Jonathan Ballico de Moraes

**Estudo do efeito adjuvante do peptídeo derivado da proteína NS3 na
resposta imunológica de camundongos vacinados com vírus Zika
inativado**

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. Benedito Antonio Lopes da Fonseca

RIBEIRÃO PRETO

2018

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

Jonathan Ballico de Moraes

Estudo do efeito adjuvante do peptídeo derivado da proteína NS3 na resposta imunológica de camundongos vacinados com vírus Zika inativado. Jonathan Ballico de Moraes; Orientador, Benedito Antonio Lopes da Fonseca - 2018

81 f. : 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, 2018.

Versão Original

1 – Arbovírus. 2 – Vírus Zika. 3 – NS3. 4 – Adjuvante. 5 – Vacina

Folha de Aprovação

Nome: Jonathan Ballico de Moraes

Título: Estudo do efeito adjuvante do peptídeo derivado da proteína NS3 na resposta imunológica de camundongos vacinados com vírus Zika inativado

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 2018,

Banca Examinadora

Prof. Dr. Benedito Antonio Lopes da Fonseca

Instituição: Universidade Federal de São Paulo

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____

Julgamento _____

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____

Julgamento _____

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____

Julgamento _____

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou
sobre aquilo que todo mundo vê.”
(Arthur Schopenhauer)

AGRADECIMENTOS

De coração, agradeço,

Primeiramente agradeço a Deus pela vida e por nos dar a oportunidade de conhecer, estudar e manipular suas obras tão fantásticas.

Ao meu amado pai Rubens, pois sem seu especial apoio eu jamais teria terminado este trabalho de mestrado. Agradeço também por ser o grande responsável pela pessoa que me tornei, minhas maiores virtudes e senso crítico, base de um bom cientista, vieram de você.

Às duas mulheres que mais amo nesta vida, minha mãe Maria e minha esposa Francielle que foram pacientes e me deram os maiores suportes emocionais possíveis durante os momentos mais difíceis dessa jornada. E a terceira, que não é humana, minha cadela Molly, por sempre estar ao meu lado, literalmente, em todos os momentos da minha vida, inclusive durante a escrita desta dissertação.

Agradeço ao ser-humaninho que, embora tenha mudado totalmente minha vida durante o segundo ano de mestrado e dificultado, e muito, meu dia a dia pessoal e no trabalho, me fez enxergar o real significado do que é amor. Ao meu filhinho Benjamin, que está me ensinando a ser uma pessoa melhor.

Agradeço, também, a toda minha família pelo apoio, desde meus irmão, tios, sobrinhos, primos, sogros, cunhados; e também aos meus amigos pela companhia nos momentos de lazer, que são extremamente necessários para o equilíbrio emocional e do bem-estar.

Ao meu querido professor e orientador Dr. Benedito Antonio Lopes da Fonseca, que depositou sua confiança em mim durante este caminho, sempre com bom humor e com responsabilidade, além de sua total empatia nos momentos difíceis que passei durante o mestrado. Agradeço aos conselhos e às críticas que me tornam um pesquisador mais competente e completo. Com certeza, é uma pessoa que levarei, para sempre, em minha memória e sempre o verei como alguém em quem me espelhar como pesquisador e profissional, não importa onde eu esteja.

Aos professores e funcionários do programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da FMRP, em especial à Ana Cristina, que foi para mim uma verdade amiga, estando sempre presente nos momentos de necessidade.

Agradeço também às auxiliares técnicas Denise Brufato Ferraz e Izaíra Tincani Brandão pela disposição em terem me auxiliado nos ensaios de citometria e

quantificação de endotoxinas, respectivamente, mesmo que em horários fora do convencional.

Aos meus colegas Djalma Santos, Renan Carvalho, Marcílio Jorge Fumagali e Ricardo Cardoso por seus preciosos auxílios em experimentos importantes realizados neste trabalho.

Aos colegas e amigos do Centro de Pesquisa em Virologia, em especial à Taline, Vitor, Beatriz, Mayara, Márcio, Marcus, Fábio, Flávia, Daniel e Danillo pela companhia e brincadeiras que alegraram esses 2 anos e meio em que ficamos juntos. Em especial, agradeço ao Danillo Espósito por atuar, não apenas como técnico, nos fornecendo todos os materiais necessários para desenvolvermos nossas pesquisas no laboratório, como também ter atuado, em muitos momentos, como um verdadeiro co-orientador. Agradeço também ao Fábio Bezerra por me ensinar todas as técnicas de manipulação de camundongos, e pelo auxílio concedido para a realização deste trabalho.

Aos professores do Centro de pesquisa em Virologia da FMRP Dr. Eurico Arruda, Dr. Luis Lamberti da Silva e Dr. Luiz Tadeu Figueiredo, bem como aos funcionários Adriana, Soraya, Pitty, Suelli, Leila e Andréia, pelo imenso aprendizado que tive em suas companhias, seja em discussão de apresentações de trabalhos, ou na conversa do dia a dia.

E agradeço imensamente a CAPES, CNPq e a Fundação de Amparo à pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa (Processo 2016/26145-3) e apoio financeiro, que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho e da minha formação como pesquisador.

Estudo do efeito adjuvante do peptídeo derivado da proteína NS3 na resposta imunológica de camundongos vacinados com vírus Zika inativado

RESUMO

A febre Zika é uma enfermidade que afeta pessoas de países tropicais e subtropicais. O agente etiológico da doença é o vírus Zika (ZIKV), um flavivírus de genoma RNA de fita simples, transmitido principalmente por mosquitos do gênero *Aedes*. Devido a associação do ZIKV à microcefalia e síndrome de Guillain-Barré é necessário desenvolver estratégias para a prevenção da doença. Entre eles, a melhor medida profilática é a vacinação. A proteína NS3 tem sido relatada como um potencial ativador da imunidade celular contra o ZIKV e outros flavivírus, cuja atuação tem sido utilizada como um alvo contra infecções virais. Neste contexto, o objetivo deste projeto foi testar a eficiência da NS3 como ativadora da resposta imunológica e, em combinação com o vírus inativado, produzir uma vacina capaz de desenvolver proteção total contra a infecção viral. Uma sequência da NS3 foi clonada no vetor pET-26b, expresso em *E. coli* Rosetta e purificado por cromatografia de afinidade em coluna de níquel. A completa inativação do ZIKV foi realizada por meio de adição de formaldeído 0,05% e incubação por 3 dias. Combinações vacinais de NS3 e vírus inativado foram inoculados em vários grupos de camundongos 129 Sv/Ev e A129 nos dias 0 e 14. No dia 21, os camundongos A129 vacinados foram desafiados com o ZIKV selvagem e analisados segundo a perda de peso e sobrevivência por 21 dias. Os camundongos vacinados com NS3 e vírus inativado, na mesma formulação vacinal, tiveram 100% de proteção contra o ZIKV infeccioso. O sangue total e o baço foram coletados dos camundongos 129 Sv/Ev e A129 após 21 dias de uma nova imunização. Foi avaliado a produção de anticorpos específicos e neutralizantes contra ZIKV por ELISA e PRNT, mostrando que animais imunizados com a formulação vacinal “vírus inativado com NS3” produzem mais anticorpos contra o vírus, porém não foi detectado neutralização do vírus em nenhum grupo imunizado. O perfil de citocinas expressas por linfócitos do baço, analisado por FACS, sugere que a NS3 participa na modulação para uma resposta Th1. Esta abordagem possibilitou a avaliação de uma combinação vacinal que se mostrou capaz de prevenir a infecção com o ZIKV em camundongos susceptíveis.

Palavras chave: Arbovírus; Vírus Zika; NS3; Adjuvante; Vacina.

Study of the adjuvant effect of the NS3 peptide in the immune response of mice vaccinated with inactivated Zika Virus

ABSTRACT

Zika Fever is a disease that affects many people in tropical and subtropical countries. The etiologic agent is Zika Virus (ZIKV), a single-stranded RNA flavivirus, transmitted mostly by *Aedes* mosquitoes, but sexual, congenital and blood transfusion transmission has also been reported. Due to the possible association of ZIKV to microcephaly and Guillain-Barré Syndrome, it is necessary to develop strategies for disease prevention. Among them, the best prophylactic measure is vaccination. The non-structural protein NS3 has been shown to stimulate cellular immunity response against others flaviviruses, and such activity has been used as a target against other flaviviruses infection. In this context, the aim of this project is to test the efficiency of NS3, in combination with the inactivated virus, to produce a vaccine capable of developing full protection against viral infection. The NS3 sequence was cloned into the pET-26b vector, expressed in *E. coli* Rosetta and purified by nickel column affinity chromatography. The complete inactivation of ZIKV was performed by addition of 0.05% formaldehyde and incubation for 3 days. Vaccine combinations of NS3 and inactivated virus were inoculated into 129 Sv/Ev and A129 mice on days 0 and 14. On day 21, vaccinated A129 mice were challenged with wild ZIKV and analyzed for weight loss and survival by 21 days. Mice vaccinated with NS3 and inactivated virus, in the same vaccine formulation, had 100% protection against infectious ZIKV. Whole blood and spleen cells were collected from 129 Sv/Ev and A129 mice after 21 days of new immunization. The production of specific and neutralizing antibodies against ZIKV was evaluated by Immunofluorescence, ELISA and PRNT, showing that animals immunized with the vaccine formulation "virus inactivated with NS3" increased the antibodies' level against the virus, but no virus neutralization was detected in any immunized group. The cytokine profile expressed by spleen lymphocytes, analyzed by FACS, suggests that NS3 participates in modulation for a Th1 response. This approach gave us the opportunity to evaluate this vaccinal combination that was shown to be able to prevent infection with ZIKV in susceptible mice.

Key words: Arbovirus; Zika Virus; NS3; Adjuvant; Vaccine.

Lista de figuras

Figura 1: Genoma de um flavivírus mostrando sua sequência codificante para a poliproteína e os respectivos sítios de clivagem.....	13
Figura 2: Fluxograma dos experimentos realizados neste trabalho.....	23
Figura 3: Representação da aplicação de vírus em cada poço para a quantificação viral por PFU.....	26
Figura 4: Representação do ensaio de inativação do vírus Zika.....	27
Figura 5: Localização do peptídeo recombinante de NS3 no genoma do vírus Zika e sequência de interesse.....	29
Figura 6: Vetor de clonagem pET-26b.....	30
Figura 7: Metodologia da vacinação e desafio.....	39
Figura 8: Metodologia de vacinação e análise da resposta imunológica.....	41
Figura 9: Representação da imunofluorescência feita com o pool de amostras de plasma dos camundongos 129 Sv/Ev (WT) e A129 (KO).....	42
Figura 10: Representação do ELISA feito para as amostras de plasma dos camundongos A129 e 129 Sv/Ev imunizados.....	44
Figura 11: Representação do PRNT feito para as amostras de plasma dos camundongos A129 e 129 Sv/Ev imunizados.....	45
Figura 12: Alinhamento das cepas ZIKVBR e ZikaSPH2015.....	47
Figura 13: Quantificação do estoque ZikaSPH2015 por contagem de PFU.....	48
Figura 14: Quantificação do estoque ZIKVBR por contagem de PFU.....	48
Figura 15: Ensaio de inativação viral.....	49
Figura 16: Verificação da inativação viral.....	50
Figura 17: Resultado de PCR do gradiente de temperatura de anelamento.....	51
Figura 18: Placa de Petri com as colônias recombinantes contendo a construção pTZ_NS3.....	52
Figura 19: PCR de colônia para a confirmação da construção pTZ_NS3.....	52
Figura 20: Placa de Petri com as colônias recombinantes contendo a construção pET26b_NS3.....	52
Figura 21: Ilustração de como ocorre a reação de ligação em presença da T4 ligase.....	53
Figura 22: PCR de colônia para a confirmação da construção pET26b_NS3.....	53
Figura 23: Ensaio de expressão da NS3 recombinante em diferentes tempos de indução de IPTG.....	54
Figura 24: Etapas de purificação da NS3 recombinante e solubilidade da proteína de interesse.....	56
Figura 25: Padronização e determinação da dose letal de ZikaSPH2015.....	57
Figura 26: Padronização e determinação da dose letal de ZIKVBR.....	58

Figura 27: Imunização e desafio.....	59
Figura 28: Ensaio de imunofluorescência.....	61
Figura 29: Ensaio de ELISA.....	63
Figura 30: Teste de neutralização por redução de plaques (PRNT50).....	65
Figura 31: Ensaio de MTT em linhagem de linfócitos A301 sob estímulo da NS3 recombinante.....	66
Figura 32: Citometria de fluxo de amostras de células de baço dos animais imunizados.....	67
Figura 33: Análise das citocinas IL-4 e IFN- γ expressas por linfócitos CD4+ e CD8+.....	68

Lista de tabelas

Tabela 1: Sequências dos primers desenhados para amplificação da NS3 do vírus Zika.....	31
Tabela 2: Tampões para a purificação da NS3 por cromatografia de afinidade em coluna de Ni ²⁺	36
Tabela 3: Ensaio de imunização dos camundongos A129.....	39
Tabela 4: Ensaio de imunização dos camundongos A129 e 129 Sv/Ev para a análise imunológica.....	40

Índice

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Vírus Zika.....	13
1.2 Ciclo reprodutivo.....	15
1.3 História e epidemiologia.....	16
1.4 Tecnologia de Vacinas.....	17
2. JUSTIFICATIVA.....	20
3. OBJETIVO.....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1 Linhagens celulares, bacterianas e estoque viral.....	23
4.1.1 Escherichia coli.....	23
4.1.2 Preparação das células competentes: E.coli Rosetta e E. coli XL10 Gold.....	24
4.1.3 Cultivo de células Vero e C6/36.....	24
4.1.4 Cepas de ZIKV e alinhamento.....	25
4.1.5 Estoque de Vírus Zika e quantificação por PFU.....	25
4.2 Desenvolvimento da vacina inativada.....	26
4.3 Clonagem da NS3 recombinante.....	28
4.3.1 Desenho de primers.....	28
4.3.2 Gradiente da Temperatura de Anelamento - PCR e eletroforese em gel de agarose.....	31
4.3.3 Subclonagem em pTZ57R/T.....	31
4.3.4 Transformação da construção pTZ_NS3 em E. coli XL10 Gold.....	32
4.3.5 Clonagem em pET-26b.....	32
4.3.6 Transformação da construção pET26b_NS3 em E. coli Rosetta.....	33
4.4 Expressão e purificação da NS3 recombinante.....	34
4.4.1 Expressão e purificação.....	34
4.4.2 Ensaio cromatográfico.....	35
4.4.3 SDS-Page e Western Blot.....	36
4.5 Teste de citotoxicidade celular: Linfócitos X NS3 recombinante.....	37
4.6 Vacinação.....	38
4.6.1 Padronização e determinação da dose letal.....	38
4.6.2 Imunização e desafio.....	38
4.7 Análises sorológicas e imunológicas.....	40
4.7.1 Preparo das amostras.....	40
4.7.2 Imunofluorescência.....	41
4.7.3 ELISA.....	43
4.7.3 PRNT.....	44

4.7.4 Citometria de fluxo.....	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1 Alinhamento das cepas de ZIKV.....	47
5.2 Estoque de ZIKV e quantificação por PFU.....	47
5.3 Desenvolvimento da vacina inativada.....	49
5.4 Clonagem da NS3 recombinante.....	50
5.5 Expressão e purificação da NS3 recombinante.....	54
5.6 Imunização e desafio.....	56
5.7 Imunização e resposta imunológica.....	59
5.7.1 Imunofluorescência.....	59
5.7.2 ELISA.....	62
5.7.3 PRNT.....	64
5.7.4 Citometria.....	66
6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	68
7. BIBLIOGRAFIA.....	69

1. INTRODUÇÃO

1.1 Vírus Zika

A Zika é uma enfermidade que acomete pessoas de muitos países tropicais. O agente etiológico da doença é o vírus Zika (ZIKV), um vírus envelopado pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, medindo aproximadamente 50 nm de diâmetro, cujo genoma é constituído de RNA de fita simples, polaridade positiva, não segmentado (MALONE RW *et al*, 2016). O ZIKV é transmitido predominantemente por artrópodes, em especial pela picada de mosquitos do gênero *Aedes* (SEMPALA SDK, 1983), sendo o *Aedes aegypti* o principal vetor no Brasil. Além disso, publicações recentes evidenciam sua transmissão por via sexual (BATES D, 2011; MARON DF, 2016), transfusional (BORJAS-CASTRO ML *et al*, 2016; MUSSO D, 2014) e vertical (VOGEL G, 2015).

Possuindo 10.794 bases, o RNA viral utiliza a maquinaria de tradução da própria célula hospedeira para sintetizar uma única poliproteína de aproximadamente 375 kDa (**Figura 1**) (BOLLATI M *et al*, 2010; FAYE O, 2014). A poliproteína é sintetizada na membrana do retículo endoplasmático (RE) e clivada por enzimas celulares e virais, resultando em 3 proteínas estruturais, como proteína do envelope (E), precursor de membrana (prM), proteína do capsídeo (C) e 7 diferentes proteínas não-estruturais, que estão relacionadas principalmente com a replicação viral, patogênese e evasão da resposta imunológica: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (CHAMBERS T, 1990).

Figura 1: Genoma de um flavivírus mostrando sua sequência codificante para a poliproteína e os respectivos sítios de clivagem

Fonte: ViralZone, Instituto Suíço de Bioinformática – https://viralzone.expasy.org/6756?outline=all_by_species – último acesso em 22 de junho de 2018.

O envelope viral constitui-se por uma bicamada lipídica contendo a glicoproteína E, que está relacionada com a interação entre o vírus e a célula hospedeira (LINDENBACH BD e RICE CM, 2003), e a glicoproteína M, uma pequena proteína que estabiliza o envelope viral (LORENZ IC *et al*, 2002; RODENHUIS-ZYBERT IA *et al*, 2010). A proteína do envelope (E) é uma glicoproteína rica em cisteína, formada de 251 aminoácidos, de aproximadamente 53 kDa, possuindo três domínios: o domínio I (DI) é a região central, chamada de região de dobradiça, moderadamente conservada, formada por uma estrutura de folha beta com orientação paralela na membrana do vírus; o domínio II (DII) é formado por um par de *loops* descontínuos apresentando uma região altamente conservada, responsável pela dimerização com outra glicoproteína E através de três ligações dissulfeto; e o domínio III (DIII) possui a função de interagir com receptores celulares, determinando a virulência dos flavivírus, além da determinação da resposta do hospedeiro (REY *et al*, 1995), sendo que variações nesta região estão relacionadas com a especificidade do vírus e potencial de virulência (WEAVER S e VASILAKIS N, 2009).

As proteínas não estruturais NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 são essenciais não apenas para a replicação e montagem do vírus, mas também para a patogênese e evasão da resposta imunológica. A NS1, durante a replicação dos flavivírus, pode ser direcionada para atuar de diferentes formas: [1] ancorado à membrana do retículo endoplasmático (RE), ela exerce um importante papel na replicação do RNA viral por participar na montagem do complexo de replicação e recrutamento de outras proteínas não estruturais para o RE (YOUN S *et al*, 2013); [2] associada à membrana plasmática na forma de dímero, a NS1 inibe a ativação do sistema complemento impedindo a destruição de células infectadas (CHUNG KM *et al*, 2006); [3] secretada pela célula infectada na forma de hexâmeros, a NS1 pode tanto inibir a sinalização do TLR3 (*Toll-like receptor*), como forma de evasão da resposta imunológica, assim como pode ativar a sinalização do TLR4 e estimular a destruição da célula, causando efeitos patológicos (HILGENFELD R, 2016; CROOK KR *et al*, 2014). A NS2A participa na montagem viral, além de inibir a síntese de interferon-beta (IFN- β) pela via de RIG-1; está também relacionada com o rompimento das junções aderentes entre as células neurais de fetos infectados com ZIKV (LEUNG JY *et al*, 2008; YOON KJ *et al*, 2017). A NS2B atua como cofator do complexo serino-protease NS2B3. A NS3 é uma proteína de 603 aminoácidos, a

qual possui 3 domínios: [1] o domínio serino-protease, localizado na porção N terminal composto dos resíduos 1 a 161, que em conjunto com a NS2B forma-se o complexo serino-protease NS2B3 responsável por se autoclavar, e clivar alguns sítios específicos localizados ao longo da poliproteína viral, liberando cada uma das proteínas importantes para a replicação do vírus (**Figura 1**); [2] o domínio da NTPase, composto pelos resíduos 152 a 338; e [3] o domínio helicase, composto pelos resíduos de 331 a 494, responsável por promover a abertura da dupla fita de RNA viral para sua replicação (PERERA R e KUHN RJ, 2008). A NS4A está associada com a regulação da atividade ATPase do domínio helicase da NS3 e, em conjunto com a NS4B, a qual induz a formação de vesículas para o transporte das partículas virais em células infectadas com ZIKV, são capazes de desregular as vias de sinalização de Akt-mTOR do ciclo celular, causando a inibição da neurogênese e o estímulo da autofagia em células tronco neural de feto humano (LIANG Q, 2016). A NS5, por sua vez, é uma proteína de 900 aminoácidos que contém um domínio metiltransferase na porção N-terminal, nos resíduos de 1 a 296, responsável pelo silenciamento da transcrição de RNAs do hospedeiro, para que seja apenas traduzido o RNA viral; e um domínio RNA polimerase na porção C-terminal, nos resíduos de 320 a 900, responsável pela multiplicação das fitas do RNA viral (PERERA R e KUHN RJ, 2008).

