG, tais sistemas de expressão permitem a separação de forma precisa as fases de crescimento e expressão da proteína pela variação da concentração do indutor e o tempo de indução (Mühlmann *et al.*, 2017). Assim, dois grupos de temperaturas, com três concentrações do indutor foram avaliados quando a expressão, sendo o grupo de 37°C mantido 5 horas em indução e o grupo de 20°C por 24 horas. Os resultados dos grupos de temperaturas em diferentes concentrações de indutor quando comparados entre si mostraram semelhança, contudo, observa-se uma maior expressão na altura da proteína de interesse na alíquota correspondente a concentração de 0,4 mmol/L de IPTG a 37°C (**Figura 21**).

Figura 21 - Eletroforese em gel desnaturante comparando variações do indutor em dois grupos de temperaturas em culturas com cepas BL21 (DE3) pLysS.

Gel de SDS-PAGE 15% corado com *Coomassie Brilliant Blue*. (1) Marcador de peso molecular LMW-SDS Marker Kit - GE Healthcare Protein and Peptide Molecular Weight Markers Run (14.4 -97 KDa); (2) Meio antes da indução com IPTG; (3) 0,2 mmol/L IPTG; (4) 0,4 mmol/L IPTG; (5) 0,8 mmol/L IPTG.

Após definido as variáveis de expressão, a cepa BL21 (DE3) pLysS foi submetida a expressão em grande escala (**Figura 22**), sendo a fração solúvel da cultura submetida a purificação em sistema ÄKTA *fast protein liquid-chromatography* (FPLC) (GE Healthcare) com colunas HiTrap FF Crude 5 mL (GE Healthcare). Contudo, quando submetida ao gradiente de imidazol para eluição da proteína aderida a coluna, nenhum pico era detectado no comprimento de onda de 280 nm, resultado não apresentado.

Figura 22- Eletroforese em gel desnaturante das frações de expressão da proteína recombinante expressa a partir da fração insolúvel da cepa BL21 (DE3) pLysS.

Gel de SDS-PAGE 15% corado com *Coomassie Brilliant Blue*. (1) Marcador de peso molecular LMW-SDS Marker Kit - GE Healthcare Protein and Peptide Molecular Weight Markers Run (14.4 -97 KDa); (2) Meio antes da indução com IPTG; (3) Meio após 5 horas de incubação com 0,6 mM de IPTG; (4) Extrato solúvel; (5) Extrato insolúvel (6) Proteína majoritária após purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel.

A fração insolúvel, foi ressuspensa em tampão com 6M de uréia, e submetida ao processo de *refolding* parcial na coluna durante o gradiente de imidazol, obtendo um único pico em 280 mM, conforme demonstrado no cromatograma da **Figura 23**.

Figura 23- Cromatograma de purificação da proteína recombinante expressa a partir da fração insolúvel da cepa BL21 (DE3) pLysS.

Cromatograma da purificação em coluna de níquel em sistema ÄKTA *fast protein liquid-chromatography* (FPLC) a partir do extrato insolúvel.

Para confirmação da ausência da proteína na fração solúvel da cepa BL21 (DE3) pLysS, bem como confirmar que a mesma não está saindo durante o *flow-through* e *wash*, e que sua maioria está presente na fração insolúvel, foi realizado o dot-blot (**Figura 24**). O resultado confirmou a ausência da proteína na fração solúvel, bem como, no *flow-through* e *wash*, não sendo possível a visualização da marcação no ponto 1, 2 e 4 consecutivamente. O ponto 5, representando a fração insolúvel, apresentou marcação, corroborando com os resultados anteriores.

Figura 24- Dot blot para confirmação da presença da proteína nas frações solúveis e insolúveis da cepa BL21 (DE3) pLysS.

Membrana de transferência de nitrocelulose Amersham™ Hybond™ - ECL (GE Healthcare). (1) Fração Solúvel; (2) Wash; (3) anti-histag; (4) flow-through; (5) Fração insolúvel; (6) Alíquota do meio após 5 horas de expressão; (7) Controle com outra proteína com histag.

Após a purificação da proteína presente na fração insolúvel, a mesma encontrava-se em tampão com 300 mmol/L de NaCl, 280 mmol/L de imidazol e aproximadamente 3M de uréia. A partir da proteína eluída obtivemos uma concentração de 1,88 mg/mL, quantificada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) em um volume final de 4 mL. Para retirada dos sais, foi utilizado o método de diálise lenta em câmara fria por 12 horas em agitação, utilizando tampões com gradiente de NaCl. Entretanto, a proteína precipitou em todas as variações testadas, não sendo possível a utilização da mesma.

