

LENNON RAMOS PEREIRA

**Utilização de proteínas recombinantes do vírus Zika no
desenvolvimento de métodos de diagnóstico e aplicações vacinais**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2021

LENNON RAMOS PEREIRA

**Utilização de proteínas recombinantes do vírus Zika no
desenvolvimento de métodos de diagnóstico e aplicações vacinais**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira.

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2021

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Pereira, Lennon Ramos
Utilização de proteínas recombinantes do vírus Zika
no desenvolvimento de métodos de diagnóstico e
aplicações vacinais / Lennon Ramos Pereira;
orientador Luís Carlos de Souza Ferreira . -- São
Paulo, 2021.
250 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Virus Zika. 2. Diagnóstico. 3. Vacina. 4.
Proteína recombinante. 5. EDIII NS1. I. Ferreira ,
Luís Carlos de Souza , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Lennon Ramos Pereira

Título da Tese: Utilização de proteínas recombinantes do vírus Zika no desenvolvimento de métodos de diagnóstico e aplicações vacinais

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Utilização de proteínas recombinantes do vírus Zika no desenvolvimento de métodos de diagnóstico e aplicações vacinais*", registrado sob o protocolo nº **96/2016**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **14/09/2016** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Luis Carlos de Souza Ferreira**

- Departamento: *Microbiologia*

- Membros da Equipe: *Lennon Ramos Pereira (Pós-graduando), Sara Araujo Pereira (Pós-graduando), Robert Andreato Santos (Pós-graduando), Denicar Lina Nascimento Fabris (Pós-graduando), Aléxia Adrienne Venceslau Brito Carvalho (Estagiário), Samuel Santos Pereira (Estagiário), Beatriz Serafim Costacurta (Iniciação científica)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www.icb.usp.br/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Use of Zika virus recombinant proteins for development of diagnostic methods and vaccines*", protocol nº **96/2016**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **9/14/2016** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Luis Carlos de Souza Ferreira**

- Team members: *Lennon Ramos Pereira (Graduate Student), Sara Araujo Pereira (Graduate Student), Robert Andreato Santos (Graduate Student), Denicar Lina Nascimento Fabris (Graduate Student), Aléxia Adrienne Venceslau Brito Carvalho (Trainee), Samuel Santos Pereira (Trainee), Beatriz Serafim Costacurta (Undergraduate Student)*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Mus musculus</i>	<i>Balb-C</i>	<i>Macho/Male</i>	<i>6-8 semanas/weeks</i>	<i>550</i>

São Paulo, 19 de setembro de 2016.



Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA-ICB/USP



Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.147.2019

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado nº **96/2016/CEUA**, aprovado em 14/09/2016, aprovo a inclusão dos animais abaixo indicados ao Protocolo "**Utilização de proteínas recombinantes do vírus Zika no desenvolvimento de métodos de diagnóstico e aplicações vacinais**", de responsabilidade do Prof. Dr. **Luís Carlos de Souza Ferreira**, do Departamento de Microbiologia:

Espécie	Linhagem	Sexo	Idade ou peso	Quantidade
<i>Mus musculus</i>	C57BL/6	Fêmea	5-8 semanas	300

São Paulo, 10 de outubro de 2019.

Luciane Valéria Sita

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora da CEUA-ICB/USP



Cidade Universitária "Amando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone(11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA.040.2020

São Paulo, 12 de novembro de 2020.

Prezado(a) Professor(a),

Informo que o projeto intitulado: "**Utilização de proteínas recombinantes do vírus Zika no desenvolvimento de métodos de diagnóstico e aplicações vacinais**", registrado sob o protocolo nº **96/2016** e aprovado em 14/09/2016, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, foi **prorrogado até 20/05/2022**.

Autorizamos a prorrogação de vigência de licença, com a declaração de que não houve alteração da metodologia e das técnicas descritas na licença inicial para o uso de animais, e inclusão dos seguintes animais:

Espécie	Linhagem	Sexo	Idade ou peso	Quantidade
<i>Mus musculus</i>	AB6 (IFNAR1-/-)	Fêmea / macho	4-5 semanas/weeks	150

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA-ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Luciane Valéria Sita

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA-ICB/USP

Prof.(a) Dr.(a) **Luís Carlos de Souza Ferreira**
Docente do Departamento de Microbiologia - ICB USP

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Infeção de Camundongos pelo vírus Zika*", registrado sob o protocolo nº **22/2016**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **28/03/2016** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais tem validade de **04 (quatro) anos** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Luis Carlos de Souza Ferreira**

- Departamento: *Microbiologia*

- Membros da Equipe: *Sara Araujo Pereira (Pós-graduando), Denicar Lina Nascimento Fabris (Pós-graduando), Rúbens Prince dos Santos Alves (Pós-graduando), Lennon Ramos Pereira (Pós-graduando), Robert Andreata Santos (Pós-graduando), Mônica Josiane Rodrigues de Jesus (Pós-graduando)*

Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Infection of mice with Zika virus*", protocol nº **22/2016**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for scientific research purposes, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **3/28/2016** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **04 (four) years** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Luis Carlos de Souza Ferreira**

- Team members: *Sara Araujo Pereira (Graduate Student), Denicar Lina Nascimento Fabris (Graduate Student), Rúbens Prince dos Santos Alves (Graduate Student), Lennon Ramos Pereira (Graduate Student), Robert Andreata Santos (Graduate Student), Mônica Josiane Rodrigues de Jesus (Graduate Student)*

If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Mus musculus</i>	Balb/c	Fêmea/female	3-6 dias/days	640
	CS7bl/6	Fêmea/female	3-6 dias/days	640
	AG129	Fêmea/female	4-6 semanas/weeks	540

São Paulo, 30 de março de 2016.



Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP



Prof. Dr. Francemilson Goulart da Silva
Vice-Secretário CEUA-ICB/USP



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 07 de novembro de 2019.

PARECER 1454/CEPSH

CAAE nº 23074718.6.0000.5467

Protocolo CEPSH-ICB nº 1509/19

O Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB, em 29/10/2019, **APROVOU** o projeto intitulado: "**Utilização de proteínas recombinantes do vírus Zika no desenvolvimento de métodos de diagnóstico e aplicações vacinais**", dos pesquisadores: **Lennon Ramos Pereira e Luís Carlos de Souza Ferreira**.

Caberá aos pesquisadores, em conformidade com a Resolução CNS nº 466/2012: 1) elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final) conforme modelo constante no site: ww2.icb.usp.br/icb/cepsh; 2) desenvolver o projeto conforme metodologia apresentada; 3) manter em arquivo sob sua guarda (impresso ou digital), por até 5 anos após conclusão da pesquisa, toda documentação relacionada a pesquisa; 4) encaminhar os resultados para publicação; 5) justificar ao CEP, via Plataforma Brasil, interrupção do projeto ou a não publicação de resultados; 6) finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste projeto. O primeiro relatório deverá ser enviado, via Plataforma Brasil, até **29/10/2020**.

Atenciosamente,

Profa. Dra. **CAMILA SQUARZONI DALE**
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP



Uso de animais
para experimentação



DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que

Lennon Ramos Pereira

participou do Curso "Uso de Animais em Experimentação" com carga horária total de 10 horas, em formato ensino a distância, realizado pela Comissão de Biotérios do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 4 abril 2019
Comissão de Biotérios
ICB USP



Declaro, para os devidos fins, que

Lennon Ramos Pereira

concluiu o Curso "Armazenamento, Manuseio e Descarte de Produtos Químicos", realizado no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 30 janeiro 2018
(Declaração válida por 5 anos)

Helayne Freitas
Presidente da Comissão de Resíduos Químicos

Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt
Diretor do ICB



Certificado



Certificamos que **Lennon Ramos Pereira** participou do Treinamento em Biossegurança realizado no Departamento de Microbiologia/ICB-USP, no dia 28 de maio de 2013, com carga horária total de 8 horas.

Prof. Dr. Gabriel Padilla
Responsável pelo Treinamento

Veridiana Munford
Técnica Responsável pelo Treinamento

Dedico esse trabalho:

Aos meus pais Givaldo e Aurenice,
Por todo o amor, apoio, incentivo e exemplo.

Aos meus irmãos Odirley e Ismenio.

À minha família e amigos.

À Deus,

Por toda proteção e oportunidades abertas no
meu caminho, me mantendo forte mesmo
nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

Na ciência e na vida é muito mais difícil quando se caminha sozinho. A tese de doutorado apresentada aqui é fruto não só do meu esforço e dedicação, mas também de todas as pessoas que me ajudaram e colaboraram direta ou indiretamente para a concretização da mesma. Aqui registro meus sinceros agradecimentos:

À minha mãe Aurenice e ao meu pai Givaldo. Vocês sempre foram meu alicerce e base. Muito obrigado por sempre acreditarem em mim e por me motivar todos os momentos. Por toda base familiar exemplar, me mostrando que o sucesso vai muito além das conquistas materiais. Eu amo muito vocês! Aproveito e dedico essa tese especialmente ao meu pai, que apesar de não ter tido a oportunidade de celebrá-la comigo em corpo presente, hoje certamente está em festa no céu. Você sempre deixou claro o seu orgulho e apoio durante a construção desse trabalho.

Aos meus irmãos Ismenio e Odirley por todo apoio e incentivo. Nada faria sentido sem vocês!

A toda minha família e amigos da Bahia e São Paulo pelo amor, carinho, apoio e torcida de sempre. Especialmente a tia Elaine, tia Tico, tio Cecílio, tio José Carlos, tia Bene, tia Nete, tio Sérgio, tio Eribaldo, tio Antônio, Laerte, Sandra, Cléria, Ivânia (Nequinha), Rose, Nelito, Michele, Fernanda, Marcela, Joice, Jaqueline, Gisele, Luciano, Ailton, Gilmar, Jéssica (Kinha), Janderson (Dande), Odir (Júnior), Gerson (Gegel), Judson, Rafaela, Isabela, Priscila, Pedro, Lili, Hobby, Sabrina, Rodrigo, Hayssan, Raíza, Eduardo, Bruno Otílio e Renato. Aos meus avós Assis, Celice, Salustiano e Júlia. Amo todos vocês.

Ao Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira pelo privilégio em ser meu orientando e todos os ensinamentos transmitidos. Durante estes últimos oito anos de convivência aprendi muito com o senhor, não só no campo da ciência, mas também sobre a vida. Obrigado pelo exemplo de profissional extremamente dedicado, humano, humilde, compreensivo e competente. Agradeço também por sempre se preocupar comigo, me incentivando a perder os medos e seguir em frente apesar das adversidades da ciência.

À prof^a Dra. Rita Café pelo acolhimento no laboratório, conselhos, apoio, incentivo e momentos de distração. Muito obrigado.

Ao Prof^o Dr. Edison Luiz Durigon, à Dra. Danielle Oliveira e toda a equipe do Laboratório de Virologia Clínica e Molecular. Sem vocês grande parte desse trabalho não seria possível. Obrigado por todo apoio, parceria e conhecimentos transmitidos.

À profª Dra. Viviane Fongaro Botosso por toda ajuda na concretização deste trabalho e ensinamentos transmitidos. Sempre solícita e disposta a ajudar. Muito obrigado por tudo! Agradeço também toda a sua equipe de laboratório, especialmente à Ana Priscila.

À colaboração e ajuda da Profª Dra. Roxane Maria Fontes Piazza (Instituto Butantan) e sua equipe na produção de mAbs direcionados aos antígenos aqui estudados.

Ao Prof. Dr. Albert Ko (Instituto Gonçalo Moniz – Fiocruz, Bahia/Universidade de Yale) pelas amostras de soro humano gentilmente cedidas ao trabalho.

À colaboração da Profª Dra. Lígia Ely Morganti Ferreira Dias e seus alunos, especialmente, à Dra. Rosa Silva e a Cléide. Muito obrigado por toda a ajuda nos experimentos, pelos ensinamentos e disponibilidade.

À Profª Dra. Viviane Maimoni e a equipe do seu laboratório pela ajuda nos experimentos e toda experiência trocada. Em especial ao Sérgio e Alex.

Ao Dr. Paolo Marinho de Andrade Zanotto e seus alunos pela colaboração e soros cedidos ao trabalho.

À Dra. Jolanda M. Smit e a Dra. Izabela Rodenhuis-Zybert pela recepção, carinho, cuidado, orientação e todo conhecimento compartilhado durante meu estágio junto à University Medical Center Groningen. Também a toda equipe do Laboratório de Virologia Experimental, em especial aos amigos Vinit, Andres, Ellen, Nillima, Denise, Heidi, Berit, Bram, Milena e Shipeng.

À professora Sílvia Beatriz Boscardin e toda equipe de seu laboratório, em especial à Bianca, Fernando, Higo e Márcio.

Aos técnicos Eduardo Gimenes, Carolina Bertelli e Maria do Carmo por toda a ajuda e amizade, sendo indispensáveis à realização deste projeto. Muito obrigado!!!

Aos funcionários dos Departamentos de Microbiologia e Parasitologia do ICB/USP. Especialmente à Gisele, Renato e Juliane por todo apoio e amizade.

Aos meus queridos colegas e amigos do LDV, com os quais compartilhei conhecimento, alegrias, conquistas e angústias. Muito obrigado por tudo!!! Vocês tornaram essa caminhada mais fácil e prazerosa. Jamais esquecerei os momentos compartilhados e todo apoio recebido. Não chegaria até aqui sem a ajuda de todos vocês!!! Em especial aos amigos Deni, Sara (Sarajane), Aléxia, Samuel, Fernanda, Natiely, Mariângela, Jamile, Hélic, Dalva, Robert, Rúbens, Mônica, Marianna, Fagner, Lukas, Naiara, Sarinha, Karine, Pati (Sem limites), Tácita, Luana, Bruna, Carol Moreno, Mari

Cintra, Éric, Samantha, Guilherme, Mariana Diniz e Ewerton. Espero compartilhar dessa amizade hoje e sempre. Contem comigo!

A todos os meus professores pelo conhecimento transmitido ao longo da vida. Obrigado por cada peça somada neste caminho.

À Deus por me permitir chegar até aqui e me amparar em todos os momentos.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento dessa pesquisa (processos N° 2016/05570-8 e 2019/18205-4).

“Procure ser uma pessoa de valor,
em vez de procurar ser uma pessoa
de sucesso. O sucesso é
consequência.”

Albert Einstein

Este trabalho foi realizado sob orientação do Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira, no Centro de Vacinas e Terapia Gênica (CEVAT – GENE 4), no Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), sob os processos número 2016/ 05570-8 e 2019/18205-4.

RESUMO

PEREIRA, L. R. **Utilização de proteínas recombinantes do vírus Zika no desenvolvimento de métodos de diagnóstico e aplicações vacinais.** [Tese (Microbiologia)]. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2021.

A infecção pelo vírus Zika (ZIKV) tem caráter agudo e autolimitado. Entretanto, parte dos indivíduos infectados apresentam manifestações neurológicas graves incluindo, a Síndrome de Guillain-Barré e a Síndrome Congênita do Zika (CZS). Apesar de mais de 70 anos de estudo, não existem métodos terapêuticos ou profiláticos específicos para o ZIKV. Além disso, a elevada similaridade antigênica entre o ZIKV e outros arbovírus torna imprescindível o estabelecimento de ensaios sorológicos que permitam diferenciar efetivamente a infecção prévia por estes vírus. Neste contexto, o presente projeto teve por objetivo obter e avaliar a especificidade sorológica e potencial vacinal de formas recombinantes do domínio III da proteína do envelope (EDIII ZIKV) e da proteína não estrutural 1 do ZIKV (NS1 ZIKV). As proteínas recombinantes propostas foram expressas em sistema procarioto, purificadas e validadas quanto à preservação da antigenicidade. Adicionalmente, um fragmento da proteína NS1 ZIKV, denominado Δ NS1 ZIKV, foi desenhado por análise computacional com base na reduzida homologia de sequência e estrutural comparada à região correspondente da NS1 de DENV1-4. Uma vez obtidas, as proteínas foram utilizadas como antígenos de fase sólida na padronização de protocolos de ELISA visando a detecção específica de anticorpos IgG anti-ZIKV. Os resultados obtidos demonstraram que a implementação da proteína Δ NS1 ZIKV, mas não da EDIII ZIKV, reduziu significativamente a detecção de anticorpos de reatividade cruzada direcionados a outros *Flavivirus*, em especial ao DENV. Além disso, a especificidade observada foi correlacionada com a presença de epítomos conformacionais termolábeis na Δ NS1 ZIKV. Diante dos resultados promissores, o protocolo de ELISA baseado na proteína Δ NS1 ZIKV (ELISA ZIKA-v IgG) foi adaptado e transposto para condições de um kit comercial em uma parceria público-privada. A validação do ELISA ZIKA-v IgG frente a painel de soro humano demonstrou especificidade e sensibilidade de 94,12% e 90,7%, respectivamente, para o qual a comercialização foi aprovada pela ANVISA. Além disso, formulações vacinais baseadas nas proteínas NS1 e EDIII ZIKV, em associação com diferentes adjuvantes (Alum, LT-B ou Poly [I:C]), foram testadas em modelo murino. Embora imunogênicas, as mesmas não foram capazes de conferir imunidade protetora frente ao ZIKV. Por fim, utilizamos de forma inédita uma estratégia de vacina de DNA (pgDNS1-ZIKV) baseada na expressão da proteína NS1 ZIKV geneticamente fusionada à glicoproteína D do vírus Herpes Simplex Tipo I (gD HSV-1). Interessantemente, esta abordagem foi capaz de melhorar a indução de respostas imunológicas humorais e celulares NS1-específicas, bem como aumentou a eficácia protetora frente à infecção pelo ZIKV. Assim, com o conhecimento gerado a partir desse trabalho esperamos contribuir para o melhoramento dos métodos de sorodiagnóstico e as estratégias vacinais baseadas em vacinas de DNA direcionadas ao ZIKV.

Palavras-chave: Vírus Zika. Diagnóstico. Vacina. Proteína recombinante. EDIII. NS1.

ABSTRACT

PEREIRA, L. R. **Use of Zika virus recombinant proteins for development of diagnostic methods and vaccines.** [Thesis (Microbiology)]. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2021.

Zika virus (ZIKV) infection is acute and self-limited. However, some infected individuals have severe neurological manifestations, including Guillain-Barré Syndrome and Congenital Zika Syndrome (CZS). Despite more than 70 years of studies, there are no specific therapeutic or prophylactic methods for ZIKV. In addition, the high antigenic similarity among ZIKV and other arboviruses makes it essential to establish serological tests that can effectively differentiate previous infection by these viruses. In this context, this project aimed to obtain and evaluate the serological specificity and vaccine potential of recombinant forms of the domain III envelope protein (ZIKV EDIII) and non-structural protein 1 of ZIKV (ZIKV NS1). Thus, the proposed recombinant proteins were expressed in a prokaryote system, purified and validated for preservation of antigenicity. Additionally, a fragment of the ZIKV NS1 protein, termed ZIKV Δ NS1, was designed by computational analysis based on sequence and structural homology compared to the corresponding region of NS1 of DENV1-4. The obtained proteins were used as solid phase antigens in the standardization of ELISA protocols aiming at the specific detection of IgG anti-ZIKV antibodies. The obtained results demonstrated that the implementation of the Δ NS1 ZIKV protein, but not the EDIII ZIKV, significantly reduced the detection of cross-reactive antibodies directed to other Flaviviruses, especially to DENV. Furthermore, the observed specificity was correlated with the presence of thermolabile conformational epitopes in the ZIKV Δ NS1. Given the promising results, the ELISA protocol based on the ZIKV Δ NS1 protein (ELISA ZIKA-v IgG) was adapted and transposed to conditions of a commercial kit in a public-private partnership. The validation of the ZIKA-v IgG ELISA against a human serum panel showed specificity and sensitivity of 94.12% and 90.7%, respectively, for which the marketing was approved by ANVISA. Furthermore, vaccine formulations based on ZIKV NS1 and EDIII proteins, in association with different adjuvants (Alum, LT-B or Poly [I:C]), were tested in a murine model. Although immunogenic, they were not able to provide protective immunity against ZIKV infection. Finally, we used a novel DNA vaccine strategy (pgDNS1-ZIKV) based on the expression of the ZIKV NS1 protein genetically fused to the glycoprotein D of the Herpes Simplex virus Type I (gD HSV-1). Interestingly, this approach was able to improve the induction of NS1-specific humoral and cellular immune responses, as well as increasing the protective efficacy against ZIKV infection. Thus, with the knowledge generated from this work, we hope to contribute to the improvement of serodiagnostic methods and vaccine strategies based on DNA vaccines for the ZIKV.

Keywords: Zika virus. Diagnosis. Vaccine. Recombinant protein. EDIII. NS1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura, organização genômica e homologia do ZIKV e outros Flavivirus.	35
Figura 2. Teste de expressão da proteína NS1 ZIKV na linhagem de <i>E. coli</i> BL21(DE3)-RIL.	71
Figura 3. Teste de expressão da proteína NS1 ZIKV e lise da massa bacteriana induzida em diferentes tampões.	71
Figura 4. Purificação da proteína NS1 ZIKV e avaliação após diálise.	73
Figura 5. Avaliação da antigenicidade da proteína NS1 ZIKV.	74
Figura 6. Avaliação da solubilização sob alta pressão hidrostática de corpos de inclusão contendo a proteína NS1 ZIKV.	77
Figura 7. Avaliação do enovelamento proteico de IBs tratados com HHP em associação com pH alcalino e Arginina.	79
Figura 8. Calibração da coluna de exclusão molecular Superdex 200 10/300.	80
Figura 9. Avaliação da formação de oligômeros em NS1-IBs solubilizados pela aplicação de HHP em pH alcalino.	81
Figura 10. Avaliação da recuperação da proteína NS1 ZIKV a partir de IBs solubilizados com HPP.	82
Figura 11. Avaliação da antigenicidade da proteína NS1 ZIKV renaturada por HHP em pH alcalino.	83
Figura 12. Análise conformacional da proteína NS1 ZIKV.	83
Figura 13. Determinação de epítomos de células B lineares ou conformacionais e homologia da proteína NS1 ZIKV.	86
Figura 14. Teste de expressão da proteína Δ NS1 ZIKV em linhagens de <i>E. coli</i>	88
Figura 15. Purificação da proteína Δ NS1 ZIKV.	89
Figura 16. Análise da antigenicidade e imunogenicidade da proteína Δ NS1 ZIKV.	92
Figura 17. Expressão das proteínas Δ NS1 do vírus dengue de sorotipos 1, 2, 3 e 4.	94
Figura 18. Purificação das proteínas Δ NS1 do vírus dengue de sorotipos 1, 2, 3 e 4. ...	96
Figura 19. Análise da antigenicidade das proteínas Δ NS1 do vírus dengue de sorotipos 1, 2, 3 e 4.	97
Figura 20. Expressão da proteína recombinante EDIII ZIKV em diferentes linhagens de <i>E. coli</i>	104
Figura 21. Otimização da expressão da proteína EDIII ZIKV na linhagem <i>E. coli</i> BL21 (DE3).	105

Figura 22. Purificação da proteína recombinante EDIII ZIKV por cromatografia de afinidade.	107
Figura 23. Avaliação da antigenicidade da proteína EDIII ZIKV obtida a partir da fração solúvel do extrato bacteriano.	108
Figura 24. Diálise da proteína EDIII ZIKV para tampão PBS após renaturação <i>in vitro</i> utilizando alta pressão hidrostática.	109
Figura 25. Purificação da proteína EDIII ZIKV obtida sob HHP.	111
Figura 26. Avaliação da antigenicidade da proteína EDIII ZIKV obtida em diferentes condições de renaturação <i>in vitro</i>	112
Figura 27. Avaliação da atividade biológica da proteína EDIII ZIKV.	113
Figura 28. Desenho, expressão e purificação da proteína Δ EDIII ZIKV.	114
Figura 29. Avaliação da antigenicidade e atividade biológica da proteína Δ EDIII ZIKV.	115
Figura 30. Avaliação da reatividade da proteína Δ NS1 ZIKV frente a soros monoespecíficos para diferentes flavivirus.	120
Figura 31. Avaliação da especificidade sorológica da proteína Δ NS1 ZIKV utilizando amostras de humano.	122
Figura 32. Avaliação da adsorção prévia de amostras de soros com as proteínas Δ NS1 de DENV.	124
Figura 33. Avaliação da especificidade e sensibilidade do teste de ELISA baseado na proteína Δ NS1 ZIKV.	126
Figura 34. Avaliação da capacidade de ligação do mAb 4H2 à proteína NS1 ZIKV nativa.	128
Figura 35. Padronização do ensaio de imunofluorescência utilizando o mAb 4H2.	129
Figura 36. Avaliação da especificidade do anticorpo monoclonal 4H2 frente a células Vero infectados com o DENV2.	130
Figura 37. Avaliação da reatividade da proteína EDIII ZIKV frente a soros de camundongos previamente infectados pelo DENV.	132
Figura 38. Avaliação do teste de ELISA baseado na proteína EDIII ZIKV com painel de soros humanos.	133
Figura 39. Determinação da resposta de IgG antígeno-específica induzida por formulações vacinais baseadas nas proteínas EDIII ZIKV.	139
Figura 40. Determinação da resposta de IgG antígeno-específica induzida por formulações vacinais baseadas no ZIKV inativado.	141

Figura 41. Determinação da resposta de IgG NS1-específica induzida na linhagem de camundongo imunocompetente C57BL/6.	144
Figura 42. Ativação de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ antígeno-específico nos animais C57BL/6 imunizados.	146
Figura 43. Mortalidade dos animais da linhagem AG129 infectados com diferentes doses do ZIKV.	148
Figura 44. Acompanhamento do peso dos animais da linhagem AG129 infectados com diferentes doses do ZIKV.	148
Figura 45. Avaliação da viremia nos animais AG129 infectados com o ZIKV.	149
Figura 46. Determinação da resposta de IgG NS1-específica induzida na linhagem de camundongo AG129.	151
Figura 47. Ativação de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ antígeno-específico nos animais AG129 imunizados.	152
Figura 48. Avaliação da viremia nos animais AG129 imunizados com a proteína NS1 ZIKV e desafiados com o ZIKV.	154
Figura 49. Avaliação da viremia nos animais AG129 imunizados com a proteína ΔNS1 ZIKV e desafiados com o ZIKV.	155
Figura 50. Avaliação da morbidade dos animais AG129 imunizados e desafiados.	156
Figura 51. Avaliação da mortalidade e perda de peso dos animais AG129 imunizados e desafiados.	157
Figura 52. Construção dos plasmídeos que codificam para a proteína NS1 ZIKV.	158
Figura 53. Expressão da proteína NS1 ZIKV isolada ou fusionada à proteína gD HSV-1.	159
Figura 54. Avaliação da expressão da proteína gD em células de mamífero transfectadas.	160
Figura 55. Avaliação da resposta imune humoral induzida pelas formulações em camundongos imunocompetentes C57BL/6.	161
Figura 56. Validação da atividade estimuladora dos peptídeos restritos a MHC-I desenhados com base na proteína NS1 ZIKV.	163
Figura 57. Análise da resposta imunológica celular induzida nos camundongos imunocompetentes vacinados.	164
Figura 58. Avaliação da resposta imune e imunidade protetora induzida pelas vacinas de DNA em camundongos imunodeficientes.	165

Figura 59. Avaliação da imunidade protetora induzida pelas vacinas de DNA que codificam para NS1 ZIKV..... 167

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Peptídeos sintéticos baseados na proteína NS1 ZIKV.....	46
Tabela 2. Características das proteínas recombinantes e condições de expressão em <i>E. coli</i>	48
Tabela 3. Composição dos tampões utilizados na obtenção das proteínas recombinantes.....	51
Tabela 4. Tampões utilizados nos testes de renaturação proteica sob alta pressão hidrostática.....	52
Tabela 5. Otimização das soluções utilizadas no teste de ELISA baseado na proteína Δ NS1 ZIKV.....	56
Tabela 6. Amostras de soro ou ascites murinas utilizadas no trabalho.	57
Tabela 7. Distribuição das amostras de soro humano obtidas de estudos de coorte.	58
Tabela 8. Epítomos conformacionais identificados na região C-Terminal da proteína NS1 ZIKV.....	87
Tabela 9. Distribuição dos resultados obtidos das amostras testadas na validação do teste de ELISA baseado na proteína Δ NS1 ZIKV.	125
Tabela 10. Comparação dos resultados do teste de ELISA com a metodologia considerada padrão – PRNT ₉₀	126
Tabela 11. Parâmetros do teste de ELISA baseado na proteína Δ NS1 ZIKV.	127
Tabela 12. Avaliação da capacidade de neutralização viral dos soros dos animais imunizados.....	140
Tabela 13. Avaliação da capacidade de neutralização viral dos soros dos animais imunizados com piZIKV.	142

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
ADE	<i>Antibody-Dependent Enhancement</i> (Aumento mediado de anticorpo)
ADCC	Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity (Citotoxicidade celular mediada por anticorpo)
Arg	Arginina
Alum	Hidróxido de Alumínio
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (Análise de Variância simples)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
aa	Aminoácidos
CD4 ⁺	<i>Cluster of differentiation 4⁺</i> (grupo de diferenciação 4)
CD8 ⁺	<i>Cluster of differentiation 8⁺</i> (grupo de diferenciação 8)
CZS	<i>Congenital Zika Syndrome</i> (Síndrome Congênita do vírus Zika)
DC	Células Dendríticas
DENV	<i>Dengue virus</i> (vírus da dengue)
DENV1	Sorotipo 1 do vírus da dengue
DENV2	Sorotipo 2 do vírus da dengue
DENV3	Sorotipo 3 do vírus da dengue
DENV4	Sorotipo 4 do vírus da dengue
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DO	Densidade óptica
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (ensaio imunabsorvente ligado à enzima)
EIII	Domínio III da glicoproteína E
NHP	Primates não humanos