1.2 Ciclo reprodutivo

O ciclo reprodutivo do ZIKV segue o modelo descrito para todos os flavivírus. As glicoproteínas do envelope viral interagem com receptores da célula hospedeira e o vírus sofre endocitose mediada por clatrina. Após isso, o aumento da acidificação na vesícula endocítica levará a um rearranjo da proteína E, na qual se fundará com a membrana do endossomo, ocorrendo a liberação do RNA viral para o citoplasma. Assim, o RNA viral, por ser senso positivo, é diretamente traduzido em poliproteína pelos ribossomos no RE. A poliproteína, sintetizada na membrana do RE, é autoclivada pelo complexo serino-protease NS2B3 viral e, após estar livre, cliva os demais sítios de clivagem, dando origem às proteínas estruturais e não-estruturais do vírus. O RNA viral, que permanece no citoplasma, é transcrito em uma fita negativa pela NS5 (RNA polimerase viral) formando um RNA de dupla fita que, ao ser novamente transcrito por esta mesma proteína, dará origem a uma nova fita de RNA viral de polaridade positiva. Esta será envolvida, ainda no citoplasma, pelas proteínas C que, por sua vez, serão transportadas para o lúmen do RE, envolvidas

por uma bicamada lipídica. No lúmen do RE, as proteínas estruturais *prM* e *E* são montadas ao redor da bicamada lipídica, contendo as proteínas *C* e o RNA viral, formando o vírus imaturo. Este, finalmente, é encaminhado para o Complexo de Golgi, onde a *prM* será clivada em *M* por proteases específicas do Complexo de Golgi, formando o vírus maduro. Este, então, é secretado para fora da célula, pronto para infectar novas células (ROTHMAN AL, 2011; LINDENBACH BD e RICE CM, 2003).

1.3 História e epidemiologia

O primeiro registro do ZIKV foi em 1947, no qual o vírus foi isolado de um macaco *Rhesus* na floresta de Zika na República de Uganda, África (DICK GW *et al*, 1952). Em 1954, o ZIKV foi isolado de soro humanos na Nigéria (MACNAMARA FN, 1954). De 1951 a 1981 foi evidenciado a progressão do ZIKV em outras nações africanas e asiáticas (HAYES EB, 2009). O primeiro surto da doença, em humanos, fora da região africana e asiática foi em abril de 2007, na Micronésia, onde foram confirmados 49 casos da doença, sendo os principais sintomas: febre intermitente, erupções cutâneas, coceira na pele e dores musculares (DUFFY MR, 2009). No fim de 2013, foi registrada outra epidemia fora do continente africano, na qual foi relatado mais de 35 mil casos na Polinésia Francesa e seu espalhamento para ilhas vizinhas, como Ilha da Páscoa, Ilhas Cook e Nova Caledônia (MUSSO D *et al*, 2014).

Acredita-se que o vírus entrou no Brasil devido a um evento futebolístico, chamado Copa das Confederações realizado em Junho de 2013, na qual houve participação da equipe do Taití, localizado na Polinésia Francesa (FARIA NR *et al*, 2016). O surto no Brasil iniciou-se em maio de 2015 de forma crescente, porém negligenciada devido à pouca gravidade da doença quando comparada a outras doenças virais em evidência no período, como a dengue. A Zika apenas começou a ser preocupante quando a doença passou a ser correlacionada com a crescente incidência da Síndrome de Guillain-Barré e de microcefalia (TRIUNFOL M, 2015; TRIUNFOL M, 2016), na qual no final daquele mesmo ano foram detectados 2.782 casos de microcefalia, sendo que no ano anterior havia sido registrado 147 casos (ROMERO S, 2015). No primeiro semestre de 2016 houve grande aumento de suspeita de pessoas infectadas com o ZIKV no Brasil, chegando a marca de 120.161 casos, além do crescente número de casos de microcefalia, totalizando 7.830 casos (Ministério da Saúde, 2016).

Ainda no primeiro semestre de 2016, o total de 60 países europeus, asiáticos e americanos reportaram casos de pessoas contaminadas com o ZIKV (WHO, 2016). Assim, a Organização Mundial de Saúde decretou situação de emergência em saúde pública internacional em razão das possíveis complicações com o ZIKV e seu avanço através do globo (WHO, 2016).

Devido à evidência do perigo do ZIKV, especialmente para embriões, tornaram-se necessárias medidas de prevenção do desenvolvimento da doença. Entre eles, e considerado a mais eficaz, o desenvolvimento de vacinas.

1.4 Tecnologia de Vacinas

Apesar de ainda não existir nenhuma vacina comercial contra o ZIKV, muitas passaram pelos testes pré-clínicos com sucesso, promovendo proteção em curto e longo prazo em animais, outras estão em fase de testes clínicos em humanos. As principais vacinas atualmente em desenvolvimento contra o ZIKV são as vacinas de DNA, de mRNA, vírus inativado e vacinas baseadas em vetores virais (ABBINK P *et al*, 2018).

As vacinas de DNA são plasmídeos que contêm genes importantes para o estabelecimento da resposta imunológica adequada e ao serem incorporadas pelas células do paciente, expressam antígenos virais de interesse, promovendo uma forte ativação da resposta imunológica humoral e celular contra estes antígenos virais (FERRARO B, 2011). Uma das vacinas atuais em desenvolvimento, liderada pela *GeneOne Life Science* e *Inovio Pharmaceuticals*, tem mostrado excelentes resultados em testes clínicos em humanos, uma vez que em 14 semanas após a primeira dose da vacinação foram encontrados altos títulos de anticorpos anti-ZIKV e, após transferir o soro destes pacientes vacinados para camundongos susceptíveis ao ZIKV, conferiram alta proteção quando desafiados com o ZIKV infeccioso (TEBAS P *et al*, 2017). Apesar de ser uma excelente estratégia para desenvolvimento vacinal, por se tratar de uma técnica muito recente há incertezas acerca de sua segurança (ROBINSON HL *et al*, 2000).

Várias vacinas inativadas também já passaram dos testes pré-clínicos e estão em fase de testes clínicos. Uma delas, conduzido por Modjarrad K *et al* (2018), mostrou que, as partículas virais inativadas com formalina, embora capaz de estimular pouca produção de anticorpos neutralizantes em humanos, foi o suficiente para proteger, totalmente ou parcialmente, camundongos da infecção por ZIKV, após a transferência de IgGs de humanos vacinados para eles. Um dos pontos a ser

considerado, ao desenvolver uma vacina inativada, é sua baixa imunogenicidade quando comparada a outros métodos vacinais, uma vez que o microorganismo inativado não consegue se reproduzir no corpo do hospedeiro e, devido a isso, há pouca exposição do sistema imunológico frente aos antígenos do patógeno, tornando necessária sua aplicação em conjunto com adjuvantes, além de aplicações da vacina em múltiplas doses, ou periodicamente (MURDIN AD *et al*, 1996). O papel dos adjuvantes é amplificar a resposta imunológica contra os antígenos vacinais simulando uma resposta real contra um patógeno; assim são utilizados moléculas imunogênicas capazes de estimular o recrutamento de fagócitos e outras células do sistema imunológico inato, como hidróxido de alumínio, em conjunto com o vírus inativado (PETROVSKY N e AGUIAR JC, 2004).

As vacinas de mRNA (RNA mensageiro) são uma nova tecnologia que se baseia em aplicar, em pacientes, mRNAs que codificam antígenos vacinais e, uma vez que tais mRNAs estão no citoplasma da célula, elas são diretamente traduzidas em proteínas pelos ribossomos, podendo estimular resposta imunológica celular e humoral, caso forem secretadas. Pesquisas recentes mostram que vacinas de mRNA que codificam a prM e E do ZIKV induziram altos níveis de anticorpos neutralizantes e proteção em camundongos e macacos, e estão sendo testadas em humanos (PARDI N *et al*, 2017; RICHNER J *et al*, 2017).

As vacinas baseadas em vetores virais, ou também chamada de vacinas quiméricas, se constituem em outra nova tecnologia que permite utilizar um “esqueleto viral” já conhecido e que não causa efeitos patológicos em humanos, como por exemplo, uma cepa atenuada de algum vírus humano, e programá-lo por tecnologia do DNA recombinante a fim de expressar antígenos virais de interesse vacinal, podendo estimular tanto resposta imunológica celular quanto humoral. Estudos recentes mostram a eficiência deste método para a produção de vacinas contra a Ebola, HIV e DENV utilizando adenovírus, vaccínia e YFV como vetor viral (LAI CJ e MONATH TP, 2003; BAROUCH DH *et al*, 2013; MILLIGAN ID *et al*, 2016; WINSLOW RK *et al*, 2017). Testes clínicos para o desenvolvimento de vacinas baseadas em vetores virais contra o ZIKV estão em andamento, utilizando adenovírus (NCT03356561) e sarampo (NCT02996890) como vetores.

As vacinas de subunidades, na qual possuem formulações compostas por um ou mais antígenos, mostram-se potencialmente interessantes por sua capacidade de estimular uma resposta imunológica protetora, sem a necessidade de expor o sistema imunológico à presença do agente patogênico em questão. Neste método,

os antígenos são produzidos e expressos por tecnologia do DNA recombinante em células eucarióticas, ou procarióticas, e purificadas para sua posterior utilização para fins vacinais; este método apresenta ainda diversas vantagens sobre outros tipos de vacinas, como por exemplo, maior segurança e menor risco de induzir reações imunológicas desfavoráveis que podem causar efeitos colaterais (LILJEQVIST S e STÅHL S, 1999).

As vacinas atenuadas contêm vírus ativos, porém cultivados em condições que minimizam suas propriedades infecciosas, como menor replicação viral e virulência. Essas vacinas normalmente provocam um aumento na durabilidade da resposta imunológica, aumentando consequentemente o número de células imunológicas de memória, essenciais para a melhor eficiência da vacina. Porém, não é recomendado para pessoas imunodeprimidas, como imunodeficientes devido a doenças ou gestantes, isto porque o vírus inoculado, mesmo que possua baixa virulência, pode passar a se replicar normalmente neste grupo de pessoas, assim como um vírus selvagem. Há ainda a baixa, porém existente, possibilidade de mutação e retorno da virulência natural (SINHA JK *et al*, 2014). A atenuação dos vírus pode ser realizada pelo método de Pasteur, o qual realiza sequenciais infecções em cultura celular *in vitro* ou em ovos embrionados a fim obter vírus mutados e atenuados após as várias passagens (WAGNER EK *et al*, 2007). Outro método de atenuação é a realização da técnica de biologia molecular de deleção direcionada, na qual é possível deletar regiões do genoma do vírus que auxiliam a replicação viral, tornando-o pouco virulento (BLANEY *et al*, 2008; LEE HC *et al*, 2012).

Algumas destas técnicas já foram utilizadas com sucesso para o controle de alguns flavivírus. Para um flavivírus que possui apenas um único sorotipo, como é o caso do vírus da febre amarela (YFV), a vacina eficientemente utilizada é a cepa vacinal atenuada 17D (no Brasil, a cepa 17DD; PUGACHEV KV *et al*, 2005). Para a dengue (DENV), o fato de existirem 4 sorotipos dificulta a utilização eficaz de alguns tipos de vacinação, como a vacina a base de vírus atenuado ou inativado, pois a vacinação, independente de cada sorotipo, pode promover o fenômeno de ADE (do inglês *antibody-dependent enhancement*), ocasionando piora no quadro clínico em um possível contágio de um dos outros sorotipos não imunizado pela vacina, aumentando o risco de hemorragia e outras complicações (HALSTEAD SB, 1989; ROTHMAN AL, 2011). Em vista deste problema, foram desenvolvidas quimeras geneticamente modificadas que possuem em seu genoma regiões codificantes para

as proteínas E e prM de cada um dos diferentes sorotipos da dengue (MURREL S *et al*, 2011), regiões estas que correspondem aos principais alvos de anticorpos protetores encontrados em soros de humanos após a infecção com o vírus (VALDES K, 2000).

2. JUSTIFICATIVA

Devido aos problemas evidentemente causados pelo ZIKV, laboratórios de pesquisa e indústrias farmacêuticas em todo o mundo têm trabalhado arduamente pelo desenvolvimento da vacina mais segura e eficaz contra o ZIKV, entre eles vacina inativada, atenuada, quimérica, de subunidades e de DNA (DURBIN A e WILDER-SMITH A, 2017). Uma das vacinas mais eficazes, a vacina atenuada, é capaz de estimular resposta imunológica humoral contra as proteínas estruturais do vírus, e também induzir resposta imunológica celular contra as células infectadas, devido a apresentação de proteínas estruturais e não-estruturais do vírus por MHC-I pelas células infectadas para linfócitos CD8 citotóxicas (CTLs), ou por MHC-II por células apresentadoras de antígenos (APCs) para a ativação de linfócitos CD4 e modulação para uma resposta Th1. Embora aparentemente pareça ser a melhor opção para uma formulação vacinal, ela não é recomendada para pessoas imunodeprimidas, como as grávidas, principal grupo a ser prevenido contra a infecção pelo ZIKV, devido à possível ocorrência da microcefalia infantil (GRUSLIN A *et al*, 2008). As vacinas inativadas, em especial, são seguras e podem ser administradas em qualquer tipo de paciente. Elas são capazes de estimular uma resposta imunológica humoral contra as proteínas estruturais do vírus (E, M e C) suficiente para neutralizar e eliminar os vírus antes de infectar novas células, porém estimula fracamente células citotóxicas a eliminar células infectadas (Bachmann MF *et al*, 1993), atuando, desta forma, apenas como um protetor parcial contra o vírus. A fim de melhorar a imunogenicidade das proteínas virais e produzir uma vacina capaz de estimular uma resposta completa (imunidade humoral e celular) contra os vírus, muitos pesquisadores têm utilizado diferentes abordagens, como a produção de vacinas de DNA, mRNA, vetores virais (KOUP RA e DOUEK DC, 2011), VLP (Virus-like particle) (HEMANN EA *et al*, 2013; RUEDL C *et al*, 2005) e vacinas de subunidades (ODEGARD JM *et al*, 2016).

Estudos recentes mostram evidências de que a proteína NS3 possui epítomos importantes para induzir uma potente resposta imunológica mediada por linfócitos T CD8 e CD4 Th1 em dengue, estimulando uma resposta imunológica inflamatória

capaz estimular células citotóxicas a eliminar células infectadas pelo vírus, resposta imunológica fundamental para o controle e eliminação da infecção viral, além de amplificar a soroconversão de outras proteínas, atuando como um potente adjuvante (HERRERA BB *et al*, 2018; SIMMONS M *et al*, 2016; XU X *et al*, 2016).

Desta forma, a proposta deste projeto é verificar a atuação de uma porção da proteína NS3 do ZIKV como um estimulador e amplificador da resposta imunológica e, assim, desenvolver uma vacina capaz de prover máxima proteção e segurança contra o ZIKV e suas complicações.

3. OBJETIVO

Este trabalho testará a hipótese da capacidade da NS3 em desempenhar um papel amplificador da resposta imunológica em camundongos, quando adicionada em conjunto a uma vacina inativada do ZIKV, e promover uma resposta completa contra este agente infeccioso.

Objetivos específicos:

- 1 – Clonar e expressar peptídeo da proteína não-estrutural NS3 de ZIKV em *E.coli Rosetta*.
- 2 – Realizar a inativação viral.
- 3 – Imunizar camundongos com diferentes combinações de vírus inativado e peptídeo NS3 recombinante
- 4 – Realizar o desafio com partículas virais selvagens em camundongos imunizados.
- 5 – Coletar o sangue total dos camundongos imunizados e analisar a presença de anticorpos específicos por ELISA e Imunofluorescência.
- 6 – Utilizar o plasma dos animais imunizados para realizar teste de neutralização por redução de plaques (PRNT) frente ao ZIKV
- 7 – Coletar as células do baço dos camundongos imunizados e analisar o padrão de linfócitos T específicos por Citometria de Fluxo.
- 8 – Analisar os resultados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O desenvolvimento deste trabalho seguiu a metodologia exemplificada na **Figura 2**:

Figura 2: Fluxograma dos experimentos realizados neste trabalho

4.1 Linhagens celulares, bacterianas e estoque viral

4.1.1 *Escherichia coli*

Para a subclonagem foi utilizada a linhagem *E. coli* XL10 Gold. Esta linhagem foi escolhida pela sua alta taxa de replicação e eficiência de transformação, devido sua excelente capacidade de tornar e manter-se competentes por quimiocompetência. As *E. coli* XL10 Gold transformadas com o vetor de expansão pTZ57R/T foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB: Triptona 10 g/L, Extrato de Levedura 5 g/L e NaCl 10 g/L) com a adição 0,1% de ampicilina (100 mg/mL).

Para a clonagem da sequência de interesse e a expressão da proteína recombinante foi utilizada a linhagem de *E. coli* Rosetta. Ela foi escolhida como sistema de expressão pelo fato de possuir em seu genoma a construção do fago DE3 que expressa a enzima T7 RNA Polimerase controlado pelo promotor *lac* o qual é induzível por IPTG. Esta construção permite que altos níveis de T7 RNA Polimerase sejam expressos com a aplicação de IPTG. Deste modo, o pET-26b torna-se um dos principais vetores de expressão para a síntese de proteínas heterólogas neste microorganismo, pois em presença de IPTG, grandes quantidades de T7 RNA polimerase, sintetizada a partir do genoma da *E.coli* Rosetta, consiga transcrever grandes quantidades do gene da proteína heteróloga (sintetizada a partir de gene específico clonado no vetor). Assim, *E.coli* Rosetta transformadas com o

vetor de expressão pET-26b foram cultivadas em meio LB líquido contendo 0,1% de canamicina (50 mg/mL).

4.1.2 Preparação das células competentes: *E.coli Rosetta* e *E. coli XL10 Gold*

O método descrito a seguir foi realizado da mesma forma para a competência da *E.coli Rosetta* e *E. coli XL10 Gold*.

Uma colônia de bactéria foi transferida de uma placa de LB-ágar (Tryptona 10 g/L, Extrato de Levedura 5 g/L, NaCl 10 g/L e Ágar 20 g/L) para um tubo falcon de 50 mL contendo 10 mL de meio LB líquido, e foi feita incubação das células a 150 rpm e 37°C *overnight*. Em seguida foi feita a transferência de 1 mL da cultura para um novo tubo falcon de 50 mL com meio LB líquido, contendo um volume de 10 mL, e as células foram incubadas nas mesmas condições anteriores até que a densidade ótica chegasse a 0,3 (600 nm). Após isso, o cultivo foi centrifugado a 3200 *g* por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em 25 mL de CaCl₂ 100 mM a 4°C e incubado em gelo por 20 min. Foi feita nova centrifugação nas mesmas condições, o sobrenadante foi descartado, o pellet foi ressuspensionado em 5 mL de CaCl₂ e incubado em gelo por 1 hora. Novamente foi realizada a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em 5 mL de CaCl₂ com glicerol em uma concentração final de 15%. Foram fracionadas alíquotas de 200 µL para diferentes microtubos (Eppendorf) estéreis e, finalmente, congeladas no freezer -80°C até o momento de uso.