O processo intrínseco de expressar uma nova proteína exige muitos testes a fim de uma boa padronização, contudo, o procedimento torna-se ainda mais difícil quando a proteína de interesse possui formação de pontes dissulfeto em sua estrutura. Sabe-se que a presença da mesma auxilia no enovelamento correto, estabilidade e/ou atividade da proteína e que sua formação é catalisada por enzimas pertencentes a super-família da *thioredoxin*. Em *E. coli* o processo de oxidação tende a ocorrer no espaço do periplasma, onde é catalizado pela enzima *Disulfide bond A* (DsbA), sendo a mesma a principal responsável pela oxidação dos resíduos de cisteínas. Proteínas que requerem múltiplas formações de ponte dissulfeto necessitam também do auxílio de uma isomerase, a fim de evitar a oxidação incorreta dos resíduos de cisteína. A isomerase presente no periplasma da *E. coli* é conhecida como *Disulfide bond C* DsbC, atuando como *chaperona* no processo de formação das proteínas. Contudo, quando a proteína se encontra no citoplasma, ambiente oxirredutor, devido à presença de redutases *glutaredoxin* e *thioredoxin* (Grx1, Grx2, Grx3, Trx1, Trx2), a proteína é incapaz de oxidar seus grupos tióis e, conseqüentemente, formar as ligações covalentes. Assim, as cepas Shuffle foram mutadas para permitir a oxidação das cisteínas no citoplasma, através do *knocking out* das redutases *glutaredoxin* e *thioredoxin* (*trx* e *grx*), bem como, uma superexpressão de uma versão citosólica da isomerase DsbC (Berkmen, 2012; Lobstein *et al.*, 2012; Ren, Ke e Berkmen, 2016).

Posteriormente, foi obtido a cepa SHuffle, a mesma foi submetida a expressão por 24 horas a 16°C, sob a indução de 0,6 mM de IPTG. A purificação ocorreu de forma similar a BL21 (DE3) pLysS. A fração ligada a coluna foi eluída usando um gradiente linear de imidazol (0 a 0.5 M), sendo a visualização de um pico único em 280 mM (**Figura 25**). A proteína

majoritária resultante foi analisada por SDS-PAGE 15% e coradas com *Coomassie brilliant blue* R-250 (Sigma-Aldrich) (**Figura 26**).

Figura 25- Cromatograma de purificação da proteína recombinante expressa a partir da fração solúvel da cepa SHuffle.

Cromatograma da purificação em coluna de níquel em sistema ÄKTA *fast protein liquid-chromatography* (FPLC) a partir do extrato solúvel.

A partir da proteína eluída obtivemos 0,30 mg/mL, quantificada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) em um volume final de 3 mL. A mesma foi posteriormente dialisada de forma lenta sob agitação, em tampão fosfato-citrato 20 mM pH: 7 para total remoção do imidazol. Um novo Bradford foi realizado após a diálise, a amostra foi centrifugada a fim de eliminar proteínas que estivessem agregadas, obtendo por fim uma concentração de 0,18 mg/mL.

Figura 26- Eletroforese em gel desnaturante das frações de expressão da proteína recombinante expressa a partir da cepa SHuffle.

Gel de SDS-PAGE 15% corado com *Coomassie Brilliant Blue*. (1) Marcador de peso molecular LMW-SDS Marker Kit - GE Healthcare Protein and Peptide Molecular Weight Markers Run (14.4 -97 KDa); (2) Meio antes da indução com IPTG; (3) Meio após 24 horas de incubação com 0,6 mM de IPTG; (4) Extrato insolúvel; (5) Extrato solúvel (6) Proteína majoritária após purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel.

4.2.4 Dicroísmo circular em comparação com a predição da estrutura secundária a partir da simulação por DSSP

Algumas moléculas possuem assimetria molecular, ou seja, seu reflexo ao espelho não é idêntico. Tais moléculas são conhecidas como quiral. A interação da molécula quiral com a luz polarizada é bem específica e tem se provado um importante método para caracterização tanto de estruturas pequenas quanto macromolecular. Uma técnica comumente utilizada para mensurar os efeitos da luz polarizada sobre moléculas assimétricas é o dicroísmo circular (DC), definido pela diferença de absorção da luz polarizada circulante emitida da esquerda e direita (Ranjbar e Gill, 2009). Buscando assim confirmar o enovelamento da proteína expressa na fração solúvel, a técnica foi realizada. A proteína anteriormente dialisada em tampão fosfato-citrato 20 mM pH: 7, foi diluída para uma concentração de 0,2 mg/mL. Posteriormente, foi analisada no espectropolarímetro, do qual foram coletadas quatro acumulações entre 195-250 nm para o monitoramento da estrutura secundária. O resultado gerado foi plotado como uma

curva utilizando-se o programa Origin™ demonstrado na **figura 27**. O resultado obtido com o gráfico do espectro de dicroísmo circular de UV-distante demonstra que a proteína recombinante está em conformação enovelada.