ICS	<i>Intracellular cytokine staining</i> (Marcação intracelular de citocinas)
IL	Interleucina
i.p	Intraperitoneal
INF γ	<i>Interferon gamma</i> (interferon gama)
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Subclasse tipo 1 de imunoglobulina G
IgG2a	Subclasse tipo 2a de imunoglobulina G
IgG2c	Subclasse tipo 2c de imunoglobulina G
IPTG	<i>Isopropyl β-D-1 thiogalactopyranoside</i>
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
MDA5	<i>Melanoma Differentiation-Associated protein 5</i> (Proteína 5 associada-Diferenciação Melanoma)
MHC I	<i>Major histocompatibility complex class I</i> (complexo maior de histocompatibilidade tipo I)
MHC II	<i>Major histocompatibility complex class II</i> (complexo maior de histocompatibilidade tipo II)
mNS1	Proteína Não estrutural 1 na forma dimérica
NS1	<i>Non structural protein 1</i> (Proteína não estrutural 1)
nAb	Anticorpos neutralizantes
OPD	<i>o-Phenylenediamine dihydrochloride</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Tampão fosfato-salino)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
piZIKV	Partículas inativadas do vírus Zika
PMSF	<i>Phenylmethanesulfonyl fluoride</i>
Poly (I:C)	<i>Polyinosinic:polycytidylic acid</i>
RE	Retículo endoplasmático

RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
ROC	<i>Operating Characteristic Curve</i>
SFB	Soro fetal bovino
sNS1	Proteína Não estrutural 1 na forma hexamérica
TB	Meio de cultura <i>Terrific Broth</i>
Th1	<i>Cells T helper</i> (células T auxiliaadoras 1)
Th2	<i>Cells T helper</i> (células T auxiliaadoras 2)
TLR3	<i>Toll-like receptor 3</i> (receptor do tipo toll 3)
TA	Temperatura ambiente
Trp	Triptofano
UFP	Unidade formadora de placa
ZIKV	<i>Zika virus</i> (vírus Zika)
Δ NS1	Fragmento C-terminal da proteína Não estrutural 1

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
cm	Centímetro
g	<i>G-Force</i> (Força centrífuga relativa [RCF] ou força gravitacional)
kDa	Kilodalton
h	Hora
l	Litro
M	Molar
mM	Milimolar
mg	Miligramma
mg/ml	Miligramma/mililitro
Min.	Minuto
ml	Mililitro
nM	Nanomolar
pH	Potencial de hidrogênio
pb	Pares de bases
psi	<i>Pound force per square inch</i> (libra força por polegada quadrada)
rpm	<i>Rotation per minute</i> (Rotação por minuto)
μl	Microlitro
μg/μl	Microgramma/microlitro
μm	Micrometro
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	33
1.1. O vírus Zika.....	33
1.2. A resposta imunológica adaptativa contra o ZIKV: impacto no desenvolvimento de vacinas e ensaios diagnósticos.....	35
1.3. Diagnóstico laboratorial do ZIKV.....	37
1.4. Estratégias vacinais contra o ZIKV.....	39
2. OBJETIVOS.....	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
3.1. Comitê de ética.....	44
3.2. Amplificação e preparo de estoque viral.....	44
3.3. Linhagens celulares.....	45
3.4. Análises de bioinformática.....	45
3.5. Clonagem e obtenção dos vetores plasmidiais.....	47
3.5.1. Plasmídeos para expressão proteica em sistema procarioto.....	47
3.5.2. Vacinas de DNA.....	47
3.6. Expressão das proteínas recombinantes em sistema procarioto.....	47
3.7. Transfecção de células HEK-293T.....	49
3.8. Purificação das proteínas recombinantes.....	49
3.9. Renaturação <i>in vitro</i> das proteínas NS1 e EDIII ZIKV por HHP.....	51
3.10. Avaliação da fluorescência intrínseca do triptofano e dispersão de luz de IBs contendo NS1 ZIKV.....	52
3.11. Avaliação de oligômeros da proteína NS1 ZIKV.....	53
3.12. Dicroísmo circular (CD).....	53
3.13. Purificação do ZIKV e obtenção de pZIKV.....	53
3.14. ELISA.....	54
3.14.1. Versão <i>in house</i>	54
3.14.2. Versão Otimizada.....	55
3.14.3. Avaliação do protocolo de ELISA estabelecido <i>in house</i>	56

3.14.4.	Validação do protocolo otimizado de ELISA ZIKA-v IgG.....	58
3.15.	<i>Western blot</i>	58
3.16.	Procedimento de imunização	59
3.16.1.	Formulações vacinais baseadas em proteínas recombinantes purificadas..	59
3.16.2.	Formulações vacinais baseadas em vetores plasmidiais.	60
3.17.	Ensaio de citometria de fluxo.	61
3.17.1.	Avaliação do reconhecimento da proteína NS1 ZIKV nativa por soros anti- Δ NS1 ZIKV e mAb 4H2.	61
3.17.2.	Detecção da proteína NS1 ZIKV em células transfectadas.	61
3.17.3.	Marcação intracelular de citocinas.	61
3.18.	Ensaio de Desafio	63
3.18.1.	Infecção de camundongos AG129 com ZIKV.....	63
3.18.2.	Desafio de animais AB6 imunizados com as vacinas de DNA.	63
3.19.	ELISpot.....	64
3.20.	Imunofluorescência.	64
3.20.1.	Caracterização da especificidade do monoclonal anti-NS1 4H2.	64
3.20.2.	Detecção da proteína NS1 ZIKV em células tranfectadas.....	65
3.21.	RT-PCR	65
3.22.	Titulação viral e PRNT.....	66
3.23.	Análises estatísticas	67
4.	RESULTADOS	69
4.1.	CAPÍTULO I. Desenho e obtenção de antígenos recombinantes baseados na proteína NS1 ZIKV.....	69
4.1.1.	Expressão, purificação e validação antigênica da proteína NS1 ZIKV.	70
4.1.2.	Otimização da obtenção da proteína NS1 ZIKV utilizando a tecnologia de renaturação <i>in vitro</i> sob pressão hidrostática.....	74
4.1.3.	Análise de bioinformática e desenho do antígeno Δ NS1 ZIKV.	84
4.1.4.	Obtenção das proteínas recombinantes Δ NS1 ZIKV e Δ NS1 DENV (sorotipos 1-4).....	87

4.1.5.	Discussão Parcial.....	98
4.2.	CAPÍTULO II. Desenho e obtenção dos antígenos recombinantes baseados na proteína EDIII ZIKV.....	103
4.2.1.	Expressão e purificação da proteína EDIII ZIKV.	103
4.2.2.	Obtenção da proteína EDIII ZIKV por técnica de renaturação <i>in vitro</i> utilizando HHP.	109
4.2.3.	Desenho e obtenção da proteína Δ EDIII ZIKV.....	113
4.2.4.	Discussão Parcial.....	116
4.3.	CAPÍTULO III. Avaliação da especificidade sorológica das proteínas EDIII e NS1 ZIKV.	118
4.3.1.	Padronização de um protocolo de ELISA baseado na proteína Δ NS1 ZIKV.	118
4.3.2.	Avaliação da especificidade do monoclonal 4H2 direcionado ao antígeno Δ NS1 ZIKV.....	127
4.3.3.	Avaliação da especificidade sorológica da proteína EDIII ZIKV.	131
4.3.4.	Discussão Parcial.....	133
4.4.	CAPÍTULO IV. Avaliação do potencial vacinal dos antígenos recombinantes baseados nas proteínas EDIII e NS1 do ZIKV.	138
4.4.1.	Avaliação de formulações vacinais baseadas na proteína EDIII ZIKV.	138
4.4.2.	Avaliação da imunogenicidade e capacidade protetora de formulações vacinais baseadas na proteína NS1 ZIKV.	142
4.4.3.	Desenho e avaliação da imunogenicidade e eficácia protetora de vacinas de DNA baseadas na proteína NS1 ZIKV.	157
4.4.4.	Discussão Parcial.....	167
5.	CONCLUSÕES.....	176
	REFERÊNCIAS.....	178
	APÊNDICES E ANEXOS.....	200

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. O vírus Zika.

O vírus Zika (ZIKV) pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, o qual apresenta parentesco evolutivo com outros vírus emergentes de importância médica da mesma família como o vírus da dengue (DENV), vírus da febre amarela (YFV), vírus da encefalite japonesa (JEV) e o vírus do Nilo Ocidental (WNV) (1). O ZIKV foi identificado pela primeira vez em 1947 a partir de amostras de sangue obtidas de macacos *Rhesus* sentinelas mantidos na Floresta Zika em Uganda, África. A primeira infecção por ZIKV em humanos foi registrada na década de 60 também em Uganda (2–4), sendo que uma nova linhagem, diferente da africana, foi descrita subsequentemente na Ásia em 1983. Desde então duas linhagens do ZIKV são oficialmente conhecidas, sendo elas a Africana e Asiática. Estas causaram epidemias pontuais em diferentes regiões do mundo, abrangendo principalmente a África, Ásia e Américas (5).

As principais epidemias documentadas ocorreram na Micronésia (2007), Polinésia Francesa (2007, 2013 e 2014) e, mais recentemente, no Brasil (2015) (5–11). Esta última levou a Organização Mundial da Saúde (OMS) decretar estado de emergência pública mundial em 2016 (7,12–14). Além disso, infecções por este vírus também foram registradas em regiões não endêmicas, as quais decorreram a partir de viajantes que foram infectados em locais onde o vírus circula (15,16). Assim, estima-se que cerca de 1,5 milhões de pessoas já foram infectadas pelo ZIKV em mais de 70 países. No Brasil cerca de 3.563 casos da Síndrome Congênita do Zika (CZS) foram confirmados entre 2015 e 2020 (5,17). Entretanto, apesar da sua importância médica e o esforço da comunidade científica, não existem métodos terapêuticos ou profiláticos específicos ao ZIKV disponíveis. Além disso, o eminente risco de surgimento de novos surtos torna imprescindível o estabelecimento de ensaios sorológicos que permitam monitorar a prevalência do vírus na população de forma eficiente.

O ciclo de transmissão natural do ZIKV envolve principalmente vetores artrópodes do gênero *Aedes* (*A. aegypti*, *A. albopictus*, *A. africanus*, etc.) e primatas não-humanos, em ambiente silvestre (18,19). De forma semelhante, a transmissão do ZIKV ao homem se faz pela picada de mosquitos fêmeas do gênero *Aedes* previamente infectadas, ocorrendo principalmente em ambientes urbanos. Além disso, vias alternativas de infecção pelo ZIKV foram descritas, incluindo, a transmissão vertical intrauterina (infecção congênita) (20), transmissão sexual (21,22) ou por transfusão sanguínea (12,23). Após contato por uma destas vias, a replicação inicial deste vírus no corpo humano ocorre em células permissivas da pele

ou mucosas, como macrófagos e células dendríticas (2). Ao atingir a corrente sanguínea o vírus pode então se disseminar por todo o corpo, infectando diversos órgãos e tecidos. Embora a maior parte dos indivíduos infectados pelo ZIKV sejam assintomáticos, após o período de incubação viral no corpo (7 a 10 dias), cerca de 20-25% dos afetados apresentam alguma sintomatologia (5). As principais manifestações clínicas desta virose inclui o aparecimento de febre, rupturas cutâneas (rash), conjuntivite, dor de cabeça e nos olhos, entre outras (1). Por outro lado, apesar desta infecção ter carácter agudo e autolimitado, alguns casos apresentam complicações neurológicas severas que podem acarretar em sequelas permanentes ou temporárias, bem como o óbito dos indivíduos (24). Dentre as implicações neurológicas relacionadas ao ZIKV destacam-se a Síndrome de Guillain-Barré e a Síndrome Congênita do Zika (CZS) (25). Esta última abrange diversas anormalidades neurológicas que ocorrem em crianças que foram expostas ao ZIKV durante o período de gestação, especialmente a microcefalia.

O ZIKV apresenta genoma constituído de um RNA de fita simples (~10.7 kb) com orientação positiva. Este é envolto por um capsídeo circundado por envelope viral lipídico (Figura 1A) (26). O RNA viral codifica para uma poliproteína que, após clivagem por proteases virais e do hospedeiro durante o ciclo de replicação viral, resulta em três proteínas estruturais que constituem a partícula viral (Capsídeo, C; precursora de Membrana, prM e Envelope, E), e sete proteínas não estruturais que estão envolvidas na replicação do genoma viral e evasão ao sistema imunológico (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) (Figura 1B) (18,27). Eletromicrografias demonstram que os vírions deste patógeno apresentam simetria icosaédrica, de aproximadamente 70 nm de diâmetro, tendo em sua superfície uma bicamada lipídica contendo as proteínas M e E dispostas em dímeros (Figura 1A) (28,29). Esta última é responsável pelo tropismo viral, a qual permite a interação com receptores celulares incluindo os da família de lectinas do tipo-C, como o DC-SIGN/CD209, bem como outros receptores do tipo TIM (do inglês, T-cell immunoglobulin mucin) ou tirosinas quinases TAM (do inglês, TYRO3, AXL and MER) (30). Arelado a isso, uma grande variedade de células demonstrou ser permissiva à infecção pelo ZIKV, incluindo, células do sistema nervoso central ou periférico (células-tronco neurais, células precursoras de oligodendrócitos, células da crista neural craniana, neurônios e astrócitos), células placentárias (trofoblastos), células do sistema imunológico (macrófagos: micróglia e células de Hofbauer; células dendríticas), bem como células endoteliais (31–33).

Conforme supracitado, a infecção em nível celular se inicia pela interação da proteína E do ZIKV com receptores da célula hospedeira. Este processo permite então a adsorção e

INTRODUÇÃO

consequente endocitose das partículas virais. Em ambiente ácido endossomal, a proteína E sofre uma reorganização conformacional, propiciando a fusão da membrana endossomal ao envelope viral (34). Este fenômeno tem como resultado a liberação do capsídeo viral contendo o RNA genômico no citoplasma da célula hospedeira. Após dissociação do capsídeo, o genoma viral pode ser traduzido de forma acoplada ao retículo endoplasmático (RE), dando origem à poliproteína citada anteriormente. Esta última, após processamento por proteases virais e celulares, dá origem as proteínas estruturais utilizadas na montagem de novas partículas, enquanto as proteínas não estruturais promovem a replicação do RNA viral, especialmente as proteínas NS5 (atividade RNA polimerase RNA-dependente e Metiltransferase) (35,36) e NS3 (atividade helicase) (37). Por fim, com as proteínas sintetizadas e o material genético replicado, procede-se então a morfogênese viral, com posterior liberação de partículas maduras infectantes.

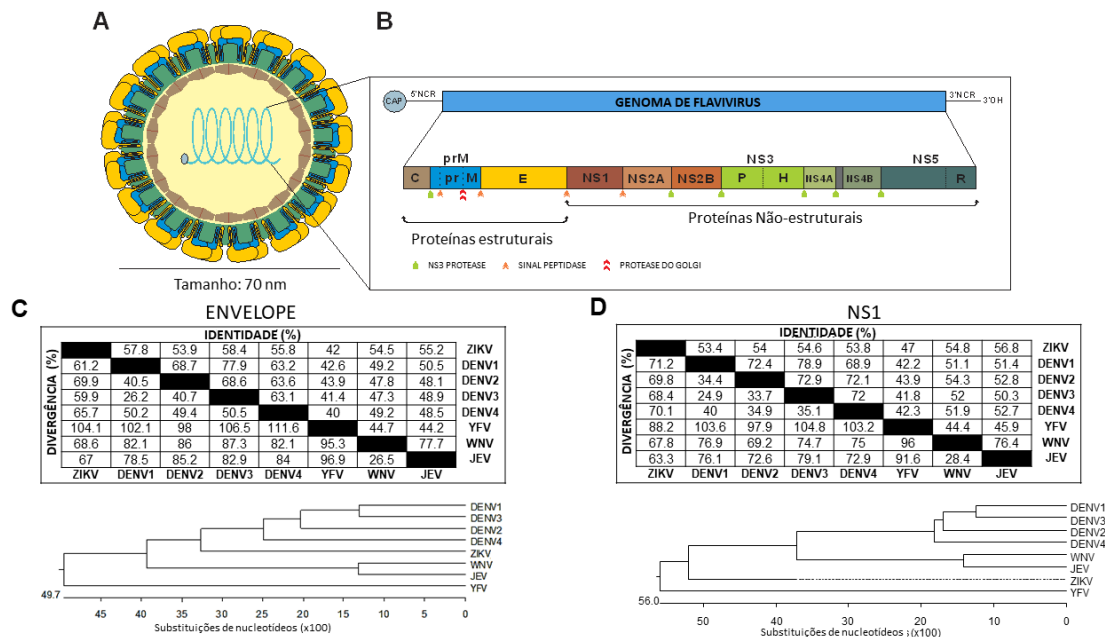


Figura 1. Estrutura, organização genômica e homologia do ZIKV e outros Flavivirus. (A) Representação esquemática da estrutura das partículas do ZIKV. (B) Representação esquemática da organização genômica do ZIKV e as proteínas codificadas pelo RNA viral. (C e D) Avaliação do perfil de identidade de sequência (aminoácidos) entre as proteínas E (C) e NS1 (D) do ZIKV e outros Flavivirus relacionados. Adaptado de Araújo *et al.*, 2020 (38).

1.2. A resposta imunológica adaptativa contra o ZIKV: impacto no desenvolvimento de vacinas e ensaios diagnósticos.

A resolução da infecção pelo ZIKV é acompanhada pela ativação de linfócitos B e T específicos ao mesmo, os quais atuam de forma efetora na eliminação viral pela produção de anticorpos ou citocinas com atividade antiviral, bem como na eliminação direta de células infectadas do organismo. Apesar da ausência de um correlato de proteção bem estabelecido para o ZIKV, evidências recentes indicam que a ativação de respostas imunes celulares e

humorais são importantes na promoção de proteção contra o mesmo (8–10). Assim, a indução de anticorpos neutralizantes específicos ao ZIKV (nAb) consiste em um fato chave, os quais foram capazes de conferir proteção frente a infecção pelo ZIKV em camundongos e primatas não humanos (NHP). Além disso, soros isolados de NHP ou humanos previamente infectados pelo ZIKV conferiram proteção contra o ZIKV em condições experimentais (11-15).

De forma complementar à indução de nAbs, as respostas imunológicas mediadas por células T também contribuem para o controle da infecção pelo ZIKV. Cargas virais e taxas de mortalidade aumentadas são observadas em camundongos com deficiência de células T CD8⁺. Por outro lado, a transferência passiva de células T CD8⁺ ZIKV-específicas, para camundongos com deficiência em células T, reduziu a infecção e conferiu proteção frente ao desafio letal com esse vírus (16-18). Recentemente, células T CD4⁺ auxiliares tipo I também demonstraram participar do controle da infecção pelo ZIKV (19–21). Além disso, outras evidências demonstraram repetidamente que as respostas dos nAbs e de células T contribuem para a imunidade protetora à infecção pelo ZIKV (14, 19, 22–24). Assim, a promoção de resposta imunológica contemplando esses perfis consiste em um fator importante a ser considerado em futuros candidatos vacinais para o ZIKV.

Estudos recentes indicam que a conservação da sequência de aminoácidos e as semelhanças estruturais entre os *Flavivirius*, especialmente entre DENV e ZIKV, são substanciais para que esses vírus tenham reatividade cruzada em nível humoral e celular (39–42). Essa característica pode implicar em efeitos benéficos, como a ocorrência de imunidade cruzada entre os mesmos (43,44). Entretanto, efeitos deletérios também podem ocorrer, especialmente os mediados por anticorpos de reatividade cruzada. Neste sentido, embora não estabelecido em condições clínicas, anticorpos anti-DENV com reduzida capacidade de neutralização foram capazes de promover a amplificação viral do ZIKV em cultura de células e modelos animais, sendo este perfil característico do fenômeno denominado ADE (do inglês, *Antibody-dependent enhancement*) (40,45). Além disso, a reatividade cruzada de anticorpos tem impacto direto no estabelecimento de ensaios sorológicos específicos para estes vírus. A elevada homologia do ZIKV comparada a outros vírus da mesma família (42-58 % baseados nas proteínas E e NS1, Figura 1C-D) constitui um real obstáculo no estabelecimento de ensaios de diagnóstico sorológico para o ZIKV, especialmente em regiões endêmicas para outros *Flavivirus* como o Brasil (40,46,47). Assim, os pontos citados anteriormente tem impacto significativo no desenvolvimento de candidatos vacinais e de ensaios sorológicos direcionados ao ZIKV.

1.3. Diagnóstico laboratorial do ZIKV.

Os sinais clínicos da infecção pelo ZIKV não são patognomônicos, o que requer, assim, associação com exames laboratoriais para a confirmação diagnóstica. Os principais métodos preconizados para detecção desse vírus podem ser classificados em diretos ou indiretos, sendo a primeira classe os que consistem em ensaios moleculares para detecção do seu material genético, principalmente pela técnica de RT-PCR (Transcriptase Reversa-Reação em Cadeia da Polimerase), bem como o cultivo e isolamento do vírus em cultura de células ou detecção da proteína NS1 circulante (48). Por outro lado, os métodos indiretos buscam detectar a resposta imune desenvolvida após infecção, em especial dos anticorpos específicos direcionados aos antígenos virais. Embora os métodos diretos, em especial os moleculares, apresentem elevada especificidade e sensibilidade, os mesmos são aplicáveis somente na detecção da infecção em fase aguda (1-10 dias após o aparecimento dos sintomas), podendo esta janela de detecção ser estendida para 21 dias (urina) (48-50). Além disso, os mesmos são onerosos e, em alguns casos, requerem dias para obtenção do resultado, como o isolamento viral. Assim, os métodos indiretos consistem em uma alternativa plausível no diagnóstico tardio da infecção e monitoramento de sua prevalência na população.

Os testes sorológicos permitem o diagnóstico de infecções em fase aguda ou convalescente com base na detecção de anticorpos ZIKV-específicos por diversas técnicas como o ELISA (do inglês, *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*). Este último é amplamente utilizado em laboratórios clínicos, sendo de baixo custo, fácil automação e permite a emissão de resultados em curtos período de tempo (51). Entretanto, conforme mencionado anteriormente, um problema relacionado a utilização desses ensaios consiste na reatividade cruzada de anticorpos observada com outros *Flavivirus* (40,46,47). Neste contexto, o PRNT (do inglês, *Plaque reduction neutralization test*) consiste no ensaio sorológico de referência para detecção da exposição ao ZIKV pela mensuração de anticorpos neutralizantes (48,52). Embora indicado, o PRNT consiste em uma técnica laboriosa, demorada e que requer estrutura laboratorial compatível com nível de biossegurança necessária a manipulação deste patógeno (48,53). Além disso, o diagnóstico diferencial do ZIKV baseado nesta técnica depende da realização concomitante para outros vírus relacionados, como o DENV1-4 (54), bem como a interpretação conjunta com os resultados de outras técnicas, uma prática muitas vezes inviável em laboratórios clínicos. Assim, a busca por técnicas e antígenos alternativos para o aperfeiçoamento da determinação da sorologia para o ZIKV se faz extremamente necessária.

A literatura relata a evolução da detecção de anticorpos IgG e IgM ZIKV-específicos por diferentes plataformas incluindo, ELISA, imunocromatográficos, imunofluorescência, PRNT e plataformas multiplex (52,55–60). Grande parte desses ensaios se baseia em proteínas recombinantes, especialmente na proteína Não estrutural 1 (NS1), a qual também é utilizada em kits comerciais para detecção sorológica de diferentes *Flavivirus* (61,62). Essa proteína é altamente imunogênica, com níveis detectáveis de anticorpos aproximadamente 5-7 dias após o início dos sintomas e que permanecem no corpo por longos períodos (63,64). Assim, estratégias de detecção direta de anticorpos anti-NS1 ZIKV por ELISA foram descritas com especificidade e sensibilidade próximas à 100% (55,65). Entretanto, estudos posteriores contradizem esses achados, sendo observada uma reduzida especificidade (65-81%), os quais alertaram para a potencial reatividade cruzada de anticorpos em ensaios baseados na sequência completa da proteína NS1 do ZIKV (NS1 ZIKV) (58,59). Por outro lado, estratégias baseadas em fragmentos derivados da região C-terminal desta proteína foram propostas e apresentaram reduzida reatividade cruzada com anticorpos anti-DENV, quando comparada à utilização da NS1 ZIKV inteira (66). Desta forma, a seleção de regiões da NS1 ZIKV com menor homologia de sequência e/ou estrutural constitui uma alternativa promissora para o desenho de ensaios sorológicos mais específicos baseados neste antígeno.

Além da NS1, antígenos baseados na proteína E do ZIKV têm sido utilizados em ensaios sorológicos para o ZIKV (67). Essa glicoproteína apresenta 3 domínios, sendo eles o domínio I central em forma de barril β (EDI), o domínio II (EDII) e um domínio III C-terminal semelhante a imunoglobulina (EDIII) (68). Dentre esses o EDIII do ZIKV (EDIII ZIKV) foi destacado como potencial antígeno com aplicação diagnóstica, o qual consiste na região da proteína de envelope com menor homologia comparada a outros arbovírus de importância médica como o DENV (as porcentagens de identidade para os DENV's 1, 2, 3 e 4 são, respectivamente, 9.9%, 11.4%, 11.4% e 10%) e YFV (8,6%). Apesar de uma estratégia baseada no EDIII recombinante ter apresentado reatividade cruzada com soros de indivíduos infectados pelo DENV de fase convalescente inicial (< 12 semanas após infecção) por ELISA, o mesmo pode promover a detecção específica de anticorpos IgG anti-ZIKV após esse período (> 12 semanas) (56). Além disso, algumas estratégias baseadas neste antígeno apresentaram reduzida reatividade cruzada com anticorpos anti-DENV (67). Portanto, esse antígeno também representa um alvo promissor no estabelecimento de ensaios de detecção da imunidade humoral direcionada ao ZIKV.

1.4. Estratégias vacinais contra o ZIKV.

Diante do eminente risco de novos eventos epidêmicos e complicações clínicas associadas à infecção pelo ZIKV, ao longo dos últimos anos diferentes estratégias vacinais foram estudadas, incluindo: vacinas baseadas em vírus inativados (PI) ou atenuados, vacinas de DNA e mRNA, VLPs (do inglês, *Virus Like Particles*), vetores virais e proteínas recombinantes (69–74). As primeiras estratégias utilizam como antígenos o vírus inativado ou proteínas estruturais, especialmente a proteína precursora de membrana associada à proteína de envelope (prM-E). Esses trabalhos evidenciaram o papel dos anticorpos neutralizantes na proteção contra a infecção pelo ZIKV em camundongos e primatas não humanos (72,73,75–78). Além disso, partes dessas estratégias evoluíram para ensaios clínicos de fase I e II (Clinical trials: NCT03008122, NCT03014089, NCT03110770, NCT02996461). Os resultados reportados demonstraram que formulações baseada em vírus inativado, bem como uma vacina de DNA codificando para os antígenos prM-E, foram bem toleradas e imunogênicas, com indução de anticorpos neutralizantes nos indivíduos imunizados (77–79). Entretanto, nenhuma estratégia vacinal encontra-se licenciada e disponível para uso em humanos até o momento.

Além da proteína E em sua forma inteira, associada à partícula viral ou produzida de forma recombinante, outras regiões apresentam potencial protetor contra o ZIKV. A exemplo disso, o estudo de plasmócitos e células B de memória provenientes de pacientes infectados pelo ZIKV permitiram caracterizar anticorpos monoclonais (mAb) altamente neutralizantes direcionados à epítomos lineares ou conformacionais presentes nos três domínios desta proteína (80–84). Dentre as regiões citadas, o domínio III (EDIII) é um importante alvo para geração de anticorpos neutralizantes que inibam a etapa de adsorção viral, vista sua capacidade de interagir com os receptores celulares. Além disso, formulações vacinais baseadas no EDIII ZIKV associado a diferentes adjuvantes foi capaz de induzir anticorpos neutralizantes em modelo murino (74,85–90), bem como conferir proteção frente a desafio letal com cepas do ZIKV (90–92). Assim, esta proteína consiste em um promissor antígeno vacinal contra o ZIKV.

Embora a resposta de anticorpos neutralizantes esteja bem estabelecida em modelos murinos e de primatas não humanos, o impacto da imunidade humoral prévia para outros *Flavivirus* sobre a patogênese da infecção pelo ZIKV em humanos ainda é incerta (69). Essa preocupação se faz relevante, sobretudo, devido ao fenômeno de ADE. Neste sentido, anticorpos que se ligam às regiões dos domínio I/II, bem como à alça de fusão conservada no

domínio II, demonstraram elevado grau de reatividade cruzada de anticorpos e reduzida capacidade neutralizante (69,80,84). Assim, uma alternativa a esse problema consiste na escolha de regiões da proteína E com menor homologia com outros *Flavivirus*. A exemplo disso, abordagens baseadas na EDIII ZIKV, a qual apresenta reduzida homologia com DENV e YFV, foram capazes de induzir nAbs anti-ZIKV sem promoção de ADE *in vitro* para DENV (74,93). Outra alternativa promissora consiste no uso de proteínas não estruturais (NS) como antígeno alvo, visto que anticorpos direcionados contra as mesmas não apresentam risco de ADE.

A proteína NS1 ZIKV é uma glicoproteína envolvida em diversos mecanismos virais, atuando como arcabouço estrutural do complexo de replicação do RNA genômico do ZIKV, bem como na evasão ao sistema imunológico do hospedeiro (94). Em contraponto às outras NS, a NS1 quando produzida nas células infectadas pode se apresentar associada à membrana citoplasmática na forma dimérica (mNS1), bem como ser secretada para o meio extracelular na sua forma hexamérica (sNS1), sendo altamente imunogênica. Neste contexto, além dos Abs anti-NS1 não apresentarem risco de ADE, os mesmos podem se ligar à mNS1 e promover a eliminação de células infectadas por ADCC (do inglês, *Antibody-dependent cellular cytotoxicity*) ou por deposição de proteínas do sistema complemento (95). Além disso, as células infectadas com o ZIKV podem ser alvejadas por linfócitos T via apresentação de epítopos da NS1 associados à moléculas de MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade) (94,96,97). Desta forma, essas características fazem da NS1 um excelente antígeno vacinal capaz de ativar respostas imunológicas humoral e celular.