4.1.3 Cultivo de células Vero e C6/36

Resultados prévios realizados por nosso laboratório mostram que o vírus Zika possui alta replicação em Vero e C6/36, sendo ambos excelentes modelos para cultivo e produção de estoque do vírus Zika. Porém, apenas na Vero é possível visualizar efeito citopático, efeito importante para a quantificação de vírus por contagem de unidades formadoras de plaques (PFU).

As células Vero foram cultivadas em meio MEM (*Minimum Essential Media*) com 1% de penicilina/estreptomicina e 10% de soro fetal bovino (SFB). As células C6/36 foram cultivadas em meio L-15 (*Leibovitz*) com 1% de penicilina/estreptomicina e 10% de SFB.

Nos ensaios de infecções das células com vírus infeccioso, tanto para a Vero como para a C6/36, foi utilizado seu respectivo meio de cultivo celular incompleto (com ausência de SFB) com 1% de penicilina/estreptomicina.

4.1.4 Cepas de ZIKV e alinhamento

As cepas virais utilizadas neste projeto foram a ZikaSPH2015, isolada e sequenciada pelo nosso grupo de pesquisa (CUNHA MS *et al*, 2016), e a ZIKVBR (BeH819966 - Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará, Brasil) (FARIA NR *et al*, 2016), gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto, que recebeu diretamente do Dr. Pedro Vasconcelos uma amostra do vírus liofilizado.

A fim de verificar a semelhança das cepas utilizadas neste projeto, foi realizado o alinhamento comparando toda a sequência de poliproteína entre as cepas virais, além das proteínas NS2b-NS3, utilizando o software CLC Sequence Viewer (Qiagen).

4.1.5 Estoque de Vírus Zika e quantificação por PFU.

O estoque do ZikaSPH2015 foi realizado a partir de seu cultivo em células Vero. Ao ser observado confluência de 90 a 100% de células Vero em uma garrafa de 25 cm², foi adicionado 50 µL de vírus em meio MEM incompleto em um volume total de 1 mL e as células a serem infectadas foram incubadas em estufa a 37°C/5% CO₂ sob agitação por 1 hora. Em seguida, as células foram lavadas em solução salina estéril (PBS: 8 g/L NaCl; 0,2 g/L KCl; 1,44 g/L Na₂HPO₄; 0,24 g/L KH₂PO₄; pH 7,4), adicionado 5 mL de meio MEM com 2% de SFB e incubadas na estufa a 37°C/5% CO₂ até que 50% das células apresentassem efeito citopático (de 5 a 6 dias). Neste momento, o meio de cultivo contendo vírus é coletado, centrifugado em 5000 g por 5 min, coletado alíquotas de 50 µL em criotubos estéreis e, assim, estocados no freezer -80°C até o momento de uso.

A quantificação viral foi realizada por meio de contagem de plaques por PFU (unidade formadora de plaques) em placas de 24 poços. Após cultivar células Vero, estas foram ressuspensas utilizando tripsina e quantificadas com a câmara de Neubauer. A seguir, foram utilizadas 4x10⁵ células diluídas em meio MEM com 10% de SFB em um volume final de 500 µL por poço e estocadas em estufa a 37°C até o dia seguinte. Finalmente, a placa foi lavada duas vezes com PBS e adicionado o

vírus diluído em meio MEM incompleto em um volume total de 200 μ L em cada poço seguindo uma diluição seriada em duplicata, conforme mostra a **Figura 3**:

Após uma hora de infecção em estufa a 37°C sob agitação, as células foram lavadas com PBS e foi adicionado 500 μ L de meio CarboxiMetilCelulose (CMC diluído em MEM). Assim, a placa foi estocada em estufa a 37°C por 4 dias. Após este período, foi retirado o CMC dos poços, adicionado 500 μ L de formaldeído (10% em PBS) em cada poço, deixado no agitador por 15 min e retirado de cada poço, para mais uma etapa de aplicação de formaldeído por mais 15 min. Assim, foi retirado o formaldeído, adicionado 3 gotas do corante cristal violeta e deixado no agitador por mais 15 min. Finalmente, os poços foram lavados com água corrente e, assim, prontos para serem analisados.

O estoque do ZIKVBR foi produzido com o mesmo protocolo descrito acima, porém em célula C6/36, sendo a única diferença a utilização do meio L-15 como meio de cultivo celular ao invés do MEM. A quantificação do ZIKVBR foi realizada em Vero, exatamente como descrito acima.

4.2 Desenvolvimento da vacina inativada

Foram preparados 10 eppendorfs com 10⁵ PFU (unidade formadora de plaques) de ZIKVBR diluído em meio MEM incompleto e 0,05% de formaldeído, com um volume final de 1 mL cada, e estocados na geladeira a 4°C até seu respectivo tempo de inativação, sendo posteriormente estocado em freezer -80°C. Cada eppendorf corresponde a determinado tempo de inativação, variando de 0 a 9 dias de inativação. Paralelamente, foram preparados mais 10 eppendorfs com 10⁵ PFU

de ZIKVBR “controle” diluído em meio MEM incompleto e 0,05% de PBS, com um volume final de 1 mL cada, e estocados na geladeira a 4°C, sendo coletados em conjunto com os eppendorfs descritos acima, em seus respectivos tempos.

Foi preparada uma placa de 24 poços contendo células Vero confluentes para a verificação da inativação do vírus. Nesta placa foram adicionados 100 µL de vírus inativado diluído em meio MEM incompleto, em um volume total de 200 µL, em 20 poços dos 24 totais, segundo seu respectivo tempo de inativação (**Figura 4**). Para o “Branco” foi adicionado apenas 200 µL de meio MEM incompleto, e para o “controle positivo” foi adicionado 50 µL do ZIKV infeccioso diluído em meio MEM incompleto para um total de 200 µL. Paralelamente, foi preparada outra placa para a análise da inativação das amostras controle seguindo o mesmo protocolo descrito acima, porém sem a adição de formaldeído (**Figura 4**). Depois de 1 hora de infecção a 37°C, o meio foi retirado e adicionado 500 µL de CMC em cada poço e, assim, a placa foi estocada na estufa a 37°C por 5 dias. Após esse período, foi realizada a fixação por formaldeído e revelação com cristal violeta conforme descrito no item 4.1.5.

Figura 4: Representação do ensaio de inativação do vírus Zika. Comparação de amostras de vírus inativados com 0,05% de formaldeído em diferentes tempos de inativação com amostras de vírus controle com 0,05% de PBS 1x nos mesmos tempos de estocagem.

Ao selecionar o período de incubação com a melhor eficiência de inativação, foi realizado 3 passagens cegas deste vírus inativado em células Vero e C6/36, conforme descrito no item 4.1.5. Após a terceira passagem, foi coletado o sobrenadante e realizado a quantificação viral por PFU, também descrito anteriormente.

Após a verificação do melhor tempo de incubação para a inativação viral, foi realizado um novo estoque de vírus de seguindo a metodologia descrita no item **4.1.5**, porém em uma garrafa de 75 cm². Deste estoque foi realizado a inativação seguindo proporcionalmente a metodologia descrita e determinada pelo experimento acima. Após isso, a amostra foi concentrada utilizando um concentrador (VivaSpin 20 de 100,000 MWCO, GE Healthcare). Assim, foram realizadas sucessivas centrifugações a 6000 *g* por 5 min, tendo como produto final o vírus inativado concentrado em um volume final de 5 mL. Após isso, o vírus inativado foi quantificado por método de Bradford em 595 nm (Bradford, 1976), na qual a curva padrão estava calibrada para a equação: $y = 27,782857142857x + 0,1438$ ($R^2 = 0,927$), e estocado em freezer -20°C até sua utilização. Uma alíquota do vírus inativado, concentrado, foi coletada para a quantificação de LPS pelo kit comercial Limulus Amoebocyte Lysate QCL-1000 (Lonza).

4.3 Clonagem da NS3 recombinante

4.3.1 Desenho de primers

A sequência codificante da NS3 do ZikaSPH2015 foi obtida a partir da sua sequência genômica, disponível no GeneBank (NCBI), sob o número de acesso KU321639.1 (CUNHA MS *et al*, 2016). O gene está localizado entre os nucleotídeos 4663 e 6471 do genoma viral, entre as proteínas NS2b e NS4a (**Figura 5A**). A região amplificada neste trabalho corresponde a um fragmento que engloba desde uma região final da NS2B (nucleotídeo 4534 do genoma viral) até uma região da NS3 após o sítio da helicase (nucleotídeo 6061), sendo, desta forma, amplificado um amplicom de 1527 pb, sendo 129 nucleotídeos da NS2B e 1398 nucleotídeos da NS3. Nesta sequência amplificada está contido os sítios codificantes do domínio da protease e helicase da NS3, sendo este último descrito como possível estimulador da imunidade celular (SIMMONS M *et al*, 2016) (**Figura 5B e 5C**). O genoma completo do vírus foi analisado a fim de selecionar primers específicos para amplificar apenas a região de interesse.

Figura 5: Localização do peptídeo recombinante de NS3 no genoma do vírus Zika e sequência de interesse. A) representação do genoma completo; B) localização dos primers escolhidos para a clonagem do fragmento de NS3; C) Sequência codificante da NS2b em azul e da NS3 em preto. Os locais de anelamento dos primers direto e reverso estão indicados em vermelho e verde, respectivamente.

C)

CCTAGCGAAGTACTCACAGCTGTTGGCCTGATATGCGCATTGGCTGGAGGGTTCCGCCAAGGCAGATATAGAGATGGCTG
GGCCCATGGCCGCGGTCTGGTCTGCTAATTGTCTAGTTACGTGGTCTCAGGAAAGAGTGTGGACATGTACATTGAAAGAGC
AGGTGACATCACATGGGAAAAAGATGCGGAAGTCACTGGAAACAGTCCCCGGCTCGATGTGGCGCTAGATGAGAGTGG
TGATTTCTCCCTGGTGGAGGATGACGGTCCCCCATGAGAGAGATCATACTCAAGGTGGTCTGATGACCATCTGTGGC
ATGAACCCCAATAGCCATACCCCTTTGCAGCTGGAGCGTGGTACGTATACGTGAAGACTGGAAAAAGGAGTGGTGTCTAT
GGGATGTGCTGCTCCCAAGGAAGTAAAAAGGGGGGAGACCCACAGATGGAGTGTACAGAGTAATGACTCGTAGACTGC
TAGGTTCAACACAAGTTGGAGTGGGAGTTATGCAAGAGGGGGTCTTTCACACTATGTGGCACGTACAAAAGGATCCGC
GCTGAGAAGCGGTGAAGGGGAGACTTGATCCATACTGGGGAGATGTCAAGCAGGATCTGGTGTCTACTGTGGTCCATGG
AAGCTAGATGCCGCTGGGACGGGCACAGCGAGGTGCAGCTCTGGCCGTGCCCCCGGAGAGAGAGCGAGGAACAT
CCAGACTCTGCCCGGAATATTTAAGACAAAGGATGGGGACATTGGAGCGGTTGCGCTGGATTACCCAGCAGGAACCTCA
GGATCTCCAATCCTAGACAAGTGTGGGAGAGTGATAGGACTTTATGGCAATGGGGTCTGTGATCAAAAATGGGAGTTATG
TTAGTGCCATCACCAAGGGAGGAGGGAGGAAGAGACTCCTGTTGAGTGTCTCGAGCCTTCGATGCTGAAGAAGAAGC
AGCTAACTGTCTTAGACTTGCATCCTGGAGCTGGGAAAAACCAGGAGAGTTCCTCTGAAATAGTCCGTGAAGCCATAAA
AACAAGACTCCGTACTGTGATCTTAGCTTACCTCAACCAAGGTTGTCTGCTGCTGAAATGGAGGAAGCCCTTAGAGGGCTTCCA
GTGCGTTATATGACAACAGCAGTCAATGTCACCCACTCTGGAACAGAAATCGTCGACTTAATGTGCCATGCCACCTTCAC
TTCACGTCTACTACAGCCAATCAGAGTCCCCAACTATAATCTGTATATTATGGATGAGGCCCACTTCACAGATCCCTCAA
GTATAGCAGCAAGAGGATACATTTCAACAAGGGTTGAGATGGGCGAGGCGGCTGCCATCTTCATGACCGCCACGCCAC
CAGGAACCCGTGACGCATTTCCGGACTCCAACCTACCAATTATGGACACCGAAGTGAAGTCCAGAGAGAGCGCTGGA
GCTCAGGCTTTGATTGGGTGACGGATTATCTGGAACCAAGTGGTGGTTGTTTCCAAGCGTGAGGAACGGCAATGAGATC
GCAGCTTGTCTGACAAAGGCTGGAAACGGGTGCATACAGCTCAGCAGAAAGACTTTTGAGACAGAGTTCAGAAAAACAA
AACATCAAGAGTGGGACTTTGTCGTGACAACCTGACATTTAGAGATGGGCGCCAACCTTAAAGCTGACCGTGTCTAGAT
TCCAGAGATGCCTAAAGCCGCTACACTTGTGATGGCGAGAGAGTCACTTGGCTGGACCTGTGACAGGCTTCCA
GCGCTGCCAGAGGAGGGGGCGCATAGGCAGGAATCCCAACAAACCTGGAGATGAGTATCTGTATGGAGGTGGGTGC
GCAGAGACTGACGAAGACCATGCACACTGGCTTGAAGCAAGAATGCTCCTTGACAATATTTACCTCCAAGATGGCCTCA
TAGCCTCGCTCTATCGACCTGAGGCCGACAAAGTAGCAGCCATTGAGGGAGAGTTCAAGCTTAGGACGGAGCAAAGGA
AGACCTTTGTGGAACCTCATGAAAAGAGGAGATCTTCCTGTTTGGCTGGCCTATCAGGTTGCATCTGCCGGAATAACCTAC
ACAGATAGAAGATGGTGTCTTGTATGGCAGCAGCAACAACACCATAATGGAAGACAGTGTGCCGGCAGAGGTGTGGACC
AGACACGGAGAGAAAAAGAGTGTCAAACCGAGGTGGATGGACGCCAGAGTTTGTTCAGATCATGCGGCCCTGAAGTCA
TTCAAGGAGTTTCCGCTGGGAAAAAGAGGAGCGGCT

Esta sequência foi analisada pelo software GeneRunner e pDRAW a fim de se escolher os sítios de restrição a serem utilizados na clonagem utilizando o vetor de expressão pET-26b (**Figura 6**). Este vetor foi escolhido pela facilidade de purificação do produto recombinante, uma vez que nele contém uma cauda de histidina na região de policlonagem, além da sequência pelB leader, o qual codifica um peptídeo sinal para que a proteína ligada a este seja secretada para o periplasma bacteriano. As enzimas de restrição escolhidas para a clonagem foram

baseadas na sequência dos sítios de policlonagem do plasmídeo, e que estavam ausentes na sequência codificante da NS3.

Figura 6: Vetor de clonagem pET-26b. (A): Mapa circular, incluindo os pontos de referências das sequências; (B): Região de clonagem e expressão detalhada.

Fonte – Manual do pET-26b(+) – <http://www.synthesigene.com/vector/pet-26b.pdf>
– último acesso em 22 de junho de 2018

Após análises nos softwares e no mapa do vetor pET-26b (**Figura 6b**), definiu-se a utilização das enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI*. Os primers Direto e Reverso foram, devido a isso, desenhados com os sítios de restrição escolhidos, conforme mostra a **Tabela 1**. A ferramenta PrimerQuest (IDT DNA Technology – disponível em <https://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>) foi utilizada para o desenho dos primers.

Com o auxílio da ferramenta OligoAnalyser (IDT DNA Technology), foi possível analisar os primers desenhados quanto sua tendência de formação de Hairpins e dímeros a partir de parâmetros termodinâmicos (dG – Energia livre de Gibbs). Valores negativos de dG apontam a tendência de ocorrerem reações

espontâneas de formação de hairpins e dímeros, podendo causar baixa eficiência na PCR.

Tabela 1: Sequências dos primers desenhados para amplificação da NS3 do vírus Zika.

Primer	Sequência 5' → 3'	Tamanho (numero de bases)	Conteúdo de GC (%)	Temperatura de <i>Melting</i> (°C)
Direto	<u>GAATTC</u> ACCATCTGTGGCATGAAC	25	48	58,3
Reverso	CTCGAG <u>GTCTTC</u> GTCACTCTCTGC	24	58,3	60,5

As bases sublinhadas correspondem aos nucleotídeos da própria sequência de interesse. As bases em azul correspondem aos nucleotídeos pertencentes ao sítio de restrição utilizado. As bases em amarelo correspondem a adições de nucleotídeos para corrigir o frame de leitura da proteína a ser sintetizada.

Os primers foram diluídos em água ultrapura autoclavada, para a preparação de solução estoque em concentração final de 100 µM. A partir desta, foi preparada uma solução de trabalho com concentração final de 10 µM, utilizando água ultrapura autoclavada. Ambas as soluções foram armazenadas a -20° C até sua utilização.

4.3.2 Gradiente da Temperatura de Anelamento - PCR e eletroforese em gel de agarose

A partir do estoque viral, foi extraído o RNA viral por meio do kit de extração de RNA (Qiagen). A partir dele foi realizada a primeira amplificação da sequência de interesse a fim de determinar a melhor temperatura de anelamento dos primers para a polimerização no restante do trabalho. Assim, foram conduzidas 6 reações utilizando o One-Step RT-PCR realizando um gradiente de temperatura de anelamento (50, 52.5, 55, 57.5, 60 e 62.5 °C) no termociclador (Veriti Thermal Cycler, Applied Biosystems). Após a RT-PCR, alíquotas foram submetidas a uma eletroforese em gel de agarose 1% (em tampão TAE 1x). A corrida foi realizada por 45 min em voltagem constante de 80 V.

4.3.3 Subclonagem em pTZ57R/T

Após se determinar a melhor temperatura de anelamento, foram realizadas novas reações de PCR, utilizando a temperatura de 57,5°C na etapa de anelamento, a fim de amplificar a sequência codificante da NS3 em maior quantidade. As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%, como descrito acima.

A banda correspondente à sequência codificante da NS3 amplificada foi recortada do gel e purificada com o kit comercial da *Macherey-Nagel* (*NucleoSpin Gel and PCR Clean-up*). A amostra purificada foi quantificada em Nanodrop (2000) e armazenada a -20°C.

O produto de RT-PCR purificado foi ligado ao plasmídeo pTZ57R/T seguindo o protocolo do kit *InsTAclone PCR Cloning Kit* (*Thermo Fisher Scientific*) e utilizado para a transformação de *E. coli* XL10 Gold competente.

4.3.4 Transformação da construção pTZ_NS3 em *E. coli* XL10 Gold

A um dos tubos de 200 µL de *E. coli* XL10 Gold competente foi adicionado 10 µL da reação de ligação (construção pTZ_NS3) e o tubo foi imediatamente transferido para um recipiente com gelo por 30 min. Em seguida, o tubo foi colocado em banho-maria a 42°C por 90 segundos e imediatamente transferido para um recipiente com gelo por 2 minutos. Foram adicionados 800 µL de meio SOC (*Thermo Fisher Scientific*) e as células foram incubadas por 45 min em estufa a 37°C. As células transformadas foram plaqueadas em meio LB ágar com 0,1% de ampicilina (100 mg/mL), Xgal e IPTG. Por fim, as placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 16 horas.

4.3.5 Clonagem em pET-26b

A partir das placas contendo *E. coli* XL10 Gold transformadas com a construção pTZ_NS3, foram selecionadas 3 colônias brancas para a realização da PCR de colônia utilizando o kit *Taq PCR Master Mix* (Qiagen), a fim de verificar a presença do inserto. Os produtos das reações de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%.

Uma das colônias que apresentou amplificação na PCR foi ressuspensa em 5 mL de meio LB com 0,1% de ampicilina (100 mg/mL) e incubada a 37°C, 150 rpm *overnight*. Em seguida, foi realizada a extração plasmidial de uma alíquota de 5 mL da cultura com o kit comercial *NucleoSpin Plasmid* (*Macherey-Nagel*). O plasmídeo foi quantificado em espectrofotômetro (*Nanodrop 2000*)

O plasmídeo pTZ_NS3 extraído e o vetor de expressão pET-26b foram submetidos à digestão com 1 µL de cada uma das enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI* (*New England Biolabs*) por 90 minutos a uma temperatura de 37°C.