Figura 27- Espectro de dicroísmo circular UV-distante da estrutura secundária da proteína recombinante expressa.

Espectro de dicroísmo circular UV-distante oriunda da proteína purificada do extrato solúvel e dialisada para tampão fosfato-citrato 20mM, pH: 7. Curva gerada utilizando-se o programa Origin™.

Posteriormente, utilizou-se da plataforma online DICHROWEB (Lobley, Whitmore e Wallace, 2002), desenvolvida e hospedada na Birkbeck College, University of London, U.K, que permite a análise de dados em diferentes formatos, incluindo os gerados pelos programas de DC. A plataforma possibilita analisar os dados por diferentes algoritmos e comparar em bancos de dados os espectros gerados com estruturas bem descritas por cristalografia de Raios-X. Os resultados gerados foram então plotados na plataforma e as porcentagens geradas são demonstradas na **tabela 5**.

Tabela 5 - Porcentagens da estrutura secundária obtida a partir da espectroscopia do dicroísmo circular.

Estrutura Secundária	Porcentagem (%)
α -hélice	7,7
β -folhas	39,1
<i>Turns</i>	12,8
Padrão desordenado	40,4

Análise realizada na plataforma online DICHROWEB. Base de dados SP175. Programa de análise CONTIN. Resultado gerado a partir do espectro de dicroísmo circular UV-distante oriunda da proteína purificada do extrato solúvel e dialisada para tampão fosfato-citrato 20mM, pH: 7.

Os programas automáticos de predição de estrutura secundária foram criados há mais de trinta anos. Tais programas tentam atribuir estrutura secundária de maneira consistente e são construídos para explorar as regularidades associadas a estruturas periódicas, como por exemplo os ângulos diédricos (ϕ , ψ) usados nos gráficos de Ramachandran, a distância dos aminoácidos do carbono alfa e o padrão de ligações de hidrogênio entre átomos da cadeia principal, bem como sua curvatura (Zhang e Sagui, 2015). Assim, a partir dos 200 ns gerados pela simulação de dinâmica molecular analisados pelo programa gmx do_dssp de predição de estrutura secundária, foi possível definir a estrutura de cada resíduo de aminoácido em solução, conforme demonstrado na **Figura 28**.

Figura 28 – Predição da estrutura secundária de cada resíduo de aminoácido em solução ao longo da simulação analisados pelo programa gmx do_dssp.

As cores correspondem a estrutura secundária assumida de cada resíduo de aminoácido nos 200 ns de simulação.

A partir dos dados gerados, também foi possível determinar as porcentagens das estruturas secundárias, bem como comparar com as porcentagens advindas da análise do dicroísmo circular gerado a partir da proteína solúvel da expressão em SHuffle (**tabela 5**). Observa-se uma grande similaridade nas porcentagens geradas a partir do dicroísmo circular com o comportamento predito para os mesmos. Tais resultados são importantes e sugerem que a proteína expressa se encontra enovelada e possivelmente assumindo a conformação esperada.

Tabela 6 - Porcentagens da estrutura secundária obtida a partir da espectroscopia do dicroísmo circular em comparação com a predição gerada pelo programa gm do_dssp.

Estrutura Secundária	Porcentagem (%)	
	DICROWEB	DSSP
α -hélice	7,7	7
β -folhas	39,1	41
<i>Turns</i>	12,8	10
Padrão desordenado	40,4	28
<i>Bends</i>	*	14

Análise realizada na plataforma online DICHROWEB. Base de dados SP175. Programa de análise CONTIN. Resultado gerado a partir do espectro de dicroísmo circular UV-distante oriunda da proteína purificada do extrato solúvel e dialisada para tampão fosfato-citrato 20mM, pH: 7. DSSP – *Dictionary of Secondary Structure Protein*. Resultado gerado a partir da simulação de dinâmica molecular. * A plataforma DICROWEB não inclui na classificação estruturas *bends*.

4.3 Avaliação sorológica

4.3.1 Avaliação da resposta sérica de IgG de pacientes infectados com ZIKV a proteína recombinante expressa

A fim de avaliar o reconhecimento de imunoglobulinas G séricas de pacientes confirmados com ZIKV a proteína recombinante expressa comparando com a proteína total do ENV de ZIKV comercial, realizou-se um ELISA indireto. Utilizou-se a titulação dos soros em 1/200, em triplicata, com três concentrações de *coating* (1, 5 e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Os resultados mostraram-se favoráveis para a continuação dos estudos, logo que os quatro soros reconheceram a proteína recombinante em todas as concentrações (**Figura 29**), sugerindo assim, que a proteína expressa encontra-se em uma conformação semelhante a presente no vírus nativo.