De fato, anticorpos monoclonais murinos ou humanos, específicos para NS1, apresentaram capacidade protetora frente ao desafio letal com ZIKV (95,98). Adicionalmente, diferentes abordagens vacinais baseadas na NS1 ZIKV foram testadas, incluindo vetores virais (99,100) e vacinas de DNA (96,97). Estas apresentaram diferentes níveis de proteção frente a infecção viral, os quais foram correlacionados com a indução de resposta imune humoral e/ou celular, incluindo a ativação da via do complemento mediada por anticorpo, a indução de ADCC e ativação de linfócitos TCD8⁺ NS1-específicos (96,97,99,100). Assim, esses resultados reafirmam que a proteína NS1 ZIKV é um antígeno adequado para vacinas contra o ZIKV baseadas em diferentes plataformas de expressão e entrega antigênica.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O presente projeto teve por objetivo avaliar o potencial biotecnológico da proteína não estrutural 1 (NS1 ZIKV), um fragmento denominado Δ NS1 ZIKV e do domínio III da proteína de envelope (EDIII ZIKV) do ZIKV no desenvolvimento de testes diagnósticos e uso como antígenos vacinais. Para atingir o objetivo descrito, as principais etapas realizadas foram:

1. Desenhar, clonar e expressar as proteínas recombinantes NS1 ZIKV, os fragmentos da proteína NS1 (Δ NS1) derivados do ZIKV e do DENV (1-4), bem como a proteína recombinante EDIII de ZIKV, utilizando sistema de expressão heterólogo baseado em linhagens de *Escherichia coli*;
2. Purificar as proteínas recombinantes por técnicas de cromatografia, obtendo-as na forma solúvel e com antigenicidade preservada;
3. Utilizar as proteínas Δ NS1 ZIKV e EDIII ZIKV como antígenos em ensaios sorológicos para diagnóstico específico do ZIKV;
4. Preparar formulações vacinais contendo as proteínas NS1 ZIKV, Δ NS1 ZIKV ou EDIII ZIKV combinadas com diferentes adjuvantes (Alum, LTK63 e Poly (I:C)) e avaliar a imunogenicidade das mesmas em modelo murino;
5. Caracterizar a respostas imunológicas humorais e celulares desencadeadas pelas formulações vacinais (quantificação e análise do perfil de anticorpos produzidos, bem como as respostas celulares T CD8⁺ e T CD4⁺ NS1-específicas desenvolvidas);
6. Avaliar a funcionalidade *in vitro* dos anticorpos específicos para a proteína EDIII ZIKV;
7. Avaliar a capacidade das formulações vacinais em induzir imunidade protetora contra o ZIKV utilizando modelo murino.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Comitê de ética

As amostras de soros humanos utilizadas neste trabalho foram gentilmente cedidas pelos professores Edison Luiz Durigon (ICB/USP), Paolo Marinho de Andrade Zanotto (ICB/USP) e Albert Ko (FIOCRUZ/BA e Universidade de Yale/USA). Os procedimentos envolvendo manuseio de soro humano seguiram as recomendações do Conselho de Revisão Institucional do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (protocolo de número 0652/09) e do Comitê de Ética do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (CEPSH - Off.011616). Todos os indivíduos forneceram consentimento informado por escrito da utilização das amostras coletas com fins de interesse científico. A utilização das referidas amostras foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEPSH-ICB nº 1509/19).

Os experimentos utilizando camundongos das linhagens BALB/c (6-8 semanas), C57BL/6 (6-8 semanas), AB6 IFNAR1^{-/-} (4 semanas) e AG129 IFNR α/β ^{-/-} (6-11 semanas) foram conduzidos de acordo aos Princípios Éticos da Experimentação Animal estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, protocolos nº 96/2016 e 22/2016.

3.2. Amplificação e preparo de estoque viral.

O ZIKV da linhagem asiática, isolado no Brasil (ZIKV^{BR}) (*GenBank*: KU497555.1), utilizado neste estudo foi cedido gentilmente pelo Instituto Evandro Chagas de Belém do Pará (101). O cultivo do ZIKV foi realizado em células de mosquito *Aedes albopictus* (C6/36), cultivadas em meio Leibovitz L-15 (Vitrocel, Brasil) acrescido de 2% de soro fetal bovino (SFB), por 7-10 dias, sendo o aparecimento de efeitos citopáticos acompanhados diariamente. Após esse período, o sobrenadante da cultura bem como as células infectadas, foram recuperadas e centrifugadas (3200 x g, 15 min., 4°C). O sobrenadante foi recuperado e reservado. A massa de células resultantes foi submetida à lise (3 ciclos de congelamento/descongelamento à -80°C e 37° por 5 min., respectivamente). O sobrenadante resultante do lisado celular, obtido após ciclo de centrifugação (3200 G, 15 min., 4°C), foi adicionado ao sobrenadante de cultura obtido previamente, sendo

então o material submetido à etapa de concentração viral por precipitação mediante a adição de PoliEtienoGlicol (PEG 6000) (Sigma-Aldrich, USA) na concentração final de 10%. A mistura foi incubada por 16 h a 4 °C. Após incubação, a mistura foi centrifugada (3200 x g, 30 min., 4 °C) e o precipitado resultante suspenso em tampão 25 mM HEPES (pH 7,2) (Cat.: H3375, Sigma-Aldrich, USA), sendo as alíquotas obtidas armazenadas em freezer -80 °C para posterior titulação viral (item 3.21).

3.3. Linhagens celulares

A linhagem celular C6/36 de *Aedes albopictus* foi cultivada em meio Leibovitz L-15 (Vitrocell, Brasil) suplementado com 5% SFB (Life Technologies, USA). As células Vero CCL-81 (ATCC) foram cultivadas em meio MEM (Vitrocell, Brasil) com 10% de SFB. Células de rim embrionário humano HEK-293T (ATCC N° CRL-11268) foram cultivadas em meio DMEM (Life Technologies, USA) suplementado com 10% de SFB. As células mencionadas foram cultivadas em estufa (37 °C) sob atmosfera de CO₂ (5%), exceto a linhagem C6/36, a qual foi mantida em estufa a 28 °C.

3.4. Análises de bioinformática

A determinação do perfil de hidrofobicidade da proteína NS1 ZIKV e EDIII ZIKV foi realizada por análise computacional seguindo algoritmo descrito previamente (102). A análise foi realizada utilizando o *software* web IEDB *Analysis Resource* (Disponível em: <http://tools.iedb.org/bcell/>) com base na predição de epítopos lineares para células B, seguida de predição de hidrofobicidade de Parker.

Os peptídeos baseados na sequência da proteína NS1 (GenBank: ALU33341.1), foram desenhados *in silico* tendo como base a sequência da proteína NS1 ZIKV utilizando algoritmo descrito previamente (103,104) hospedado no *Immune Epitope Database and Analysis Resource* (Disponível em <http://tools.iedb.org/mhci/>). As afinidades de ligação foram obtidas para todos os peptídeos de 8–14 resíduos de aminoácidos para os alelos H2-Kb e H2-Db. Os alelos selecionados tiveram a classificação do percentual de consenso restrita a 1,7% com escore ≤ 1 . Três peptídeos preditos com alta pontuação foram selecionados (Tabela 1). Os peptídeos foram sintetizados e obtidos comercialmente junto à empresa GenScript (USA), solubilizados em DMSO e preservados em freezer -80 °C até o uso.

Tabela 1. Peptídeos sintéticos baseados na proteína NS1 ZIKV.

SEQUÊNCIA	TAMANHO	POSIÇÃO	ID	CEPA	Kb	Db
AAKTNSFV	9	125-133	Pep. 10	ALU33341	X	
SHHNTREGYRTQM	13	250-262	Pep. 36	ALU33341	-	X
LVRSMVTA	8	343-350	Pep. 128	ALU33341	X	-

Para a análise da presença de epítomos conformacionais da proteína NS1 as ORFs completas das sequências de aminoácidos representativas da proteína NS1 ZIKV foram utilizadas para guiar a modelagem de homologia da proteína Δ NS1 ZIKV. As sequências com menos de 95% de identidade foram selecionadas de cada subtipo e modeladas com o programa YASARA (105) com 10 iterações PSI-Blast (E-Value de 0,01). Considerando três estados de oligomerização, vinte modelos foram baixados do Protein Data Bank (Disponível em <http://www.rcsb.org/pdb/>), tendo cinco alinhamentos de sequência por modelo. A modelagem foi definida para baixa velocidade com dez extensões de terminal, amostrando 50 loops terminais. As simulações foram realizadas em um ambiente BioLinux. As estruturas produzidas foram então verificadas quanto à consistência no servidor PDBSum, com a opção “gerar” (disponível em <https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/pdbsum/>). Análises PROCHECK da qualidade estereoquímica da estrutura de proteína modelada também foram gravadas. Os cálculos relativos da área de superfície acessível foram realizados tendo por base as estruturas modeladas com o servidor GETAREA, as quais foram comparadas à visualização da superfície com o programa YASARA (disponível em <http://curie.utmb.edu/getarea.html>). Os modelos foram então corrigidos e submetidos a uma simulação de dinâmica molecular de 1 ns em caixa cheia de água e, após a minimização de energia, a estrutura de saída foi salva para a análise. Os epítomos de célula B descontinuados foram preditos usando o software Discotope (106) (Disponível em <http://tools.iedb.org/discotope/>). A vista do módulo YASARA foi utilizada para mapear nas estruturas modeladas dos epítomos encontrados pelo servidor IEDB. Os alinhamentos estruturais foram realizados para avaliar a superposição da região C-terminal da proteína NS1 (aa 251-352) sobre a cristalografia da NS1 DENV2, no qual os escores de RMSD entre os modelos e as regiões dos epítomos foram produzidos.

3.5. Clonagem e obtenção dos vetores plasmidiais.

3.5.1. Plasmídeos para expressão proteica em sistema procarioto.

Os genes que codificam as proteínas do ZIKV (*GenBank* n°: ALU33341): NS1 ZIKV, Δ NS1 ZIKV (aminoácidos 251-352), EDIII ZIKV e Δ EDIII ZIKV; ou para o DENV: Δ NS1 DENV1 (*GenBank* n°: AHF50491.1), Δ NS1 DENV2 (*GenBank* n°: 288848), Δ NS1 DENV3 (*GenBank* n°: AFN80339.1), e Δ NS1 DENV4 (*GenBank* n°: AEX09561.1), foram desenhados e sintetizados comercialmente tendo por base o vetor de expressão pET28a (GenScript, USA). As sequências gênicas foram flanqueadas com os sítios de restrição das enzimas *Bam*HI e *Xho*I. Os códons foram otimizados para expressão em *E. coli*. As construções obtidas foram confirmadas por análise de restrição e sequenciamento.

3.5.2. Vacinas de DNA

As vacinas de DNA que codificam para a sequência completa (aa 1-352) da proteína NS1 ZIKV (*GenBank*: ALU33341) de forma isolada (pNS1-ZIKV) ou como uma proteína quimérica fusionada geneticamente com a proteína gD do HSV-1 (pgDNS1-ZIKV) foram sintetizadas comercialmente (GenScript, USA). Os genes sintéticos foram otimizados para o uso de códons humanos e projetados para conter os locais de restrição *Pst*I e *Bgl*II nas extremidades 5' e 3', respectivamente. As sequências foram clonadas no vetor pUMVC3 (Aldevron, USA), conforme descrito anteriormente (107). Para a construção do plasmídeo pgDNS1-ZIKV, a sequência correspondente à proteína NS1 foi flanqueada pelo sítio de restrição da enzima *Apa*I. A cepa de *Escherichia coli* DH5 α foi transformada com os plasmídeos recombinantes separadamente e os plasmídeos foram purificados usando o *kit* EndoFree Plasmid Mega (Cat.: 12183, QIAGEN), de acordo com as instruções do fabricante. As construções foram confirmadas por análises de restrição e sequenciamento de genes.

3.6. Expressão das proteínas recombinantes em sistema procarioto.

As linhagens de *E. coli* BL21(DE3), BL21(DE3)-Ril, Arctic Express(DE3) e Rosetta quimiocompetentes foram transformadas com os plasmídeos que albergam os genes para expressão das proteínas NS1 ZIKV, Δ NS1 ZIKV, EDIII ZIKV, Δ EDIII ZIKV, Δ NS1 DENV1, Δ NS1 DENV2, Δ NS1 DENV3, e Δ NS1 DENV4 seguindo protocolo padrão estabelecido no laboratório (108). As bactérias transformadas foram

cultivadas em 50 ml de meio LB (*Luria Bertani*) ou TB (*Terrific Broth*) acrescido de canamicina (50 µg/ml), gentamicina (20 µg/ml, somente para a linhagem Arctic Express) ou Cloranfenicol (30 µg/ml, para a linhagem BL21(DE3)-Ril) a 37°C até obter a absorbância de 0.7 ou 2.0, respectivamente, sob agitação orbital (220 rpm). A expressão da proteína recombinante foi iniciada pela adição de IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) (Cat.: R0392, Thermo Scientific, USA) à cultura na concentração desejada (0,1 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 0,75 mM ou 1 mM). A expressão proteica foi realizada nas temperaturas de 37 °C (até 4 h) e 18°C (até 24 h), ambas sob agitação (220 rpm). Alíquotas pré- e pós- indução, com quantidades equivalentes de células, foram coletadas de cada cultura e centrifugadas a 8000 rpm por 5 min..

Para avaliação da expressão da proteína alvo, os precipitados resultantes foram suspensos em tampão de amostra (Tris HCl 100 mM pH 6,8; SDS 4 %; Azul de Bromofenol 0,2 % e Glicerol 20 %), aquecidos por 10 min. a 100 °C, sendo alíquotas de 10 µL da solução resultante submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%). As culturas que superexpressaram as proteínas foram centrifugadas e as células suspensas em tampão A (100 mM Tris; 500 mM NaCl, 1 mM PMSF, 20% de glicerol e pH 8,5). As suspensões bacterianas foram submetidas à lise celular por sonicação. O lisado resultante foi centrifugado (10.000 x g por 30 min. a 4 °C) e as frações solúveis (sobrenadante) e insolúveis (precipitado) separadas e coletadas. À fração insolúvel foi adicionado tampão B (8 M ureia; 0,1 M Tris; 0,5 M NaCl; pH 8.5). A solubilização desta fração foi realizada por 18 h a 4°C, sendo posteriormente a solução centrifugada (10.000 x g por 30 min. a 4 °C) e o sobrenadante coletado (Fi). Amostras antes (T0) e após (T18) indução, bem como alíquotas das frações solúveis (Fs) e insolúveis (Fi), foram desnaturadas (100 °C, 5 min.) e em seguida submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%) e ensaio de *western blot* utilizando anticorpo anti-HisTag (Cat.: MA1-21315, Invitrogen, USA) (109). As condições de expressão selecionadas para as proteínas recombinantes utilizadas no trabalho estão sumarizadas na tabela 2.

Tabela 2. Características das proteínas recombinantes e condições de expressão em *E. coli*.

PROTEÍNA	PI ¹	MM ² (kDa)	Linhagem ³	IPTG	MEIO	CULTIVO
NS1 ZIKV	7.12	44,73	BL21(DE3)-RIL	0,5 mM	TB	37 °C /4 h
ΔNS1 ZIKV	7,80	16,25	Arctic Express(DE3)	0,5 mM	TB	18 °C /16 h

MATERIAIS E MÉTODOS

ΔNS1 DENV1	6,99	16,3	BL21(DE3)	0,5 mM	TB	18 °C /16 h
ΔNS1 DENV2	6,96	16,0	BL21(DE3)	0,5 mM	TB	18 °C /16 h
ΔNS1 DENV3	7,80	16,3	BL21(DE3)	0,5 mM	TB	18 °C /16 h
ΔNS1 DENV4	7,28	16,3	BL21(DE3)	0,5 mM	TB	18 °C /16 h
EDIII ZIKV	6,78	14,73	BL21(DE3)	0,75 mM	TB	18 °C /16 h
ΔEDIII ZIKV	6,63	10,48	BL21(DE3)	0,5 mM	TB	18 °C /16 h

1, Ponto isoelétrico teórico; 2, Massa molecular teórica; 3, Linhagem de *E. coli* selecionada.

3.7. Transfecção de células HEK-293T.

Células HEK293 foram transfectadas com os plasmídeos pUMVC3, pNS1-ZIKV ou pgDNS1-ZIKV de acordo com um protocolo descrito previamente (52). Resumidamente, células HEK-293T foram semeadas (10^5 célula/poço) em placas de 24 poços (Corning, USA) e cultivadas (37 °C, 5% CO₂) até atingir 70–80% de confluência. Uma hora antes da transfecção, o sobrenadante da cultura de células foi removido e 200 µl/poço de DMEM (suplementado com 2% SFB) foram adicionados às células. Para a transfecção, soluções MIX contendo 1 µg dos plasmídeos para cada 3 µg de polietilenoimina (PEI) (Cat.: 408727, Sigma-Aldrich, USA) foram preparadas em solução de 150 mM NaCl. Após incubação por 5 min em temperatura ambiente (TA), as misturas foram distribuídas uniformemente sobre as placas e as células foram incubadas por até 24 h (37 °C, 5% CO₂). Ao final do protocolo células foram lavadas duas vezes com PBS (1 ml/poço) e recuperadas após incubação (20 min., 37 °C) com tampão de remoção (PBS, 10 mM EDTA, pH 7,2). A presença das proteínas NS1 ZIKV foi avaliada por citometria de fluxo e imunofluorescência de acordo ao descrito nos itens 3.16.2 e 3.19.2, respectivamente. A expressão da proteína gD HSV1 foi avaliada por *western blot* de acordo ao descrito no item 3.14. Para este último, as células transfectadas foram lisadas com tampão RIPA (Cat.: 89900, Thermo Scientific, USA) acrescido de coquetel de inibidores de proteases (Roche, Suíça).

3.8. Purificação das proteínas recombinantes.

As linhagens de *E. coli* recombinantes foram cultivadas e a expressão proteica induzida com IPTG de acordo ao padronizado nos ensaios de expressão (item 3.6, Tabela 2). Para esta etapa o volume de cultura foi escalonado para dois litros de meio de cultura. Ao final da indução da expressão proteica a cultura bacteriana foi centrifugada (10.000 rpm, 10 min), o *pellet* resultante foi recuperado e suspenso em 200

ml de tampão A conforme estabelecido para cada proteína (Tabela 3), acrescido de 1 mM PMSF. A suspensão bacteriana obtida foi homogeneizada e submetida à lise celular mecânica em equipamento APLAB-10 (Artepeças, São Paulo, Brasil) para obtenção do extrato proteico. Este último foi então centrifugado (50 min, 10.000 rpm à 4 °C) e o sobrenadante resultante armazenado e clarificado em membrana de nitrocelulose de 0,22 µm. O extrato proteico solúvel foi purificado de forma automatizada em equipamento AKTA – AVANT (GE Healthcare, USA) utilizando a técnica de cromatografia de afinidade ao níquel (CAN) em coluna HisTrap FF 5 ml (GE Healthcare, USA). A eluição proteica foi realizada pela aplicação de concentrações crescentes de imidazol (0-1M). Ao final da etapa de purificação, as amostras fracionadas foram reunidas e a presença da proteína de interesse confirmada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%). As proteínas que se apresentaram contaminadas após purificação por CAN, como a ΔNS1 ZIKV, foram submetidas a um segundo passo de purificação por técnica de exclusão de tamanho (Gel filtração) utilizando coluna HiPrep™ 26/60 Sephacryl™ S-200 HR (GE Healthcare, USA).

Para as proteínas insolúveis, os corpúsculos de inclusão obtidos após a lise bacteriana foram solubilizados em tampão contendo 8 M ureia sob agitação por 16 h (4 °C). Os extratos solubilizados foram submetidos ao procedimento de renaturação *in vitro* por diluição pulsada de acordo ao descrito previamente pelo nosso grupo de pesquisa (109), seguido da purificação com CAN. A expressão e purificação das proteínas LT-B, LTK63 e LT-1 foram conduzidas de acordo a protocolos estabelecidos previamente (110,111).

A análise e quantificação da proteína purificada foram realizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% (SDS-PAGE). As intensidades das bandas proteicas evidenciadas nos géis de poliacrilamida, após eletroforese e procedimento de coloração utilizando Coomassie blue, foram comparadas após aquisição de imagem em aparelho ChemiDoc™ XRS+ System (Bio-Rad, USA) utilizando o *software* ImageLab (Bio-Rad). A concentração proteica foi mensurada em mg/ml e as proteínas foram armazenadas em freezer -20 °C para posterior utilização.

Para os testes de otimização da obtenção da proteína NS1 ZIKV a massa bacteriana induzida foi suspensa nos tampões: HEPES (20 mM Hepes, 500 mM NaCl, 20 % de Glicerol, pH 8,0), Fosfato de Sódio I (100 mM de Fosfato de Sódio, 500 mM

NaCl, 20 % de Glicerol, pH 8,0) ou Fosfato de Sódio II (100 mM de Fosfato de Sódio, 300 mM NaCl, 20 % de Glicerol, pH 8,0). As suspensões obtidas foram submetidas aos procedimentos para a lise bacteriana, renaturação *in vitro* e purificação em tampão homólogo de acordo ao descrito anteriormente.

Tabela 3. Composição dos tampões utilizados na obtenção das proteínas recombinantes.

TAMPÃO A	PROTEÍNA
100 mM Fosfato de Sódio, 300 mM NaCl, 20 % Glicerol, pH 8,0.	NS1 ZIKV
100 mM Tris, 500 mM NaCl, 20% Glicerol, pH 8,5.	ΔNS1 ZIKV
100 mM Tris, 150 mM NaCl, 20% Glicerol, pH 8,5.	ΔNS1 DENV1
100 mM Tris, 500 mM NaCl, 20% Glicerol, pH 8,5.	ΔNS1 DENV2
100 mM Tris, 150 mM NaCl, 20% Glicerol, pH 8,5.	ΔNS1 DENV3
100 mM Tris, 500 mM NaCl, 20% Glicerol, pH 8,5.	ΔNS1 DENV4
PBS 1x, 10% Glicerol, pH 7.2	EDIII ZIKV
20 mM Hepes, 300 mM NaCl, 20% Glicerol, pH 7,8	ΔEDIII ZIKV

3.9. Renaturação *in vitro* das proteínas NS1 e EDIII ZIKV por HHP.

Os corpos de inclusão (IB) contendo as proteínas NS1 ZIKV ou EDIII ZIKV (sem solubilização prévia em tampão contendo ureia) foram suspensos em tampão de lavagem A1 (Tabela 4), sonificados (15 seg. ON; 10 seg. OFF; 35% amplitude por 1,5 min) e centrifugados (8.000 x g, 10 min, 4 °C). Esta etapa de lavagem foi repetida mais uma vez, sendo que ao final os CI foram suspensos nos tampões B1 e submetidos à lavagem por mais 2 vezes. Ao final, os IB lavados foram recuperados em um volume final de 10-20 ml de tampão B1. As suspensões obtidas foram separadas em alíquotas e armazenadas a -20 °C até o uso.

Os IBs lavados contendo as proteínas NS1 e EDIII ZIKV foram submetidas a protocolo de renaturação *in vitro* sob pressão hidrostática (HHP, do inglês, *high hydrostatic pressure*) em colaboração com a Dra. Lígia E. M. Ferreira Dias (IPEN-USP). Resumidamente, os IBs foram diluídos para uma absorbância (350nm) de 1,0, 2,0 ou 5,0 em tampão de renaturação R1 (Tabela 4). As amostras foram acondicionadas separadamente em sacos plásticos (50 ml), os quais foram selados. As amostras foram então submetidas ao tratamento de renaturação em vaso de pressão R4-6-40/PS-50 (*High Pressure Equipment Company*) por 1,5 h sob 2,4 kbar seguidas de redução da pressão para 0,4 kbar e incubação por mais 14,5 h. A renaturação sob compressão de 1

bar (atmosférica) por 16 h foi utilizada como controle. Após descompressão, as amostras foram centrifugadas (11.000 x g, 15 min, 4 °C), os sobrenadantes recuperados e dialisados para tampão C1 (NS1 ZIKV) ou C2 (EDIII ZIKV). Foi realizado o mínimo 3 trocas de tampão seguida de aferição do pH final da solução. Após diálise as amostras foram centrifugadas novamente para remoção das proteínas precipitadas. Os sobrenadantes resultantes foram utilizados separadamente para purificação por CAN de acordo ao descrito anteriormente. Ao final, as proteínas purificadas foram submetidas à análise de pureza e quantificação por eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% (SDS-PAGE) conforme descrito anteriormente.

Tabela 4. Tampões utilizados nos testes de renaturação proteica sob alta pressão hidrostática.

TAMPÃO	COMPOSIÇÃO
A1	0,1 M Tris-HCl; 5 mM EDTA; 0,1% Deoxicolato de sódio; pH 8,5.
B1	0,1 M Tris-HCl; 50 mM NaCl; 1 mM EDTA; pH 8,5.
R1	50 mM Tris-HCl; pH 7-12.
C1	50 mM Tris-HCl; pH 8,5.
C2	PBS 1x; 10% Glicerol; pH 7,4.

Alternativamente, variações de pH (7-12), adição de arginina (0,1 M, 0,2 M, 0,3 M, 0,4 M, 0,5 M, 0,6 M ou 0,7 M), guanidina (0,5 M, 1 M, 1,5 M, 2 M, 2,5 M, 3 M ou 3,5 M) ou DTT (2 mM) no tampão de renaturação (R1) foram também avaliadas durante as etapas de compressão/descompressão.

3.10. Avaliação da fluorescência intrínseca do triptofano e dispersão de luz de IBs contendo NS1 ZIKV.

A fluorescência intrínseca do triptofano (Trp) e dispersão de luz (LS) foram mensurados em suspensões de IBs contendo NS1 ZIKV com auxílio de espectrofluorímetro Cary Eclipse (Varian). Os dados foram coletados em cubetas de trajeto óptico de 1 cm e as medidas foram realizadas em um ângulo de 90 ° em relação à luz incidente, com tempo de resposta de 1 segundo (s) e velocidade de leitura de 240 nm/minuto. As mensurações de LS foram realizadas com excitação a 320 nm, e a emissão foi coletada na faixa de 315 a 325 nm. A emissão de fluorescência intrínseca do triptofano foi coletada entre 300 e 400 nm, com excitação em 290 nm. As curvas LS foram obtidas de IBs solubilizados em tampão contendo concentrações crescentes de guanidina (0 a 3 M), arginina (0 a 0,6 M) ou aumentando o pH (7 a 12).

3.11. Avaliação de oligômeros da proteína NS1 ZIKV.

Amostras da proteína NS1 ZIKV obtida por HHP foram analisadas por cromatografia de exclusão de tamanho utilizando coluna Superdex 200 10/300 (GE Healthcare, USA) acoplado a um sistema AKTA (GE Healthcare, USA). Os tampões utilizados para a eluição proteica foram Tris 50 mM (pH de 8,5) ou CAPS 50 mM (pH de 11,0). As proteínas comerciais ovalbumina (Monômeros e dímeros de, respectivamente, 44,3 kDa e 88,6 kDa) e BSA (monômeros de 66,4 kDa) foram utilizadas para calibrar a referida coluna. Uma equação de regressão linear foi estabelecida com base no tempo de retenção proteica obtida durante a cromatografia: $Y = -0,03838 X + 14,82$, onde Y é o volume de eluição e X é a massa molecular ($N = 3$, $r^2 = 0,9989$). Esta última foi utilizada para estimar a massa molecular dos oligômeros da proteína NS1 ZIKV.

3.12. Dicroísmo circular (CD)

Medidas de dicroísmo circular foram realizadas com espectropolarímetro Jasco J-720 (Jasco, USA) em amostras da proteína NS1 ZIKV obtida por HHP. Os espectros foram adquiridos em células de quartzo de comprimento de caminho de 0,2 cm a uma concentração de proteína de 2 μ M em tampão contendo fosfato de sódio à 10 mM (pH 8,5). Três varreduras consecutivas de 260 a 190 nm foram realizadas. As elipticidades brutas observadas foram convertidas nas elipticidades molares (θ). A estrutura secundária foi estimada a partir de espectros de ultravioleta ajustados usando o servidor DichroWeb (112). A porcentagem total dos componentes da estrutura secundária foi obtida usando diferentes programas de análise (SELCON3, Contin-LL e CDSSTR) com diferentes conjuntos de referência de proteínas (113).

3.13. Purificação do ZIKV e obtenção de piZIKV.

O ZIKV^{BR} em células C6/36 por 5-7 dias até o aparecimento de efeitos citopáticos. Após esse período, o sobrenadante da cultura foi coletado, centrifugado (3200 G, 15 min, 4°C) e recuperado. Para a purificação, o sobrenadante de cultura (250 ml) foi diafiltrado e concentrado (~10x) para tampão A2 (Fosfato de Sódio 0,02 M; NaCl 0,3 M; pH 7,0) em aparelho LabScale TFP System (Millipore), utilizando membrana Pellicon de 100 kDa (Millipore). A suspensão viral foi submetida à

purificação por cromatografia em coluna trocadora aniônica CaptoQ 1 mL (GE Healthcare, USA). O processo de purificação foi realizado em aparelho AKTA – Avant (GE Healthcare, USA). A coluna foi previamente equilibrada com 5 volumes de coluna (VC) de tampão A2. A amostra foi aplicada à coluna e, em seguida, a coluna foi lavada novamente com 5 VC de tampão A2. O processo de eluição foi realizado pela aplicação de 20 VC de tampão B2 (Fosfato de Sódio 0,02 M; NaCl 1 M; pH 7,0). As alíquotas resultantes da primeira etapa foram imediatamente submetidas a um segundo passo de purificação em coluna HiTrap Capto Core 700 1 ml (GE Healthcare, USA), previamente equilibrada com tampão A2. A amostra foi aplicada junto a coluna mencionada, sendo a fração não ligada (flow-through), contendo as partículas virais, recuperada. Ao final da purificação as alíquotas foram reunidas, alíquotadas e armazenadas em freezer -80 °C. Alíquotas correspondentes a cada etapa de purificação foram coletadas para análises de pureza por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5% (SDS-Page) e titulação viral. Ao final do processo as colunas cromatográficas e aparelho foram sanitizados com solução contendo NaOH 0,5 M, seguida de lavagem com água mili-Q e solução contendo 20% de etanol.