Após a digestão, as duas amostras foram colocadas em banho-maria a 65°C por 20 min a fim de desativar as enzimas de restrição. As amostras digeridas foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%. As bandas correspondentes às sequências lineares do pET-26b e NS3 foram recortadas do gel e purificadas com o kit comercial da *Macherey-Nagel* (*NucleoSpin Gel and PCR Clean-up*). As amostras purificadas foram quantificadas em *Nanodrop*.

Com o auxílio da ferramenta *NEBio Calculator* (*New England Biolabs* – disponível em <http://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>) e baseando-se na proporção 3 para 1 (inserto:vetor), foram preparados 20 µL de reação de ligação, segundo o protocolo do kit comercial de ligação da T4 DNA ligase (*Fermentas*), e foi incubada em temperatura ambiente por 1 hora. Após o término deste tempo de ligação, a solução contendo a construção pET26b_NS3 foi colocada na geladeira a 4°C até o momento da transformação.

4.3.6 Transformação da construção pET26b_NS3 em *E. coli* Rosetta

A um dos tubos de 200 µL de *E. coli* BL21 (DE3) competente foi adicionado 10 µL da reação de ligação (construção pET26b_NS3) e o tubo foi imediatamente transferido para um recipiente com gelo por 30 min. Em seguida, o tubo foi colocado em banho-maria a 42°C por 90 segundos e imediatamente transferido para um recipiente com gelo por 2 minutos. Foram adicionados 800 µL de meio SOC e as células foram incubadas por 45 min em estufa a 37°C. As células bacterianas transformadas foram plaqueadas em meio LB ágar com 0,1% de canamicina (50 mg/mL). Por fim, as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 16 horas.

A partir das placas contendo *E. coli* Rosetta transformadas com a construção pET26b_NS3, foram selecionadas 6 colônias para a realização da PCR de colônia, conforme descrito no item **4.3.5**. Uma das colônias, cujo resultado deu positivo, foi cultivada em 5 mL meio LB líquido contendo 0,1% de canamicina, *overnight*, em shaker a 37°C e 150 RPM. Após este período foi realizada extração plasmidial, conforme descrito no item **4.3.5**, na qual uma alíquota foi utilizado para sequenciamento utilizando primers específicos do plasmídeo pET26b (primers que se ligam na região promotora e finalizadora T7), o restante foi armazenado em freezer -20°C até futuras utilizações.

4.4 Expressão e purificação da NS3 recombinante

4.4.1 Expressão e purificação

Para a expressão de NS3 recombinante, uma colônia da transformação da *E. coli Rosetta* com a construção pET26b_NS3 foi inoculada em 10 mL de meio LB contendo 50 µg/mL de canamicina e incubada por *overnight* a 37°C e 250 rpm. Uma alíquota de 1 mL foi transferida para 500 mL de meio de cultura em um Erlenmeyer de 2000 mL e foi incubada nas mesmas condições até que a cultura atingisse densidade óptica (DO_{600nm}) de 0,7. Neste momento, foi retirada uma alíquota de 1 mL (chamada de T₀ - tempo zero) para análise, por SDS-PAGE e *Western Blot*, das proteínas totais da célula cultivada antes da indução. Em seguida adicionou-se IPTG em concentração final de 0,5 mM para induzir a expressão da proteína recombinante, e o cultivo foi incubado novamente a 37°C e 250 rpm por mais 4 horas. Ao final de cada hora de incubação, foi retirada nova alíquota, até completar 4 horas (T₁, T₂, T₃ e T₄), para análise por SDS-PAGE e *Western Blot*.

Em paralelo foram feitos outros dois cultivos nas mesmas condições, porém um com células não transformadas (em meio sem antibiótico), e outro com células transformadas apenas com o pET26b (em meio com antibiótico), para avaliar a expressão das proteínas destas células em comparação com a linhagem recombinante.

Para avaliar a solubilidade e a localização da proteína NS3 produzida, o cultivo induzido foi centrifugado a 10000 g por 10 min e o sobrenadante foi estocado e uma alíquota de 1 mL (intitulado como “meio”) foi retirada para a análise em SDS-PAGE e *Western Blot*. A primeira etapa foi verificar se a proteína estava localizada no periplasma, assim as células foram ressuspendidas em 100 mL de tampão de solubilização (30 mM Tris-HCl, pH 8,0, 20% Sacarose) e incubados em temperatura ambiente por 10 min em plataforma agitadora. As bactérias foram centrifugadas a 10000 g, 4°C por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi ressuspenso em 100 mL de solução gelada de MgSO₄ (5 mM), incubado em gelo com rotação lenta por 10 min e centrifugado a 10000 g, 4°C por 10 minutos. O sobrenadante contendo as proteínas do periplasma foi armazenado em freezer -20°C. O *pellet* contendo as proteínas citoplasmáticas foi ressuspendido em 100 mL de tampão de solubilização gelado (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, NaH₂PO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, Triton X-100 0,05%, pH 7,4), e em seguida foram lisadas com 5 pulsos de sonicação de 1 minuto com 30 segundos de intervalo entre cada pulso

(Sonic Dismembrator Model 100, Fisher Scientific, nível de sonicação 7). Foram adicionados ao produto da sonicação 500 µL de PMSF (*phenylmethylsulfonyl fluoride*; 100 mM) e foi feita centrifugação a 10000 g, 4°C por 20 minutos. O sobrenadante, contendo a fração de proteínas solúveis das células, foi separado para análise por SDS-PAGE e *Western Blot* e armazenado a -20 °C.

O precipitado foi ressuspenso em 100 mL de tampão de lavagem de corpo de inclusão (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, NaH₂PO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, Triton X-100 0,05%, uréia 1M, pH 8,4), incubado no gelo em rotação por 20 min e centriugado a 10000 g, 4°C por 20 minutos; foi aliqotado 1 mL do sobrenadante para análise por SDS-Page e *Western Blot*. O precipitado foi ressuspenso em 100 mL de tampão de solubilização gelado contendo uréia (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, NaH₂PO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, uréia 6M, pH 8,4) e uma alíquota foi retirada para análise da fração das proteínas insolúveis por SDS-PAGE e *Western Blot*. Após 12 horas de solubilização a 4°C, foi feita centrifugação a 10000 g, 4°C por 20 minutos para a separação das proteínas solúveis e insolúveis em uréia. O sobrenadante contendo as proteínas solúveis em uréia foram armazenados a -20 °C, e o *pellet*, contendo as proteínas insolúveis em uréia, foi ressuspendido em 100 mL de tampão de solubilização gelado contendo uréia e armazenado a -20 °C. Ambos foram coletados alíquotas de 1 mL para análise por SDS-Page e *Western Blot*.

4.4.2 Ensaio cromatográfico

A NS3 recombinante, a qual contém em sua porção C-terminal uma cauda de histidina, foi purificada por cromatografia de afinidade utilizando uma coluna de íons Ni²⁺ comercial (*HisTrap milipore*) de 5 mL de volume de coluna. Para o processo de purificação, a coluna foi lavada com 10 volumes de coluna com água ultrapura e, então, com 10 volumes de coluna com tampão de ligação (**Tabela 2**). Após isso, foi passado pela coluna 100 mL das proteínas solúveis em uréia (item **4.4.1**), sendo coletadas em tubos *Falcon* de 50 mL as proteínas que passavam pela coluna para análise por SDS-PAGE e *Western Blot*. Depois, a coluna foi lavada com 10 volumes de coluna de tampão de lavagem (**Tabela 2**), sendo também coletada para análise por SDS-PAGE e *Western Blot*. Após isso, foi feita eluição com 10 volumes de coluna com tampão de eluição (**Tabela 2**), sendo que as amostras coletadas nesta etapa foram colocadas em um tubo *Falcon* de 50 mL para a realização da diálise, uma alíquota foi retirada para futura análise por SDS-PAGE e *Western Blot* (Sambrook et al. 2001).

Tabela 2: Tampões para a purificação da NS3 por cromatografia de afinidade em coluna de Ni²⁺

Reagentes	Tampão de Ligação	Tampão de Lavagem	Tampão de Eluição
NaH ₂ PO ₄	20 mM	20 mM	20 mM
NaCl	500 mM	500 mM	500 mM
Uréia	6 M	6 M	6 M
pH	8,4	8.4	8.4
Imidazol	40 mM	40 mM	500 mM

Após ser purificada e analisada por SDS-PAGE e *Western Blot*, a amostra eluída, que continha NS3 recombinante pura, foi dialisada com a membrana de diálise com poros de 14 kDa de *cut-off* (*Dialysis tubing cellulose membrane*, D9527-100FT, *Sigma-Aldrich*) em sucessivas trocas de tampões com diminuição gradativa de 6 M até 1 M de uréia em agitação constante, sendo cada troca de tampão realizada a cada 1 hora. A última troca, de 1 M para ausência de uréia (apenas PBS), foi realizado *overnight*. Após a diálise, as proteínas foram centrifugadas a 10000 g por 20 min, e o sobrenadante foi transferido para um concentrador (VivaSpin 20 de 10,000 MWCO, GE Healthcare) e foram realizadas sucessivas centrifugações a 6000 g por 5 min, tendo como produto final a NS3 recombinante concentrada em um volume final de 10 mL. Após isso, a NS3 foi quantificada pelo método de Bradford em 595 nm (Bradford, 1976), na qual a curva padrão estava calibrada para a equação: $y = 27,782857142857x + 0,1438$ ($R^2 = 0,927$), e estocada em freezer -20°C até sua utilização. Uma alíquota da NS3 recombinante, pura e concentrada, foi coletada para a quantificação de LPS pelo kit comercial Limulus Amoebocyte Lysate QCL-1000 (Lonza)

4.4.3 SDS-Page e *Western Blot*

Para a análise da localização das proteínas e a pureza da purificação, primeiramente foi realizado um SDS-PAGE com gel de poliacrilamida 12% contendo amostras de cada etapa da expressão e purificação conforme descrito no item 4.4.1 e 4.4.2. Primeiramente, foi adicionado a solução corante de β-mercaptoetanol 5x em cada amostra (proporção: 4 de amostra para 1 do corante), depois as amostras foram aquecidas a 100°C por 10 min. Após isso, foram aplicadas da mesma forma em dois géis idênticos, um para a realização do SDS-PAGE e outro para o *Western*

Blot. A corrida foi realizada por 2 horas e meia com voltagem constante de 90 V (PS300-B, *Hoefler*).

Após a corrida, um dos géis foi utilizado para o SDS-PAGE, o qual foi colocado em um recipiente contendo o corante *Coomassie* e incubado por 10 min em temperatura ambiente com rotação constante. Após isso, o gel foi lavado com água *MiliQ* e adicionado ácido acético 20% para a retirada do *Coomassie*. Após alguns minutos já era possível analisar o gel.

O outro gel, idêntico ao primeiro, foi utilizado para a análise por *Western Blot*. Assim, para passar as proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose foi realizada uma transferência por meio de uma corrente constante de 300 mA por 1 hora (PS300-B, *Hoefler*). Após a transferência, a membrana foi colocada em um recipiente e foi adicionada 20 mL da solução de Ponceau 0,1% (m/v), a fim de verificar o sucesso da transferência. Após isso, foi adicionado tampão de bloqueio (PBS com a adição de 0,05% de Tween 20 e 5% de leite em pó) e incubado *overnight* sob rotação constante. No dia seguinte, a membrana foi lavada 3 vezes com PBST (PBS com a adição de 0,05% de Tween 20), por 15 minutos cada lavagem. Após isso, foi adicionado 0,5 µL de anticorpo anti-HisTag, diluído em 25 mL em tampão PBST com 5% de leite em pó, e incubado por 1 hora. As membranas foram novamente lavadas 3 vezes com tampão PBST, por 15 minutos cada lavagem, e colocadas em um novo recipiente contendo anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase, diluído 1 µL do anticorpo em 25 mL de tampão PBST com 5% de leite em pó. Por fim, foi adicionado 1 mL de *Clarify Western ECL Substrate* (*Bio-Rad*) e a membrana foi incubada em temperatura ambiente por 30 segundos. As membranas foram analisadas no leitor: *ImageQuant LAS 500* (*GE Healthcare*).

4.5 Teste de citotoxicidade celular: Linfócitos X NS3 recombinante

A linhagem celular de linfócitos A301 foi cultivada em meio RPMI com 1% de penicilina/estreptomicina e 10% de SFB. Utilizando o TC20 *Automated Cell Counter* (*Bio-Rad*), 10⁵ células foram transferidas para cada um dos poços de uma placa de 48 poços e completado para 500 µL de meio RPMI 2% de SFB. No dia seguinte, foi adicionado 10 diferentes concentrações de NS3 recombinante em seus respectivos poços (0,2 µg/mL, 0,4 µg/mL, 0,6 µg/mL, 0,8 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL, 4 µg/mL, 6 µg/mL, 10 µg/mL e 15 µg/mL, completados para 500 µL em meio RPMI com 2% de SFB), um controle negativo (500 µL de meio RPMI com 2% de SFB) e controle

positivo (adição de 50 µL de água oxigenada em 450 µL de meio RPMI com 2% de SFB) e incubado por 48 horas em estufa a 37°C.

Após 48 horas, 50 µL de solução MTT (0,005 g/mL de MTT em PBS) foi adicionada em cada um dos poços e incubada por 4 horas em estufa a 37°C. Após isso, as células foram centrifugadas a 400 g por 5 min, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 200 µL da solução de isopropanol acidificado com HCl (0,4% de HCl em isopropanol). As células foram incubadas em temperatura ambiente por 30 min, transferidas para uma placa de 96 poços e realizado a leitura pelo comprimento de onda 570 nm utilizando o leitor de placas *Multiscan Ascent (Labsystems)*.

4.6 Vacinação

4.6.1 Padronização e determinação da dose letal

O vírus ZikaSPH2015 foi testado no modelo animal A129 (*knockout* para o receptor de IFN do tipo 1, chamado também de “IFNaR KO”) a fim de verificar se este vírus é capaz de infectar e causar danos a estes animais. Foi inoculado 10^6 , 10^4 , 10^2 PFU do ZikaSPH2015, e o mock, em 3 camundongos A129 por grupo. Desta forma, eles foram acompanhados por 15 dias após a inoculação a fim de avaliar a perda de peso e sobrevivência.

Adicionalmente, foram inoculadas 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 e 10^0 PFUs da cepa infecciosa ZIKVBR e o mock (meio de cultivo celular na ausência de vírus) em 6 camundongos A129 de 7 semanas de vida por grupo. Paralelamente, foi inoculado 10^6 , 10^4 , 10^2 PFU do ZIKVBR, e o mock, em 3 camundongos 129 Sv/Ev (*wild type*) por grupo. Da mesma forma, eles foram acompanhados por 15 dias após a inoculação a fim de avaliar a perda de peso e sobrevivência.

4.6.2 Imunização e desafio

Foram utilizados 6 grupos de 6 camundongos da linhagem A129 com 4 semanas de vida para a imunização intraperitoneal da solução vacinal. O grupo 1 foi utilizado como controle, composto por animais não imunizados, sendo inoculado apenas 0,12 mL de meio MEM, contendo 0,1% de hidróxido de alumínio e 3,36 UE (unidades de endotoxina) de LPS. O grupo 2 foi composto por animais imunizados com 100 µg de partículas virais inativadas em um volume total de 0,12 mL em meio com 0,1% de hidróxido de alumínio e 3,36 UE de LPS. O grupo 3 foi composto por

animais imunizados com 20 µg do NS3 recombinante em um volume total de 0,12 mL em meio com 0,1% de hidróxido de alumínio. O grupo 4 foi composto por animais imunizados com 100 µg de partículas virais inativadas e 20 µg do NS3 recombinante em um volume total de 0,12 mL em meio com 0,1% de hidróxido de alumínio. O grupo 5 foi composto por animais imunizados com 80 µg do NS3 recombinante em um volume total de 0,12 mL em meio com 0,1% de hidróxido de alumínio. O grupo 6 foi composto por animais imunizados com 100 µg de partículas virais inativadas e 80 µg do NS3 recombinante em um volume total de 0,12 mL em meio com 0,1% de hidróxido de alumínio (**Tabela 3**).

A imunização foi realizada nos dias 0 e 14, segundo a imunização programada para cada grupo. No 21º dia, os camundongos A129 foram desafiados com 10⁴ PFU do ZIKVBR selvagem, sendo verificado diariamente o peso e sobrevivência dos animais até 21 dias após a inoculação do vírus (**Figura 7**).

Tabela 3: Ensaio de imunização dos camundongos A129. Cada grupo possuía 6 camundongos de 4 semanas de vida no momento da primeira dose.

Grupo	Vírus Inativado (µg)	Hidróxido de alumínio (%)	NS3 (µg)	LPS (UE)	Meio MEM	Volume total (mL)
1	-	0,1	-	3,36	Q.S.P	0,12
2	100	0,1	-	3,36	Q.S.P	0,12
3	-	0,1	20	-	Q.S.P	0,12
4	100	0,1	20	-	Q.S.P	0,12
5	-	0,1	80	-	Q.S.P	0,12
6	100	0,1	80	-	Q.S.P	0,12

Legenda: UE = Unidade de endotoxina

Figura 7: Metodologia da vacinação e desafio. Os camundongos A129 foram vacinados em duas doses (no dia 0 e 14) e desafiado no dia 21. Após o desafio, foi verificado o peso e sobrevivência dos camundongos até 21 dias após a aplicação do ZIKVBR selvagem.

4.7 Análises sorológicas e imunológicas

4.7.1 Preparo das amostras

Foram utilizados 5 grupos de 5 camundongos da linhagem A129 com 4 semanas de vida para a imunização intraperitoneal da solução vacinal. O grupo 1 foi utilizado como controle, composto por animais não imunizados, sendo inoculado apenas 0,12 mL de mock, contendo 0,1% de hidróxido de alumínio e 3,36 UE de LPS. O grupo 2 foi composto por animais imunizados com 100 µg de partículas virais inativadas em um volume total de 0,12 mL em meio com 0,1% de hidróxido de alumínio e 3,36 UE de LPS. O grupo 3 foi composto por animais imunizados com 80 µg do NS3 recombinante em um volume total de 0,12 mL em meio com 0,1% de hidróxido de alumínio. O grupo 4 foi composto por animais imunizados com 100 µg de partículas virais inativadas e 80 µg do NS3 recombinante em um volume total de 0,12 mL em meio com 0,1% de hidróxido de alumínio. O grupo 5 foi composto por animais infectados por uma única dose de 10^4 PFU da cepa ZikaSPH2015 selvagem no dia 0 (**Tabela 4**). Os tempos de vacinação dos grupos de 1 a 4 ocorreram conforme descrito no item 4.6.2.

Tabela 4: Ensaio de imunização dos camundongos A129 e 129 Sv/Ev para a análise imunológica. Cada grupo possuía 5 camundongos de 4 semanas de vida no momento da primeira dose.

Grupo	Vírus vivo infeccioso (PFU)	Vírus Inativado (µg)	Hidróxido de alumínio (%)	NS3 (µg)	LPS (UE)	Meio MEM	Volume total (mL)
1	-	-	0,1	-	3,36	Q.S.P	0,12
2	-	100	0,1	-	3,36	Q.S.P	0,12
3	-		0,1	80		Q.S.P	0,12
4	-	100	0,1	80		Q.S.P	0,12
5	10^4	-	0,1	-	3,36	Q.S.P	0,12

Paralelamente foram imunizados 5 grupos de 5 camundongos 129 Sv/Ev, sendo os 4 primeiros grupos conforme descrito acima (**Tabela 4**). Entretanto, no grupo 5 foi inoculado uma única dose de 10^4 PFU do ZIKVBR infeccioso no dia 0. Os tempos de vacinação dos grupos de 1 a 4 ocorreram conforme descrito no item 4.6.2.