Figura 29- Avaliação da resposta sérica de IgG de pacientes infectados com ZIKV à proteína recombinante expressa e a proteína total do envelope de ZIKV.

Quatro soros diferentes (A02, D20, D21, D38) de pacientes infectados com Zika (Diluição 1/200, triplicados) foram testados em placas de ELISA de alta ligação em diferentes concentrações de revestimento (1, 5 e 10 µg/mL). A ligação ao soro foi detectada com o uso de uma IgG anti-humana de cabra conjugada com HRP. OD - Densidade Óptica.

4.3.2 Teste de Neutralização por Redução de Plaque (PRNT)

O teste de neutralização por redução de plaque foi realizado afim de confirmar o potencial de neutralização de anticorpos gerados a partir da imunização com a proteína expressa em camundongos Balb/c. Para isso, células Vero foram semeadas em orifícios de placas com 24 poços, as quais diluições dos soros dos animais imunizados foram misturadas ao vírus ZIKV em quantidade constante. Posteriormente, foi avaliado a formação de plaque em comparação ao controle positivo. O teste tem como resultado positivo para neutralização, soros que reduziam 50% ou mais as placas virais, o qual seria considerado neutralizantes e positivas para o respectivo vírus. Contudo, os resultados observados são preliminares e, portanto, não é possível definir um padrão em porcentagem de neutralização. Problemas com a execução da técnica, bem como a parada dos experimentos devido a pandemia pelo vírus Corona impossibilitou a confirmação do resultado em outro experimento independente. Assim, o resultado apresentado é sugestivo de que a proteína expressa possua a capacidade de gerar anticorpos neutralizantes contra o vírus da Zika, logo, que há uma clara diferença na destruição

da monocamada de células Vero do controle viral quando comparado com os grupos que possuem o soro do animal imunizado, conforme demonstrado na **Figura 30**.

Figura 30- Teste de neutralização por redução de plaque a partir do soro de camundongos Balb/c imunizados com a proteína recombinante expressa.

Monocamada constante de 4×10^5 células Vero semeadas em orifícios de placas com 24 poços. Controle Viral: somente o vírus em quantidade de $5,75 \times 10^5$ PFU. Controle negativo: meio de cultura. Diluições dos soros 1/10, 1/20 e 1/40 misturadas ao vírus em quantidade constante de $5,75 \times 10^5$ PFU.

4.3.3 Acompanhamento da resposta imunológica do espécime *Lama glama* induzida por imunização

Acompanhamento da resposta imunológica a partir do monitoramento do título de anticorpos do animal imunizado com a proteína recombinante Zika por ensaio de ELISA (**Figura 31**). O título de anticorpos aumentou gradativamente após as imunizações, com reatividade de $1:1,5 \times 10^6$ (v/v) alcançado após *boost*, no 131º dia de imunização. A partir da coleta de 25 mL do sangue periférico do animal foi possível isolar cerca de $2,4 \times 10^6$ linfócitos.

Figura 31- Monitoramento da resposta imunológica do camélídeo após hiperimunização com a proteína expressa.

No eixo Y, estão as absorbâncias avaliadas em comprimento de onda de 450nm (OD 450nm). No eixo X, estão os dias referente a coleta e imunização. O monitoramento do aumento de títulos induzido por hiperimunização foram realizadas em intervalos de 7 dias

4.3.4 Construção da biblioteca gênica de VHH de camélídeos

A partir do RNA total obtidos linfócitos periféricos isolados do animal imunizado foi realizada a síntese de cDNA. Em seguida, com auxílio de oligonucleotídeos gene específicos, o material foi submetido a reação de PCR para amplificação do repertório gênico de VHH. Na PCRI foram obtidas duas bandas, uma de aproximadamente 900 pb correspondente à amplificação das regiões VH-CH1-CH2 de anticorpos convencionais de camélídeos, IgG1, e um *amplicon* de aproximadamente 600 pb referente aos domínios VHH-CH2 de anticorpos de cadeia pesada de camélídeos, IgG2 e 3 (**figura 32.A**).

O fragmento de aproximadamente 600pb foi excisado do gel de agarose, purificado (**figura 32.B**) para posterior reação de PCR II. Nesta reação além da amplificação da região VHH, correspondente a um *amplicon* de 400pb (**figura 32.C**), são inseridos sítios das

endonucleases de restrição *SfiI* e *NotI* nas regiões 5' e 3' do repertório VHH, a partir de oligonucleotídeos específicos.

Figura 32 - Amplificação do repertório gênico de VHH por PCR.