A obtenção de partículas inativadas do ZIKV (piZIKV) foi realizada de acordo a protocolo adaptado (114). Brevemente, formalina (Formaldeído 0,929% em PBS, pH 7,2) (Synth, Brasil) foi diluída na proporção de 1:50 (v/v) em alíquota obtida do ZIKV purificado. A mistura foi mantida por 12 dias (4 °C) sob agitação para inativação viral. Metabissulfito de Sódio (3,75%) foi adicionado à mistura viral (1:100) para inativação da formalina. A amostra resultante foi dialisada para tampão PBS (pH 7,2), alíquotada e armazenada em freezer -80 °C. A concentração proteica das amostras foi mensurada usando kit de Bradford (Cat.: 23236, Thermo Scientific, USA), conforme instruções do fabricante. Uma curva com diferentes concentrações de BSA (Cat.: 23209, Thermo Scientific, USA) foi utilizada como padrão. A inativação viral foi confirmada por titulação viral em células VERO (Item 3.22).

3.14. ELISA

3.14.1. Versão *in house*.

Microplacas de 96 poços (Cat.: 9018, Corning, USA) foram sensibilizadas por 18 h a 4 °C com as proteínas de interesse na proporção de 200 ng/poço, previamente diluídas em tampão de sensibilização (32,5 mM NaHCO₃, 14,9 mM Na₂CO₃, pH 9,6).

As placas foram lavadas três vezes com PBS 1x contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T). Após lavagem, etapa de bloqueio foi realizada (2 h a 37 °C) mediante adição (200 µl/poço) de solução de bloqueio (SB) contendo leite 3% acrescido de 0,5% BSA em PBS-T. Após novo ciclo de lavagem (3x), 100 µl dos soros diluídos individuais foram adicionados aos poços e incubados por 1 h a 37 °C. Após lavagem (3x), foram adicionados aos poços 100 µl do anticorpo anti-IgG humano (Cat.: A0170) ou de camundongo (Cat.: A4416) conjugados a HRP (*Horseradish Peroxidase*) (Sigma-Aldrich, USA) diluídos na proporção de diluição 1:4000. Para a determinação das subclasses de IgG foram empregados anticorpos anti- IgG1 (Cat. 1070-05), IgG2a (Cat.:1080-05), ou IgG2bc (Cat.: 1079-05) (Southern Biotech, USA). Após incubação de 1 h (37°C), as placas foram novamente lavadas (3x) com PBS-T e a revelação da reação foi realizada mediante adição de 100 µL/poço da solução reveladora (contendo OPD e peróxido de hidrogênio) por 15 min, a temperatura ambiente sob abrigo da luz. A reação foi interrompida com 50 µL/poço de ácido sulfúrico a 1 M (Synth, Brasil). A leitura da absorbância resultante foi realizada a 492 nm ($Ab_{S_{492nm}}$) em leitor de placa (Multiscan MS- Labsystems).

Para os ensaios cuja etapa de pré-adsorção foi adotada, as amostras de soro foram pré-incubados (1 h a 37°C), na diluição final de 1/100, com solução de bloqueio contendo as quatro proteínas Δ NS1 do DENV (1, 2, 3 e 4) na concentração de 22 ng/ul para cada proteína. Após incubação, as misturas contendo soro foram transferidas para as placas de ELISA previamente sensibilizadas com o antígeno Δ NS1 ZIKV.

Para os ensaios de antigenicidade as proteínas foram submetidas, ou não, à desnaturação térmica (aquecimento a 100°C por 10 min, seguido de resfriamento em gelo) antes da sensibilização das microplacas.

3.14.2. Versão Otimizada.

As soluções que compõem o protocolo de ELISA baseado na proteína Δ NS1 estabelecido *in house* foram parcialmente substituídas (Tabela 5). Assim, um protocolo otimizado foi então estabelecido (ELISA ZIKA-v IgG). Resumidamente, microplacas de Stripwell High Binding (Cat.: 2592, Corning, USA) foram sensibilizadas com o antígeno Δ NS1 ZIKV na concentração de 200 ng/poço (diluída em tampão carbonato/bicarbonato: 32,5 mM NaHCO₃, 14,9 mM Na₂CO₃, pH 9,6) por 1 h (37 °C). O bloqueio foi realizado com o reagente WellChampion (Cat.: 4900, KenEnTech, Dinamarca), conforme instruções do fabricante. As amostras de soro (previamente

inativadas por incubação a 56°C por 30 min) foram diluídas (1/10) em tampão de depleção [PBS1x-Tween 0,05% contendo 22 ng/ul de cada umas das proteínas ΔNS1 do DENV (1, 2, 3 e 4)] e incubadas a 37 °C por 1 h. Transcorrido esse tempo, as amostras de soro depletadas foram diluídas em solução diluente 1 (PBS1x-Tween 0,05%) na proporção de 1/10 e adicionada (100 µl/poço) à placa sensibilizada e bloqueada previamente com o antígeno ΔNS1 ZIKV. Após incubação (1 h, 37 °C) e ciclo de lavagem (5 vezes com PBST 1x-Tween 0,05%), anticorpo anti-IgG humano conjugado à HRP (1:4000) em tampão HRP Stabilizer (Cat.: 4800, KPL, USA) foi adicionado à placa (100 µl/poço), sendo incubado por 1 h (37 °C). Ao final, procedeu-se novo ciclo de lavagem, como posterior revelação do ensaio mediante adição de 100 µl/poço do reagente TMB (KenEnTech, Dinamarca) e parada da reação seguindo as instruções do fabricante. A leitura da absorbância resultante foi realizada a 450 nm (Abs_{450nm}) em leitor de placa (Multiscan MS- Labsystems).

Tabela 5. Otimização das soluções utilizadas no teste de ELISA baseado na proteína ΔNS1 ZIKV.

REAGENTE	PROTOCOLO <i>IN HOUSE</i>	PROTOCOLO ELISA ZIKA-v IgG
Tampão de Sensibilização	PBS 1x	Carbonato-Bicarbonato
Solução de Bloqueio	PBS 1X + 0,05% Tween-20 + Leite 3% + BSA 0,5%	SyntheticBlocking (Kem-En-Tec)
Solução de Lavagem	PBS 1X + Tween 0,05%	PBS 1X + Tween 0,05%
Diluyente da amostra	PBS 1X + Tween 0,05% + Leite 3% + BSA 0,5%	PBS 1X + Tween 0,05%
Diluyente das proteínas de adsorção	PBS 1X + Tween 0,05% + Leite 3%	PBS 1X + Tween 0,05%
Diluyente do anticorpo de detecção	PBS 1X + Tween 0,05% + Leite 3% + BSA 0,5%	HRP Stabilizer (KPL)
Solução de Revelação	OPD + H ₂ O ₂	TMB (Ken-En-Tec)
Solução de Parada	Ácido Sulfúrico (1 M)	Ácido Sulfúrico (0,2 N)

3.14.3. Avaliação do protocolo de ELISA estabelecido *in house*.

A especificidade dos protocolos de ELISA baseados nas proteínas ΔNS1 ZIKV ou EDIII ZIKV, estabelecidos *in house*, foram avaliados utilizando amostras de ascites

hiperimunes produzidas em camundongos infectados com DENV (*GenBank*: D00346.1), CHIKV (*GenBank*: AF339485.1), YFV (*GenBank*: X03700.1) ou ZIKV (*GenBank*: KF383035.1). Estas amostras foram cedidas gentilmente pelo Dr. Amadou Alpha Sall (Instituto Pasteur de Dakar, Senegal). Alternativamente, amostras de soro obtidas de camundongos AG129 saudáveis (Naive) ou infectados separadamente com o ZIKV^{BR} ou os quatro sorotipos de DENV foram também utilizadas (Tabela 6). A presença de anticorpos direcionados aos respectivos vírus foi confirmada por ELISA tendo como antígenos de fase sólida as proteínas ΔNS1 de ZIKV ou DENV1-4, bem como partículas dos respectivos DENV ou ZIKV.

Tabela 6. Amostras de soro ou ascites murinas utilizadas no trabalho.

TIPO DE AMOSTRA	VÍRUS	QUANTIDADE	ORIGEM
Ascite	DENV	4	Instituto Pasteur
Ascite	ZIKV	4	Instituto Pasteur
Ascite	YFV	4	Instituto Pasteur
Ascite	CHIKV	4	Instituto Pasteur
Soro	DENV1	14	In house (LDV/USP)
Soro	DENV2	9	In house (LDV/USP)
Soro	DENV3	10	In house (LDV/USP)
Soro	DENV4	7	In house (LDV/USP)
Soro	Naive	10	In house (LDV/USP)

Amostras de soro humano obtidas de pacientes infectados previamente pelo DENV e/ou ZIKV foram também utilizadas. Um conjunto de oito amostras DENV+ (coletadas antes de 2014, período prévio à epidemia do ZIKV no Brasil) foram gentilmente cedidas pelo professor Dr. Paolo Marinho de Andrade Zanotto (ICB/USP). Além disso, conjuntos de amostras de pessoas saudáveis (ZIKV⁻DENV⁻) ou infectados pelo ZIKV (com imunidade prévia ou não para o DENV [ZIKV⁺DENV⁺ ou ZIKV⁺DENV⁻]), foram cedidas pelo professor Dr. Edison Luiz Durigon (ICB/USP). Estas amostras foram validadas por RT-PCR (ZIKV) e PRNT90 (ZIKV e DENV).

A avaliação da positividade das amostras testadas foi realizada mediante determinação do ponto de corte (*cut-off*) baseando-se na média das absorbâncias (Ab_{492nm}) dos soros negativos acrescidos do valor de 2 desvios padrões em relação à média. Amostras com Ab_{492nm} superior ao *cut-off* foram consideradas positivas.

3.14.4. Validação do protocolo otimizado de ELISA ZIKA-v IgG.

A performance do ELISA ZIKA-v IgG foi avaliada frente a soros de indivíduos previamente infectados pelo ZIKV ou DENV, bem como de indivíduos vacinados para febre amarela (Tabela 7). As amostras foram cedidas gentilmente pelos professores Dr. Edison Luís Durigon (ICB/USP) e Dr. Albert Ko. Essas amostras foram validadas por RT-PCR (ZIKV e DENV) ou PRNT90 (ZIKV e DENV).

Para avaliação dos parâmetros de especificidade e sensibilidade do teste de ELISA ZIKA-v IgG, os resultados obtidos para as amostras do grupo G4 e G5 (Tabela 7) foram utilizados para determinação da curva ROC (do inglês, *Operating Characteristic Curve*), comparando-se o referido teste de ELISA com o PRNT90, realizado para o ZIKV. O valor de *cut-off* estabelecido para o ELISA ZIKA-v IgG foi de Ab_{8450nm} de 0,2295.

Tabela 7. Distribuição das amostras de soro humano obtidas de estudos de coorte.

GRUPO	AMOSTRAS	ORIGEM	QUANT.
G1	Dengue – confirmado por RT-PCR	Dr. Albert Ko	35
G2	Zika - confirmado por RT-PCR	Dr. Edison Durigon	10
G3	Vacinados para febre amarela	Dr. Albert Ko	40
G4	ZIKV positivas*	Dr. Albert Ko	65
G5	ZIKV negativos*	Dr. Albert Ko	85
Total			235

*Confirmadas por PRNT90 ZIKV.

3.15. *Western blot*

As amostras proteicas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% (SDS-Page) e transferidas para membrana de nitrocelulose (GE Healthcare, USA). O bloqueio da membrana foi realizado em solução de PBS-Tween 0,05% (PBS-T) acrescida de 3% de leite desnatado (Molico, Nestlé) por até 18 h (*overnight*) a 4 °C. A marcação primária foi realizada por incubação de 1 h à temperatura ambiente (T.A) com anticorpo monoclonal anti-HisTag (Cat.: MA1-21315, Invitrogen, USA) na diluição de 1:3000 ou anti-gD HSV1 na diluição de 1:10000, ambos preparados em tampão de bloqueio. Após lavagem da membrana por 3X com PBS-T, a marcação

secundária foi realizada com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à HRP (Cat.: A4416, Sigma-Aldrich, USA) (diluição 1:3000, em tampão de bloqueio) por 1h (T.A). Após novo ciclo de lavagem, as bandas reativas resultantes foram identificadas pela exposição das membranas à solução ECL Select™ (Cat.: RPN2235, GE Healthcare, USA), de acordo com as indicações do fabricante. Imagens foram capturadas em aparelho ChemiDoc™ XRS+ System (Bio-Rad, USA) utilizando o *software* ImageLab (Bio-Rad, USA).

3.16. Procedimento de imunização

3.16.1. Formulações vacinais baseadas em proteínas recombinantes purificadas.

Camundongos da linhagem C57BL/6 ou AG129 foram inoculados por via subcutânea de acordo aos seguintes grupos de imunização: 1) solução salina apirogênica (EQUIPLEX, Brasil) acrescida dos adjuvantes Poly (I:C) (Cat.: tlr1-pic-5, InvivoGen, USA) e LT-B; 2) 3,6 µg de Δ NS1 ZIKV; 3) 3,6 µg de Δ NS1 ZIKV co-administrada com 3,4 µg do adjuvante LT-B. 4) 3,6 µg de Δ NS1 ZIKV co-administrada com 50 µg do adjuvante Poly (I:C). 5) 10 µg de NS1 ZIKV; 6) 10 µg de NS1 ZIKV co-administrada com 3,4 µg do adjuvante LT-B. 7) 10 µg de NS1 ZIKV co-administrada com 50 µg do adjuvante Poly (I:C). Cada grupo de animais (n=5-7) recebeu três doses das formulações vacinais, sendo adotado um intervalo de 2 semanas entre as mesmas.

Para as imunizações baseadas nos antígenos EDIII ZIKV, Δ EDIII ZIKV e piZIKV, animais C57BL/6 foram inoculados por via intramuscular (i.m.) de acordo aos seguintes grupos de imunização: 1) PBS acrescido dos adjuvantes 100 µg Alum (Cat.: vac-alu-vac, InvivoGen, USA) e 1 µg LTK63; 2) 25 µg EDIII ZIKV co-administrada com 100 µg Alum; 3) 25 µg EDIII ZIKV co-administrada com 100 µg Alum e 1 µg LTK63; 4) 25 µg Δ EDIII ZIKV co-administrada com 100 µg Alum; 5) 25 µg Δ EDIII ZIKV co-administrada com 100 µg Alum e 1 µg LTK63; 6) 10 µg piZIKV; 7) 10 µg piZIKV co-administrada com 100 µg Alum; 8) 10 µg piZIKV co-administrada com 100 µg Alum e 1 µg LTK63. Alternativamente, camundongos da linhagem BALB/c foram inoculados por via subcutânea de acordo aos seguintes grupos de imunização: 1) Animais que receberam o veículo vacinal (PBS); 2) animais que receberam 10 µg de Δ NS1 ZIKV co-administrada com 1µg do adjuvante LT-1. Cada grupo de animais (n=3) recebeu três doses das formulações vacinais, sendo adotado um intervalo de 2 semanas entre as doses.

Todas as formulações vacinais foram preparadas contendo como aditivo a Polimixina B para uma concentração final de 40 µg/ml. Para o monitoramento de resposta de anticorpos específicos contra o antígeno vacinal, amostras de sangue dos animais foram obtidas por punção do plexo submandibular e processadas (coagulação a 37 °C por 15 min e retração do coágulo a 4 °C por 30 min, seguida de centrifugação à 3000 x g por 30 min, 4°C) para obtenção de soro. As amostras obtidas foram estocadas em freezers a – 20°C para análises posteriores. As coletas de sangue foram realizadas um dia antes de cada dose e 14 dias após a administração da última dose do protocolo vacinal.

Para os ensaios de avaliação da resposta celular o baço dos animais imunizados (linhagem C57BL/6) ou amostras de sangue anticoaguladas com heparina (linhagem AG129) foram obtidos 14 dias após a última dose vacinal. Os animais submetidos à retirada do baço foram previamente eutanasiados em câmara de CO₂, sendo a retirada cirúrgica do baço realizada em ambiente estéril. As amostras foram processadas e analisadas de acordo ao descrito no item 3.16.3.

3.16.2. Formulações vacinais baseadas em vetores plamidiaais.

Camundongos da linhagem C57BL/6 ou AB6 foram imunizados com 2 doses de 50 µg de pUMVC3, pNS1-ZIKV ou pgDNS1-ZIKV formulado (50 µl/animal) em solução salina 0,9% apirogênica (EQUIPLEX, Brasil). Para a imunização, os animais foram previamente anestesiados com uma mistura de Ketamina (CEVA, Brasil) e Xilazina (CEVA, Brasil) (100 e 10 mg/kg, respectivamente) administrada por via intraperitoneal (i.p.). Em seguida, os animais receberam injeções intramusculares (i.m.) com as formulações vacinais por meio de eletroporação (dois pulsos de 130 V com duração de 1 ms e quatro pulsos de 70 V com duração de 50 ms, com intervalo de 450 ms entre cada pulso) com o eletrodo CUY560-5-0.5 usando o NEPA21 Super Electroporator (Nepa Gene Co, Japão.). As doses vacinais foram intervaladas em 2 semanas. Amostras de sangue foram obtidas 14 dias após a administração de cada dose de acordo ao descrito no item 3.16.1.

3.17. Ensaios de citometria de fluxo.

3.17.1. Avaliação do reconhecimento da proteína NS1 ZIKV nativa por soros anti- Δ NS1 ZIKV e mAb 4H2.

Monocamadas de células VERO CCL-81 foram obtidas após semeadura (5×10^5 /poço) em placas de 24 poços (Costar, USA). As células foram infectadas com o ZIKV^{BR} (M.O.I = 1) por 24 h (37 °C, 5% CO₂). As células foram lavadas duas vezes com PBS (1 ml/poço), tripsinizadas e fixadas/permeabilizadas com tampão BD Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences, USA), de acordo as instruções do fabricante. Em seguida, as células foram incubadas (30 min em gelo) com diferentes diluições do soro α NS1 (1/1000 ou 1/2000) ou anticorpo monoclonal 4H2 (16 ng/ml ou 8 ng/ml) preparados em solução de permeabilização (BD Biosciences, USA). O mAb 4G2 (16 ng/ml) foi utilizado como um controle positivo do ensaio. Após ciclo de lavagem (2x com PBS + 2% SFB), as células foram incubadas com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado ao fluorocromo AlexaFluor 488 (Cat.: A11001, Invitrogen, USA) por 30 min em gelo. Após ciclo de lavagem as células foram suspensas em PBS + 2% SFB e avaliadas por citometria de fluxo em equipamento BD LSRFortessaTM (BD Biosciences, USA). Os dados obtidos foram analisados com *software* FlowJo v.10 (TreeStar, OR, USA).

3.17.2. Detecção da proteína NS1 ZIKV em células transfectadas.

Células HEK-293T transfectadas com os plasmídeos pUMVC3, pNS1-ZIKV ou pgDNS1-ZIKV foram obtidas de acordo ao descrito no item 3.7. As células foram fixadas, permeabilizadas, marcadas e analisadas de acordo ao descrito no item anterior (3.16.1). A marcação primária foi realizada com mAb 4H2 (5 μ g/ml) em gelo durante 30 min, sendo a marcação secundária realizada também com anticorpo de detecção anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor 488 (Cat. : A11001, Thermo Fisher Scientific) diluído 1:800.

3.17.3. Marcação intracelular de citocinas.

A marcação de citocinas intracelulares foi realizada em amostras de sangue periférico ou esplenócitos (obtidos após procedimento de maceração em meio RPMI) de camundongos imunizados. Para isso, as amostras de sangue periférico ou esplenócitos foram tratadas por 5 min (TA) com tampão de lise ACK (BioSourceInternational, Waltham, USA) para remoção das hemácias presentes, seguido de neutralização com

meio RPMI 1640 (Vitrocell, Brasil) acrescido de 2% SFB e centrifugação (500 x g, 5 min). Após novo ciclo de lise com o tampão de lise, as células foram recuperadas após centrifugação (500 x g, 5 min) e suspensas em meio RPMI completo [RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB, 2 mM L-glutamina, 1 mM piruvato de sódio (Gibco, USA), 1% vol/vol solução de aminoácidos não essenciais (Gibco, USA), 1% vol/vol solução de aminoácidos essenciais (Gibco), 1% vol/vol solução de vitaminas (Gibco, USA)), 55 µM 2β-mercaptoetanol (Gibco, USA)]. A viabilidade celular foi avaliada usando o corante de exclusão azul de Tripán 0,4% (Sigma-Aldrich, USA). A concentração celular foi mensurada em câmara de Neubauer e ajustada para os ensaios imunológicos.

Os esplenócitos ou células sanguíneas foram distribuídos (10^6 células em 200 µl/poço) em placas de 96 poços (Cat.: 3788, Corning, USA). Estas foram cultivadas por até 12 h (estímulo com peptídeo) ou 48 h (estímulo com o vírus Zika) a 37°C (5% CO₂) em meio RPMI completo contendo como aditivo Brefeldin A (10 µg/ml) (Cat.: 555029, BD Bioscience, USA) e monensina (10 µg/ml) (Cat.: 554724, BD Biosciences, USA), anticorpo anti-CD28 (0,5 µg/ml) (Cat.: 102102, BioLegend, USA), na presença ou ausência dos peptídeos 36, 125 ou 128 (5 µg/ml) (Tabela 1) ou infecção com o vírus Zika (M.O.I = 0,5), de acordo ao descrito previamente (115,116). Os reagentes Brefeldin A e monensina foram adicionados somente nas últimas 12 h prévias à finalização do ensaio. Ao final do período de cultivo, as células foram lavadas duas vezes com PBS+2% SFB. As células foram então incubadas (30 min, 4 °C) com anticorpos monoclonais anti-CD3 (PerCP-Cy5.5, Clone: 145-2C11) (Tonbo Biosciences, USA), anti-CD8 (APC ou FITC) (BD Biosciences, USA), anti-CD4 (APC-H7, Clone: GK1.5) (BioLegend, USA) e anti-CD11a (PE, Clone: 2D7) (BD Biosciences, USA). Após lavagem (2x com PBS 2% SFB), as células foram fixadas e permeabilizadas com tampão Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences, USA) de acordo as instruções do fabricante. Em seguida, as células foram incubadas (30 min, 4 °C) com anticorpos monoclonais anti-IFN-γ (PE, Clone: XMG1.2) (eBioscience, USA) ou (FITC, Clone: XMG1.2) (Tonbo Biosciences, USA); anti-IL-4 (BV421) (BD Bioscience), anti-TNFα (PE-Cy7, Clone: MP6-XT22) (BD Biosciences, USA), todos diluídos em tampão de permeabilização (Cat.: 554715, BD Biosciences, USA). Após novo ciclo de lavagem, as células foram suspensas em PBS+2% SFB e avaliadas em

equipamento BD LSRFortessa™ (BD Biosciences). Os dados obtidos foram analisados com *software* FlowJo v.10 (TreeStar, OR, USA).

3.18. Ensaios de Desafio

3.18.1. Infecção de camundongos AG129 com ZIKV.

Para padronização do ensaio de desafio camundongos da linhagem AG129 (8-11 semanas) foram infectados com diferentes doses (10^4 - 10^7 UFP/animal) do ZIKV^{BR}, formulado para o volume final de 50 µl em meio MEN acrescido de 1% SFB. Os animais foram inoculados por via subcutânea seguindo protocolo descrito previamente (117). Aos animais controles foi administrada somente a solução veículo (MEN + 1% SFB). Os animais infectados foram monitorados diariamente quanto ao peso corporal (mensurado com auxílio de balança analítica), aparecimento de sinais clínicos (fraqueza muscular, pelo eriçado, paralisia total ou parcial de membros, arqueamento da coluna) e mortalidade. Amostras de soro dos animais foram obtidas em dias alternados e estocadas a -80 °C para análise de viremia.

O desafio de animais AG129 imunizados foi realizado duas semanas após a terceira dose vacinal. Para isso os animais foram inoculados por via subcutânea com 50 µL de meio MEN+1%SFB contendo 10^5 UFP do ZIKV^{BR}. Os camundongos foram monitorados por até 13 dias quanto ao aparecimento de sinais de morbidade (fraqueza muscular, arqueamento da coluna, paralisia parcial ou total de membros), perda de peso corporal e mortalidade. Amostras de soro dos animais foram coletadas e estocadas a -80 °C para análise de viremia.

3.18.2. Desafio de animais AB6 imunizados com as vacinas de DNA.

Duas semanas após a administração da segunda dose vacinal, os camundongos AB6 imunizados foram infectados por via intravenosa (i.v.) com 10^6 UFP de ZIKV^{BR}. Os animais foram monitorados por até 15 dias quanto ao aparecimento de sinais clínicos de acordo com uma escala de pontuação arbitrária (saudável, pontuação 0; pelo eriçado, pontuação 1; paralisia, pontuação 2; coluna vertebral curvada, pontuação 3; moribundo, pontuação 4), mensuração do peso corporal e mortalidade. Amostras de soro foram coletadas e armazenadas a -80 °C para análise de viremia.

Para os experimentos de ELISpot os animais AB6 imunizados foram infetados duas semanas após a administração da segunda dose vacinal, conforme descrito acima.

Três dias após infecção, os animais foram eutanasiados e o baço dos mesmos foram recuperados e processados de acordo ao descrito nos itens 3.15.1. e 3.16.3.

3.19. ELISpot

O ensaios de ELISpot (do inglês, *Enzyme-linked Immunospot*) foram realizados de acordo com um protocolo previamente descrito (116). Resumidamente, os esplenócitos de camundongos imunizados e infectados foram distribuídos (2×10^5 células / poço) em placas de 96 poços (Millipore, USA), previamente revestidas com anticorpo de captura para IFN- γ (BD Biosciences, USA). Em seguida, as células foram cultivadas por 48 h (37 °C, 5% de CO₂) na presença ou ausência de peptídeos 36 e 128 (Tabela 1) derivados de NS1 (100 ng de cada peptídeo/poço). Após período de estimulação, as placas foram lavadas (3 \times com PBS e 5 \times com PBS-T) e incubadas (2 h, T.A) com mAb anti-IFN- γ de rato biotilado (BD Biosciences, USA) (2 μ g/ml). Após a lavagem, as placas foram incubadas com estreptavidina marcada com peroxidase (1:500) (Sigma-Aldrich, EUA) por 2 h em temperatura ambiente. As placas foram lavadas novamente e reveladas com TrueBlue™ Substrate (KPL, Milford, MA, USA) por 20 min. (T.A). Os *spots* resultantes foram contados e expressos como células produtoras de IFN γ / 10^6 esplenócitos.

3.20. Imunofluorescência.

3.20.1. Caracterização da especificidade do monoclonal anti-NS1 4H2.

Para avaliação do potencial diagnóstico do anticorpo monoclonal 4H2 (Anti-NS1 ZIKV), monocamadas de células VERO CCL-81 foram obtidas por cultivo em placas de cultura celular (Cat.: 3595, Costar, USA) de 48 poços (7×10^4 cél./poço) utilizando meio MEM (Vitrocell Embriolife) suplementado com 2% SFB. As células foram incubadas (37 °C, 5% CO₂) por 24 h. As células foram infectadas separadamente com o ZIKV^{BR} ou DENV2 (cepa NGC) a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 1,0. Após 24 h do início da infecção as células foram lavadas com PBS 1x e fixadas (15 min., T.A.) com solução de paraformaldeído 4% (4% PFA) em PBS (250 μ l/poço). Após fixação, as células foram permeabilizadas (10 min., T.A.) com solução de 0,1 % Triton X-100 (Thermo Scientific, USA) preparada PBS (250 μ l/poço). Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS e bloqueadas com solução de 2% BSA em PBS (30 min., T.A.). As células infectadas pelos diferentes vírus foram então incubadas

(1 h, T.A., sob agitação) com diferentes concentrações dos anticorpos monoclonais 4H2 (10, 20 e 40 µg/ml), 4F6 (20 µg/ml) ou 4G2 (40 µg/ml) diluídos previamente em solução de bloqueio (100 µl/poço). Após lavagem (3 vezes) com PBS, as células foram incubadas (45 min., T.A., sob agitação) com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com AlexaFluor 488 (Cat.: A11001, Invitrogen, USA) (75 µl/poço). Após novo ciclo de lavagem, as células foram incubadas (20 min., T.A.) com corante para núcleo Hoechst 33342 (Life Technologies, USA) diluído (1/500) em PBS (75 µL/poço). Após ciclo de lavagem as células foram visualizadas em microscópio de fluorescência Evos FL (Thermo Scientific, USA) e imagens foram capturadas com aumentos de 100x e 200x.

3.20.2. Detecção da proteína NS1 ZIKV em células tranfectadas.

Células HEK-293T tranfectadas foram lavadas (2×) com PBS e fixadas com 4% PFA (15 min., T.A.). Após a incubação, as células foram permeabilizadas com 0,1% Triton X-100 em PBS (15 min à TA) e bloqueadas com uma solução de bloqueio (BS) (2% BSA diluído em PBS) por 30 min (T.A.). Após um novo ciclo de lavagem (3×) com PBS, as células foram marcadas com mAb anti-NS1 ZIKV 4H2 (20µg/ml), diluído em BS e mantidas por 1 h (T.A.), sob agitação. Após lavagem (3 ×) com PBS-T, as células foram incubadas (45 min., T.A.) com anticorpo IgG anti-camundongo conjugado com AlexaFluor 488 (Cat .: A11001, Invitrogen, USA). Finalmente, as células foram lavadas com PBS-T e observadas em microscópio de imunofluorescência (Evos FL Thermo Scientific, USA). Imagens foram capturadas com aumento de 100x.