No 21º dia após a primeira dose da imunização dos camundongos, 800 µL de sangue total foi coletado, na presença de 20 µL EDTA (100 mM) como agente anticoagulante, e centrifugado a 3000 g por 5 min. O plasma foi coletado e armazenado em freezer -20°C para futuras análises sorológicas, como verificação

de anticorpos específicos por Imunofluorescência, e anticorpos neutralizantes por PRNT (**Figura 8**). Paralelamente o baço dos camundongos foram coletados e armazenados em meio RPMI incompleto até seu processamento e utilização na citometria de fluxo (**Figura 8**).

Figura 8: Metodologia de vacinação e análise da resposta imunológica. Os camundongos A129 e 129 Sv/Ev foram vacinados em duas doses (no dia 0 e 14). No 21º dia foi coletado o sangue total e o baço para as análises sorológicas e imunológicas.

4.7.2 Imunofluorescência

Células Vero foram cultivadas e plaqueadas 2×10^5 células em 2 poços de uma placa de 46 poços. No dia seguinte, ao atingir 90% de confluência, um dos poços foi infectado com ZIKVBR com MOI de 1, diluído em meio MEM incompleto, em um volume final de 100 μ L, o outro poço foi tratado como MOCK, sem a presença de vírus, porém nas mesmas condições. O período de adsorção viral ocorreu por 1 hora sob agitação e temperatura ambiente, sendo então adicionado meio MEM 2% completando o volume de 300 μ L. Após 24 horas da infecção, as células foram lavadas 3 vezes com PBS, foi adicionado 100 μ L de tripsina em cada poço; a placa foi incubada por 40 segundos em estufa a 37°C, adicionado 100 μ L de MEM com 10% de SFB, para neutralizar o efeito da tripsina sobre as células, e colocadas em seus respectivos eppendorfs. Após isso, foi adicionado 400 μ L de PBS em cada eppendorf, estes foram centrifugados a 200 g por 5 minutos, descartado o sobrenadante e as células foram ressuspensas em 300 μ L de PBS. Foi novamente centrifugado a 200 g por 5 minutos, descartado o sobrenadante e as células ressuspensas em 600 μ L de PBS. Assim, foi adicionado 20 μ L de células infectadas em cada um dos poços de uma lamínula de imunofluorescência, realizando o mesmo procedimento com as células não infectadas em outra lamínula. As lamínulas foram incubadas em temperatura ambiente até secar e, após totalmente secas, foram incubadas em um recipiente contendo acetona gelada e

deixadas no freezer -20°C por 25 minutos. Assim, as lâminulas foram incubadas em temperatura ambiente até secar.

Foi adicionado 20 µL de cada pool de plasma (coletados conforme especificado no item 4.7.1) diluído 1:100 em PBS, em seus respectivos poços, conforme mostra a **Figura 9**. Nos poços denominados “Ctrl1” e “Ctrl2” foram adicionados 20 µL de PBS e 20 µL do pool de plasma dos animais infectados com o ZIKV selvagem, respectivamente. Após isso, as lâminulas foram incubadas por 30 minutos em estufa úmida à 37°C, lavadas 5x com PBS, sob agitação manual, e incubada em temperatura ambiente até secar.

Figura 9: Representação da imunofluorescência feita com o pool de amostras de plasma dos camundongos 129 Sv/Ev (WT) e A129 (KO). Foram preparadas duas lâminulas: A) com células VERO infectadas com o ZIKVBR (Infect); e B) com células VERO não infectadas (N Infect). O pool de amostras foi adicionado em seus respectivos poços.

Legenda: C- = animais imunizados apenas com o mock (Grupo 1), NS3 = animais imunizados apenas com NS3 (Grupo 3), Inat = animais imunizados apenas com o vírus inativado (grupo 2), N+I = animais imunizados com NS3 e vírus inativado (Grupo 4), e ZIK = animais infectados com ZIKV selvagem (Grupo 5). O poço denominado Ctrl1 representa o controle experimental na ausência do anticorpo primário, já o Ctrl2 representa o controle experimental na ausência do anticorpo secundário e as marcações com Azul de Evans e DAPI. (ver TABELA 4)

Foi preparada uma solução contendo Azul de Evans (diluída 1:20000 em PBS) e, a partir desta solução, foi preparada uma solução contendo DAPI (diluição de 1:40). Finalmente, a partir destas duas soluções, foi preparado a solução final contendo DAPI (diluição 1:80), Azul de Evans (diluição 1:20000) e anticorpo anti-mouse marcado com FITC (diluição 1:100). Desta solução final, foi utilizado 20 µL em cada poço, exceto no poço denominado “Ctrl2”, onde foi adicionado 20 µL de PBS. As lâminulas foram incubadas em estufa úmida a 37°C por 30 minutos, lavadas 5x com PBS, sob agitação manual, e incubada em temperatura ambiente

até secar. Foi adicionado 10 µL de glicerol 10% em cada poço e tampado com a lamínula para a análise em microscópio óptico.

4.7.3 ELISA

Cada um dos poços de uma placa de 96 poços foi sensibilizada com 10^3 PFU de ZIKVBR diluída em tampão carbonato (1,59 g/L de Na_2CO_3 ; 2,93 g/L de NaHCO_3 ; pH 9,5) em um volume final de 100 µL. Como controle experimental, os poços intitulados “Branco” foram sensibilizados com tampão carbonato. A placa foi incubada *overnight* na geladeira a 4°C.

A placa foi lavada 3 vezes com PBST e incubada com tampão de bloqueio (5% de leite em pó em PBST) por 1 hora a 37 °C. A placa foi novamente lavada 3x com PBST, aplicado em cada poço 100 µL dos plasmas dos animais imunizados em uma diluição 1:250 em PBST com 2% de leite em pó, conforme ilustra a **Figura 10**, e incubado por 1 hora à 37°C. Para os poços intitulados “Branco”, os quais não houve sensibilização com proteínas virais, foram preparados *pools* com as amostras dos plasmas dos camundongos imunizados, sendo um *pool* para cada grupo de imunização; desta forma, foi utilizado 100 µL do *pool* de plasma preparado em uma diluição 1:250 em PBST com 2% de leite em pó. Nos poços intitulados S/P, não foi utilizado anticorpo primário, ao invés disso foi adicionado apenas 100 µL de PBST em 2% de leite em pó. Nos poços intitulados S/S foi utilizado, como anticorpo primário, um pool das amostras de plasma dos camundongos infectados com o ZIKV selvagem, sendo utilizado 100 µL do *pool* de plasma preparado em uma diluição 1:250 em PBST com 2% de leite em pó. A placa foi novamente lavada 3x com PBST e adicionado 100 µL do anticorpo secundário anti-mouse marcado com peroxidase diluído 1:10000 em PBST com 3% de leite em pó, após isso foi incubado a 37°C por 1 hora. Nos poços intitulados S/S ao invés do anticorpo secundário, foi adicionado 100 µL de PBST com 3% de leite em pó; nos restantes dos poços a aplicação do anticorpo secundário ocorreu conforme descrito acima. Assim, a placa foi lavada 3x com PBST, aplicado 100 µL da solução *1-Step Turbo TMB-ELISA Substrate* (Thermo Fisher Scientific) em cada poço e incubado por 20 minutos em ambiente escuro a temperatura ambiente. Após isso, foi adicionado 50 µL de *TMB Stop Solution* (Thermo Fisher Scientific) em cada poço e realizado a leitura no leitor de placas *Multiscan Ascent* (Labsystems) no comprimento de onda 450 nm. Os resultados foram analisados utilizando o software *GraphPad Prism 6*.

Figura 10: Representação do ELISA feito para as amostras de plasma dos camundongos A129 e 129 Sv/Ev imunizados. Teste realizado em duplicata.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S/S	S/P	B C-	B C-	B N	B N	B In	B In	B N+I	B N+I	B ZIK	B ZIK
B	S/S	S/P	C- 1	C- 1	N 1	N 1	In 1	In 1	N+I 1	N+I 1	ZIK 1	ZIK 1
C			C- 2	C- 2	N 2	N 2	In 2	In 2	N+I 2	N+I 2	ZIK 2	ZIK 2
D			C- 3	C- 3	N 3	N 3	In 3	In 3	N+I 3	N+I 3	ZIK 3	ZIK 3
E			C- 4	C- 4	N 4	N 4	In 4	In 4	N+I 4	N+I 4	ZIK 4	ZIK 4
F			C- 5	C- 5	N 5	N 5	In 5	In 5	N+I 5	N+I 5	ZIK 5	ZIK 5
G												
H												

Legenda: S/S = controle sem anticorpo secundário; S/P = controle sem anticorpo primário; B = controle branco, sem a presença do ZIKVBR sensibilizado, utilizando o pool de suas respectivas amostras; C- = amostra de plasma de camundongos imunizados com o controle negativo; N = amostra de plasma de camundongos imunizados com o NS3; In = amostra de plasma de camundongos imunizados com o vírus Inativado; N+I = amostra de plasma de camundongos imunizados com o vírus Inativado e a NS3; ZIK = amostra de plasma de camundongos infectados com ZIKV infeccioso. Cada número simboliza diferentes animais.

4.7.3 PRNT

Alíquotas de 25 µL do plasma de cada um dos animais imunizados foram inativadas a 56°C por 1 hora em banho maria. Foi realizada diluição fracionada (1:2) em cada plasma inativado, desde 1:20 até 1:20480 diluído em meio MEM sem SFB, em um volume final de 250 µL. Assim, foi adicionado 10² PFU do ZIKVBR, em um volume de 250 µL em meio MEM incompleto, em cada um dos eppendorfs contendo as diluições dos plasmas inativados e, após isso, foram incubados à 37 °C por 1 hora.

Após isso, cada diluição de plasma foi pipetado em seu respectivo poço de uma placa de 24 poços, em duplicata, utilizando 1 placa para cada animal (**Figura 11**). A placa, que continha células Vero com aproximadamente 90% de confluência em cada poço (preparada no dia anterior), foi lavada 3x com PBS e incubada em temperatura ambiente sob agitação por 1 hora após a aplicação de 200 µL da solução contendo as diluições do plasma e o ZIKVBR em seus respectivos poços. Após a incubação, foi descartado o sobrenadante contendo o plasma e vírus,

adicionado 500 μ L de CMC em cada poço e incubado por 4 a 5 dias em estufa a 37°C, até o aparecimento dos plaques.

Figura 11: Representação do PRNT feito para as amostras de plasma dos camundongos A129 e 129 Sv/Ev imunizados.

	1	2	3	4	5	6
A	Branco	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320
B	Branco	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320
C	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240	1:20480
D	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240	1:20480

Após os 5 dias de incubação, o CMC foi retirado, as células foram fixadas com 500 μ L de formol 10%, duas aplicações de 15 minutos sob agitação, e coradas com 3 gotas de cristal violeta por 15 minutos sob agitação.

Cada placa, correspondendo um animal, foi analisada segundo a quantidade de formação de plaques e a titulação de anticorpos neutralizantes de cada animal imunizado.

4.7.4 Citometria de fluxo

O baço de cada camundongo imunizado foi coletado e colocado em uma placa de 6 poços, cada baço em seu respectivo poço, contendo meio RPMI incompleto. Cada baço foi lavado em álcool 70% e depois transferido para um recipiente contendo 3 mL de meio RPMI sem SFB. Após isso, eles foram triturados utilizando a parte traseira de um êmbulo de 3 mL. As células suspensas foram transferidas para um tubo Falcon de 15 mL e adicionado 3 mL de meio RPMI sem SFB. Após 5 min de centrifugação a 400 g, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 2 mL de solução de lise de hemácias (solução de NH_4Cl a 10%, diluído em H_2O , pH 7,4), sendo estocadas por 2 min e adicionado 8 mL de meio RPMI sem SFB. Então, as células foram centrifugadas por 5 min a 400 g, o sobrenadante foi descartado, as células ressuspensas em 3 mL de meio RPMI sem SFB e quantificadas utilizando o TC20 Automated Cell Counter (Bio-Rad). Esta metodologia foi realizada para cada baço, separadamente.

Após a quantificação, foram transferidas 5×10^6 células do baço de cada camundongo para uma placa de 24 poços, sendo separados por grupos de imunização. Assim, 2,5 µg da NS3 recombinante filtrada (utilizando filtro de 0,25 µm) foi adicionada a cada poço da placa contendo as células do baço dos camundongos imunizados, após isso o volume foi completado para um volume final de 500 µL em meio RPMI incompleto (concentração final de 5 µg de NS3 por 1 mL de cultivo celular estéril), desta forma a placa foi incubada em estufa a 37°C/5% CO₂ por 24 horas. Após esse período, as células foram centrifugadas a 400 g por 5 min, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 400 µL de meio RPMI incompleto. Em seguida, foi adicionado, a cada poço, 0,3 µL de PMA (50 ng/mL), 3 µL de Iomicina (500 ng/mL) e 0,5 µL de *Golgi Plug* (1 µL/mL), sendo então estocadas por 5 horas em estufa a 37°C/5% CO₂. As células foram transferidas para tubos de citometria, centrifugadas a 400 g por 5 min, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 200 µL de PBS por tubo.

Para a marcação da superfície celular foi preparado um mix de anticorpos contendo 1/200 de cada um dos anticorpos (anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, FC block e live/dead) diluídos em meio RPMI incompleto, sendo adicionado 100 µL em cada tubo. Após 30 min na geladeira, coberto por papel alumínio, foi adicionado 2 mL de PBS em cada tubo, centrifugado a 400 g por 5 min e descartado o sobrenadante.

Para a marcação das citocinas intracelulares, as células foram ressuspensas em 250 µL da solução de *Cytofix/cytoperm* (BD, *Fixation/Permeabilization Solution Kit with BD GolgiPlug*), os tubos foram cobertos por papel alumínio e incubados por 20 min na geladeira. Assim, foi adicionado 2 mL da solução *Permwash*, sendo então centrifugado a 400 g por 5 min. Após isso, foi adicionado 1/100 de cada um dos anticorpos de marcação de citocinas (anti-IL-4 e anti-IFN-γ) diluídos em *permwash*, sendo adicionado 100 µL em cada tubo, e incubados na geladeira por 30 min coberto por papel alumínio. As células foram lavadas com 2 mL de PBS, centrifugadas a 400 g por 5 min e ressuspensas em 200 µL de PBS. Por fim, as células marcadas foram lidas no FACS (BD FACSCanto II Flow Cytometer).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Alinhamento das cepas de ZIKV

A alinhamento realizado entre as cepas ZIKVBR e ZikaSPH2015 mostrou 99% de similaridade das sequências de aminoácidos, havendo diferenças em apenas 5 aminoácidos ao longo da poliproteína viral, sendo apenas 1 delas na região na qual sintetiza a proteína NS2b-NS3 (**Figura 12**).

Figura 12: Alinhamento das cepas ZIKVBR e ZikaSPH2015. O resultado mostra o alto grau de similaridade entre os aminoácidos de ambas as cepas, havendo apenas 1 aminoácido diferente na posição 485 da proteína NS2b-NS3.

O alto grau de similaridade nos garantiu a possibilidade de trabalhar com ambas as cepas nos ensaios realizados ao longos deste trabalho.

5.2 Estoque de ZIKV e quantificação por PFU

O estoque do ZikaSPH2015 produzido a partir da infecção de células Vero foi quantificado por contagem de PFU (**Figura 13**). Assim, foi possível calcular que este estoque viral possui uma concentração de 2×10^6 PFU/mL sendo, desta forma, utilizado para a realização da clonagem do peptídeo de NS3 e em outros experimentos.

Figura 13: Quantificação do estoque ZikaSPH2015 por contagem de PFU. A contagem é feita nos poços da última diluição em que há a presença de plaques, no caso há uma média de 4 plaques nos poços contendo diluições $1:10^5$. Como foi utilizado 200 μL para a realização deste teste, podemos concluir que há 4×10^5 PFU/200 μL , ou 2×10^6 PFU/mL.

Apesar desta cepa ter boa replicação em cultivo celular, não foi possível trabalhar com ela no desafio dos camundongos devido à ausência de sintomas (ver item 5.6).

O estoque do ZIKVBR produzido a partir da infecção de células C6/36 foi quantificado por contagem de PFU (**Figura 14**). Assim, foi possível calcular que este estoque viral possui uma concentração de 10^7 PFU/mL. Esta cepa viral foi escolhida para ser utilizada nos experimentos de desafio, pois apresentou altíssima letalidade em camundongos A129 (ver resultados do item 5.6), e demais experimentos realizados neste trabalho.

Figura 14: Quantificação do estoque ZIKVBR por contagem de PFU. A contagem é feita nos poços da última diluição em que há a presença de plaques, no caso há uma média de 2 plaques nos poços contendo diluições $1:10^6$. Como foi utilizado 200 μL para a realização deste teste, podemos concluir que há 2×10^6 PFU/200 μL , ou 10^7 PFU/mL.

5.3 Desenvolvimento da vacina inativada

Embora fácil de produzir, a inativação de vírus para fins vacinais é um trabalho delicado e exige a confirmação de inativação absoluta, de 100% das partículas virais, uma vez que a persistência de um único vírus vivo poderá trazer complicações para pacientes imunodeprimidos, pois este poderá “driblar” o sistema imunológico, se replicar nas células do paciente e, assim, causar efeitos patológicos não esperados. Desta forma, a estratégia de verificar a eficiência da inativação, em variados tempos deste processo, é uma das maneiras de confirmar sua segurança em sua utilização para fins vacinais.

O ensaio realizado mostrou que o formaldeído é um excelente inativador viral. Com este protocolo, foi possível verificar que a partir do 3º dia de incubação do ZIKV com formaldeído, as células infectadas já não apresentaram nenhuma formação de plaques, comparado ao controle, que apresentou plaques em todos os dias de incubação analisados. Este resultado evidencia que em 3 dias de incubação de 10^5 PFU do ZIKVBR na presença de 0,05% de formaldeído é o suficiente para inativar as partículas virais (**Figura 15**).

Figura 15: Ensaio de inativação viral. Foi realizado duas placas, uma para analisar o “Vírus Inativado” em seus respectivos tempos de incubação com formaldeído, e o “Controle”, vírus não inativado que passou pelos mesmos procedimentos que o inativado. Este ensaio mostrou que após 3 dias de incubação não há o aparecimento de lise celular ou formação de plaques, evidenciando a inativação do ZIKV.

Legenda: B = Branco; T0 = Tempo zero; T1 = 1 dia de incubação; T2 = 2 dias de incubação; T3 = 3 dias de incubação; T4 = 4 dias de incubação; T5 = 5 dias de incubação; T6 = 6 dias de incubação; T7 = 7 dias de incubação; T8 = 8 dias de incubação; T9 = 9 dias de incubação; e + = Controle positivo contendo ZIKV vivo e infeccioso.

Após as 3 passagens dos vírus inativados no 3º dia em célula Vero e C6/36, verificou-se que, de fato, 3 dias de inativação foi o suficiente para a inativação de

100% dos vírus, uma vez que a inexistência de plaques após as passagens, evidencia a não ocorrência de replicação viral (**Figura 16**).

Figura 16: Verificação da inativação viral. Após 3 passagens em células Vero e C6/36 foi possível verificar que os vírus, após 3 dias de incubação com formaldeído, foram 100% inativados, uma vez que não houve o aparecimento de lise celular, ou formação de plaques, nos poços destas amostras.

Legenda: B = Branco; 10-1 = diluição 1/10; 10-2 = diluição 1/102; 10-3 = diluição 1/103; 10-4 = diluição 1/104; 10-5 = diluição 1/105; + = controle positivo contendo ZIKV vivo e infeccioso.

Como os vírus inativados não formam plaques, a quantificação para a utilização da vacina inativada nos ensaios de imunização foi definida pela concentração de massa pelo volume, determinada pela quantificação realizada pela técnica de Bradford. Desta forma, foi possível obter 5 mL do ZIKV inativado em uma concentração de 10 µg/µL. A concentração de LPS para esta amostra foi 0,0058 UE/mL.

5.4 Clonagem da NS3 recombinante

A escolha da melhor temperatura de anelamento é baseada na observação de três variáveis: (1) a intensidade da banda, pois quanto mais intensa, mais eficiente a amplificação; (2): a não formação de hairpins e dímeros, pois suas formações podem indicar fraca hibridização entre os primers e o DNA molde por motivos termodinâmicos, resultando, nestes casos, em baixa eficiência na amplificação; (3): se os itens 1 e 2 forem satisfeitos para mais de uma temperatura, deve ser escolhida a maior temperatura de anelamento possível, a fim de evitar hibridização inespecífica dos primers com quaisquer outras regiões do DNA molde para os quais não foram projetados.