A. Produto de PCR referente à amplificação gênica das regiões VH-CH1-CH2 correspondente aos anticorpos convencionais (~900 pb) e VHH-CH2 (~600 pb) de imunoglobulinas Ig2 e 3. PM: Peso molecular 1kb, Produto PCR I utilizando diferentes diluições do cDNA, 1. sem diluir (S/D), 2. 1:10, 3. 1:100 e 4. 1:1000. 5. Controle negativo (-) apenas o mix; 6. Controle (+) biblioteca gênica de VHH. **B.** Produto de purificação do segmento VHH-CH2 após excisão do gel ~ 600pb; **C.** Amplificação de fragmento de ~ 400 pb após PCR II correspondente ao VHH. PM: Peso molecular 1kb, 1:VHH

O repertório gênico de VHH amplificado na PCR II será submetido às reações de digestão enzimática com as endonucleases de restrição, para posterior recombinação em vetor fagomídeo pHEN1 visando a produção de uma biblioteca gênica de VHH. Assim, foi obtida a biblioteca de regiões codantes para anticorpos VHH que será utilizada para seleção de anticorpos potencialmente neutralizantes.

5. Conclusão

5. Conclusões

- ✓ Definiu-se uma região dentre os três domínios da proteína de envelope do vírus Zika como alvo a ser expresso que apresenta resíduos conservados, é alvo de anticorpos neutralizantes e também se encontra exposta sobre a superfície do vírus através de estudos de bioinformática;
- ✓ Definiu-se o comportamento em solução do alvo a ser expresso por dinâmica molecular;
- ✓ Definiu-se o comportamento em solução do alvo a ser expresso complexado a um anticorpo neutralizante;
- ✓ A proteína recombinante foi expressa e purificada;
- ✓ A proteína recombinante teve sua estrutura secundária caracterizada e apresentou conformação predita;
- ✓ O soro de pacientes infectados com Zika vírus reconheceu a proteína recombinante expressa em todas as concentrações de *coating*;
- ✓ O soro de camundongos Balb/c imunizados com a proteína recombinante expressa mostrou-se sugestivo de neutralização do vírus Zika;
- ✓ Criou-se uma biblioteca gênica de anticorpos VHH de camelídeos.

6. Referências Bibliográficas

- ABBINK, P. *et al.* Therapeutic and protective efficacy of a dengue antibody against Zika infection in rhesus monkeys. **Nature Medicine**, v. 24, n. 6, p. 721–723, 4 jun. 2018.
- ABRAHAM, M. J. *et al.* Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, v. 1–2, p. 19–25, 1 set. 2015.
- AL-QAHTANI, A. A. *et al.* Zika virus: a new pandemic threat. **Journal of infection in developing countries**, v. 10, n. 3, p. 201–7, 31 mar. 2016.
- ANANDAKRISHNAN, R.; AGUILAR, B.; ONUFRIEV, A. V. H++ 3.0: automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations. **Nucleic acids research**, v. 40, n. Web Server issue, p. W537–41, jul. 2012.
- ANTON, C. P.; RALEIGH, B. P. Complete genome sequence of NEB 5-alpha, a derivative of Escherichia coli K-12 DH5. **Genome Announc**, v. 4, n. 6, p. 1245–1261, 2016.
- ARBABI GHAHROUDI, M. *et al.* Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. **FEBS Letters**, v. 414, n. 3, p. 521–526, 15 set. 1997.
- ASHKENAZY, H. *et al.* ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. **Nucleic acids research**, v. 44, n. W1, p. W344–50, 2016.
- BARBA-SPAETH, G. *et al.* Structural basis of potent Zika-dengue virus antibody cross-neutralization. **Nature**, v. 536, n. 7614, p. 48–53, 3 jun. 2016.
- BARLOW, D. J.; EDWARDS, M. S.; THORNTON, J. M. Continuous and discontinuous protein antigenic determinants. **Nature**, v. 322, n. 6081, p. 747–748, 1986.
- BARLOW, D. J.; THORNTON, J. M. Ion-pairs in proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 168, n. 4, p. 867–885, 25 ago. 1983.
- BASAK, S. C. *et al.* Computer-assisted and data driven approaches for surveillance, drug discovery, and vaccine design for the zika virus. **Pharmaceutical**, v.12, n. 4, p.157, 1 dez. 2019.
- BERKMEN, M. Production of disulfide-bonded proteins in Escherichia coli. **Protein Expression and Purification**, v. 82, p. 240–251, 2012.
- BERMAN, H. M. *et al.* The protein data bank. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 58, n. 6 I, p. 899–907, 2002.
- CAO-LORMEAU, V. M. *et al.* Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. **Lancet (London, England)**, v. 387, n. 10027, p. 1531–1539, 9 abr. 2016.
- CHAMES, P. *et al.* THEMED SECTION: VECTOR DESIGN AND DRUG DELIVERY REVIEW Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future Therapeutic antibodies: coming of age. **British Journal of Pharmacology**, v. 157, p. 220–233, 2009.
- CHIU, M. L. *et al.* Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. **Antibodies**, v. 8, n. 4, p. 55, 2019.
- CIOTA, A. T. The role of co-infection and swarm dynamics in arbovirus transmission. **Virus Research**, v.265, p.88-93, 2019.