3.21. RT-PCR

Para a análise da replicação viral em animais AG129 infectados, por meio da detecção da quantidade de cópias de RNA viral, amostras de soro (50 µL) foram submetidas à extração do material nucleico utilizando o Kit MagMax™ Core Nucleic Acid Purification (Applied Biosystem) conforme o requerido pelo fabricante, com o auxílio do equipamento extrator MagMAX™ Express 96 (Applied Biosystem). O ensaio de RT-PCR foi realizado de acordo a protocolo previamente estabelecido (118,119), utilizando oligonucleotídeo iniciador senso ZIKV 1086 5'-CCGCTGCCCAACACAAG-3', antisenso ZIKV 1162c 5'-CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT-3 e sonda com gene marcado ZIKVP 1107-FAM-AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACTCAA (11). O ensaio foi realizado

utilizando 5 µl do RNA extraído, 1 µl da mistura de iniciadores/sonda (10 pM/µl) e 9 µl do reagente AgPathIDTM OneStep RT-PCR (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. A amplificação gênica foi avaliada em equipamento de Real-Time PCR System 7500 (Thermo Scientific, USA). Os resultados obtidos foram analisados com *software 7500 Software v2.0.6* (Thermo Scientific, USA), sendo calculados e expressos em cópias de genoma viral/ml com base em uma equação de regressão linear obtida de curva padrão do ensaio.

3.22. Titulação viral e PRNT

Diluições seriadas das amostras de soro obtidas dos animais infectados ou de cultura viral foram adicionadas em placas (24 poços) contendo monocamadas da linhagem celular VERO (10⁵ células/poço) e incubada por 1 h a 37°C. Após incubação, a mistura foi retirada de contato com a monocamada celular por aspiração e as células incubadas durante 5-10 dias em estufa (37 °C, 5 % CO₂) com adição de 1 ml/ poço de meio MEM acrescido de carboximetilcelulose (1%) e SFB (2%). Ao final do ensaio a monocamada celular foi fixada com formaldeído (4%) por 15 min., lavada com água corrente e corada com solução de cristal violeta para evidenciação da formação de placas de lise. As placas de lise foram contabilizadas e expressas em unidades formadoras de placa de lise (UFP) por ml.

Para os ensaios de PRNT (do inglês, *Plaque reduction neutralization test*) diluições seriadas (log. 2) das amostras de soros (previamente inativadas por incubação a 56 °C/ 30 min) foram incubadas com quantidade fixa (100 UFP) de partículas do ZIKV ou DENV1-4 por 30 min a 37°C. Após incubação, as misturas vírus/soro foram adicionadas sobre monocamadas de células VERO estabelecidas previamente em placas de 24 poços. Após incubação (1 h, 37 °C), a mistura foi retirada de contato com a monocamada celular por aspiração, sendo os passos seguintes análogos ao de titulação viral descrito anteriormente. Ao final do experimento, as placas de lise foram contabilizadas e expressas em unidades formadoras de placa de lise (UFP). Foi considerado o título neutralizante como sendo aquele anterior à última diluição em que se observa redução de 50% (PRNT50) ou 90% (PRNT90) na formação de placas de lise viral quando comparado ao controle.

3.23. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com o *software* Prism 6 (GraphPad Software Inc, LA Jolla, CA). O teste t foi usado para comparar apenas dois grupos. A ANOVA de uma via foi aplicada com o teste de Bonferroni para comparar os resultados envolvendo vários (≥ 3) grupos. ANOVA de duas vias seguida pela correção de Bonferroni foi usada quando os dados envolveram vários grupos e mais de uma variável (*time-point*). O teste de Log-rank (Mantel-Cox) foi usado para analisar os dados de sobrevida e morbidade. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p (p) foi $\leq 0,05$. Para o cálculo da curva ROC foi utilizado o programa Medcalc (MedCalc Software Ltd, Acaciaaan, Ostend, Belgium) de acordo a protocolo previamente estabelecido (120).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho foram divididos em quatro capítulos principais visando a melhor compreensão do conteúdo apresentado. Cada capítulo é composto pela descrição dos resultados organizados em subseções, bem como uma sessão de discussão relacionada a cada capítulo. No primeiro capítulo estão apresentados os resultados referentes ao desenho, obtenção e caracterização de antígenos recombinantes baseadas nas proteínas NS1 do ZIKV e DENV (sorotipos 1-4). Parte destes resultados foram publicados na revista *BMC Biotechnology* (121) (Apêndice B). No segundo capítulo, descreve-se a obtenção de diferentes versões da proteína EDIII ZIKV. De posse das proteínas EDIII ZIKV e Δ NS1 ZIKV, procedemos então à padronização de ensaios de sorodiagnóstico para detecção específica de anticorpos anti-ZIKV, os quais foram descritos no terceiro capítulo. Por fim, o quarto capítulo se concentra nos resultados referentes à avaliação da imunogenicidade e capacidade protetora de formulações vacinais baseadas das referidas proteínas em associação com diferentes adjuvantes. Alternativamente, vacinas de DNA baseadas na proteína NS1 ZIKV foram desenhadas e obtidas, sendo a imunogenicidade e capacidade protetora também avaliadas em protocolo de imunização e desafio com ZIKV em modelo murino. Parte dos resultados deste último capítulo foram publicados na revista *Frontiers in Medical Technology* (122) (Apêndice B).

4.1. CAPÍTULO I. Desenho e obtenção de antígenos recombinantes baseados na proteína NS1 ZIKV.

A proteína NS1 tem sido largamente utilizada como antígeno base para ensaios de diagnóstico sorológico de *Flavivirus*, especialmente para DENV e ZIKV (47,58,66,123,124). Além disso, diferentes formulações vacinais baseadas nesta proteína demonstraram efeito protetor contra a infecção pelo ZIKV em nível pré-clínico, evidências estas que ilustram o seu potencial vacinal (96,99,100,125). Assim, inicialmente buscamos expressar e purificar a proteína NS1 ZIKV, a ser utilizada como antígeno controle durante a padronização dos ensaios sorológicos para detecção

específica do ZIKV bem como empregada como candidato vacinal em ensaios de imunização contra o ZIKV.

4.1.1. Expressão, purificação e validação antigênica da proteína NS1 ZIKV.

A sequência da proteína NS1 ZIKV foi sintetizada comercialmente no vetor pET28a, sendo a construção obtida utilizada para a transformação e avaliação da expressão proteica na linhagem de *E. coli* BL21(DE3)-Ril. Além disso, diferentes temperaturas de indução da expressão proteica (37°C e 18°C) foram testadas visando maximizar a sua concentração na fração solúvel do extrato bacteriano. Como é possível observar na figura 2, a proteína NS1 ZIKV foi expressa na linhagem de *E. coli*, sendo a proteína alvo detectada majoritariamente na fração insolúvel do extrato bacteriano. Com objetivo de recuperar a proteína NS1 ZIKV na fração solúvel do extrato, a lise da massa bacteriana, obtida após indução da expressão da proteína alvo, foi avaliada em dois tampões: HEPES (20 mM HEPES, 500 mM NaCl, 20% glicerol, pH 8,0) e Fosfato de Sódio I (100 mM Fosfato de Sódio, 500 mM NaCl, 20% glicerol, pH 8,0). Conforme ilustrado na Figura 3, mesmo após realizar testes de lise da massa bacteriana nos tampões indicados, a proteína concentrou-se em sua totalidade na fração insolúvel do extrato bacteriano. Assim, a aplicação de métodos alternativos de renaturação *in vitro* (do inglês, *Refolding*) para recuperação da proteína NS1 ZIKV de forma solúvel se fizeram necessários.

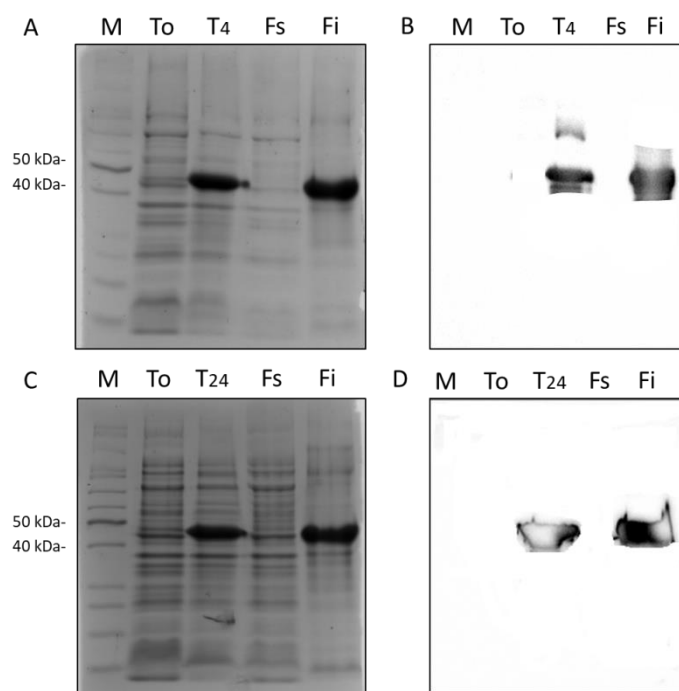


Figura 2. Teste de expressão da proteína NS1 ZIKV na linhagem de *E. coli* BL21(DE3)-RIL. Culturas da linhagem de *E. coli* BL21(DE3)-RIL transformada com o plasmídeo pETNS1-ZIKV foram induzidas à 37 °C (A e B) ou 18°C (C e D). Amostras antes e após a indução da proteína alvo foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) (A e C) e ensaio de *western blot* (B e D) utilizando anticorpo monoclonal anti-HisTag. Descrição: canaleta M corresponde ao marcador de massa molecular; canaleta T0, extrato celular total sem indução; canaletas T4 ou T24, extrato celular total após indução; canaleta Fs, fração celular proteica solúvel após indução; canaletas Fi, fração celular proteica insolúvel após indução, solubilizada em tampão desnaturante contendo 8 M de ureia.

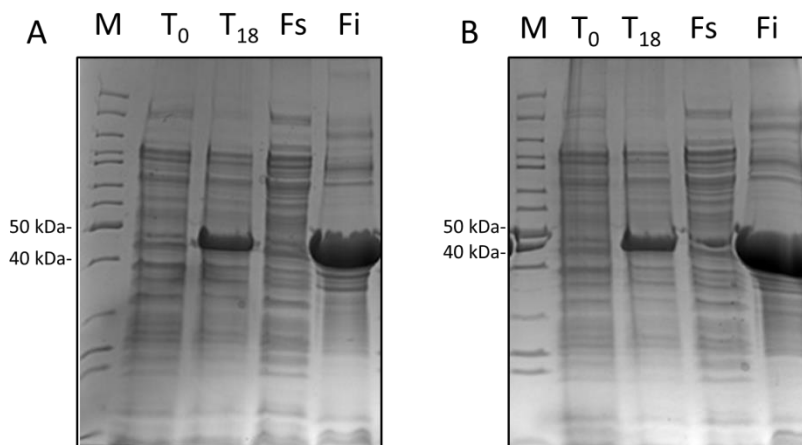


Figura 3. Teste de expressão da proteína NS1 ZIKV e lise da massa bacteriana induzida em diferentes tampões. A linhagem de *E. coli* BL21 (DE3)-RIL capaz de expressar a proteína NS1-ZIKV foi induzida a 18 °C/18 h. Alíquotas antes e após a indução, e das frações solúvel e insolúvel do extrato proteico bacteriano obtidos após lise em tampão HEPES (A) ou Fosfato de Sódio (B) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% (SDS-PAGE). Descrição: canaleta M corresponde ao marcador de massa molecular; canaleta T0, extrato celular antes da indução; canaleta T18, extrato celular

18 h após a indução; canaleta Fs, fração solúvel do extrato proteico bacteriano; canaleta Fi, fração insolúvel do extrato proteico bacteriano.

Em geral, a superexpressão de proteínas recombinantes em *E. coli* apresenta a desvantagem de deposição das mesmas em corpúsculos de inclusão insolúveis (IB), sendo necessário empregar técnicas para obtenção da proteína de interesse de forma solúvel, com estrutura, antigenicidade e função preservadas (126,127). Assim, neste trabalho para recuperar a proteína NS1 ZIKV de forma solúvel a partir de corpos de inclusão insolúveis foi adotado o método de renaturação *in vitro* por diluição pulsada seguida de purificação por cromatografia de afinidade ao níquel (CAN) padronizado previamente pelo nosso grupo de pesquisa (109). O material resultante da purificação proteica foi dialisado para tampão homólogo (HEPES ou Fosfato de Sódio I). Conforme ilustrado na Figura 4, a proteína NS1 foi recuperada de forma solúvel, apresentando a massa molecular esperada de 44,7 kDa quando submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida. Além disso, dentre as duas condições testadas, o tampão Fosfato de Sódio I resultou na melhora da recuperação proteica após diálise (Figura 4 D).

Embora tenha sido possível recuperar a proteína NS1 ZIKV, seu recongelamento resultou em precipitação proteica parcial, um indicativo de reduzida solubilidade da proteína alvo. Desta forma, a obtenção da NS1 ZIKV foi também avaliada em condições reduzidas de salinidade utilizando o tampão Fosfato de Sódio II (100 mM Fosfato de Sódio, 300 mM NaCl, 20% glicerol, pH 8,0) (Figura 4, E e F). Nesta nova condição uma menor perda proteica após procedimento de diálise foi observada (Figura 4F). Assim, após otimização da purificação da proteína no tampão indicado (incluindo duas etapas de lavagem prolongadas contendo 50-100 mM de Imidazol), a proteína pôde ser recuperada de forma pura e solúvel (Figura 5A), sendo o rendimento proteico final estimado em 2,5 mg de proteína por litro de cultura bacteriana.

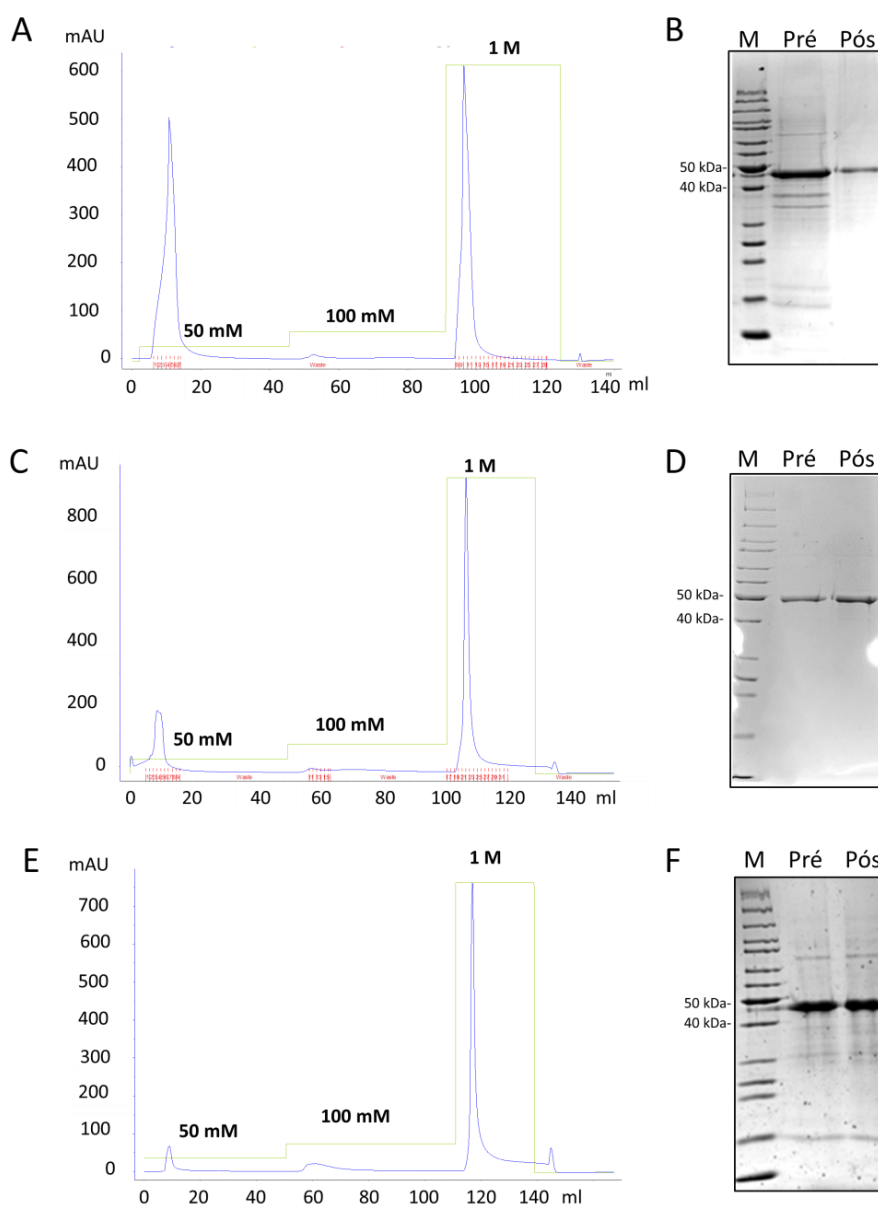


Figura 4. Purificação da proteína NS1 ZIKV e avaliação após diálise. A proteína NS1 ZIKV foi submetida à renaturação *in vitro* seguida de purificação por cromatografia de afinidade ao níquel utilizando os tampões HEPES (A), Fosfato de Sódio I (500 mM NaCl) (C) e Fosfato de Sódio II (300 mM NaCl) (E). As alíquotas resultantes da purificação foram reunidas e submetidas à diálise em tampão homólogo para retirada do imidazol remanescente. Amostras obtidas antes e após diálise em cada um dos tampões foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% (SDS-PAGE): B, HEPES; D, Fosfato de Sódio (500 mM NaCl) e F, Fosfato de Sódio (300 mM NaCl). Descrição: canaleta M corresponde ao marcador de massa molecular; canaleta pré, corresponde a alíquotas obtidas antes da diálise; canaleta pós, corresponde a alíquotas obtidas após a diálise.

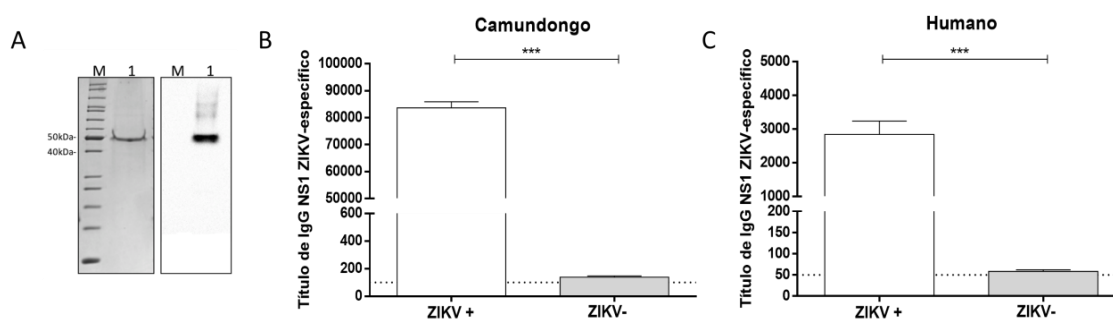


Figura 5. Avaliação da antigenicidade da proteína NS1 ZIKV. As alíquotas das frações resultantes da purificação da proteína alvo foram reunidas e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% (SDS-PAGE) e ensaio de *western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-HisTag (A). A reatividade da proteína NS1 ZIKV com amostras de soro provenientes de camundongos (B) ou paciente (C), previamente infectados ou não pelo ZIKV, foi mensurada por ELISA utilizando a mesma como antígeno de fase sólida. Os resultados são representados como valores médios (barras) \pm DP dos títulos anticorpos IgG antígeno-específico. *** $p < 0,0001$ (Test t). Descrição: canaleta M = marcador de peso molecular; 1, alíquota da proteína NS1 ZIKV purificada.

Conforme descrito anteriormente, a proteína NS1 ZIKV foi obtida a partir de um modelo procarioto de expressão, o qual não é capaz de promover algumas modificações pós-traducionais. Além disso, a mesma foi submetida a processo de renaturação *in vitro*. Com objetivo de avaliar a qualidade da proteína obtida, a preservação da antigenicidade da NS1 ZIKV foi avaliada por ELISA utilizando amostras de camundongos ou pacientes previamente infectados ou não pelo vírus Zika. Como é possível observar na figura 5 (B e C), a proteína foi reconhecida especificamente por soros controles ZIKV⁺, sendo este resultado indicativo de preservação das características antigênicas semelhantes à proteína nativa. Assim, os dados apresentados indicam que a proteína produzida preservou sua antigenicidade, característica fundamental para a aplicação desta no desenho de formulações vacinais e/ou ensaios sorológicos para o ZIKV.

4.1.2. Otimização da obtenção da proteína NS1 ZIKV utilizando a tecnologia de renaturação *in vitro* sob pressão hidrostática.

Conforme descrito na sessão anterior (4.1.1) a proteína NS1 ZIKV foi obtida a partir da fração insolúvel do extrato bacteriano utilizando protocolo de renaturação *in vitro* por diluição pulsada. Entretanto, após diálise para retirada do imidazol remanescente da purificação, verificamos que parte da proteína obtida apresentou-se instável e precipitou em concentrações maiores que 0,2 mg/ml, bem como apresentou

reduzida eficiência de recuperação (~2,5 mg/litro de cultura). Apesar de a proteína obtida nas condições testadas ter preservado sua antigenicidade e imunogenicidade, a sua aplicação futura em formulações vacinais ou testes de sorodiagnóstico se fez limitada devido ao ineficiente método de obtenção. Assim, visando melhorar a eficiência de obtenção da proteína NS1 ZIKV, nesta etapa do trabalho buscamos aplicar métodos alternativos de renaturação proteica *in vitro*.

Neste sentido, a técnica de solubilização de corpos de inclusão proteicos sob alta pressão hidrostática (do inglês, *high hydrostatic pressure* - HHP) apresenta como vantagem a capacidade de preservar a estrutura secundária contida nos IBs, reduzindo as interações eletrostáticas e exposição de regiões hidrofóbicas intramoleculares (128–130). Atrelado a isso, o uso de pH alcalino permite solubilizar proteínas agregadas por repulsão eletrostática (131). A influência do pH elevado também foi descrito como uma técnica capaz de solubilizar os IBs com eficiente renovelamento subsequente, na presença de um agente desnaturante em baixas concentrações (2 M de ureia) (132). Assim, nesta etapa do trabalho utilizamos de forma inédita a associação da técnica de solubilização de IBs proteicos usando HHP e pH alcalino. Os resultados foram obtidos em colaboração com o grupo de pesquisa coordenado pela Dra. Lígia Morganti (IPEN/USP), os quais foram compilados e publicados junto ao periódico BMC Biotechnology (Apêndice B). Partes desses resultados estão descritos a seguir.

Inicialmente buscamos avaliar a melhor condição de solubilização dos IBs contendo agregados da proteína NS1 ZIKV (NS1-IB). A HHP foi testada em associação com o agente caotrópico cloridrato de guanidina (GndHCl) ou diferentes condições de pH (7-12). Conforme descrito anteriormente na literatura, a pressão de 2,4 kbar demonstrou ser eficiente na solubilização de agregados proteicos. Além disso, a incubação em níveis reduzidos de pressão (0,35-0,7 kbar) promoveu o renovelamento proteico com menor taxa de agregação ao final do processo (133,134). Devido a isso, as amostras de IBs contendo NS1 foram incubadas sob pressão de 2,4 kbar por 1,5 h seguidas de redução da pressão para 0,4 kbar e incubação por mais 14,5 h (aqui denominada: 2,4 /0,4 kbar). Para estes ensaios a incubação sob pressão atmosférica (1 bar, 16 h) foi usada como controle. Conforme ilustrado na figura 6, a associação de HHP (2,4 /0,4 kbar) promoveu a melhor desagregação proteica, mensurada

indiretamente pela redução da dispersão de luz (LS) a 315-325 nm, quando comparada às amostras incubadas em pressão atmosférica (PA). Como esperado, a associação de HHP com GdnHCl (0,5-3 M) potencializou a desagregação da proteína NS1 (Figura 6A). Interessantemente, a aplicação de HHP em pH 10-12 também demonstrou ser eficiente na solubilização dos NS1-IBs. Além disso, quando o sobrenadante das suspensões incubadas em PA ou HHP, obtidos após centrifugação, foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida, a proteína NS1 ZIKV (44,7 kDa) foi detectada somente quando aplicada as condições de HHP em pH alcalino de 10-12 (Fig. 6, C e D). Assim, esses resultados indicam que a HHP, realizada em pH alcalino na faixa de 10 a 12, consiste em uma estratégia eficiente na solubilização de IBs contendo a proteína NS1 ZIKV.

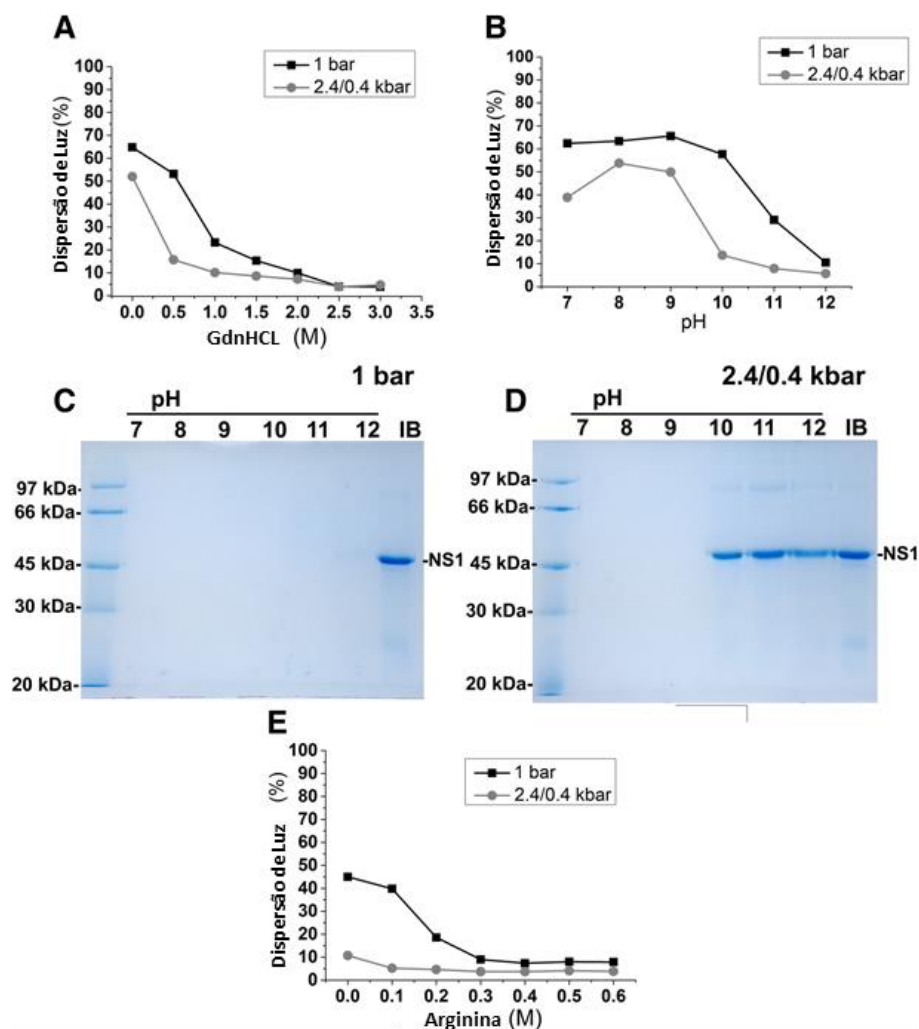


Figura 6. Avaliação da solubilização sob alta pressão hidrostática de corpos de inclusão contendo a proteína NS1 ZIKV. Suspensões da proteína NS1 ZIKV foram submetidas ao tratamento sob pressão de 2.4 kbar por 90 min. seguido de incubação a 0.4 kbar por 14,5 h (2,4 /0,4 kbar). Alternativamente, as amostras foram incubadas a 1 bar por 16h. (A) Curvas de dispersão de luz (LS) obtida para amostras diluídas em tampão contendo diferentes concentrações de GdnHCl. (B) Curvas de LS obtida para as amostras diluídas em tampão contendo diferentes condições de pH. (C e D) Análise do perfil eletroforético em gel de poliacrilamida de amostras das suspensões proteicas submetidas aos tratamentos com 1 bar ou 2.4/0.4 kbar, respectivamente. (E) Curva de LS obtida para as amostras diluídas em tampão contendo diferentes concentrações de Arginina. A LS foi mensurada em aparelho espectrofotômetro (315-325 nm), sendo a área dos picos obtidos utilizados para plotagem. O valor de LS obtido para a suspensão a um pH 8,0, lido imediatamente a 1 bar, foi considerado como sendo de 100%. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

A arginina (Arg) consiste em um aminoácido descrito como agente estabilizante de proteínas em solução, um inibidor da agregação proteica, bem como um auxiliar no processo de enovelamento de proteínas recombinantes (135–137). Assim, considerando obter condições que maximizem não só a solubilização dos IBs, mas também a

renaturação posterior da proteína e sua estabilidade em solução, avaliamos a influência do uso da Arg junto ao método de HHP. Como esperado, a solubilização proteica por HHP foi mais eficiente quando comparada a solubilização em pressão atmosférica (Figura 6E). Por outro lado, a presença de arginina, mesmo em concentração reduzida (0,1 M) potencializou a solubilização dos IBs contendo NS1 submetidos à alta pressão, sendo, portanto, uma alternativa promissora.

A etapa seguinte consistiu na análise do grau de enovelamento da proteína NS1 solubilizada nas condições descritas anteriormente. Para isso, as mudanças conformacionais na proteína foram mensuradas indiretamente pela intensidade de fluorescência intrínseca do triptofano (Trp). Visto que a proteína NS1 ZIKV contém 14 resíduos de Trp em sua estrutura, o seu grau de enovelamento foi estimado mediante o monitoramento dos picos de fluorescência intrínseca das amostras proteicas solubilizadas. Para este parâmetro observamos que a solubilização de NS1 em pH alcalino poderá ser acompanhada apenas por desdobramento parcial (Figura 7). Entretanto, esse resultado demonstrou-se inconclusivo devido à ausência de aumento no pico de intensidade de fluorescência intrínseca obtida para os diferentes tratamentos (Figura 7A).