O sucesso da amplificação da NS3, a partir do RNA do vírus Zika, foi verificado pelo aparecimento de um fragmento de aproximadamente 1,6 kb em diferentes temperaturas de anelamento (**Figura 17**). Como o amplicon de interesse foi desenhado para possuir 1527 pb, podemos concluir que realmente se trata do fragmento de interesse. Como houve amplificações em todas as temperaturas, a escolha da melhor temperatura foi baseada justamente na maior temperatura em que haja melhor intensidade da banda. Assim, foi escolhida a temperatura de 57,5°C.

Figura 17: Resultado de PCR do gradiente de temperatura de anelamento.

Legenda: Ladder = 1 kb DNA Ladder (NEB); 50 = 50°C; 52,5 = 52,5°C; 55 = 55°C; 57,5 = 57,5°C; 60 = 60°C; 62,5 = 62,5°C; C- = Controle negativo.

Após a RT-PCR e a etapa de purificação da sequência codificante da NS3 a partir do gel, foi obtido uma concentração de 18,6 ng/μL, medidas com o *Nanodrop*. Assim, ela foi ligada ao pTZ57R/T e utilizada para a transformação de *E. coli* XL10 Gold. Conforme a **Figura 18**, houve crescimento de poucas colônias azuis e muitas colônias brancas, evidenciando uma grande eficiência na ligação da construção pTZ_NS3 e na transformação.

As 3 colônias selecionadas foram analisadas segundo a presença do produto de PCR, sequência amplificada do NS3 do ZIKV, em gel de agarose 1%. A presença das bandas na altura próxima a 1600 pb confirma o êxito da clonagem e transformação em todas as colônias selecionadas (**Figura 19**).

Figura 18: Placa de Petri com as colônias recombinantes contendo a construção pTZ_NS3. As colônias BRANCAS evidenciam que tais colônias foram transformadas com a construção pTZ_NS3; as colônias AZUIS mostram que a sequência da NS3 não se ligou ao pTZ57R/T e, nestes casos, tais colônias não possuem o inserto de interesse.

Figura 19: PCR de colônia para a confirmação da construção pTZ_NS3. Visualização em gel de agarose 1%, mostrando que todas as colônias analisadas apresentaram amplificação, ou seja, todas foram transformadas com êxito.

Ladder = 1 kb DNA Ladder (NEB); 1 = Colônia 1; 2 = Colônia 2; 3 = Colônia 3; C- = Controle negativo.

A construção pET26b_NS3 também pôde ser evidenciada pelo crescimento de colônias na placa de Petri (**Figura 20**), uma vez que, em teoria, quando há digestão do plasmídeo com duas enzimas de restrição e, esta for realizada com 100% de eficiência, não há como ela re-circularizar sem a presença do inserto de interesse (**Figura 21**).

Figura 20: Placa de Petri com as colônias recombinantes contendo a construção pET26b_NS3.

Figura 21: Ilustração de como ocorre a reação de ligação em presença da T4 ligase. A ligação ocorrerá apenas se as extremidades forem complementares.

A confirmação da presença do inserto de interesse nas colônias se deu pela visualização da eletroforese em gel de agarose 1%, na qual houve o aparecimento de bandas próximas à altura de 1527 pb após a realização da PCR de colônia. Houve amplificação em todas as 5 colônias testadas, evidenciando o êxito na construção pET26b_NS3 e na transformação (**Figura 22**).

Figura 22: PCR de colônia para a confirmação da construção pET26b_NS3. Visualização em gel de agarose 1%, mostrando que todas as colônias analisadas apresentaram amplificação, ou seja, todas foram transformadas com êxito.

Legenda: Ladder = 1 kb DNA Ladder (NEB); 1 = Colônia 1; 2 = Colônia 2; 3 = Colônia 3; 4 = Colônia 4; 5 = Colônia 5; C- = Controle negativo; C+ = Controle positivo.

A colônia 1 foi selecionada e enviada para o sequenciamento e, após verificar que a clonagem foi bem-sucedida, foi utilizada no ensaio de expressão da NS3 recombinante.

5.5 Expressão e purificação da NS3 recombinante

Conforme o planejado, o fato da NS3 recombinante possuir uma cauda de histidina facilita a localização da proteína de interesse, uma vez que no *Western Blot* foi utilizado anticorpo anti-HisTag conjugado com peroxidase para a realização da análise. Para as análises de *SDS-PAGE* e *Western Blot* era esperado encontrar uma banda de aproximadamente 60 kDa que seja reconhecida e marcada por anticorpos anti-HisTag, conforme explicado anteriormente.

A expressão da NS3 recombinante se deu pela indução de até 4 horas na presença de 0,5 mM de IPTG, sendo verificado por *SDS-PAGE* e *Western Blot* o aumento da expressão da proteína recombinante nos diferentes tempos de indução. O fato de apenas as amostras induzidas apresentarem uma forte banda expressa na altura de 60 kDa e marcada por *Western Blot*, evidencia a correta síntese da proteína de interesse após o início de sua indução (**Figura 23**).

Figura 23: Ensaio de expressão da NS3 recombinante em diferentes tempos de indução de IPTG. A presença de uma única banda marcada nas amostras induzidas, além desta possuir aproximadamente 60 kDa, evidencia a expressão da NS3 recombinante. A) *SDS-PAGE* contendo as proteínas totais das amostras; B) *Western Blot* marcando apenas as proteínas que possuem cauda de histidina.

Legenda: Ladder = BenchMark His-Tagged Protein Standard (ThermoFisher); E = *E.coli* sem plasmídeo; E+P = *E.coli* transformada com pET26b sem inserto; T0 = *E.coli* com a construção pET26b_NS3 antes da indução; T1 = *E.coli* com a construção pET26b_NS3 após 1 hora de indução; T2 = *E.coli* com a construção pET26b_NS3 após 2 horas de indução; T3 = *E.coli* com a construção pET26b_NS3 após 3 horas de indução; T4 = *E.coli* com a construção pET26b_NS3 após 4 horas de indução.

Apesar da presença do peptídeo sinal “*pelB leader*” no sítio de clonagem do pET26b, o qual induz a secreção da proteína de interesse para o periplasma a fim de facilitar sua purificação, não foi possível encontrar a NS3 recombinante neste local. Uma possível explicação é ocorrência de uma superexpressão da proteína pela bactéria, formando corpos de inclusão antes da possibilidade desta ser secretada para o periplasma. O fato da proteína ter sido encontrada apenas na

porção insolúvel de proteínas pode evidenciar isso (**Figura 24**), uma vez que corpos de inclusão são reconhecidos por fazerem parte da porção insolúvel das proteínas expressas em bactérias. Apesar de ter sido identificado a NS3 recombinante na etapa de lavagem dos corpos de inclusão (**Figura 24**), este foi descartado pela alta contaminação com outras proteínas.

Para solubilizar o corpo de inclusão formado foi necessário a utilização de alta concentração de ureia (6 M). A ureia é um agente capaz de desnaturar uma proteína através do rompimento das ligações de hidrogênio e desestabilização de interações hidrofóbicas presentes na formação da estrutura secundária e terciária das proteínas, fazendo com que ela perca sua conformação nativa e, conseqüentemente, sua função (Anfinsen CB e Haber E, 1960). Desta forma, a utilização de altas concentrações de ureia em corpos de inclusão torna-se útil para romper as ligações hidrofóbicas que constituem o agregamento das proteínas, formado pelos corpos de inclusão (Sambrook J e Russell D W, 2001).

A solubilização da NS3 recombinante por meio da utilização do tampão de solubilização contendo 6 M de ureia mostrou-se parcialmente efetivo, uma vez que uma quantidade considerável da NS3 recombinante permaneceu insolúvel (**Figura 25**). Apesar da quantidade de proteína de interesse produzida e solubilizada ter sido suficiente para este trabalho, será necessário o aprimoramento das etapas de expressão e purificação em caso de futura utilização em larga escala a fim de reduzir gastos.

A cromatografia de níquel realizada mostrou-se extremamente eficaz, uma vez que perdeu-se muito pouca proteína de interesse durante as etapas de ligação e lavagem, e houve altíssimo rendimento na etapa de eluição, eluindo a NS3 recombinante praticamente pura (**Figura 24**).

Figura 24: Etapas de purificação da NS3 recombinante e solubilidade da proteína de interesse. Ensaio realizado para verificar a solubilidade da NS3 recombinante e a eficiência da purificação completa, desde a separação das proteínas solúveis e insolúveis até a cromatografia de afinidade por coluna de níquel. A) SDS-PAGE; B) Western Blot.

Legenda: L = Ladder (Precision Plus Protein Dual Color Standards, Bio-Rad); P = proteínas extraídas do periplasma; Sol = proteínas solúveis; IC = lavagem do corpo de inclusão com PBS com 1 M de uréia; UIns = proteínas insolúveis em tampão de solubilização com uréia 6 M; USol = proteínas solúveis em tampão de solubilização com uréia 6 M; Bin = proteínas que passaram pela coluna de cromatografia durante a ligação; Was = proteínas soltas durante a lavagem da coluna de cromatografia; Elu = proteínas eluídas durante a etapa de eluição na cromatografia.

Após a eluição da NS3 recombinante, foi realizado a diálise a fim de retirar a ureia e o imidazol presentes. Foi detectado, após a diálise, a formação de agregados de proteínas, uma vez que a retirada da ureia favorece a interação hidrofóbica entre as proteínas. Porém, foi possível obter 10 mL com a concentração de 0,82 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de NS3 recombinante pura e solúvel para as imunizações. A concentração de LPS presente nesta proteína foi 33,64 EU/mL.

5.6 Imunização e desafio

Como experimento central desta tese, a “imunização e desafio” foram realizadas para verificar se a NS3, utilizada como formulação vacinal, é capaz de induzir a ativação de linfócitos CD4 e CD8 a fim fornecer proteção para os camundongos A129 (nocaute para o receptor de IFN do tipo 1) contra o ZIKV.

O IFN do tipo 1 é uma importante citocina para a via de controle de infecções virais do sistema imunológico inato. Uma vez que uma célula infectada consegue reconhecer os Padrões Moleculares Associados ao Patógeno (PAMPs) do vírus por meio dos Receptores de Reconhecimento-Padrão (PRRs), estes podem desencadear uma cascata de sinalização e ativar a síntese de IFN- α e IFN- β (IFN do tipo 1). Estes IFNs são secretados e reconhecidos pelos receptores de IFN do tipo 1, presentes na membrana celular de células adjacentes desencadeando a: [1] inibição

da síntese proteica viral, [2] degradação do RNA viral e [3] inibição da expressão gênica viral e da montagem do virion (HAMEL R et al, 2015). Desta forma, camundongos nocaute para o receptor de IFN do tipo 1, como é o caso do A129, apresentam uma grave deficiência imunológica contra doenças virais, uma vez que esta via é extremamente importante para o controle e eliminação do vírus (AZAR SR et al, 2016; DOWALL SD et al, 2016).

Desta forma, primeiramente foi testada presença de sintomas da infecção do vírus Zika em camundongos A129 com 7 semanas de vida. Os testes realizados com o ZikaSPH2015 mostraram que este vírus, apesar de conseguir infectar e se replicar em células VERO, não causa nenhum efeito patológico nos camundongos A129 (**Figura 25**), sugerindo que este vírus provavelmente foi atenuado devido a múltiplas passagens no laboratório.

Figura 25: Padronização e determinação da dose letal de ZikaSPH2015. Camundongos A129 de 7 semanas de vida foram infectados com diferentes concentrações de ZikaSPH2015 selvagem, sendo analisado a sobrevivência (A) e peso (B) destes animais por 15 dias.

Já os testes realizados com o ZIKVBR mostraram que quanto maior a dose, maior a probabilidade de óbito dos camundongos, sendo que um único vírus pode ser capaz de matar um camundongo susceptível e, à medida que são inoculados com maiores quantidades de ZIKVBR, eles passam a falecer mais rapidamente, com maiores perdas de massa corporal (**Figura 26**).

Este resultado segue exatamente o que é descrito na literatura, mostrando que camundongos jovens, e nocaute para o receptor de IFN do tipo 1, são altamente susceptíveis ao ZIKV selvagem (DOWALL SD et al, 2016; AZAR SR et al, 2016)

Neste ensaio foi detectado que a LD50 (dose letal capaz de eliminar 50% dos camundongos) é de 10 vírus (10¹ PFU), tendo sido utilizado 1000x esta dose, ou seja 10⁴ PFU, para o ensaio de imunização e desafio. Esta dose foi escolhida por já ter apresentado, em testes anteriores não detalhados neste relatório, proteção

parcial dos camundongos imunizados apenas com o vírus inativado. Como o objetivo é verificar a influência da NS3 em proteger ou melhorar a proteção, em conjunto com o vírus inativado, contra o ZIKV infeccioso, esta quantidade de vírus parece ser o ideal para este experimento.

Figura 26: Padronização e determinação da dose letal de ZIKVBR. Camundongos A129 de 7 semanas de vida foram infectados com diferentes concentrações de ZIKVBR selvagem, sendo analisado a sobrevivência (A) e a variação de peso (B) destes animais por 15 dias.

Desta forma, foi realizado a imunização de duas doses vacinais nos camundongos A129 de 4 semanas de vida, segundo a metodologia descrita no item 4.6.2. Após o período de vacinação eles foram desafiados e acompanhados por 21 dias, verificando a perda de peso e sobrevivência.

O resultado obtido mostra que a vacina composta apenas com a NS3 recombinante não oferece proteção para o camundongo contra o ZIKV infeccioso, uma vez que tanto a inoculação de altas, ou baixas, concentrações de NS3 não influenciaram na proteção dos camundongos contra a infecção viral. Este resultado sugere que, se realmente a NS3 está sendo apresentada e atuando na ativação da imunidade celular, esta resposta sozinha não é o suficiente para proteger os animais da infecção viral. Por outro lado, a vacina composta por vírus inativado e alta concentração de NS3 foi capaz de proteger 100% dos camundongos, uma vez que as vacinas compostas por vírus inativado ou vírus inativado com baixa concentração da NS3 protegeram parcialmente os camundongos vacinados, com “apenas” 67% e 83% de sobrevivência dos camundongos, respectivamente. Estes resultados mostram que concentrações crescentes da NS3 melhoram a proteção contra a infecção viral, quando utilizadas em conjunto com o vírus inativado, sugerindo que a utilização da NS3 recombinante como adjuvante vacinal pode ter um papel importante na proteção contra o vírus (**Figura 27**).

Figura 27: Imunização e desafio. 6 grupos de camundongos A129 de 4 semanas de vida foram vacinados com duas doses de suas respectivas formulações vacinais, variando na presença ou ausência do vírus inativado e presença, ausência ou concentração da NS3 recombinante. Após o desafio de 10^4 PFU de ZIKV infeccioso, foi analisado a sobrevivência (A) e peso (B) dos camundongos por até 21 dias.

5.7 Imunização e resposta imunológica

5.7.1 Imunofluorescência

O ensaio de imunofluorescência foi realizado com o objetivo de detectar se as imunizações foram capazes de estimular produção de anticorpos específicos contra o ZIKV.

O resultado deste ensaio mostrou que as formulações vacinais desenvolvidas (a NS3 com o vírus inativado, apenas o vírus inativado, ou apenas a NS3) foram capazes de induzir uma resposta de imunidade humoral específica contra as proteínas virais expressas pelas células infectadas, em ambas as linhagens de camundongos (129 Sv/Ev e A129), uma vez que em todos estes casos houve o aparecimento de marcações FITC apenas nas células infectadas (**Figura 28**).

Considerando que o cultivo de vírus, que precede a inativação, foi realizado com meio contendo soro fetal bovino e, após a inativação, houve concentração dos vírus inativados utilizando o concentrador *VivaSpin* sem a purificação dos vírus inativados, é bastante provável que os animais imunizados com esta formulação tenha produzido anticorpos não apenas contra as proteínas estruturais do ZIKV, mas também contra proteínas presentes no meio MEM e no soro fetal bovino, uma vez que muitas proteínas presentes no soro fetal bovino e no meio de cultivo celular são maiores do que os poros do concentrador. Assim, os “pontinhos” verdes extracelulares, encontrados apenas nas fotos de imunofluorescência em que foram utilizados os plasmas dos animais imunizados com vírus inativado e NS3 com vírus inativado, provavelmente são proteínas do soro fetal bovino e do meio de cultivo celular, uma vez que eles aparecem tanto em células infectadas como em não infectadas.

Apesar de anticorpos presentes no plasma de animais imunizados com o vírus inativado marcarem positivamente células infectadas com o ZIKV, é notória a fraca intensidade e o baixo número de células reconhecidas (**Figura 28**). Este resultado pode se dar por 3 motivos: [1] talvez a dose real de vírus inativado utilizado para preparar as formulações vacinais são insuficientes para produzir uma forte resposta imunológica humoral, lembrando que foi utilizado 100 µg do concentrado de vírus inativado com proteínas do soro fetal bovino, ou seja, a quantidade de vírus inativado está superestimada nesta dose, isto explicaria o porquê de apenas 67% dos camundongos sobreviverem após o desafio, apesar de ter sido inoculado alta quantidade de vírus inativado; ou [2] o método de inativação química, utilizando formalina, foi responsável pela desnaturação das proteínas estruturais do vírus, provocando a “perda” de epítomos conformacionais importantes para o reconhecimento do vírus pelos anticorpos produzidos (DUQUE H *et al*, 1989); ou [3] a combinação das hipóteses 1 e 2.

Os anticorpos presentes no plasma dos animais imunizados com NS3, por outro lado, reconhecem todas as células infectadas, mostrando que há expressão significativa de NS3 durante a replicação viral. Curiosamente, os anticorpos presentes no plasma dos animais imunizados com NS3 e vírus inativado reconheceram com altíssima intensidade as células infectadas, sugerindo que a NS3, de fato, pode estar atuando como adjuvante e amplificando o reconhecimento de anticorpos contra o vírus.

A diferença na visualização no resultado da imunofluorescência dos camundongos 129 Sv/Ev e A129 mostram que a linhagem nocaute, embora não possua o receptor de uma citocina da resposta imunológica inata, também prejudica a soroconversão e o desenvolvimento da resposta imunológica humoral contra os antígenos inoculados. Por outro lado, é evidente que a intensidade da imunofluorescência dos camundongos A129 infectados com o ZIKV é maior do que a dos camundongos 129 Sv/Ev, sugerindo que os camundongos nocaute, por serem susceptíveis ao vírus e permitir sua replicação, tornam-se mais expostos aos antígenos virais presentes no vírus replicante, desenvolvendo, assim, mais anticorpos contra o ZIKV.

Figura 28: Ensaio de imunofluorescência utilizando plasma de camundongos 129 Sv/Ev (A) e A129 (B). O ensaio foi realizado em células infectadas com o ZIKVBR e em células não infectadas. Foi detectado a presença de anticorpos em plasma de camundongos imunizados que reconheceram proteínas do ZIKV nas células infectadas.

Legenda: C- = animais imunizados apenas com o mock (Grupo 1), NS3 = animais imunizados apenas com NS3 (Grupo 3), Inact = animais imunizados apenas com o vírus inativado (grupo 2), N+I = animais imunizados com NS3 e vírus inativado (Grupo 4), e ZIKV = animais infectados com ZIKV infeccioso (Grupo 5). C) O poço denominado Ctrl1 representa o controle experimental na ausência do anticorpo primário, já o Ctrl2 representa o controle experimental na ausência do anticorpo secundário e as marcações com Azul de Evans e DAPI. (ver TABELA 4)

5.7.2 ELISA

A placa de ELISA, utilizada neste ensaio, foi sensibilizada com 10^3 PFU do ZIKVBR infeccioso, ou seja, os antígenos que são reconhecidos pelos anticorpos dos animais imunizados, neste teste, são apenas as proteínas estruturais do ZIKV, não detectando anticorpos anti-NS3, por exemplo. Desta forma, apenas os anticorpos produzidos pelos animais que foram expostos ao ZIKV infeccioso ou ao ZIKV inativado (soluções que contêm as proteínas estruturais do ZIKV) foram detectados neste ELISA. Desta forma, a diferença significativa na detecção de anticorpos “anti-proteínas estruturais do ZIKV” entre os camundongos imunizados com apenas o vírus inativado e o vírus inativado com NS3 (**Figura 29**), sugere que a NS3 pode ter influenciado na amplificação da resposta imunológica humoral, atuando como um bom adjuvante vacinal, corroborando com os resultados obtidos no ensaio de imunofluorescência.