- CZERWIŃSKI, M.; KROP-WATOREK, A. [Heavy-chain antibodies of the Camelidae and their possible applications]. **Postepy higieny i medycyny doświadczalnej (Online)**, v. 59, p. 193–202, 16 maio 2005.
- DAI, L. *et al.* Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. **Cell Host and Microbe**, v. 19, n. 5, p. 696–704, 11 maio 2016.
- DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L. Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. **The Journal of Chemical Physics**, v. 98, n. 12, p. 10089–10092, 15 jun. 1993.
- DICK, G. W. A. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509–520, 1952.
- DUFFY, M. R. *et al.* Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536–2543, 11 jun. 2009.
- DUNBAR, J. *et al.* SAbPred: a structure-based antibody prediction server. **Nucleic acids research**, v. 44, n. W1, p. W474–8, 2016.
- ECHAVE, J.; SPIELMAN, S. J.; WILKE, C. O. Causes of evolutionary rate variation among protein sites. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, n. 2, p. 109–121, 1 fev. 2016.
- FATIMA, A. *et al.* Development of VHH antibodies against dengue virus type 2 NS1 and comparison with monoclonal antibodies for use in immunological diagnosis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. 52–63, 2014.
- FERNANDES, C. F. C. *et al.* Camelid single-domain antibodies as an alternative to overcome challenges related to the prevention, detection, and control of neglected tropical diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 2017.
- FIBRIANSAH, G. *et al.* A potent anti-dengue human antibody preferentially recognizes the conformation of E protein monomers assembled on the virus surface. **EMBO Molecular Medicine**, v. 6, n. 3, p. 358–371, 2014.
- FIBRIANSAH, G. *et al.* Cryo-EM structure of an antibody that neutralizes dengue virus type 2 by locking E protein dimers. **Science**, v. 349, n. 6243, p. 88–91, 3 jul. 2015.
- FOY, B. D. *et al.* Probable Non-Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 880–882, 2011.
- GU, Y. *et al.* Structural basis of outer membrane protein insertion by the BAM complex. **Nature**, v. 531, n. 7592, p. 64–69, 3 mar. 2016.
- GUO, Y. *et al.* Structure and activity of tryptophan-rich TSPO proteins. **Science**, v. 347, n. 6221, p. 551–555, 30 jan. 2015.
- HAMERS-CASTERMAN, C. *et al.* Naturally occurring antibodies devoid of light chains. **Nature**, v. 363, n. 6428, p. 446–448, 3 jun. 1993.
- HASAN, S. S. *et al.* A human antibody against Zika virus crosslinks the E protein to prevent infection. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1–6, 16 mar. 2017.
- HASAN, S. S. *et al.* Structural biology of Zika virus and other flaviviruses. **Nature structural & molecular biology**, v. 25, n. 1, p. 13–20, jan. 2018.
- HEANG, V. *et al.* Zika virus infection, Cambodia, 2010. **Emerging infectious diseases**, v. 18,

n. 2, p. 349–51, fev. 2012.

HEINZ, F. X.; STIASNY, K. The Antigenic Structure of Zika Virus and Its Relation to Other Flaviviruses: Implications for Infection and Immunoprophylaxis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 2017.

HESS, B. *et al.* LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 18, n. 12, p. 1463–1472, 1 set. 1997.

HOCKNEY, R. W.; GOEL, S. P.; EASTWOOD, J. W. Quiet high-resolution computer models of a plasma. **Journal of Computational Physics**, v. 14, n. 2, p. 148–158, 1 fev. 1974.

JORGENSEN, W. L. *et al.* Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. **The Journal of Chemical Physics**, v. 79, n. 2, p. 926–935, 15 jul. 1983.

KABSCH, W.; SANDER, C. Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. **Biopolymers**, v. 22, n. 12, p. 2577–2637, dez. 1983.

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 4, p. 772–780, abr. 2013.

KELLY, S. M.; PRICE, N. C. **The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding** *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* Elsevier B.V., 4 abr. 1997.

KUCHARSKI, A. J. *et al.* Transmission Dynamics of Zika Virus in Island Populations: A Modelling Analysis of the 2013–14 French Polynesia Outbreak. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 5, p. e0004726, 17 maio 2016.

LARENTIS, A. L. *et al.* Evaluation of pre-induction temperature, cell growth at induction and IPTG concentration on the expression of a leptospiral protein in *E. coli* using shaking flasks and microbioreactor. **BMC Research Notes**, v.7, p.1-9, 2014.

LEES, J. G. *et al.* A reference database for circular dichroism spectroscopy covering fold and secondary structure space. **Bioinformatics**, v. 22, n. 16, p. 1955–1962, 2006.