A análise da proteína NS1 solubilizada em pH alcalino e HHP também foi realizada por cromatografia de exclusão por tamanho. Ao avaliarmos o sobrenadante das suspensões proteicas foi possível observar que a aplicação de HHP na faixa de pH 11,0 a 12,5 proporcionou maior solubilização dos agregados proteicos com volume de eluição compatível com as formas dimérica (11,5 ml, correspondendo à 86,5 kDa) e monômeros (12,8 ml, correspondendo à 52,6 kDa), de acordo com a equação de regressão linear obtida para a calibração da coluna de exclusão de tamanho (Figura 8). A presença de Arg contribuiu para a dissociação dos oligômeros de NS1, para a qual a condição de pH 11 com adição de arginina (0,4 M) promoveu maior recuperação de dímeros e monômeros de NS1, com significativa redução de oligômeros (Figura 9).

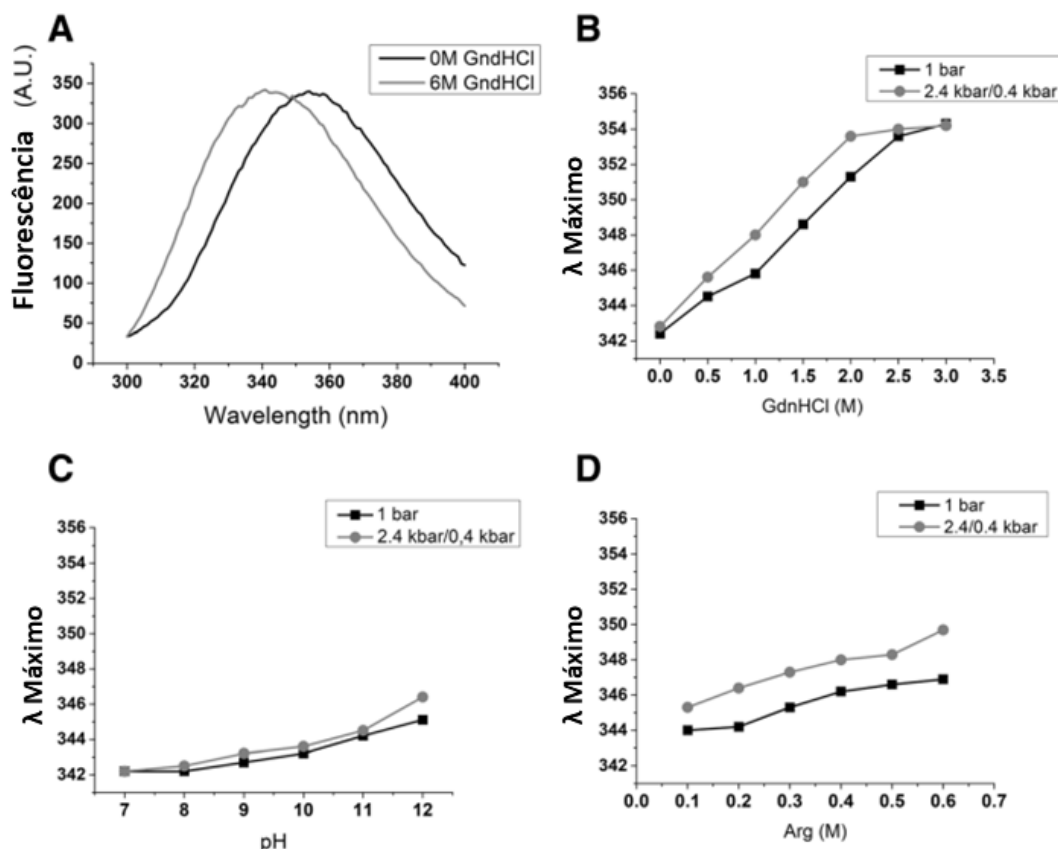


Figura 7. Avaliação do enovelamento proteico de IBs tratados com HHP em associação com pH alcalino e Arginina. Suspensões de IBs contendo NS1 foram tratadas com pressão de 2,4 kbar/0,4 kbar ou a 1 bar. (A) Fluorescência intrínseca (Trp) avaliada em suspensões de IB contendo NS1. (B) λ máximo de fluorescência vs concentração de GdnHCl. (C) λ máximo de fluorescência vs pH. (D) λ máximo de fluorescência vs concentração de Arg. Uma excitação a 290 nm foi usada para determinação da fluorescência intrínseca e a emissão foi mensurada entre 300 e 400 nm. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

As suspensões proteicas submetidas à HHP, sob as condições representadas nas figuras 6 e 7, foram dialisadas para tampão homólogo em pH 8,5. A ocorrência de agregação proteica foi avaliada após remoção de agregados insolúveis por centrifugação, sendo o rendimento final estimado para cada condição testada. Como é possível observar na figura 10, maiores níveis (6 vezes) de NS1 foram obtidos para as amostras submetidas a HHP em pH alcalino, especialmente em pH 11, quando comparada com amostras submetidas à compressão na presença de GdnHCl. Esses resultados indicam maior grau de agregação após a diálise nas amostras tratadas com GdnHCl, os quais possivelmente estão relacionados ao menor grau de enovelamento dessas amostras. Além disso, a recuperação da NS1 a partir de IBs submetidos à HHP em pH 11 ou 11,5, na presença de arginina (0,4 M), atingiu aproximadamente 68 mg de

NS1 por litro de cultura bacteriana. Esse rendimento é 27,2 vezes maior comparado ao rendimento obtido por renaturação *in vitro* da proteína NS1 ZIKV (2,5 mg/L) sob pressão atmosférica, utilizando o protocolo estabelecido previamente na sessão 4.1.1.

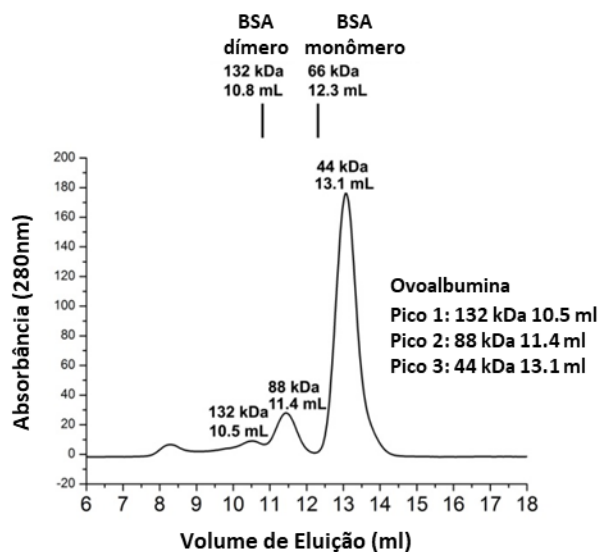


Figura 8. Calibração da coluna de exclusão molecular Superdex 200 10/300. Amostras controles contendo monômeros (44 kDa), dímeros (88 kDa) e trímeros (132 kDa) de ovalbumina, bem como monômero (66 kDa) e dímero (132 kDa) de albumina de soro bovino foram aplicadas em coluna Superdex 200 10/300. Os volumes de retenção das amostras foram obtidos e utilizados como curva padrão na análise das amostras da proteína NS1 ZIKV.

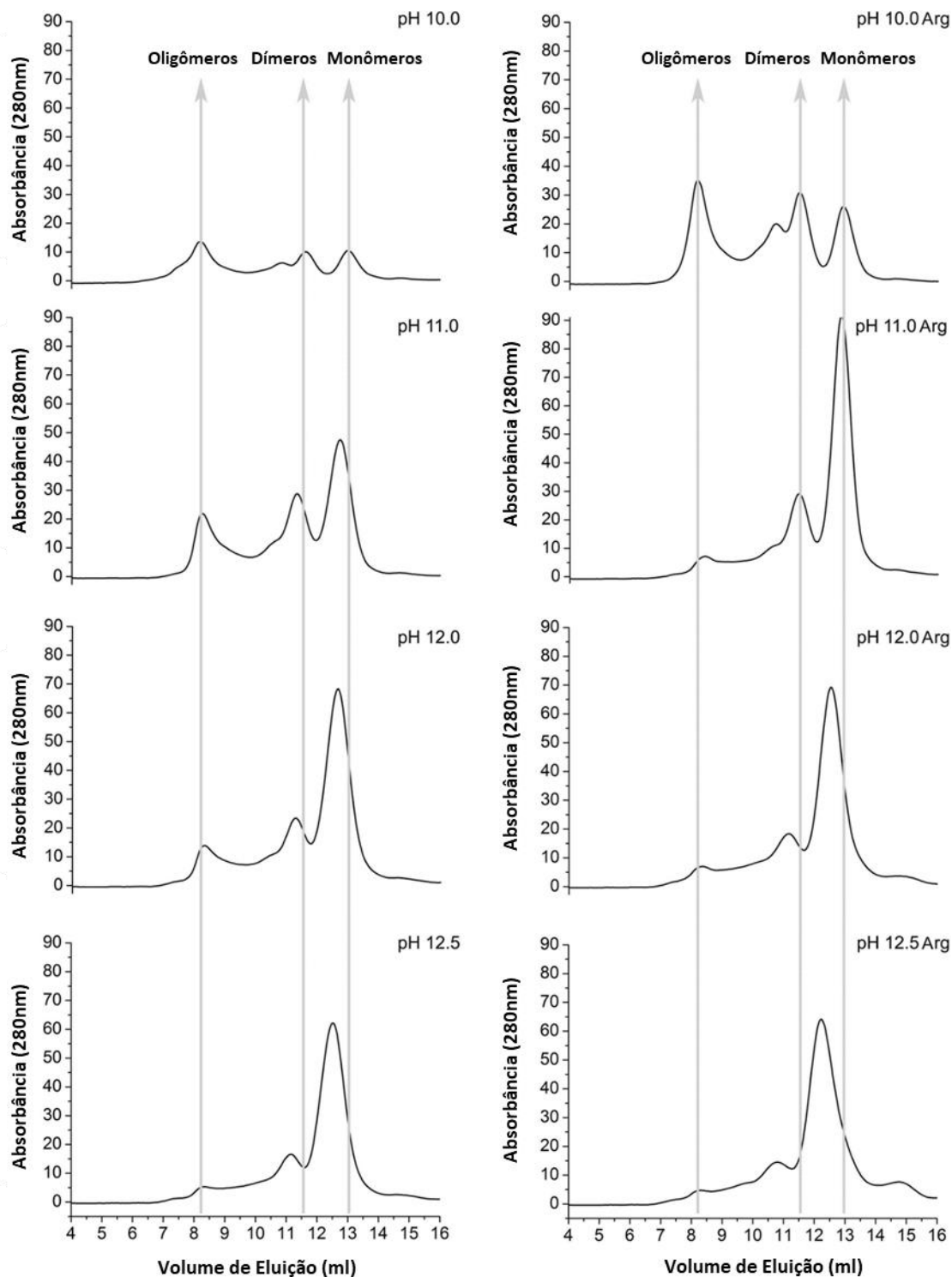


Figura 9. Avaliação da formação de oligômeros em NS1-IBs solubilizados pela aplicação de HHP em pH alcalino. Cromatogramas de eluição resultantes da análise por técnica de exclusão molecular realizada com sobrenadantes de suspensões da proteína NS1 ZIKV solubilizadas por HHP (2,4kbar / 0,4 kbar) sob diferentes condições, conforme indicado nas figuras.

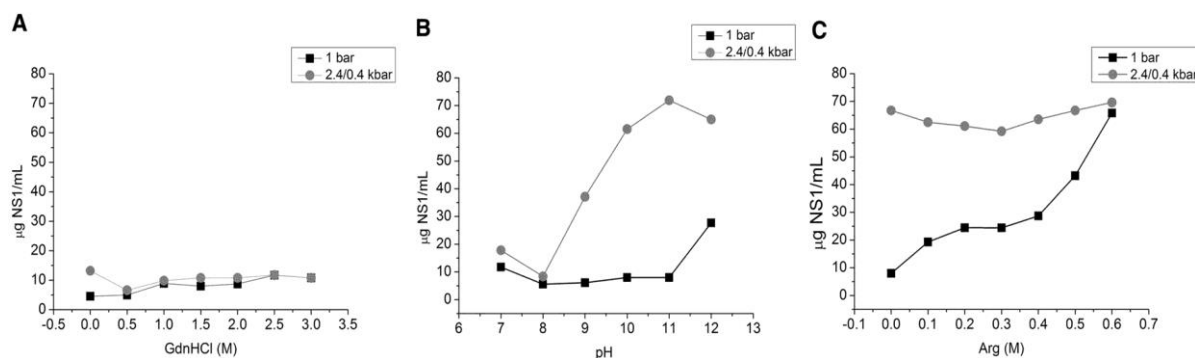


Figura 10. Avaliação da recuperação da proteína NS1 ZIKV a partir de IBs solubilizados com HPP. IBs contendo a proteína NS1 foram diluídos em tampões contendo concentrações crescentes de GdnHCl (A), arginina (C) ou diferentes condições de pH (B). As suspensões proteicas foram submetidas aos tratamentos de 2,4/0,4 kbar ou a 1 bar, sendo ao final dialisadas para tampão Tris-HCl (50 mM, pH de 8,5). A concentração da proteína NS1 foi mensurada no sobrenadante das preparações e expressa em microgramas de NS1 por mililitro.

Além do rendimento e solubilidade, um parâmetro importante na obtenção da proteína NS1 ZIKV consiste na preservação da sua antigenicidade. Assim, a reatividade da proteína NS1 ZIKV obtida nas melhores condições testadas (HHP sob pH 11,0 ou 11,5, em associação com Arg), foi avaliada por ELISA utilizando soros de pacientes previamente infectados ou não pelo ZIKV. Para estes ensaios a presença do par redox glutationa reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), que é frequentemente usado para melhorar a formação de ligações dissulfeto em protocolos de renaturação *in vitro* (138) ou do reagente redutor ditioneitol (DTT), também foi analisada em relação ao tratamento em pH 11 na presença de Arg (Figura 11). Todas as amostras renaturadas com HHP foram reativas frente a soros positivos para ZIKV, sendo que os maiores títulos de anticorpos, obtidos para os tratamentos em pH 11 (com Arg) e pH 11,5 (com Arg e GSH/GSSG), foram equiparáveis aos obtidos para a proteína NS1 controle (renaturada com protocolo realizado à pressão atmosférica descrito na sessão 4.1.1). Por outro lado, a presença de DTT (2 mM) durante a compressão levou a um decaimento da reatividade da NS1. Além disso, a presença de GSH/GSSG não impactou significativamente a antigenicidade da proteína NS1 em pH 11 (Figura 11A).

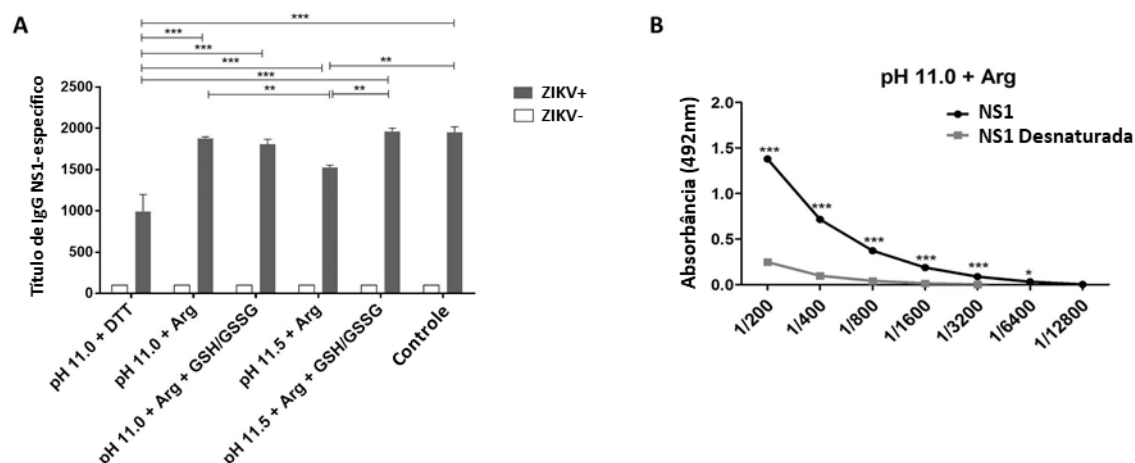


Figura 11. Avaliação da antigenicidade da proteína NS1 ZIKV renaturada por HHP em pH alcalino. (A) A proteína NS1 foi utilizada como antígeno de fase sólida em protocolo de ELISA, empregando soros controles obtidos de pacientes previamente infectados com ZIKV (barras pretas) ou não (barras brancas). Os valores são expressos como média \pm erro de títulos de anticorpos IgG específicos para o antígeno. (B) Avaliação da preservação de epítomos conformacionais na proteína NS1. A NS1 ZIKV obtida em HHP e pH 11,0 foi submetida a desnaturação (aquecimento a 100 ° C por 10 min seguido por choque térmico a 0 ° C) ou não e analisada por ELISA para reatividade com soro de paciente previamente infectado com ZIKV. Os valores obtidos são expressos como média \pm erro da absorbância obtida no ensaio. A compressão IB foi realizada em 2,4/ 0,4 kbar. Controle: NS1 obtida por protocolo tradicional (pressão atmosférica). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (ANOVA de duas vias com correção Bonferroni).

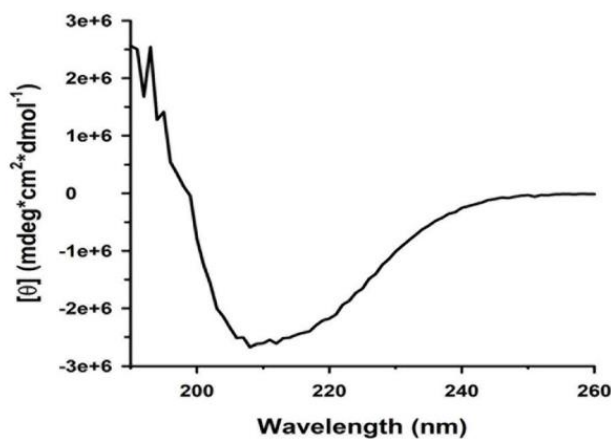


Figura 12. Análise conformacional da proteína NS1 ZIKV. Os sobrenadantes de suspensões de IBs contendo a proteína NS1 renaturados sob HHP (2,4 kbar / 0,4 kbar) em pH 11 (com adição de Arg) foram analisados por dicroísmo circular. O espectro de Far-UV CD obtido para a proteína NS1 encontra-se representado na figura.

Ao avaliarmos a reatividade da proteína NS1 ZIKV obtida por HHP em pH 11 com Arg, submetida previamente à desnaturação térmica (Figura 11B), a reatividade detectada foi significativamente reduzida, sendo esse resultado sugestivo que a proteína preserva epítomos conformacionais em sua estrutura. Atrelado a isso, a análise do

espectro de dicroísmo circular (far-UV) da NS1 solubilizada nas mesmas condições indica a preservação de estrutura secundária (Figura 12), cujo teor total de $14,6 \pm 3,5\%$ de α -hélices e $34,2 \pm 2,3$ β -folhas apresentou-se semelhante ao padrão previamente descrito para a proteína NS1 ZIKV nativa (PDB 5GS6) (139). Desta forma, esses resultados demonstram que o uso de HHP em associação com pH alcalino pode ser aplicado com sucesso na renaturação de proteínas recombinantes agregadas em IBs, permitindo um elevado rendimento proteico e preservação da antigenicidade. A proteína NS1 ZIKV obtida sob HHP (pH 11 + Arg) foi utilizada nas etapas seguintes do projeto, especialmente, na avaliação do seu potencial vacinal contra o ZIKV.

4.1.3. Análise de bioinformática e desenho do antígeno Δ NS1 ZIKV.

A dificuldade na utilização de ensaios sorológicos para o ZIKV consiste na elevada reatividade cruzada observada com outros *Flavivirus*, sobretudo em regiões onde esses patógenos co-circulam ou onde há imunidade prévia induzida por vacinação (40,46,47). Por outro lado, a seleção de antígenos que tem por finalidade a aplicação diagnóstica deve ter como características a reduzida homologia com patógenos relacionados e ser de fácil produção e escalonamento industrial. Assim, na tentativa de selecionar um antígeno baseado na proteína NS1, a qual já é utilizada em ensaios de sorodiagnóstico para o ZIKV (58,65,124), sua sequência completa foi submetida a análises de bioinformática com objetivo de evidenciar regiões que atendam aos critérios citados anteriormente.

Conforme evidenciado nas sessões 4.1.1 e 4.1.2, a proteína NS1 ZIKV quando expressa em sistema procarioto baseado em *E. coli* concentrou-se na fração insolúvel do extrato bacteriano, um fator limitante na produção de antígenos recombinantes (140–142). Assim, visando maximizar a solubilidade da proteína Δ NS1 ZIKV a ser desenhada, inicialmente determinamos o perfil de hidrofobicidade de Parker da sequência completa da proteína NS1 ZIKV (Figura 13A). Ao avaliarmos a proporção de epítomos lineares presentes na referida proteína, observamos que a região C-terminal (aa 251-352) concentra uma maior proporção de epítomos com caráter hidrofílico, sendo a porção N-terminal (aa 1-250) predominantemente hidrofóbica (Figura 13A). Além disso, analisamos também a homologia de sequência de aminoácidos da proteína NS1

do ZIKV (aa 251-352) e a correspondente de outros *Flavivirus* (DENV e YFV), para as quais foi observado grau de homologia de aproximadamente 64,4%, 66,3%, 61,4%, 63,4% e 61,4%, respectivamente, para os DENV 1, 2, 3, 4 e YFV. Assim, embora potencialmente hidrofílica, a região aa 251-352 da proteína NS1 apresenta elevado grau de homologia de sequência quando comparada aos principais flavivirus co-circulantes no Brasil.

Os métodos descritos anteriormente são restritos à análise da sequência linear de proteínas. Por outro lado, a presença de epítomos conformacionais também representa um fator importante na geração de anticorpos patogênicos-específicos. Desta forma, uma análise de predição de epítomos descontínuos para linfócitos B foi realizada comparando as sequências e as estruturas das proteínas NS1 ZIKV e NS1 DENV2 (Figura 13B). Essas análises revelaram seis epítomos conformacionais (Tabela 8 e Figura 13B) presentes na proteína NS1 do ZIKV. Esses epítomos estão localizados na região C-terminal da proteína, para a qual outros trabalhos demonstraram características físico-químicas distintas incluindo o perfil eletrostático de superfície, que permite diferenciar a proteína NS1 do ZIKV de outros flavivirus como DENV e WNV (143,144). Deste modo, a região C-terminal da proteína NS1 ZIKV (aa 251-352), aqui denominada como Δ NS1 ZIKV, foi selecionada como antígeno base para a padronização de ensaios de sorodiagnóstico específicos ao ZIKV nas próximas etapas do trabalho.

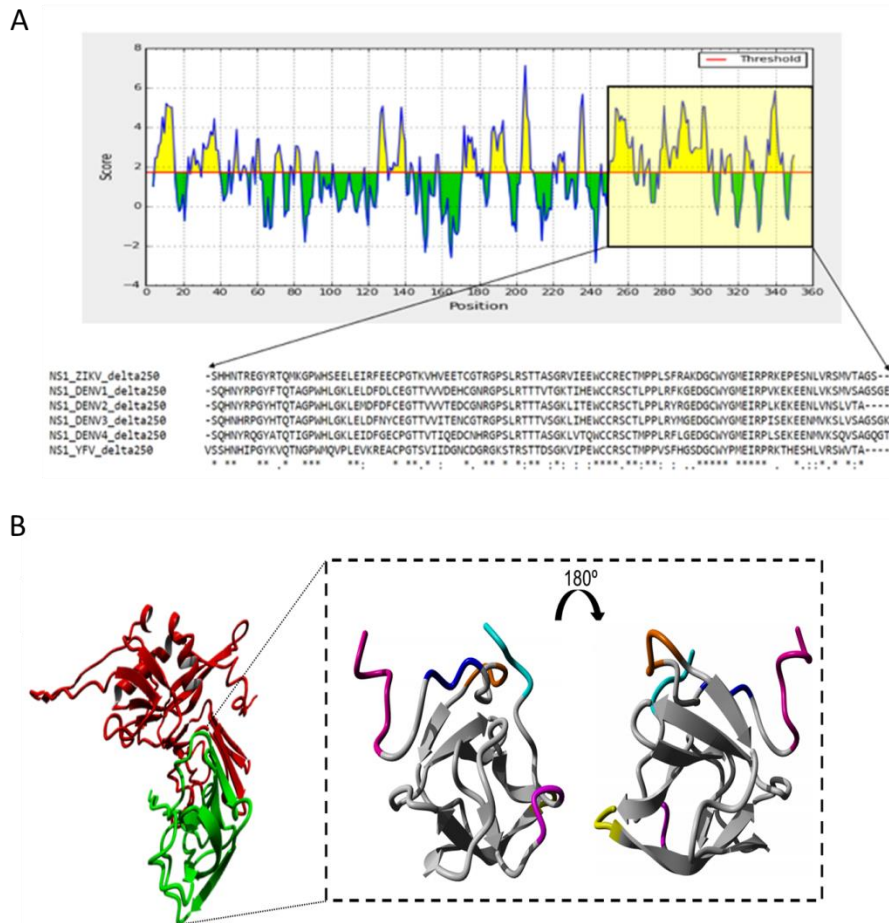


Figura 13. Determinação de epítomos de células B lineares ou conformacionais e homologia da proteína NS1 ZIKV. (A) Representação do perfil de hidrofobicidade de Parker da proteína NS1 ZIKV e alinhamento da sequência de aminoácidos de sua região C-terminal, que apresentou maior conteúdo hidrossolúveis, com as regiões correspondentes à sequência da NS1 dos DENVs (1, 2, 3 e 4) e YFV. As porções amarelas do gráfico (acima da linha de corte) indicam regiões hidrofílicas, sendo que as porções coloridas em verdes (abaixo da linha de corte) indicativas de regiões hidrofóbicas. (B) Representação estrutural do tipo fita da proteína NS1 ZIKV e destacado em verde a sua região C-Terminal (aa 251-352). Os epítomos de células B conformacionais determinados por análise computacional, tendo por base a sequência da NS1, estão destacados nas estruturas representadas no quadro tracejado, sendo indicados por cores (Tabela 8).

Tabela 8. Epítomos conformacionais identificados na região C-Terminal da proteína NS1 ZIKV.

Epítopo	Região *	Sequência	Cor **
1	251-258	SER-HIS-HIS-ASN-THR-ARG-GLU	Vermelho
2	261-263	THR-GLN-MET	Azul
3	268-271	HIS-SER-GLU-GLU	Verde
4	302-304	ALA-SER-GLY	Amarelo
5	340-342	PRO-GLU-SER	Magenta
6	348-351	MET-VAL-THR-ALA	Ciano

* As regiões são numeradas de acordo a sequência de aminoácidos da proteína NS1 ZIKV inteira; ** Ver Figura 13B.

4.1.4. Obtenção das proteínas recombinantes Δ NS1 ZIKV e Δ NS1 DENV (sorotipos 1-4).

Após o desenho da proteína Δ NS1 ZIKV tendo por base a avaliação da homologia de sequência da proteína NS1 ZIKV, bem como análise do perfil de hidrofobicidade e epítomos descontínuos, os passos seguintes consistiram na expressão e na purificação das proteínas recombinantes Δ NS1 de ZIKV e DENV (sorotipos 1-4).

4.1.4.1. Expressão, purificação e validação antigênica da proteína Δ NS1 ZIKV.

Para obtenção do antígeno Δ NS1 ZIKV, a região correspondente na proteína NS1 (aa 251-352) foi produzida sinteticamente com o vetor pET28a. As linhagens de *E. coli* BL21(DE3)-Ril e Arctic Express (DE3) foram transformadas com a construção e testadas quanto à expressão da Δ NS1 ZIKV em diferentes temperaturas (18°C e 37°C). Como é possível observar na figura 14, ambas as linhagens avaliadas foram capazes de expressar a proteína de interesse, sendo a linhagem *E. coli* ArcticExpress (DE3) a que demonstrou maior eficiência em superexpressar a Δ NS1 ZIKV na fração solúvel do

extrato bacteriano (Figura 14, E e F). Interessantemente, este resultado se correlaciona com o perfil de hidrofobicidade de Parker (item 4.1.3), o qual destacou esta região da proteína NS1 como a que apresenta maior proporção de epítomos hidrofílicos.