Embora o resultado do ELISA para as amostras dos camundongos infectados com o ZIKV infeccioso tenha tido uma absorvância muito abaixo do esperado,

podemos explicar sua diferença para com os grupos dos animais imunizados com ZIKV inativado ou ZIKV inativado com NS3 pelo fato destes últimos terem sido imunizados, além do vírus inativado, com alta concentração de proteínas do meio de cultura e SFB, desenvolvendo anticorpos contra eles, conforme explicado no item 5.7.2 e, como os poços para a realização deste ELISA foram sensibilizados com 10^4 PFU do ZIKV em meio MEM com 2% de SFB, é bastante provável que a alta detecção de anticorpos dos grupos ZIKV inativado e ZIKV inativado com NS3 se trate, não somente de anticorpos anti-ZIKV, mas também de anticorpos anti-proteínas do meio de cultivo e SFB. Embora este problema tenha atrapalhado na titulação real de anticorpos anti-ZIKV para cada grupo de camundongos imunizados, ainda é evidente que a NS3 tenha amplificado a resposta humoral, seja contra o ZIKV ou contra proteínas do meio de cultura e SFB.

Figura 29: Ensaio de ELISA realizado com amostras de plasma de camundongos 129 Sv/Ev (A) e A129 (B) imunizados, a fim de verificar a quantidade de anticorpos anti-ZIKV presentes no plasma dos animais imunizados. (**) = $p < 0,01$; (****) = $p < 0,0001$

Um adjuvante possui o importante papel de amplificar a resposta imunológica de 2 formas significativas: [1] estimular a produção de quimiocinas, atraindo leucócitos para o sítio de inflamação; [2] ativar fagócitos, como macrófagos e células dendríticas a fim de estimular a ação do sistema imunológico inato e, consequentemente, o adaptativo. Já não é novidade a utilização de proteínas como adjuvantes vacinais, desde o clássico adjuvante completo de Freund, como também toxinas da difteria e outros (SCHIJINS VEJC, 2000). Trabalhos recentes utilizaram a HSP70 (*Heat Shock Protein*) da *Mycobacterium tuberculosis* como adjuvante vacinal, atuando na amplificação da imunidade contra HIV, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum* (EBRAHIMI SM e TEBIANIAN M, 2011). Outro trabalho

utilizando a proteína ASP-1 do helminto *Onchocerca volvulus* mostrou agir como um bom adjuvante quando utilizadas com vacinas inativadas contra o vírus Influenza (JIANG J *et al*, 2016). Desta forma, os resultados da imunofluorescência e do ELISA, encontrados neste trabalho, sugerem que a NS3 pode ser um bom adjuvante vacinal, uma vez que, em ambos os ensaios, apresentou aumentos significativos dos níveis de anticorpos contra o ZIKV, resultado que corrobora com o encontrado por SIMMONS M *et al* (2016) em seu estudo de NS3 em DENV-2. Apesar destes resultados, são necessários novos testes comparativos da NS3 com outros adjuvantes, para quantificar a ação da NS3 como um bom adjuvante vacinal.

5.7.3 PRNT

O teste de PRNT₅₀ foi realizado a fim de titular a quantidade de anticorpos, produzidos pelas imunizações dos camundongos, capaz de neutralizar 50% de vírus, explicando, assim, o porquê dos camundongos imunizados com as formulações vacinais contendo o ZIKV Inativado e ZIKV Inativado mais NS3 terem sobrevivido após o desafio.

Apesar dos ensaios ELISA e imunofluorescência detectarem anticorpos anti-ZIKV para as amostras de plasma dos camundongos imunizados, apenas os camundongos infectados com o ZIKV infeccioso foi capaz de neutralizar o ZIKV (**Figura 30**), mostrando que os anticorpos produzidos pelas imunizações não são neutralizantes. A falta de anticorpos neutralizantes indica que os antígenos utilizados para as imunizações não possuíam epítomos capazes de produzi-los. Porém, considerando que foi utilizado o próprio ZIKV inativado como antígeno vacinal, já descrito por possuir epítomos importantes para a neutralização viral (MODJARRAD K *et al*, 2018), podemos concluir que o processo químico utilizado no processo de inativação viral, utilizando formaldeído 0,05%, provavelmente desnaturou estes epítomos, impedindo o reconhecimento pelo sistema imunológico e, conseqüentemente, não desenvolvendo anticorpos neutralizantes (MURDIN AD *et al*, 1996).

Figura 30: Teste de neutralização por redução de plaques (PRNT₅₀) realizado com o plasma dos camundongos 129 Sv/Ev (A) e A129 (B), a fim de titular a quantidade de anticorpo capaz de neutralizar 50% dos vírus

Embora seja comum esperarmos que formulações vacinais desenvolvam anticorpos neutralizantes, estudos recentes demonstram que anticorpos não-neutralizantes também são importantes para a proteção contra patógenos (MAYR *et al*, 2017). Alguns estudos demonstraram que vacinas produzidas contra HIV, influenza, HCMV e DENV mostraram proteção in vivo mediado por funções efetoras de anticorpos não neutralizantes (HENRY DUNAND CJ *et al*, 2016; KIM JH *et al*, 2016; NELSON CS *et al*, 2018; SCHLESINGER JJ *et al*, 1987). Um estudo realizado por Tebas *et al* (2017) demonstrou que a proteção de animais susceptíveis ao ZIKV, após a transferência de soro de humanos imunizados com vacina de DNA que codifica as proteínas prM e E, é independente do título de anticorpo neutralizante, havendo, inclusive, proteção de animais após a transferência de soros humanos que não foram detectados anticorpos neutralizantes. Existem várias formas de um anticorpo não neutralizante auxiliar na proteção contra um patógeno: [1] a opsonização, promovendo a fagocitose por meio do reconhecimento da porção Fc dos anticorpos ligados aos patógenos por fagócitos que possuem receptores Fc; [2] a ativação do sistema complemento pela via clássica, promovendo respostas pró-inflamatórias, amplificação da opsonização e a lise do patógeno ou da célula infectada; [3] citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), uma vez que antígenos dos patógenos são sintetizados pela célula hospedeira e estes são ancorados à membrana celular, estes podem ser reconhecidos pelos anticorpos não neutralizantes e, desta forma ativarem respostas citotóxicas mediadas por células NK; e [4] neutralização de toxinas ou proteínas que promovem os efeitos patológicos (DEMBERG T *et al*, 2006; EXCLER JL *et al*, 2014; SCHLESINGER JJ *et al*, 1993). Embora todas essas ações são possíveis explicações da sobrevivência dos animais imunizados neste trabalho, vale lembrar que os flavivírus, em especial, são passíveis

de promover o ADE (*antibody dependent enhancement*) devido a pré-existência de anticorpos específicos não neutralizantes (BARDINA SV *et al*, 2017), Desta forma, são necessários novos estudos a fim de verificar por qual via os anticorpos dos animais imunizados, neste trabalho, estão promovendo a proteção contra o ZIKV.

5.7.4 Citometria

Este ensaio foi realizado a fim de verificar qual é o papel da NS3 na resposta imunológica em camundongos infectados com o vírus, se ela é capaz de ser apresentada para linfócitos CD4 e CD8 e estimular uma resposta imunológica mediada por células.

Para esta análise, primeiramente foi realizado o ensaio de citotoxicidade celular pelo estímulo de NS3 em linhagens de linfócitos A301, a fim de determinar se a NS3 poderia causar algum efeito citotóxico nas células. A presença de efeitos citotóxicos nos linfócitos, na presença da NS3, inviabilizaria os ensaios de citometria de fluxo visando a análise da expressão de citocinas produzidas por linfócitos por citometria, ensaio importante para determinar a capacidade da NS3 em estimular resposta imunológica mediada por células. O ensaio de citotoxicidade por MTT mostrou que independente da concentração de NS3, não houve morte de linfócitos comparado ao controle (**Figura 31**), sendo assim possível seguir para os próximos experimentos. Para os ensaios de estimulação de linfócitos dos camundongos, foi utilizado 5 µg/mL.

Conforme o protocolo descrito anteriormente, as células do baço dos camundongos infectados com o ZIKV foram estimulados com a NS3 recombinante para a análise da presença de linfócitos CD4 e CD8 capazes de reconhecer a NS3 e estimular a expressão de citocinas para o desenvolvimento da resposta imunológica

Os resultados do ensaio de citometria mostram que o ZIKV inativado é o responsável pelo aumento de linfócitos CD4 produtora de IFN- γ e, embora a NS3 não esteja influenciando o aumento de linfócitos CD4 e CD8 produtoras de IFN- γ , ela está inibindo a ativação de linfócitos CD4 e CD8 produtoras de IL-4 (**Figura 32**). Embora descrito na literatura que a NS3 possui epítomos para a ativação de linfócitos CD4 e CD8 (XU X *et al*, 2016), não houve diferença significativa na ativação de CD8 produtora de IFN- γ . Provavelmente, a utilização de outros tipos vacinais, como vacinas de DNA que codifica a NS3, por exemplo, nos daria melhores resultados quanto a ativação de linfócitos CD8, uma vez que a utilização de vacinas de subunidades não é um dos melhores caminhos para a ativação destes linfócitos, pois depende exclusivamente da realização de apresentação cruzada pelas células dendríticas (JOFFRE OP *et al*, 2012; VILLADANGOS JA e SCHNORRER P, 2007).

Figura 32: Citometria de fluxo de amostras de células de baço dos animais imunizados, sendo analisado a porcentagem de linfócitos que expressam: IFN- γ em linfócitos CD4+ (A); IL-4 em linfócitos CD4+ (B); IFN- γ em linfócitos CD8+ (C); IL-4 em linfócitos CD8+ (D). (*) = $p < 0,05$; (**) = $p < 0,01$.

Se considerarmos que a principal resposta imunológica contra infecções virais, a resposta Th1, cujo padrão de citocinas se baseia na expressão de altas concentrações de IFN- γ e pouca IL-4 (BRETSCHER PA, 2014), nossos resultados sugerem que a formulação vacinal contendo ZIKV inativado (capaz de ativar linfócitos CD4 produtoras de IFN- γ) e o NS3 (capaz de inibir linfócitos CD4

produtoras de IL-4) podem estar modulando a resposta imunológica para um forte padrão Th1, o que explicaria a sobrevivência dos animais imunizados com esta formulação (**Figura 33**). Apesar desta conclusão, seria necessário verificar e quantificar a expressão dos fatores de transcrição para Th1 (T-bet) e Th2 (NF-kappaB) para garantir qual a resposta promovida pelas imunizações.

Figura 33: Análise das citocinas IL-4 e IFN- γ expressas por linfócitos CD4+ (A) e CD8+ (B) nos diferentes grupos de animais imunizados. (***) = $p < 0,001$

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Os resultados do sequenciamento do plasmídeo pET26b_NS3, dos ensaios de SDS-PAGE, Western blotting e imunofluorescência confirmaram a correta clonagem e expressão da proteína recombinante.

A inativação viral mostrou-se eficiente, sendo que em apenas 3 dias de inativação com 0,05% de formaldeído, foi possível inativar 10^5 PFU do ZIKVBR. Apesar de o vírus inativado não ter sido purificado, o que causou problemas na titulação de anticorpos anti-ZIKV por ELISA, além de provavelmente ter supervalorizado a quantificação de partículas virais inativadas para as imunizações, promoveu proteção parcial dos camundongos A129 desafiados com o ZIKV infeccioso.

Embora a vacina composta pela NS3 sozinha não seja o suficiente para proteger os camundongos desafiados com o ZIKV infeccioso, sua utilização em conjunto com o vírus inativado mostrou significativa melhora na proteção destes camundongos, sugerindo que a aplicação da NS3 auxilia na resposta imunológica contra o ZIKV.

O conjunto dos resultados obtidos nos ensaios de citometria deste trabalho sugerem que embora a NS3 não seja responsável pela ativação de linfócitos produtoras de IFN- γ , mas que ela atua na inibição de linfócitos produtoras de IL-4,

auxiliando na modulação da resposta imunológica para um padrão Th1, quando administrada em conjunto com o ZIKV inativado.

Os resultados obtidos nos ensaios de ELISA e Imunofluorescência evidenciam a ação da NS3 em atuar como adjuvante vacinal, capaz de amplificar a resposta humoral contra o ZIKV. Embora as imunizações produziram anticorpos anti-ZIKV, o ensaio de PRNT₅₀ mostrou que nenhuma imunização foi capaz de neutralizar o ZIKV, apenas as amostras dos camundongos infectados com o vírus infeccioso, sugerindo que os anticorpos anti-ZIKV produzidos pelas formulações vacinais podem estar relacionadas com funções efetoras de anticorpos não neutralizantes.

Embora seja necessário aprimorar alguns processos importantes para a qualidade desta investigação, como a [1] otimização no processo de expressão e purificação da NS3 recombinante, [2] realização da purificação das partículas virais inativadas, os dados obtidos neste trabalho sugerem que a NS3 possui um papel significativo na modulação da resposta imunológica e pode ser utilizada como adjuvante vacinal a fim de amplificar a resposta imunológica contra o ZIKV quando utilizada uma formulação vacinal em conjunto com o ZIKV inativado. Esta abordagem possibilitou a avaliação de uma combinação vacinal que se mostrou capaz de prevenir a infecção com o ZIKV em camundongos susceptíveis.

7. BIBLIOGRAFIA

ABBINK, P.; STEPHENSON, K. E.; BAROUCH, D. H. Zika virus vaccines. **Nature Reviews Microbiology**, 19 jun. 2018.

ANFINSEN, C. B; HABER, E. Studies on the Reduction and Re-formation of Protein Disulfide Bonds. *J. Biol. Chem.* 1961, 236:1361-1363.

AZAR, S. R.; TESH, R. B.; VASILAKIS, N.; PAESSLER, S.; ROSSI, S. L.; LANGSJOEN, R. M.; AUGUSTE, A. J.; WEAVER, S. C.; MURUATO, A. E.; HANLEY, K. A. Characterization of a Novel Murine Model to Study Zika Virus. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 6, p. 1362–1369, 1 jun. 2016.

BACHMANN, M. F.; KÜNDIG, T. M.; KALBERER, C. P.; HENGARTNER, H.; ZINKERNAGEL, R. M. Formalin inactivation of vesicular stomatitis virus impairs T-

cell- but not T-help-independent B-cell responses. **Journal of virology**, v. 67, n. 7, p. 3917–22, jul. 1993.

BARDINA, S. V.; BUNDUC, P.; TRIPATHI, S.; DUEHR, J.; FRERE, J. J.; BROWN, J. A.; NACHBAGAUER, R.; FOSTER, G. A.; KRYSZTOF, D.; TORTORELLA, D.; STRAMER, S. L.; GARCÍA-SASTRE, A.; KRAMMER, F.; LIM, J. K. Enhancement of Zika virus pathogenesis by preexisting ant flavivirus immunity. **Science (New York, N.Y.)**, v. 356, n. 6334, p. 175–180, 14 mar. 2017.

BAROUCH, D. H.; LIU, J.; PETER, L.; ABBINK, P.; IAMPIETRO, M. J.; CHEUNG, A.; ALTER, G.; CHUNG, A.; DUGAST, A.-S.; FRAHM, N.; MCEL RATH, M. J.; WENSCHUH, H.; REIMER, U.; SEAMAN, M. S.; PAU, M. G.; WEIJTENS, M.; GOUDSMIT, J.; WALSH, S. R.; DOLIN, R.; BADEN, L. R. Characterization of humoral and cellular immune responses elicited by a recombinant adenovirus serotype 26 HIV-1 Env vaccine in healthy adults (IPCAVD 001). **The Journal of infectious diseases**, v. 207, n. 2, p. 248–56, 15 jan. 2013.

Bates, D. "Scientist 'becomes first person to pass insect-borne virus on to another human by sex' after making his wife ill". Daily Mail [S.l.: s.n.]; 2011.

Blaney JE Jr, Sathe NS, Goddard L, Hanson CT, Romero TA, Hanley KA, Murphy BR, Whitehead SS. Dengue virus type 3 vaccine candidates generated by introduction of deletions in the 3' untranslated region (3'-UTR) or by exchange of the DENV-3 3'-UTR with that of DENV-4. *Vaccine*. 2008 Feb 6;26(6): 817-28. doi: 10.1016/j

Bollati M, Alvarez K, Assenberg R, et al. Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design. *Antiviral Research*. 2010;87(2):125-148. doi:10.1016/j.antiviral.2009.11.009.

BARJAS-CASTRO, M. L.; ANGERAMI, R. N.; CUNHA, M. S.; SUZUKI, A.; NOGUEIRA, J. S.; ROCCO, I. M.; MAEDA, A. Y.; VASAMI, F. G. S.; KATZ, G.; BOIN, I. F. S. F.; STUCCHI, R. S. B.; RESENDE, M. R.; ESPOSITO, D. L. A.; DE SOUZA, R. P.; DA FONSECA, B. A.; ADDAS-CARVALHO, M. Probable transfusion-transmitted Zika virus in Brazil. **Transfusion**, v. 56, n. 7, p. 1684–1688, jul. 2016.

BRADFORD, M. Analytical Biochemistry. 72, 248-254, 1976.

Chambers T, Hahn C, Galler R, Rice C. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annual Reviews of Microbiology*; 1990

CHUNG, K. M.; LISZEWSKI, M. K.; NYBAKKEN, G.; DAVIS, A. E.; TOWNSEND, R. R.; FREMONT, D. H.; ATKINSON, J. P.; DIAMOND, M. S. West Nile virus nonstructural protein NS1 inhibits complement activation by binding the regulatory protein factor H. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 50, p. 19111–19116, 12 dez. 2006.

CROOK, K. R.; MILLER-KITTRELL, M.; MORRISON, C. R.; SCHOLLE, F. Modulation of innate immune signaling by the secreted form of the West Nile virus NS1 glycoprotein. **Virology**, v. 458–459, p. 172–182, jun. 2014.

CUNHA, M. S.; ESPOSITO, D. L. A.; ROCCO, I. M.; MAEDA, A. Y.; VASAMI, F. G. S.; NOGUEIRA, J. S.; DE SOUZA, R. P.; SUZUKI, A.; ADDAS-CARVALHO, M.; BARJAS-CASTRO, M. de L.; RESENDE, M. R.; STUCCHI, R. S. B.; BOIN, I. de F. S. F.; KATZ, G.; ANGERAMI, R. N.; DA FONSECA, B. A. L. First Complete Genome Sequence of Zika Virus (Flaviviridae, Flavivirus) from an Autochthonous Transmission in Brazil. *Genome announcements*, v. 4, n. 2, p. e00032-16, 3 mar. 2016.

DEMBERG, T.; FLORESE, R. H.; GOMEZ-ROMAN, V. R.; LARSEN, K.; VAN ROMPAY, K. K.; MARTHAS, M. L.; VENZON, D.; KALYANARAMAN, V.; PAL, R.; BARNETT, S. W.; CAFARO, A.; ENSOLI, B.; ROBERT-GUROFF, M. Non-neutralizing antibodies and vaccine-induced protection. **Retrovirology**, v. 3, n. Suppl 1, p. S26, 21 dez. 2006.

Dick GW, Kitchen SF, Haddow AJ. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 46(5):509–20; 1952.

DOWALL, S. D.; GRAHAM, V. A.; RAYNER, E.; ATKINSON, B.; HALL, G.; WATSON, R. J.; BOSWORTH, A.; BONNEY, L. C.; KITCHEN, S.; HEWSON, R. A

Susceptible Mouse Model for Zika Virus Infection. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 5, p. e0004658, 5 maio 2016.