LINDENBACH, B. D.; THIEL, H.-J.; RICE, C. M. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. **Fields Virology**, v. 5, p. 1101-1152, 2007.

LINDORFF-LARSEN, K. *et al.* Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 78, n. 8, p. 1950–1958, jun. 2010.

LOBLEY, A.; WHITMORE, L.; WALLACE, B. A. DICHROWEB: an interactive website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra. **Bioinformatics applications note**, v.18, n. 1, p. 211-212.

LOBSTEIN, J. *et al.* SHuffle, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. **Microbial Cell Factories**, v. 11, p. 11-56, 2012.

MARSTON, H. D. *et al.* Considerations for Developing a Zika Virus Vaccine. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 13, p. 1209–1212, 29 set. 2016.

MATTOS, J. C. P. DE *et al.* Agarose gel electrophoresis system in the classroom: Detection of

DNA strand breaks through the alteration of plasmid topology. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 32, n. 4, p. 254–257, jul. 2004.

MILLER, B. R. *et al.* MMPBSA.py: An efficient program for end-state free energy calculations. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 8, n. 9, p. 3314–3321, 11 set. 2012.

MIYAMOTO, S.; KOLLMAN, P. A. Settle: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. **Journal of Computational Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 952–962, 1 out. 1992.

MLAKAR, J. *et al.* Zika Virus Associated with Microcephaly. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 10, p. 951–958, 10 mar. 2016.

MÜHLMANN, M. *et al.* Optimizing recombinant protein expression via automated induction profiling in microtiter plates at different temperatures. **Microbial Cell Factories**, v. 16, p. 220, 2017.

MURIN, C. D.; WILSON, I. A.; WARD, A. B. Antibody responses to viral infections: a structural perspective across three different enveloped viruses HHS Public Access. **Nat Microbiol**, v. 4, n. 5, p. 734–747, 2019.

NEUFELDT, C. J. *et al.* **Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family** *Nature Reviews Microbiology*, 2018.

PERERA-LECOIN, M. *et al.* Flavivirus entry receptors: An update. **Viruses**, v. 6, n. 1, p. 69–88, 2013.

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

PICKETT, B. E. *et al.* ViPR: an open bioinformatics database and analysis resource for virology research. **Nucleic acids research**, v. 40, n. Database issue, p. D593–8, jan. 2012.

POSTMA, J. C. *et al.* Molecular dynamics with coupling to an external bath. **Studies in Molecular Dynamics. I. General Method The Journal of Chemical Physics**, v. 81, n. 8, p. 234505, 1984.

PREMKUMAR, L. *et al.* Development of envelope protein antigens to serologically differentiate zika virus infection from dengue virus infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 3, 1 mar. 2018.

PROVENCHER, S. W.; GLÖCKNER, J. Estimation of Globular Protein Secondary Structure from Circular Dichroism. **Biochemistry**, v. 20, n. 1, p. 33–37, 1981.

PURCELL, A. W. *et al.* Dissecting the role of peptides in the immune response: theory, practice and the application to vaccine design. **Journal of Peptide Science**, v. 9, n. 5, p. 255–281, 1 maio 2003.

RANJBAR, B.; GILL, P. Circular Dichroism Techniques: Biomolecular and Nanostructural Analyses- A Review. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 74, n. 2, p. 101–120, 1 ago. 2009.

REGENMORTEL, M. H. V. VAN. What is a b-cell epitope? **Methods in Molecular Biology**, v. 524, p. 3–20, 2009.

REN, G.; KE, N.; BERKMEN, M. Use of the SHuffle strains in production of proteins. **Current Protocols in Protein Science**, v. 2016, p. 5.26.1–5.26.21, 1 ago. 2016.