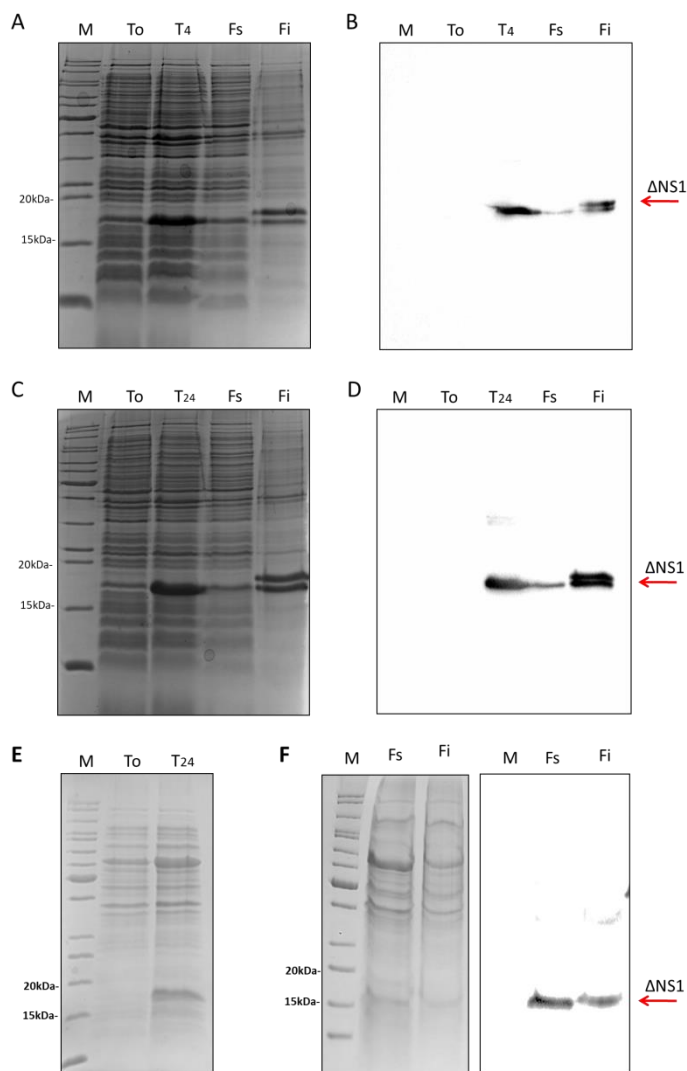


Figura 14. Teste de expressão da proteína Δ NS1 ZIKV em linhagens de *E. coli*. Culturas das linhagens de *E. coli* BL21(DE3)-Ril (A-D) ou *E. coli* Arctic Express(DE3) (E e F) transformadas com o plasmídeo pET Δ NS1-ZIKV foram induzidas à 37 °C (A e B) ou 18°C (C-F) e processadas para avaliação de qual fração do extrato bacteriano a proteína alvo se concentra. Amostras antes e após indução da proteína alvo (~16,3kDa) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% (SDS-PAGE) e ensaio de *western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-HisTag. Descrição: canaleta M corresponde ao marcador de massa molecular; canaleta T0, extrato celular total sem indução; canaletas T₄ ou T₂₄, extrato celular total após indução; Canaleta Fs, fração celular proteica solúvel após indução; canaletas Fi, fração celular proteica insolúvel após indução, solubilizada em tampão desnaturante contendo 8 M de ureia.

O extrato proteico solúvel, obtido após indução da expressão da proteína Δ NS1 ZIKV na linhagem *E. coli* Arctic Express (DE3), foi então submetido ao processo de

purificação por CAN. Como é possível observar na figura 15A, a proteína foi eluída mediante a aplicação de 700 mM de imidazol. A confirmação da eluição da proteína foi evidenciada por eletroforese em gel de poliacrilamida, no qual foi possível identificar a proteína Δ NS1 ZIKV com tamanho esperado de aproximadamente 16,3 kDa (Figura 15B). A análise das alíquotas resultantes da CAN também possibilitou identificar a coexpressão da proteína chaperona (~60 kDa) e a presença de outras proteínas contaminantes ao final da purificação (Figura 15B). Diante da presença de proteínas contaminantes remanescentes, as alíquotas resultantes da CAN foram reunidas e submetidas a um segundo processo de purificação empregando a técnica de gel filtração. A proteína Δ NS1 ZIKV foi então eluída com sucesso, apresentando tempo de retenção de aproximadamente 190 min. nas condições estabelecidas (Figura 15C). Ao final deste procedimento obteve-se a proteína Δ NS1 ZIKV e sua pureza foi confirmada por eletroforese em gel de poliacrilamida e *western blot* (Figura 15D).

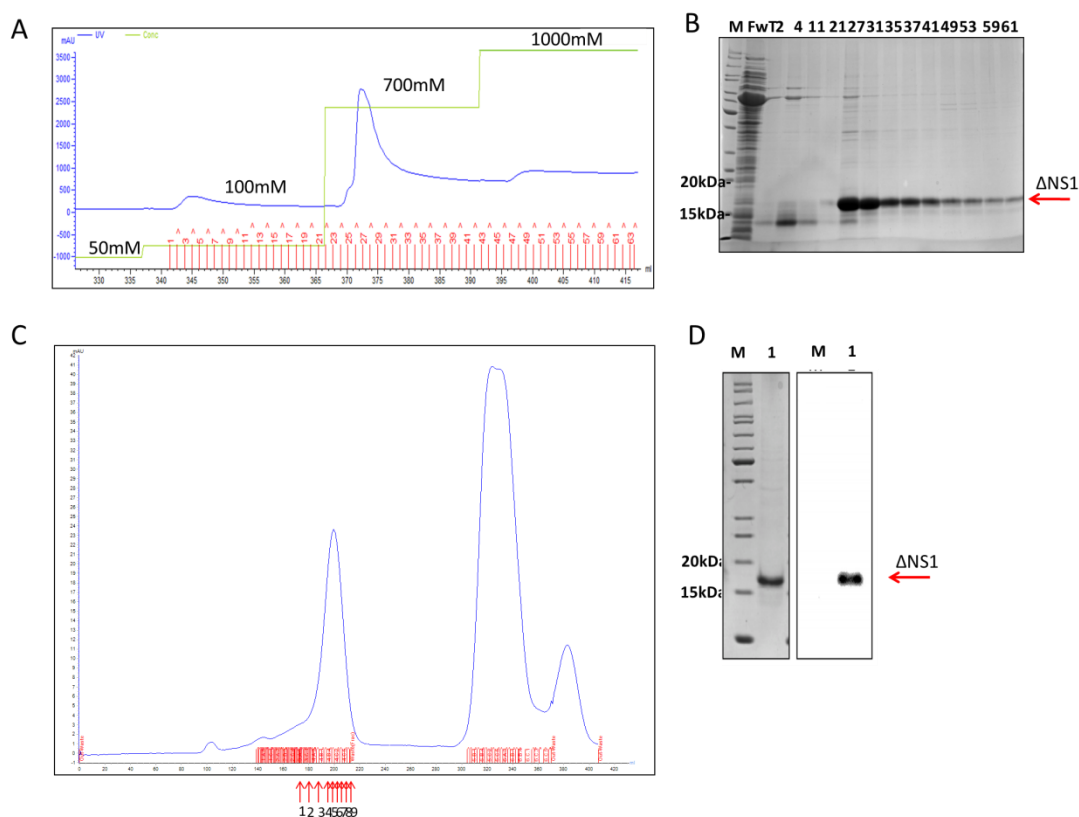


Figura 15. Purificação da proteína Δ NS1 ZIKV. A fração solúvel do extrato bacteriano da linhagem de *E. coli* (DE3) Arctic Express contendo a proteína Δ NS1 ZIKV foi utilizada para purificação pelos métodos de cromatografia de afinidade ao níquel e gel filtração. (A) Cromatograma de eluição da proteína Δ NS1 ZIKV utilizando tampão contendo Imidazol nas concentrações indicadas na figura. (C)

Cromatograma de purificação da proteína Δ NS1 ZIKV por gel filtração. As frações da purificação da proteína Δ NS1 ZIKV (~16,3kDa), pelas técnicas de CAN (B) e Gel filtração (D), respectivamente, foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% (SDS-Page) e *western blot* (após gel filtração) empregando anticorpo monoclonal anti-HisTag. Descrição: canaleta M corresponde ao marcador molecular; FwT, alíquota da fração proteica resultante após passagem na coluna de cromatografia (Flow Through); 2-61, alíquotas das frações eluídas durante a purificação, conforme indicado nos cromatogramas; 1, alíquota da proteína Δ NS1 ZIKV purificada após gel filtração.

A antigenicidade da proteína Δ NS1 ZIKV purificada foi também avaliada por ELISA, a qual foi reconhecida por anticorpos presentes em amostras de soros de pacientes previamente infectados pelo ZIKV (Figura 16A). Por outro lado, quando a referida proteína foi tratada termicamente, a sua capacidade de reconhecimento frente às amostras de soro ZIKV⁺ foi reduzida (Figura 16B). Assim, estes resultados indicam que a proteína em sua forma íntegra conservou epítomos conformacionais necessários ao reconhecimento antigênico e, conseqüentemente, retém qualidade compatível com a sua aplicação em ensaios de sorodiagnóstico.

Tendo por objetivo analisar também a imunogenicidade da proteína Δ NS1 ZIKV, um ensaio de imunização em modelo murino foi realizado utilizando a toxina termo-lábel de *E. coli* (LT-1) como adjuvante (Figura 16C). Ao analisar a resposta imunológica humoral nos animais imunizados foi possível detectar elevados níveis de anticorpos direcionados à Δ NS1 ZIKV, os quais foram desenvolvidos de maneira dose-dependente, sendo o efeito mais pronunciado após a administração da terceira dose prevista no protocolo (Figura 16D). Além disso, as mostras de soro dos animais imunizados contendo anticorpos anti- Δ NS1 ZIKV, bem como o anticorpo monoclonal 4H2 (produzido a partir da imunização de camundongos com a proteína Δ NS1 ZIKV), foram capazes de reconhecer à proteína NS1 nativa presente em monocamadas de células VERO infectadas com o ZIKV (Figura 16, E e F). Esses resultados demonstram que a proteína utilizada nas imunizações retém características semelhantes ao encontrado na proteína nativa. Além disso, os dados se correlacionam com a predição de epítomos para células B descritos na sessão 4.1.3 (Figura 13; Tabela 8), a qual serviu como indicativo inicial de que a região C-terminal da proteína NS1 ZIKV retém imunogenicidade, característica esta essencial para sua utilização em ensaios de sorodiagnóstico (detecção de anticorpos anti-NS1) e exploração da sua capacidade vacinal frente ao ZIKV. Por fim, a disponibilidade dos anticorpos anti- Δ NS1 (soros e o

monoclonal 4H2) gerados abre perspectiva em avaliar a sua utilização em ensaios de diagnóstico para o ZIKV, baseados nas técnicas de imunofluorescência e imunocromatografia, parte dos quais foram explorados nas etapas seguintes deste trabalho.

RESULTADOS E DISCUSSÕES – PARTE 1

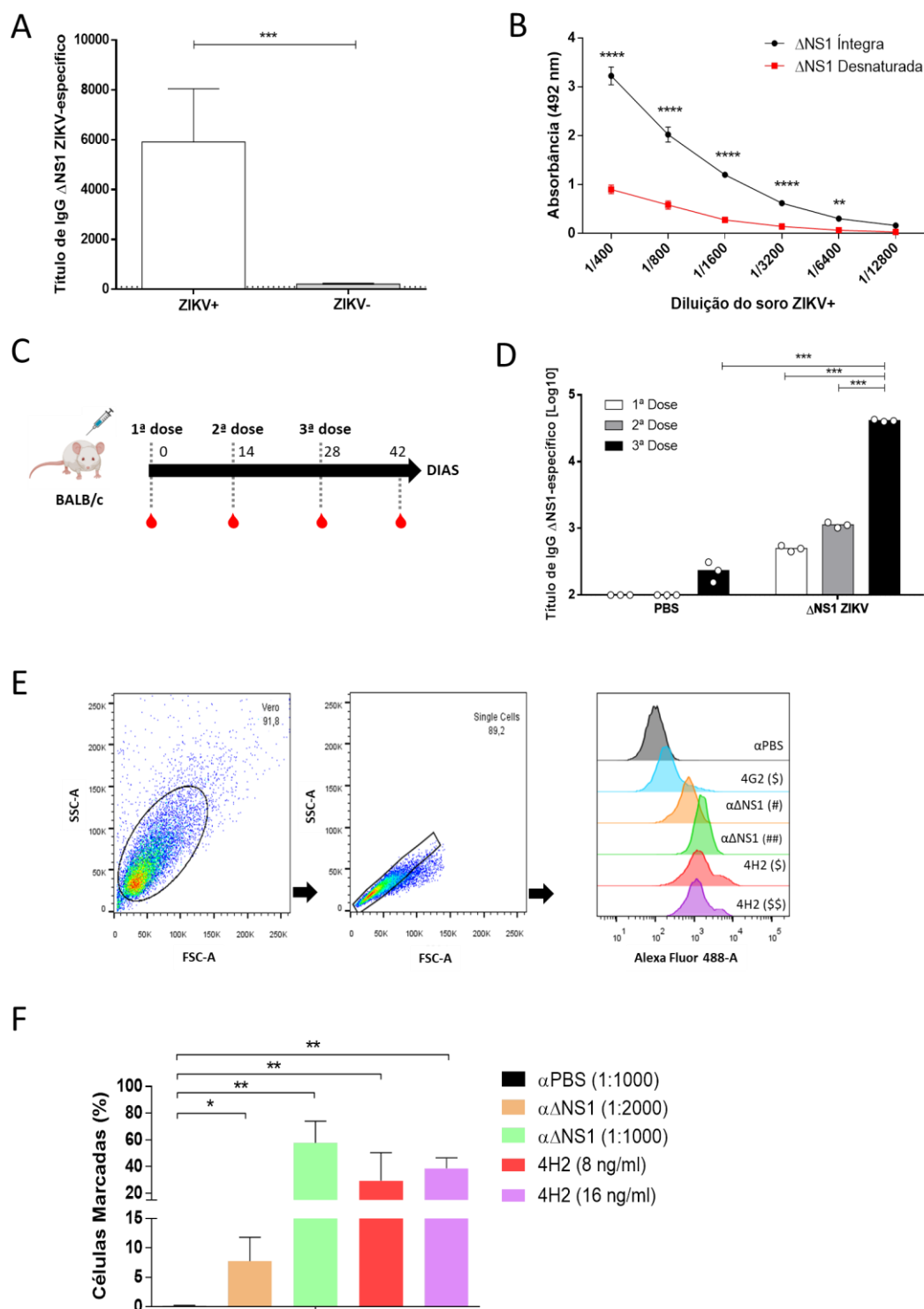


Figura 16. Análise da antigenicidade e imunogenicidade da proteína Δ NS1 ZIKV. (A) Ensaio de ELISA empregando a proteína Δ NS1 ZIKV como antígeno de fase sólida. A reatividade com amostras de soros humanos controles, sabidamente positivo ou negativo para infecção prévia pelo ZIKV. (B) Amostras da proteína Δ NS1 ZIKV, submetida ou não previamente à desnaturação (100°C/10 min.), foram analisadas por ELISA quanto a sua reatividade com soro de paciente previamente infectado com o ZIKV.

C) Esquema representativo do protocolo adotado para imunização de camundongos BALB/c (n=3) com a proteína Δ NS1 ZIKV em associação com o adjuvante LT-1 por via subcutânea. D) Curva dose-resposta de anticorpos IgG séricos Δ NS1 ZIKV-específicos desenvolvidos durante o protocolo de imunização mensurados por ELISA. Os resultados são representados como valores médios (barras) e individuais (símbolos) de título (Log. 10) de IgG. E) Estratégia de análise dos ensaios de citometria de fluxo utilizados na avaliação de soro e mAb anti- Δ NS1 ZIKV. F) Amostras de células VERO foram infectadas com o ZIKV e, posteriormente, utilizadas para marcação com diferentes diluições do soro (α Δ NS1) ou anticorpo monoclonal (4H2) produzidos contra a proteína Δ NS1 ZIKV, sendo as amostras analisadas por citometria de fluxo. Os valores são apresentados como porcentagem de células marcadas \pm DP. Descrição: #, diluição de 1/2000; ## diluição de 1/1000; \$, concentração de 8 ng/ul; \$\$, concentração de 16 ng/ul. A figura C foi criada com BioRender.com. *p<0,05; **p<0,01; *** p<0,001 (ANOVA de duas vias com correção de Bonferroni; Unpaired t test).

4.1.4.2. Obtenção das proteínas Δ NS1 de DENV (sorotipos 1-4).

Conforme relatado anteriormente, a proteína NS1 de *Flavivírus* apresenta elevada homologia de sequência, uma característica que influencia diretamente a reatividade cruzada de anticorpos contra os vírus pertencentes a esse gênero. Assim, as regiões correspondentes das proteínas NS1 (aa 251-352) dos vírus da dengue (sorotipos 1, 2, 3 e 4) foram também obtidas tendo por objetivo sua aplicação como controles de reatividade cruzada na padronização de ensaios sorológicos baseadas no antígeno Δ NS1 ZIKV. As sequências das proteínas Δ NS1 DENV1, Δ NS1 DENV2, Δ NS1 DENV3 e Δ NS1 DENV4 foram então sintetizadas junto ao vetor pET28a, sendo as construções obtidas utilizadas para a transformação da linhagem de *E. coli* BL21(DE3) e avaliação da expressão das proteínas alvos após indução a 18 °C. Como é possível observar na figura 17, todas as proteínas foram expressas junto à fração insolúvel do extrato bacteriano, apresentando massa molecular compatível com a esperada quando submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (Figura 17).

Para obtenção das proteínas de forma solúvel os extratos bacterianos induzidos foram solubilizados em ureia e submetidos a procedimento de renaturação *in vitro* por técnica de diluição pulsada, seguida de purificação por CAN de forma análoga à obtenção da proteína NS1 ZIKV descrita previamente (Sessão 4.1.1). Como é possível observar na figura 18, todas as proteínas Δ NS1 DENV1-4 foram purificadas mediante aplicação de gradiente linear de tampão contendo imidazol (0-1 M). Além disso, a antigenicidade das proteínas purificadas foi também acessada por ELISA, tendo as mesmas como antígeno de fase sólida. Como esperado, todas as proteínas foram reativas especificamente frente a amostras de soro obtidas de indivíduos previamente

infectados pelo DENV (Figura 19). Desta forma, as proteínas obtidas preservaram características antigênicas compatíveis a sua utilização em protocolos de ELISA para a detecção de anticorpos direcionada ao DENV nas próximas etapas do trabalho.

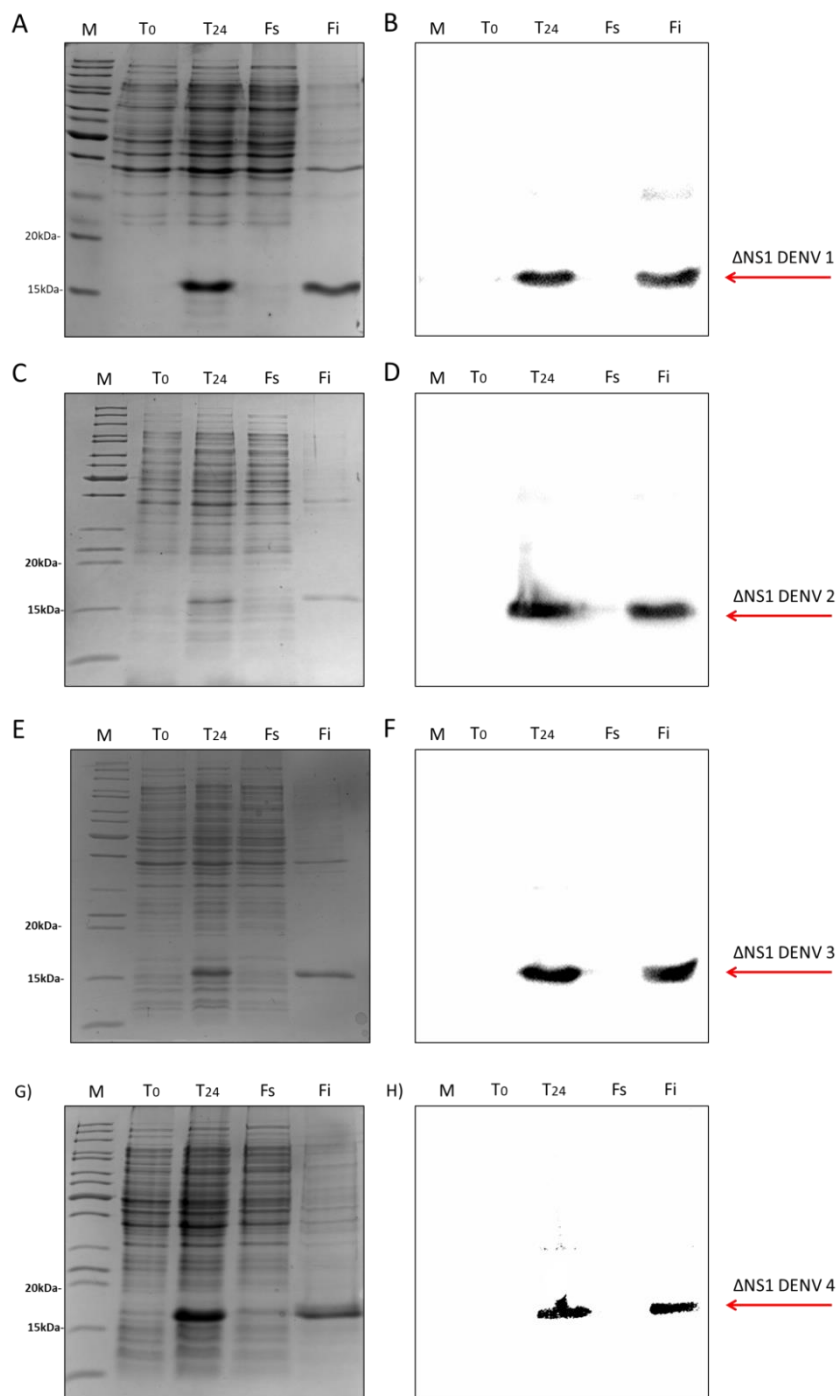


Figura 17. Expressão das proteínas Δ NS1 do vírus dengue de sorotipos 1, 2, 3 e 4. Culturas da linhagem de *E. coli* BL21(DE3) transformadas separadamente com os plasmídeos que codificam para as proteínas alvo foram induzidas à 18°C de acordo ao descrito na sessão de materiais e métodos. Amostras

antes e após indução das proteínas Δ NS1 correspondentes ao DENV1 (A e B), DENV2 (C e D), DENV3 (E e F) e DENV4 (G e H) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% (SDS-PAGE) (A, C, E e G) e ensaio de *western blot* (B, D, F e H) utilizando anticorpo monoclonal anti-HisTag. Descrição: canaleta M, corresponde ao marcador de massa molecular; canaleta T0, extrato celular total sem indução; canaleta T24, extrato celular total após indução; canaleta Fs, fração celular proteica solúvel após indução; canaletas Fi, fração celular proteica insolúvel após indução, solubilizada em tampão desnaturante contendo 8 M de ureia.

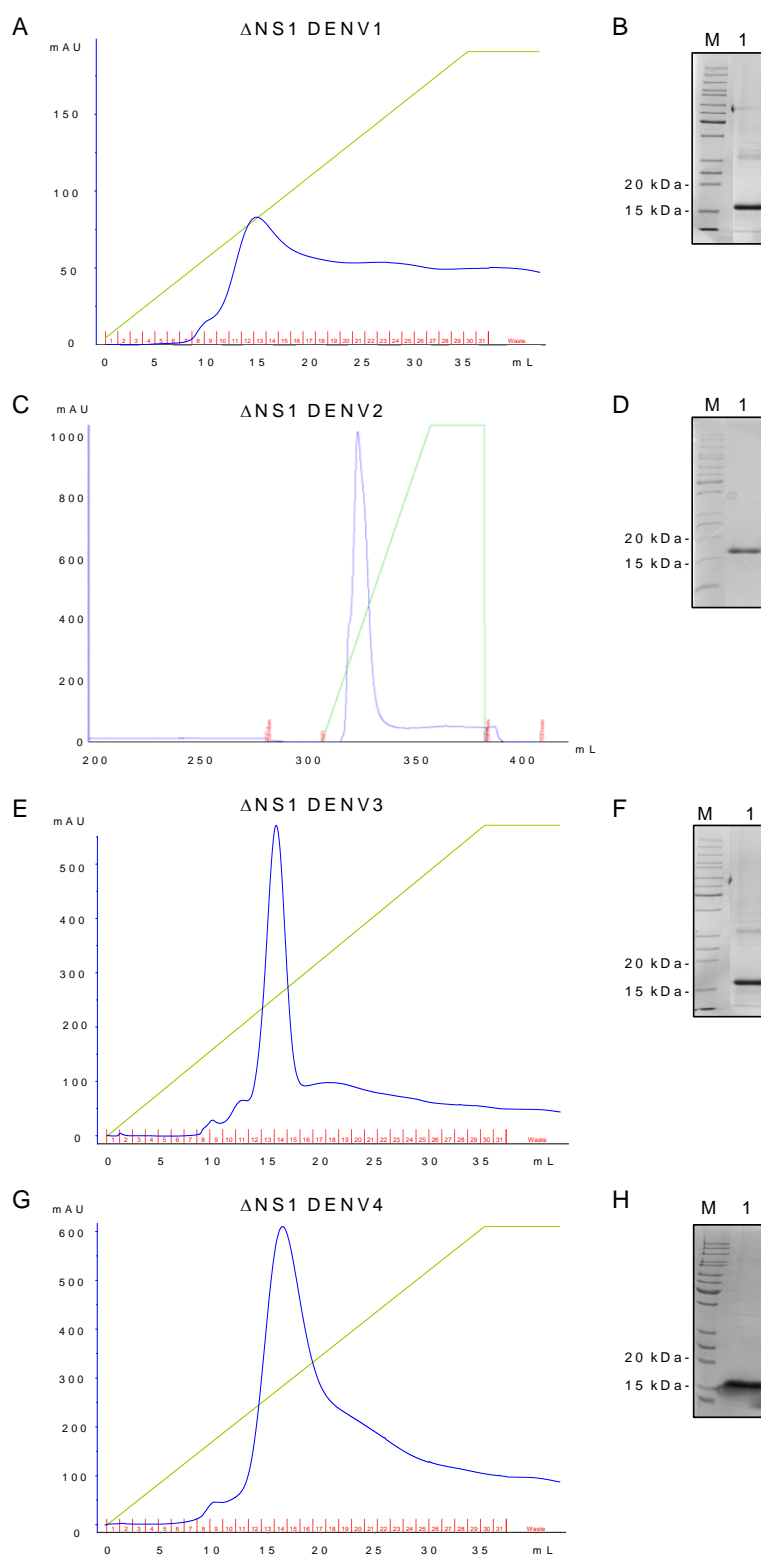


Figura 18. Purificação das proteínas Δ NS1 do vírus dengue de sorotipos 1, 2, 3 e 4. O extrato insolúvel solubilizado em ureia das linhagens de *E. coli* BL21(DE3) capazes de expressar as proteínas Δ NS1 referente ao DENV (sorotipos 1-4) foi utilizado para procedimento de renaturação *in vitro* e

RESULTADOS E DISCUSSÕES – PARTE 1

posterior purificação por cromatografia de afinidade. (A, C, E e G) Cromatogramas de purificação das proteínas Δ NS1 referentes aos DENV 1, 2, 3 e 4, respectivamente. A eluição da proteína foi realizada mediante aplicação de crescentes concentrações de imidazol, conforme indicado na figura. (B, D, F e H) Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida a 15% (SDS-PAGE) das proteínas purificadas. Descrição: canaletas M corresponde ao marcador de massa molecular; canaletas 1, alíquota da proteína purificada.

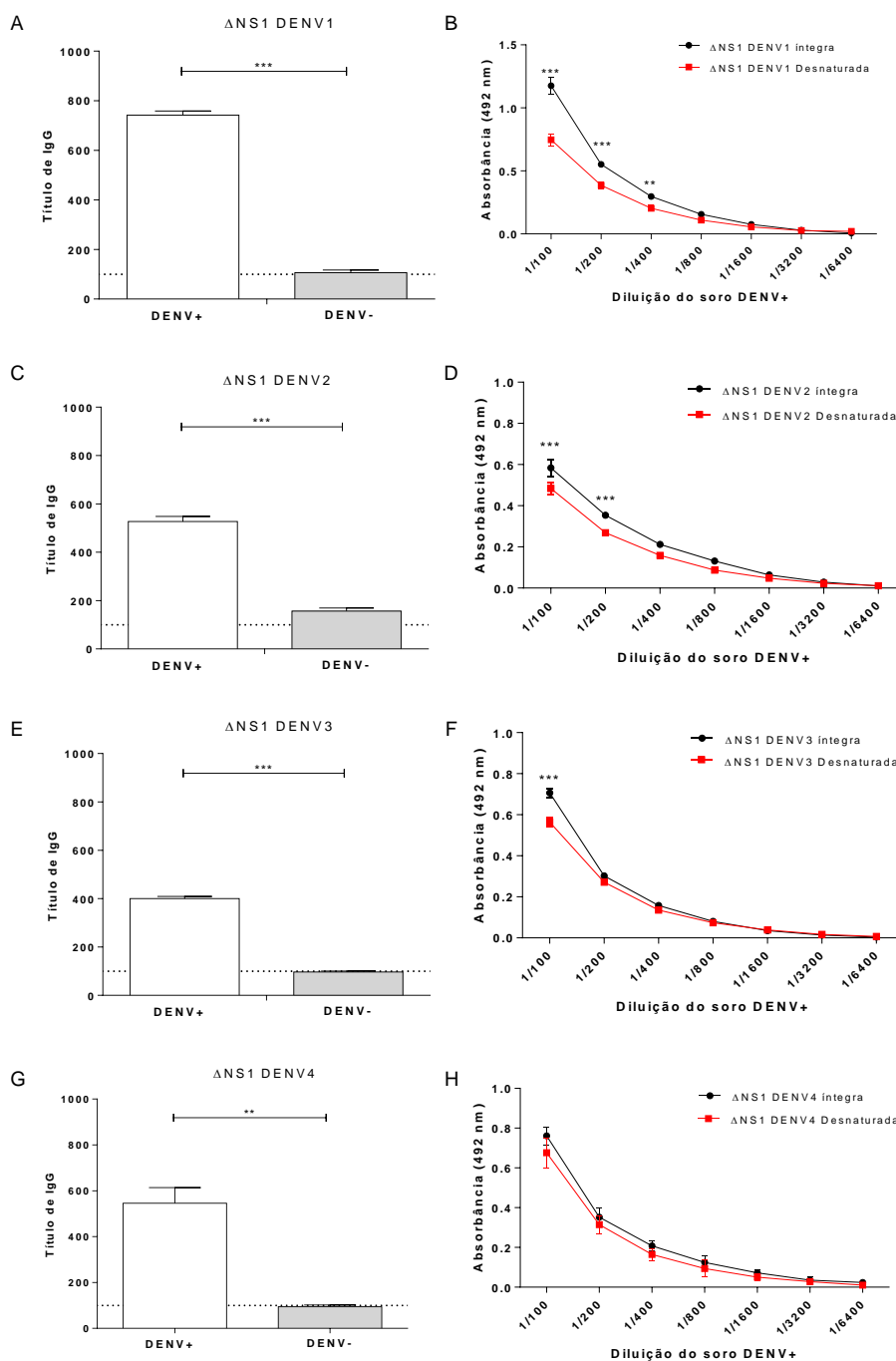


Figura 19. Análise da antigenicidade das proteínas Δ NS1 do vírus dengue de sorotipos 1, 2, 3 e 4. As proteínas Δ NS1 referentes aos DENV 1, 2, 3 e 4, respectivamente, foram utilizadas como antígeno de fase

sólida em protocolo de ELISA. (A, C, E e G) Perfil de reatividade das proteínas frente a amostras de soros humanos controles, sabidamente positivo ou negativo, para infecção prévia por DENV. (B, D, F e H) Reatividade de amostras das proteínas Δ NS1 DENV, submetidas ou não previamente à desnaturação (aquecimento a 100 °C por 10 min. seguido de choque térmico à 0 °C), com soro de paciente previamente infectado pelo DENV. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (Teste t ou ANOVA de uma via com correção de Bonferroni).