Duffy, Mark R.; Chen, Tai-Ho; Hancock, W. Thane; et al. "Zika virus outbreak on Yap Islands, Federated States of Micronesia". *New England Journal of Medicine* [S.l.: s.n.] 360 (24): 2536–2543; 2009.

DUQUE, H.; MARSHALL, R. L.; ISRAEL, B. A.; LETCHWORTH, G. J. Effects of formalin inactivation on bovine herpes virus-1 glycoproteins and antibody response elicited by formalin-inactivated vaccines in rabbits. **Vaccine**, v. 7, n. 6, p. 513–520, 1 dez. 1989.

DURBIN, A.; WILDER-SMITH, A. An update on Zika vaccine developments. **Expert Review of Vaccines**, v. 16, n. 8, p. 781–787, 3 ago. 2017.

EBRAHIMI, S. M.; TEBIANIAN, M. Role of Mycobacterial Heat Shock Protein 70 (mHSP70) as Genetic Vaccine Adjuvants. **World Applied Sciences Journal**, v. 14, n. 10, p. 1569–1575, 2011.

EXCLER, J.-L.; AKE, J.; ROBB, M. L.; KIM, J. H.; PLOTKIN, S. A. Nonneutralizing functional antibodies: a new "old" paradigm for HIV vaccines. **Clinical and vaccine immunology : CVI**, v. 21, n. 8, p. 1023–36, ago. 2014.

FARIA, N. R. *et al.* Zika virus in the Americas: early epidemiological and genetic findings. **Science**. v. 351, n. 6280, p. 1-9. 25 mar. 2016

Faye O, Freire C, Iamarino A, Faye O, de Oliveira J, Diallo M, Zanutto P, Sall A. Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. *PLOS Neglected Tropical Diseases*; 2014

FERRARO, B.; MORROW, M. P.; HUTNICK, N. A.; SHIN, T. H.; LUCKE, C. E.; WEINER, D. B. Clinical Applications of DNA Vaccines: Current Progress. **Clinical Infectious Diseases**, v. 53, n. 3, p. 296–302, 1 ago. 2011.

GRUSLIN, A.; STEBEN, M.; HALPERIN, S.; MONEY, D. M.; YUDIN, M. H.; BOUCHER, M.; CORMIER, B.; OGILVIE, G.; PAQUET, C.; STEENBEEK, A.; VAN EYK, N.; VAN SCHALKWYK, J.; WONG, T. Immunization in pregnancy. **Journal of obstetrics and gynaecology Canada : JOGC = Journal d'obstetrique et gynecologie du Canada : JOGC**, v. 30, n. 12, p. 1149–54, dez. 2008.

Halstead SB. Antiody, macrophages, dengue virus infection, shock and hemorrhage a pathogenetic cascade. *Reviews of infectious Diseases*. 1989; 11; S830-9

HAMEL, R.; DEJARNAC, O.; WICHIT, S.; EKCHARIYAWAT, P.; NEYRET, A.; LUPLERTLOP, N.; PERERA-LECOIN, M.; SURASOMBATPATTANA, P.; TALIGNANI, L.; THOMAS, F.; CAO-LORMEAU, V.-M.; CHOUMET, V.; BRIANT, L.; DESPRÈS, P.; AMARA, A.; YSSEL, H.; MISSÉ, D. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. **Journal of Virology**, v. 89, n. 17, p. 8880–8896, 1 set. 2015.

Hayes EB. Zika virus outside Africa. *Emerg Infect Dis*. Sep;15(9):1347-50; 2009.

HEMANN, E. A.; KANG, S.-M.; LEGGE, K. L. Protective CD8 T cell-mediated immunity against influenza A virus infection following influenza virus-like particle vaccination. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 191, n. 5, p. 2486–94, 1 set. 2013.

HENRY DUNAND, C. J.; LEON, P. E.; HUANG, M.; CHOI, A.; CHROMIKOVA, V.; HO, I. Y.; TAN, G. S.; CRUZ, J.; HIRSH, A.; ZHENG, N.-Y.; MULLARKEY, C. E.; ENNIS, F. A.; TERAJIMA, M.; TREANOR, J. J.; TOPHAM, D. J.; SUBBARAO, K.; PALESE, P.; KRAMMER, F.; WILSON, P. C. Both Neutralizing and Non-Neutralizing Human H7N9 Influenza Vaccine-Induced Monoclonal Antibodies Confer Protection. **Cell host & microbe**, v. 19, n. 6, p. 800–13, 8 jun. 2016.

HERRERA, B. B.; TSAI, W.-Y.; CHANG, C. A.; HAMEL, D. J.; WANG, W.-K.; LU, Y.; MBOUP, S.; KANKI, P. J. Sustained specific and cross-reactive T cell responses to Zika and Dengue viruses NS3 in West Africa. **Journal of Virology**, p. JVI.01992-17, 10 jan. 2018.

HILGENFELD, R. Zika virus NS1, a pathogenicity factor with many faces. **The EMBO journal**, v. 35, n. 24, p. 2631–2633, 2016.

JIANG, J.; FISHER, E. M.; CONCANNON, M.; LUSTIGMAN, S.; SHEN, H.; MURASKO, D. M. Enhanced humoral response to influenza vaccine in aged mice with a novel adjuvant, r Ov -ASP-1. **Vaccine**, v. 34, n. 7, p. 887–892, 10 feb. 2016.

JOFFRE, O. P.; SEGURA, E.; SAVINA, A.; AMIGORENA, S. Cross-presentation by dendritic cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 8, p. 557–569, 13 ago. 2012.

KIM, J. H.; REBER, A. J.; KUMAR, A.; RAMOS, P.; SICA, G.; MUSIC, N.; GUO, Z.; MISHINA, M.; STEVENS, J.; YORK, I. A.; JACOB, J.; SAMBHARA, S. Non-neutralizing antibodies induced by seasonal influenza vaccine prevent, not exacerbate A(H1N1)pdm09 disease. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 37341, 16 dez. 2016.

KOUP, R. A.; DOUEK, D. C. Vaccine design for CD8 T lymphocyte responses. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, v. 1, n. 1, p. a007252, set. 2011.

Lai CJ, Monath TP. “Chimeric flaviviruses: novel vaccines against dengue fever, tick-borne encephalitis, and Japanese encephalitis”. *Adv Virus Res* **61**: 469–509. 2003

Lee HC, Butler M, Wu SC. Using recombinant DNA technology for the development of live-attenuated dengue vaccines. *Enzyme and Microbial Technology*; 51 (2012) 67–72

LEUNG, J. Y.; PIJLMAN, G. P.; KONDRATIEVA, N.; HYDE, J.; MACKENZIE, J. M.; KHROMYKH, A. A. Role of Nonstructural Protein NS2A in Flavivirus Assembly. **Journal of Virology**, v. 82, n. 10, p. 4731–4741, 15 maio 2008.

LIANG, Q.; LUO, Z.; ZENG, J.; CHEN, W.; FOO, S.-S.; LEE, S.-A.; GE, J.; WANG, S.; GOLDMAN, S. A.; ZLOKOVIC, B. V.; ZHAO, Z.; JUNG, J. U. Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Deregulate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy. **Cell Stem Cell**, v. 19, n. 5, p. 663–671, nov. 2016.

LILJEQVIST, S.; STÅHL, S. Production of recombinant subunit vaccines: Protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines. **Journal of Biotechnology**, v. 73, n. 1, p. 1–33, 1999.

Lindenbach BD, Rice CM. Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res.* 59:23-61; 2003.

Lorenz IC, Allison SL, Heinz FX, Helenius A. Folding and dimerization of tickborne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum. *J Virol.* 76(11):5480-91; 2002.

MacNamara FN. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 48:139-145; 1954.

Malone, RW.; Homan, J; Callahan, MV.; et al. (2 March 2016). "Zika Virus: Medical Countermeasure Development Challenges". *PLOS Neglected Tropical Diseases***10** (3): e0004530. :10.1371/journal.pntd.0004530.ISSN

Maron, Dina Fine. "First Case of U.S. Transmission in Ongoing Zika Outbreak Announced in Texas". *Scientific American*. Retrieved 2016-02-03; 2016.

MAYR, L.; SU, B.; MOOG, C. Role of nonneutralizing antibodies in vaccines and/or HIV infected individuals. **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 12, n. 3, p. 209–215, maio 2017.

MILLIGAN, I. D.; GIBANI, M. M.; SEWELL, R.; CLUTTERBUCK, E. A.; CAMPBELL, D.; PLESTED, E.; NUTHALL, E.; VOYSEY, M.; SILVA-REYES, L.; MCEL RATH, M. J.; DE ROSA, S. C.; FRAHM, N.; COHEN, K. W.; SHUKAREV, G.; ORZABAL, N.; VAN DUIJNHOFEN, W.; TRUYERS, C.; BACHMAYER, N.; SPLINTER, D.; SAMY, N.; PAU, M. G.; SCHUITMAKER, H.; LUHN, K.; CALLENDRET, B.; VAN HOOFF, J.; DOUGUIH, M.; EWER, K.; ANGUS, B.; POLLARD, A. J.; SNAPE, M. D. Safety and Immunogenicity of Novel Adenovirus Type 26- and Modified Vaccinia Ankara-Vectored Ebola Vaccines: A Randomized Clinical Trial. **JAMA**, v. 315, n. 15, p. 1610–23, 19 abr. 2016.

Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 16, 2016. Vol 47, nº 20; 2016

Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de microcefalia no Brasil. Semana epidemiológica (SE) 22/2016 (29/05 A 04/06/2016). Informe Epidemiológico nº 29; 2016

MODJARRAD, K.; LIN, L.; GEORGE, S. L.; STEPHENSON, K. E.; ECKELS, K. H.; DE LA BARRERA, R. A.; JARMAN, R. G.; SONDERGAARD, E.; TENNANT, J.; ANSEL, J. L.; MILLS, K.; KOREN, M.; ROBB, M. L.; BARRETT, J.; THOMPSON, J.; KOSEL, A. E.; DAWSON, P.; HALE, A.; TAN, C. S.; WALSH, S. R.; MEYER, K. E.; BRIEN, J.; CROWELL, T. A.; BLAZEVIC, A.; MOSBY, K.; LAROCCA, R. A.; ABBINK, P.; BOYD, M.; BRICAULT, C. A.; SEAMAN, M. S.; BASIL, A.; WALSH, M.; TONWE, V.; HOFT, D. F.; THOMAS, S. J.; BAROUCH, D. H.; MICHAEL, N. L. Preliminary aggregate safety and immunogenicity results from three trials of a purified inactivated Zika virus vaccine candidate: phase 1, randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trials. **Lancet (London, England)**, v. 391, n. 10120, p. 563–571, 10 fev. 2018.

Murdin AD, Barreto L, Plotkin S. Inactivated poliovirus vaccine: past and present experience. *Vaccine*. 14(8):735-46; 1996.

Murrel S, Suh-Chin W, Michael B. Review of dengue virus and the development of a vaccine. *Biotechnology Advances*. 29: 239–247; 2011.

Musso, D; Nilles, E.J; Cao-Lormeau, V. M. Rapid spreading of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infection Diseases*, p. 1-5, 7; 2014

MUSO, D. et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Euro Surveill*, v. 19, n. 14, p. 1-3, 2014.

NELSON, C. S.; HUFFMAN, T.; JENKS, J. A.; CISNEROS DE LA ROSA, E.; XIE, G.; VANDERGRIFT, N.; PASS, R. F.; POLLARA, J.; PERMAR, S. R. HCMV glycoprotein B subunit vaccine efficacy mediated by nonneutralizing antibody effector functions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 24, p. 6267–6272, 12 jun. 2018.

ODEGARD, J. M.; FLYNN, P. A.; CAMPBELL, D. J.; ROBBINS, S. H.; DONG, L.; WANG, K.; TER MEULEN, J.; COHEN, J. I.; KOELLE, D. M. A novel HSV-2 subunit vaccine induces GLA-dependent CD4 and CD8 T cell responses and protective immunity in mice and guinea pigs. **Vaccine**, v. 34, n. 1, p. 101–109, 2 jan. 2016.

PARDI, N.; HOGAN, M. J.; PELC, R. S.; MURAMATSU, H.; ANDERSEN, H.; DEMASO, C. R.; DOWD, K. A.; SUTHERLAND, L. L.; SCEARCE, R. M.; PARKS, R.; WAGNER, W.; GRANADOS, A.; GREENHOUSE, J.; WALKER, M.; WILLIS, E.; YU, J.-S.; MCGEE, C. E.; SEMPOWSKI, G. D.; MUI, B. L.; TAM, Y. K.; HUANG, Y.-J.; VANLANDINGHAM, D.; HOLMES, V. M.; BALACHANDRAN, H.; SAHU, S.; LIFTON, M.; HIGGS, S.; HENSLEY, S. E.; MADDEN, T. D.; HOPE, M. J.; KARIKÓ, K.; SANTRA, S.; GRAHAM, B. S.; LEWIS, M. G.; PIERSON, T. C.; HAYNES, B. F.; WEISSMAN, D. Zika virus protection by a single low-dose nucleoside-modified mRNA vaccination. **Nature**, v. 543, n. 7644, p. 248–251, 9 fev. 2017.

Perera R, Kuhn RJ. "Structural proteomics of dengue virus". *Current Opinion in Microbiology* 11 (4): 369–77, 2008.

Pugachev KV, Guirakhoo F, Monath TP. New developments in flavivirus vaccines with special attention to yellow fever. *Curr Opin Infect Dis*. 18:387-94; 2005.

Putnak RJ, Collier BA, Voss G, Vaughn DW, Clements D, Peters I, Bignami G, Houngh HS, Chen RC, Barvir DA, Seriwatana J, Cayphas S, Garcon N, Gheysen D, Kanesa-Thanan N, McDonnell M, Humphreys T, Eckels KH, Prieels JP, Innis BL. An evaluation of dengue type-2 inactivated, recombinant subunit, and live-attenuated vaccine candidates in the rhesus macaque model. *Vaccine* 23(35):4442–4452; 2005.

Rey, F. A. et al. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature*, v. 375, n. 6529, p. 291-8, 25; 1995.

RICHNER, J. M.; HIMANSU, S.; DOWD, K. A.; BUTLER, S. L.; SALAZAR, V.; FOX, J. M.; JULANDER, J. G.; TANG, W. W.; SHRESTA, S.; PIERSON, T. C.; CIARAMELLA, G.; DIAMOND, M. S. Modified mRNA Vaccines Protect against Zika Virus Infection. **Cell**, v. 169, n. 1, p. 176, 23 mar. 2017.

Robinson HL, Pertmer TM; Pertmer. "DNA vaccines for viral infections: basic studies and applications". Adv. Virus Res. Advances in Virus Research55: 1–74; 2000.

Rodenhuis-Zybert IA, Wilschut J, Smith JM. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cell Mol Life Sci*. 67:2773-86; 2010.

Romero, Simon. "Alarm Spreads in Brazil Over a Virus and a Surge in Malformed Infants". The New York Times. Consult. 2015.

Rothman, Alan L. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nature Reviews*. 11: 532-543; 2011

RUEDL, C.; SCHWARZ, K.; JEGERLEHNER, A.; STORNI, T.; MANOLOVA, V.; BACHMANN, M. F. Virus-like particles as carriers for T-cell epitopes: limited inhibition of T-cell priming by carrier-specific antibodies. **Journal of virology**, v. 79, n. 2, p. 717–24, jan. 2005.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3ed. Cold Spring Harbor, New York, 2001.

SCHIJNS, V. E. Immunological concepts of vaccine adjuvant activity: Commentary. **Current Opinion in Immunology**, v. 12, n. 4, p. 456–463, 1 ago. 2000.

SCHLESINGER, J. J.; FOLTZER, M.; CHAPMAN, S. The Fc Portion of Antibody to Yellow Fever Virus NS1 Is a Determinant of Protection against YF Encephalitis in Mice. **Virology**, v. 192, n. 1, p. 132–141, jan. 1993.

Simmons M, Sun P, Putnak R. Recombinant Dengue 2 Virus NS3 Helicase Protein Enhances Antibody and T-Cell Response of Purified Inactivated Vaccine. PLoS ONE 11(4): e0152811; 2016. doi:10.1371/journal.pone.0152811

Sempala, S.D.K. "Seasonal population dynamics of the immature stages of *Aedes africanus* (Theobald) (Diptera: Culicidae) in Zika Forest, Uganda". Bulletin of Entomological Research. Cambridge University Press [S.l.] 73 (1): 11–18; 1983.

Sinha JK and Bhattacharya S. A Text Book of Immunology. Academic Publishers. p. 318. ISBN 978-81-89781-09-5; 2014.

TEBAS, P.; ROBERTS, C. C.; MUTHUMANI, K.; REUSCHEL, E. L.; KUDCHODKAR, S. B.; ZAIDI, F. I.; WHITE, S.; KHAN, A. S.; RACINE, T.; CHOI, H.; BOYER, J.; PARK, Y. K.; TROTTIER, S.; REMIGIO, C.; KRIEGER, D.; SPRUILL, S. E.; BAGARAZZI, M.; KOBINGER, G. P.; WEINER, D. B.; MASLOW, J. N. Safety and Immunogenicity of an Anti-Zika Virus DNA Vaccine — Preliminary Report. **New England Journal of Medicine**, p. NEJMoa1708120, 4 out. 2017.

Triunfol, M. "A new mosquito-borne threat to pregnant women in Brazil". The Lancet. Infectious diseases [S.l.: s.n.] 16 (2): 156; 2015.

Triunfol, Marcia. "A new mosquito-borne threat to pregnant women in Brazil". Lancet [S.l.: s.n.] 387 (10014): 96; 2016

Valdes, K. et al. Human dengue antibodies against structural and nonstructural proteins. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 7, 856–857; 2000.

VILLADANGOS, J. A.; SCHNORRER, P. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 7, p. 543–555, jul. 2007.

Vogel, Gretchen. "Fast-spreading virus may cause severe birth defects". Science News. AAAS. doi:10.1126/science.aad7527; 2015.

WAGNER, E. K.; HEWLETT, M. J.; BLOOM, D. C.; CAMERINI, D.. Basic Virology. 3. ed. Massachusetts: Wiley-Blackwell, 584 p; 2007.

Weaver, S. C; Vasilakis, N. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. Infection, genetics and evolution: Journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases, v. 9, n. 4, p. 523-40; 2009.

WINSLOW, R. L.; MILLIGAN, I. D.; VOYSEY, M.; LUHN, K.; SHUKAREV, G.; DOUGUIH, M.; SNAPE, M. D. Immune Responses to Novel Adenovirus Type 26 and Modified Vaccinia Virus Ankara–Vectored Ebola Vaccines at 1 Year. **JAMA**, v. 317, n. 10, p. 1075, 14 mar. 2017.

World Health Organization (WHO). Situation Report. Zika Virus, Microcephaly and Guillain-Barré Syndrome; 13 october 2016. Acesso em: (último acesso 14/10/2016)

Xu X., Vaughan K., Weiskopf D., Grifon A., Diamond M. S., Sette A., et al. Identifying candidate targets of immune responses in Zika virus based on homology to epitopes in other flavivirus species. *PLoS Curr.* 15 8; 2016.

YOON, K.-J.; SONG, G.; QIAN, X.; PAN, J.; XU, D.; RHO, H.-S.; KIM, N.-S.; HABELA, C.; ZHENG, L.; JACOB, F.; ZHANG, F.; LEE, E. M.; HUANG, W.-K.; RINGELING, F. R.; VISSERS, C.; LI, C.; YUAN, L.; KANG, K.; KIM, S.; YEO, J.; CHENG, Y.; LIU, S.; WEN, Z.; QIN, C.-F.; WU, Q.; CHRISTIAN, K. M.; TANG, H.; JIN, P.; XU, Z.; QIAN, J.; ZHU, H.; SONG, H.; MING, G. Zika-Virus-Encoded NS2A Disrupts Mammalian Cortical Neurogenesis by Degrading Adherens Junction Proteins. **Cell Stem Cell**, v. 21, n. 3, p. 349–358.e6, 7 set. 2017.

YOUN, S.; AMBROSE, R. L.; MACKENZIE, J. M.; DIAMOND, M. S. Non-structural protein-1 is required for West Nile virus replication complex formation and viral RNA synthesis. **Virology Journal**, v. 10, n. 1, p. 339, 18 nov. 2013.