- ROBBIANI, D. F. *et al.* Recurrent Potent Human Neutralizing Antibodies to Zika Virus in Brazil and Mexico. **Cell**, v. 169, n. 4, p. 597- 609.e11, 4 maio 2017.
- SAPPARAPU, G. *et al.* Neutralizing human antibodies prevent Zika virus replication and fetal disease in mice. **Nature**, v. 540, n. 7633, p. 443–447, 15 dez. 2016.
- SARGSYAN, K.; GRAUFFEL, C.; LIM, C. How Molecular Size Impacts RMSD Applications in Molecular Dynamics Simulations. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 13, n. 4, p. 1518–1524, 11 abr. 2017.
- SCHEIN, C. H.; NOTEBORN, M. H. M. Formation of soluble recombinant proteins in escherichia coli is favored by lower growth temperature. **Bio/Technology**, v. 6, n. 3, p. 291–294, 1988.
- SCHUBERT, M. *et al.* Aspergillus -specific antibodies – Targets and applications. **Biotechnology Advances**, 30 mar. 2018.
- SELA, I. *et al.* GUIDANCE2: Accurate detection of unreliable alignment regions accounting for the uncertainty of multiple parameters. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. W1, p. W7–W14, 2015.
- SHALI, A. *et al.* Generation and screening of efficient neutralizing single domain antibodies (VHHs) against the critical functional domain of anthrax protective antigen (PA). **International Journal of Biological Macromolecules**, 7 mar. 2018.
- SINGH, R. K. *et al.* **Zika virus – emergence, evolution, pathology, diagnosis, and control: current global scenario and future perspectives – a comprehensive review** *Veterinary Quarterly*, 2 jul. 2016.
- SINGH, R. K. *et al.* Advances in diagnosis, surveillance, and monitoring of zika virus: An update. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JAN, p. 1–17, 2018.
- SIROHI, D. *et al.* The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. **Science**, v. 352, n. 6284, p. 467–470, 22 abr. 2016.
- SMOLAREK, D.; BERTRAND, O.; CZERWINSKI, M. Variable fragments of heavy chain antibodies (VHHs): a new magic bullet molecule of medicine?* Zmienne fragmenty przeciwciał ciężkołańcuchowych (VHH): nowa magiczna kula medycyny? **Postepy Hig Med Dosw**, v. 66, p. 348–358, 2012.
- SUN, P. *et al.* Review Article Bioinformatics Resources and Tools for Conformational B-Cell Epitope Prediction. **Computational and Mathematical Methods in Medicine**, v. 2013, p. 11, 2013.
- TEGEL, H. *et al.* Increased levels of recombinant human proteins with the Escherichia coli strain Rosetta(DE3). **Protein Expression and Purification**, v. 69, n. 2, p. 159–167, fev. 2010.
- TOPORIK, A. *et al.* Computational identification of natural peptides based on analysis of molecular evolution. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2137–2141, 2014.
- TURMEL, J. M. *et al.* **Late sexual transmission of Zika virus related to persistence in the semen** *The Lancet* Lancet Publishing Group, , 18 jun. 2016.
- U, S. M. Single domain camel antibodies : current status. 2001.
- WALLACE, A. C.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. **Protein Engineering, Design and**

Selection, v. 8, n. 2, p. 127–134, 1 fev. 1995.

WANG, J. *et al.* A Human Bi-specific Antibody against Zika Virus with High Therapeutic Potential. **Cell**, v. 171, n. 1, p. 229–241.e15, 21 set. 2017.

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

WATERHOUSE, A. M. *et al.* Jalview Version 2-A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. **Bioinformatics**, v. 25, n. 9, p. 1189–1191, 2009.

WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and Future Arboviral Threats. **Antiviral Res**, v. 85, n. 2, p. 328, 2010.

WEBB, B.; SALI, A. Comparative protein structure modeling using MODELLER. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 2016, p. 5.6.1–5.6.37, 2016.

WICKHAM, H. **ggplot2**. New York, NY: Springer New York, 2009.

WU, Y. *et al.* Neutralization of Zika virus by germline-like human monoclonal antibodies targeting cryptic epitopes on envelope domain III. **Nature Publishing Group**, v. 6, 2017.

XU, J. *et al.* Immunotherapy for pancreatic cancer: A long and hopeful journey. **Cancer Letters**, v. 425, p. 143–151, 29 jul. 2018.

YU, I. M. *et al.* Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. **Science**, v. 319, n. 5871, p. 1834–1837, 28 mar. 2008.

ZANLUCA, C. *et al.* First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569–72, jun. 2015.

ZHANG, J.; YANG, J. R. **Determinants of the rate of protein sequence evolution** *Nature Reviews Genetics* *Nature Publishing Group*, , 19 jul. 2015.

ZHANG, S. *et al.* Neutralization mechanism of a highly potent antibody against Zika virus. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 1–7, 24 nov. 2016.

ZHANG, Y. *et al.* Structures of immature flavivirus particles. **EMBO Journal**, v. 22, n.11, p. 2604–2613, 2003.

ZHANG, Y.; SAGUI, C. Secondary structure assignment for conformationally irregular peptides: Comparison between DSSP, STRIDE and KAKSI. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 55, p. 72–84, fev. 2015.

ZHAO, H. *et al.* Structural Basis of Zika Virus-Specific Antibody Protection. **Cell**, v. 166, n. 4, p. 1016–1027, ago. 2016.

WHO. **World Health Organization**. (2020). The history of Zika vírus. Disponível em: <http://www.who.int/emergencies/zika-virus/timeline/en/>. Acessado em: 12/04/2020.

WHO. **World Health Organization**. (2016). Situation report: Zika virus, microcephaly, Guillain-Barré syndrome. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/250633>. Acessado em: 10/04/2020.