4.1.5. Discussão Parcial.

Apesar dos 70 anos transcorridos desde a descoberta do ZIKV e seu impacto sobre a saúde pública, nenhuma estratégia vacinal foi licenciada para uso em humanos até o momento. Além disso, a elevada similaridade antigênica entre o ZIKV e outros arbovírus, especialmente o DENV, dificulta o estabelecimento de ensaios que permitam diferenciar sorologicamente essas infecções em regiões onde estes vírus circulam (40,46,47). Neste contexto, o primeiro capítulo do presente trabalho foi dedicado à obtenção de antígenos recombinantes, baseados na proteína NS1 ZIKV, que permitam a sua aplicação como antígeno vacinal, bem como o seu uso em ensaios de sorodiagnóstico. A aplicação inédita da técnica de renaturação proteica sob alta pressão hidrostática em pH alcalino permitiu obter a proteína NS1 ZIKV com rendimento superior ao protocolo realizado sob pressão atmosférica. Além disso, a proteína resultante preservou sua antigenicidade e epítomos termolábeis em sua estrutura. Alternativamente, o fragmento Δ NS1 ZIKV foi desenhado *in silico* tendo por base seu perfil de hidrofobicidade e reduzida homologia estrutural frente à NS1 DENV2. A obtenção deste antígeno a partir da fração solúvel do extrato bacteriano resultou em elevado rendimento proteico, bem como preservação de epítomos termomolábeis, reatividade frente a soros ZIKV⁺ e da imunogenicidade. Além disso, os fragmentos correspondentes às Δ NS1 DENV1-4 foram também obtidos com antigenicidades preservadas. Desta forma, os antígenos propostos foram produzidos com qualidade compatível à sua aplicação diagnóstica e vacinal.

E. coli figura entre os hospedeiros mais utilizados para a expressão de proteínas heterólogas por diversas razões, incluindo a simplicidade de manipulação e rápido cultivo, alto rendimento proteico e baixo custo (145). Conforme revisado recentemente pelo nosso grupo, esse organismo é largamente utilizado para expressão de proteínas de *Flavivirus*, as quais foram utilizadas como candidatos vacinais de subunidades para WNV, YFV, DENV e, mais recentemente, o ZIKV (38). Entretanto, o acúmulo de

agregados proteicos biologicamente inativos em corpos de inclusão consiste em um fator limitante desse sistema. A proteína NS1 ZIKV produzida neste trabalho concentrou-se na fração insolúvel do extrato bacteriano mesmo após expressão em diferentes linhagens de *E. coli* sob variadas condições de cultivo. Além das variáveis inerentes ao organismo hospedeiro, esses resultados podem estar relacionados ao elevado perfil de hidrofobicidade observada para a sequência da NS1 ZIKV. Observações semelhantes foram descritas para a expressão da proteína NS1 de outros *Flavivirus* expressas em sistema procarioto (109,140,146,147). Além disso, a produção de um fragmento da NS1 ZIKV em sistema procarioto também necessitou da recuperação da mesma a partir de IBs (143). Assim, a aplicação de métodos de renaturação proteica *in vitro* foram necessários à obtenção da NS1 ZIKV de forma solúvel a partir de IBs.

As estratégias tradicionais de renaturação *in vitro* de proteínas recombinantes a partir de IB envolvem o uso de agentes químicos desnaturantes (ureia, guanidina, entre outros). Esses compostos permitem a solubilização e a desagregação das proteínas, sendo o enovelamento proteico realizado mediante retirada do agente químico por diferentes estratégias (109,126,148). Entretanto, durante esse processo, regiões hidrofóbicas das proteínas podem ser expostas, facilitando a agregação proteica. Além disso, o grau de enovelamento compatível com a estrutura secundária proteica (folha β -pregueada), apresentada por parte das proteínas presentes no IB, é perdido completamente, configurando, assim, um fator limitante no enovelamento proteico depois de retirado o agente redutor (149,150). Desta forma, o rendimento proteico e a qualidade da proteína obtida ao final do processo podem ser negativamente impactados. Neste contexto, embora tenha sido possível a recuperação da proteína NS1 ZIKV utilizando um protocolo adaptado baseado na solubilização com ureia seguido de renaturação por diluição pulsada (109), a mesma apresentou baixo rendimento proteico ao final do processo. Além disso, a proteína se mostrou instável quando mantida em concentrações superiores a 0,1 mg/ml.

Com objetivo de melhorar o rendimento e estabilidade da NS1 ZIKV, em uma segunda etapa avaliamos a utilização da técnica de solubilização de IBs sob alta pressão hidrostática (HHP). Esta técnica permite a desagregação proteica preservando a

estrutura secundária da proteína contida nos IBs, reduzindo assim as interações eletrostáticas e a exposição de regiões hidrofóbicas intramoleculares (128–130). Por outro lado, o uso de pH alcalino permite solubilizar proteínas agregadas por repulsão eletrostática. Essa condição se mostra menos agressiva quando compara ao uso de reagentes caotrópicos (131). Surpreendentemente, a utilização de HHP realizada em pH alcalino permitiu a recuperação de até 89% da NS1 ZIKV contida em IBs e resultou em aumento de aproximadamente 30x no rendimento proteico final comparada à renaturação em pressão atmosférica normal. Esses resultados estão em linha com outros trabalhos utilizando HHP, os quais observaram alto grau de recuperação proteica (>90%) a partir de IBs (151,152).

O aminoácido arginina é descrito como agente inibidor da agregação proteica e um auxiliador no processo de enovelamento proteico (135–137). Assim, visando aumentar a solubilidade da NS1 ZIKV e a redução da formação de agregados proteicos, a adição de Arg à estratégia de HHP, associada ao pH alcalino, também foi avaliada. A presença de Arg potencializou a recuperação da NS1 a partir de IBs, sendo observada a redução da formação de oligômeros de elevada massa molecular. Nesta condição, a proteína resultante apresentou elevado grau de pureza (90-95%), manteve-se estável em concentração relativamente alta (acima de 0,4 mg/ml), bem como preservação de estrutura secundária (folhas α/β -pregueadas). Além disso, a NS1 ZIKV foi efetivamente reconhecida por anticorpos de indivíduos previamente infectados pelo ZIKV. Assim, os resultados apresentados aqui indicam que o uso de HHP em associação com pH alcalino pode ser aplicada eficientemente na recuperação de proteínas recombinantes a partir de IB.

O desenho e obtenção de antígenos com a aplicação diagnóstica devem contemplar importantes características como a reduzida homologia frente a patógenos relacionados, antigenicidade preservada, fácil produção e escalonamento industrial. Sob essas premissas, a análise de epítomos lineares e descontínuos presentes na proteína NS1 ZIKV, bem como do perfil de hidrofobicidade, permitiram desenhar o antígeno Δ NS1 ZIKV como potencial alvo diagnóstico para o ZIKV. Corroborando os resultados obtidos para Hidrofobicidade de Parker, a proteína Δ NS1 ZIKV apresentou carácter predominantemente hidrofílico, sendo expressa na fração solúvel do extrato bacteriano.

Além disso, a proteína preservou antigenicidade e imunogenicidade após purificação, bem como epítomos termolábeis em sua estrutura. Esse último aspecto é fundamental para a detecção de anticorpos específicos direcionados ao ZIKV, tendo por base a presença de epítomos para células B descontínuos exclusivos a este patógeno preditos na análise computacional inicial. Desta forma, o referido antígeno foi produzido com qualidade e pureza (> 95%) adequados à sua aplicação em ensaios de diagnóstico sorológico.

Atentando para o potencial biotecnológico da proteína Δ NS1 ZIKV, padronizamos a expressão da mesma sob cultivos em alta densidade em biorreator, bem como o escalonamento do processo de purificação e a validação antigênica, em colaboração com a equipe do laboratório da professora Dra. Viviane Maimoni Gonçalves (Instituto Butantan). Em concordância aos resultados apresentados aqui, a expressão sob condições controladas em biorreator (21 °C, 20 h, 0,7 mM de IPTG) permitiu a obtenção da Δ NS1 ZIKV, junto à fração solúvel do extrato bacteriano, com rendimento proteico de aproximadamente 500 mg/L. Além disso, a proteína obtida apresentou elevado grau de pureza, sendo reconhecida especificamente por soros ZIKV⁺. Assim, a proteína Δ NS1 ZIKV apresenta propriedades biotecnológicas que a configura como um promissor antígeno a ser aplicado em kits de sorodiagnóstico para o ZIKV. Esses resultados foram publicados na revista *AMB Express* (Anexo C) (153). Além disso, um pedido de patente foi depositado junto ao INPI (Processo n°: BR 10 2018 067345 9) e PCT (Processo n°: PCT/BR2019/050362) referente aos processos de expressão e purificação da proteína Δ NS1 ZIKV mencionados.

A proteína NS1 DENV apresenta carácter predominantemente hidrofóbico, sendo que a produção de fragmentos ou sua sequência completa em *E. coli* resultou em deposição em IBs (38,109,154). Alinhado a isso, os fragmentos correspondentes à Δ NS1 DENV1-4 aqui expressos se concentraram na fração insolúvel do extrato bacteriano, sendo obtidas por renaturação *in vitro*. Assim, as proteínas Δ NS1 citadas foram obtidas com elevado grau de pureza e preservação a antigenicidade, sendo adequadas à utilização em ensaios de sorodiagnóstico.

Desta forma, como continuidade ao trabalho, buscou-se avaliar o potencial vacinal das proteínas produzidas em formulações vacinais contra o ZIKV. Além disso,

protocolos de ELISA foram estabelecidos com essas proteínas tendo por objetivo a detecção específica de anticorpos direcionados ao ZIKV.

4.2.CAPÍTULO II. Desenho e obtenção dos antígenos recombinantes baseados na proteína EDIII ZIKV.

O domínio três da proteína de envelope do ZIKV (EDIII ZIKV) consiste na região da proteína que interage com os receptores celulares alvejados pelo vírus, sendo um importante alvo para geração de anticorpos neutralizantes que inibam a etapa de adsorção viral. Além disso, o EDIII ZIKV consiste na região da proteína de envelope do ZIKV com reduzida homologia comparada a outros *Flavivirus*. Desta forma, esta proteína demonstra excelente potencial como antígeno a ser incorporado em formulações vacinais e em ensaios de sorodiagnóstico para o ZIKV, a qual foi expressa e obtida conforme os resultados descritos a seguir.

4.2.1. Expressão e purificação da proteína EDIII ZIKV.

Na tentativa de obter a proteína EDIII ZIKV de forma solúvel e com antigenicidade preservada, a expressão junto à fração solúvel do extrato bacteriano, foi avaliada nas linhagens de *E. coli* Rosetta, ArcticExpress e BL21(DE3) transformadas com o plasmídeo pET28aEDIII ZIKV. Após indução da expressão proteica, a presença da proteína de interesse no extrato bacteriano das diferentes linhagens foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida e confirmada por ensaios de *western blot*. Como é possível observar na figura 20, as linhagens de *E. coli* ArcticExpress e BL21(DE3) foram capazes de expressar a proteína EDIII ZIKV (~15 kDa). Além disso, a proteína foi detectada em ambas as frações (solúvel e insolúvel) do extrato bacteriano (Figura 20, C-F).

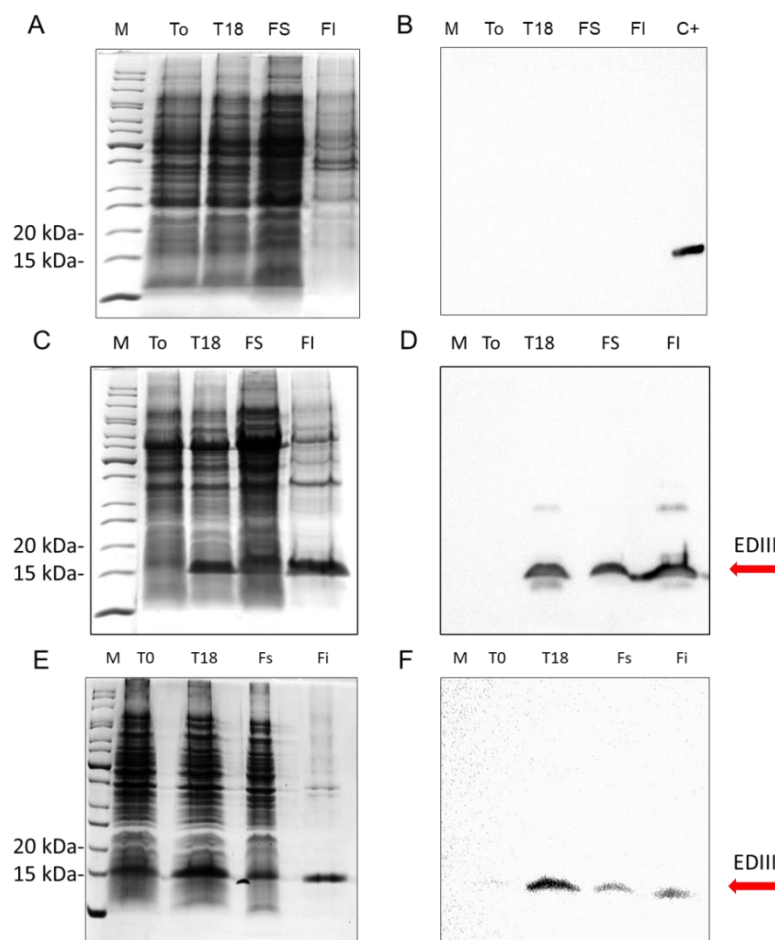


Figura 20. Expressão da proteína recombinante EDIII ZIKV em diferentes linhagens de *E. coli*. Amostras antes e após indução da expressão da proteína EDIII ZIKV foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% (SDS-PAGE) e ensaio de *western blot* utilizando anticorpo anti-HisTag. A expressão da proteína EDIII ZIKV foi avaliada nas linhagens de *E. coli* Rosseta (DE3) (A e B), *E. coli* ArcticExpress (C e D) e *E. coli* BL21 (DE3) (E e F). Descrição: canaleta M, marcador de peso molecular; To, extrato celular total antes da indução; T18, extrato celular total após indução; FS, fração celular proteica solúvel após indução; Fi, fração celular proteica insolúvel após indução, solubilizada em tampão desnaturante contendo 8M de ureia.

Após expressão da proteína EDIII ZIKV nas linhagens citadas anteriormente, ensaios de obtenção e purificação da proteína alvo, a partir da fração solúvel (Fs) ou insolúvel (Fi) do extrato bacteriano, foram realizados a partir das linhagens de *E. coli* ArcticExpress e BL21 (DE3). Entretanto, o rendimento final obtido se apresentou reduzido. Além disso, a proteína quando recuperada a partir de corpos de inclusão demonstrou-se instável, mesmo quando utilizadas diferentes condições de salinidade e pH (Dados não mostrados). Neste sentido, vários fatores podem ser modificados a fim de se contornar tais problemas, dentre os quais se destaca o uso de diferentes cepas de

E. coli, a diminuição da temperatura de cultivo, mudança do meio de cultura e concentração de IPTG (indutor de expressão proteica) (141,142). Deste modo, com objetivo de maximizar a obtenção da EDIII ZIKV na Fs, ensaios de otimização do cultivo bacteriano e das condições de indução da expressão proteica foram realizados. Para isso, a cepa de *E. coli* BL21(DE3) capaz de produzir a proteína de interesse foi submetida ao cultivo em distintos meios de cultura (TB e LB), sendo avaliado também a influência da concentração do indutor IPTG (0,1 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 0,75 mM ou 1 mM) sobre a expressão e obtenção da proteína EDIII ZIKV (Figura 21). Em todas as concentrações testadas foi possível detectar a proteína de interesse junto à Fs do extrato bacteriano, sendo que bandas com maior intensidade foram observadas nas alíquotas correspondentes à Fs induzidas com 0,5 mM e 0,75 mM de IPTG (Figura 21, A e B). A comparação da concentração da proteína EDIII ZIKV junto à Fs por ensaio de imunodeteção permitiu observar uma banda com maior proeminência na fração solúvel correspondente a indução com 0,75 mM de IPTG, em ambos os meios de cultivo (Figura 20, C e D). Desta forma, a concentração de 0,75 mM de IPTG foi escolhida para indução da expressão da proteína de interesse nas etapas seguintes do trabalho.

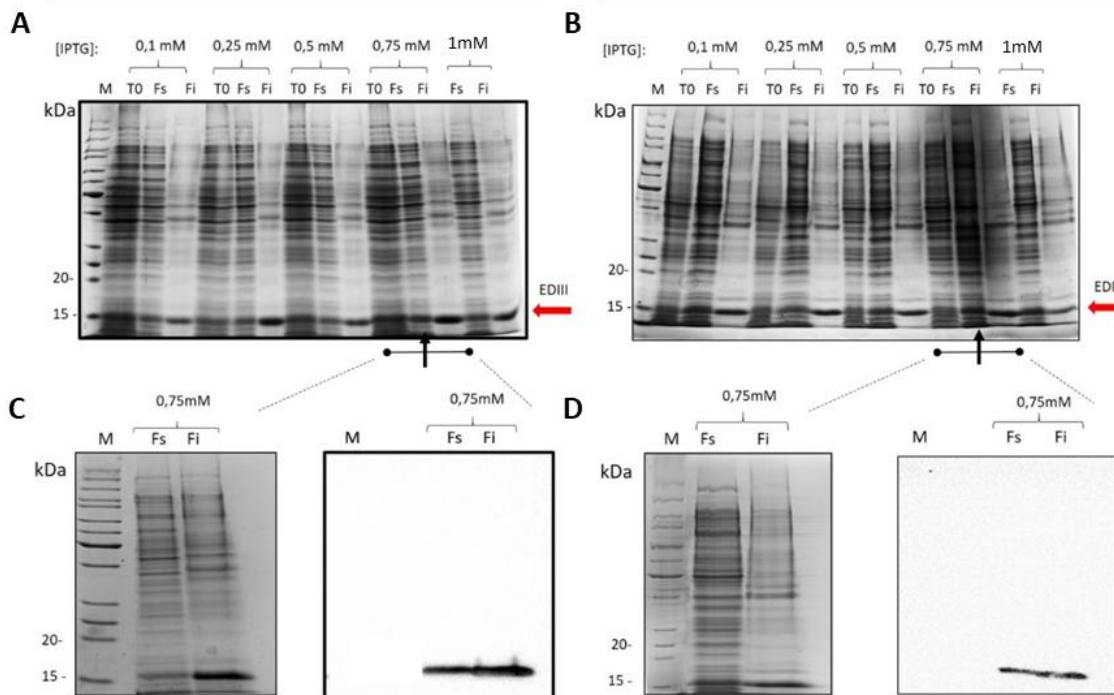


Figura 21. Otimização da expressão da proteína EDIII ZIKV na linhagem *E. coli* BL21 (DE3). A expressão da proteína EDIII foi avaliada sob a utilização de diferentes concentrações de IPTG (0.1 mM,

0,25 mM, 0,5 mM, 0,75 mM e 1 mM) e meios de cultivo (LB e TB). (A e B) Fotos de géis de poliacrilamida a 15% ilustram a indução da expressão da proteína EDIII ZIKV em meio de cultura LB e TB, respectivamente. (C e D) Fotos de géis de poliacrilamida e *western blot* referente ao teste de expressão utilizando 0,75 mM de IPTG em meio de cultivo LB e TB, respectivamente. Descrição: canaleta M = marcador de peso molecular; To, extrato celular total antes da indução; Fs, fração celular proteica solúvel após indução; Fi, fração celular proteica insolúvel após indução, solubilizada em tampão desnaturante contendo 8M de ureia.

Ao se analisar a expressão da proteína EDIII ZIKV nos diferentes tipos de meios de cultivo (TB e LB) pôde-se observar que não houve uma diferença significativa quanto ao crescimento final das culturas pós-indução a 0,75mM de IPTG (Ab_{600} Final de 5,8 e 4,57, respectivamente). Assim, os dois meios foram escolhidos para dar prosseguimento ao cultivo e expressão da proteína alvo a ser utilizada nos testes de purificação, a fim de averiguar o impacto destes parâmetros no rendimento final do processo.

Para a obtenção e purificação da EDIII ZIKV, culturas em meio LB e TB foram produzidas em maior escala, adotando a linhagem de *E. coli* BL21(DE3) e indução da expressão proteica com IPTG a 0,75mM. A proteína alvo foi purificada a partir de ambas as condições de cultivo testadas (Figura 22), sendo que a utilização do meio LB resultou em um maior rendimento proteico final (0,357 mg de proteína/750 ml de cultura) quando comparado ao meio TB (0,167 mg de proteína/750 ml de cultura). A ausência da necessidade de renaturação diminuiu os custos da produção da proteína em estudo. Contudo, o rendimento proteico alcançado apresentou-se reduzido, demonstrando a necessidade de otimização de outras condições para maximizar o rendimento final da EDIII ZIKV.

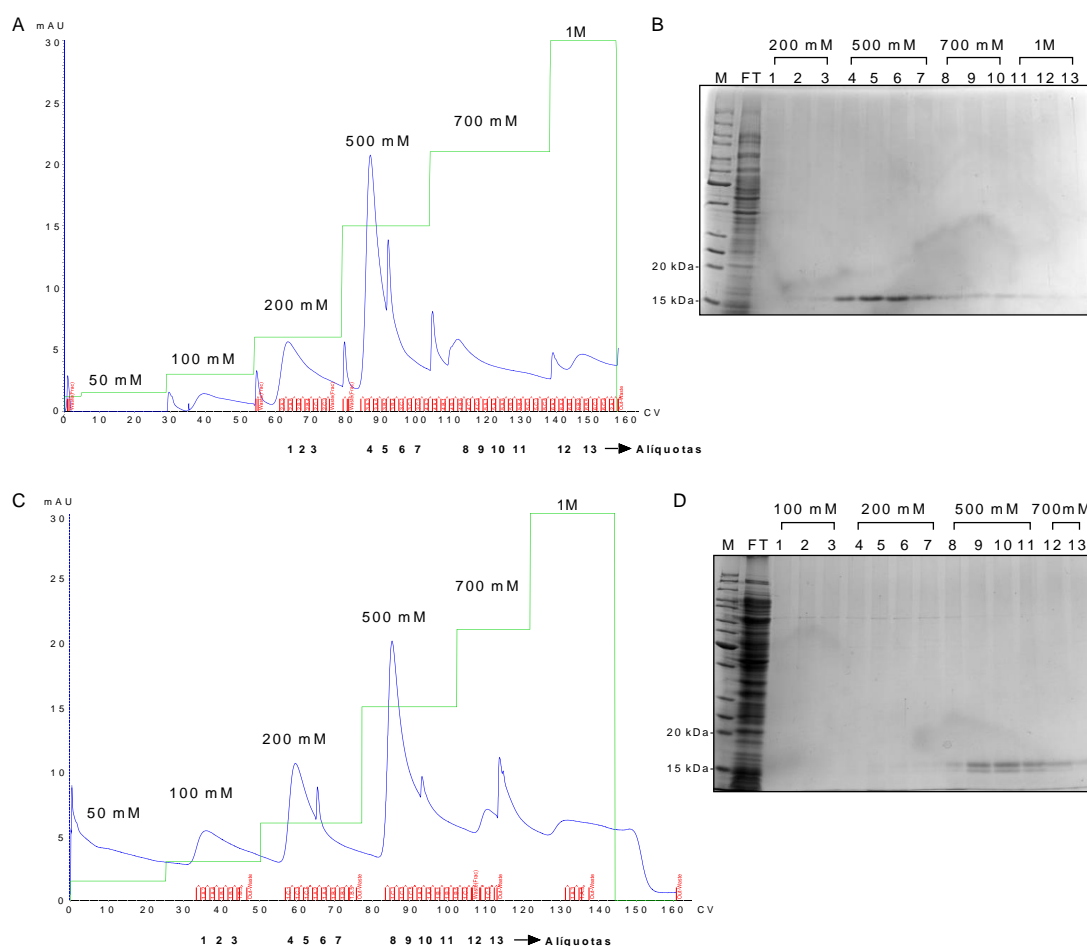


Figura 22. Purificação da proteína recombinante EDIII ZIKV por cromatografia de afinidade. (A e C) Cromatogramas de purificação da proteína EDIII ZIKV produzida na linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) cultivada em meio LB ou TB, respectivamente. A eluição da proteína foi realizada mediante aplicação de crescentes concentrações de imidazol (linha verde), conforme indicado nas figuras. (B e D) Perfil eletroforetico em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%) de alíquotas das frações resultantes da purificação da proteína alvo, produzida em meio LB ou TB, respectivamente. Descrição: canaleta M, marcador de peso molecular; FT, extrato proteico solúvel obtido após passagem na coluna de purificação (Flow through); 1-13, Frações resultantes das purificações.

Com objetivo de avaliar a qualidade da proteína obtida, a preservação da antigenicidade da proteína EDIII ZIKV purificada também foi avaliada por ELISA. Como é possível observar na figura 23A, a proteína preservou sua antigenicidade, sendo reativa com soro controle ZIKV+. Para avaliar a preservação de epítomos conformacionais em sua estrutura, a proteína EDIII também foi testada em sua forma desnaturada por ELISA. Para este parâmetro a reatividade máxima foi obtida somente quando a proteína foi utilizada em sua forma íntegra (Figura 23B). Assim, estes

resultados indicam que a proteína EDIII ZIKV produzida manteve epítomos conformacionais termolábeis em sua estrutura.

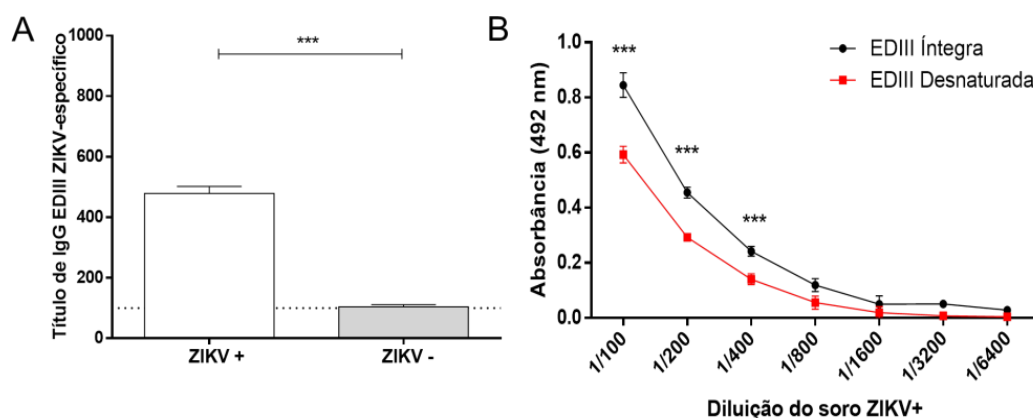


Figura 23. Avaliação da antigenicidade da proteína EDIII ZIKV obtida a partir da fração solúvel do extrato bacteriano. Para avaliar a preservação da atividade antigênica da proteína produzida ensaios de ELISA foram realizados empregando a proteína EDIII ZIKV como antígeno de fase sólida. (A) Reatividade da proteína EDIII ZIKV com amostras de soros humanos controles, sabidamente positivo ou negativo, para infecção prévia pelo ZIKV. (B) Amostras da proteína EIII ZIKV, submetida ou não previamente à desnaturação (aquecimento a 100 °C por 10 min. seguido de choque térmico à 0 °C), foram analisadas por ELISA quanto a sua reatividade com soro de paciente previamente infectado com o ZIKV. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (Teste t ou ANOVA de duas vias com correção de Bonferroni).

Apesar dos resultados apresentados demonstrarem que a proteína foi obtida de forma solúvel e com antigenicidade preservada, a mesma demonstrou-se extremamente instável após purificação, precipitando em concentrações superiores a 0,1 mg/ml. Além disso, significativa perda proteica foi observada durante o processo de diálise para retirada do imidazol remanescente da purificação, sendo inviável a aplicação desta proteína nas etapas seguintes previstas no trabalho. Desta forma, diversas tentativas de otimização da obtenção da proteína foram também realizadas incluindo, testes de purificação e diálise em diferentes tampões base (HEPES, Fosfato de Sódio e Bis-Tris-propano) e variadas condições de salinidade (50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 300 mM e 500 mM de NaCl). Além disso, a recuperação da proteína EDIII ZIKV a partir da fração insolúvel do extrato bacteriano, sob variadas condições de renaturação *in vitro*, também foi avaliada. Entretanto, a mesma permaneceu instável e com rendimento insatisfatório ao final do processo. Assim, métodos alternativos para obtenção da EDIII ZIKV se fizeram necessários.

4.2.2. Obtenção da proteína EDIII ZIKV por técnica de renaturação *in vitro* utilizando HHP.

Diante do sucesso em obter a proteína NS1 ZIKV utilizando a técnica de HHP em pH alcalino (Sessão 4.1.2), avaliamos sua utilização na solubilização e renaturação de IBs contendo a proteína EDIII ZIKV. Para isso, testes de solubilização da proteína EDIII ZIKV foram realizados em diferentes condições de pH (9-11) na presença ou ausência de arginina. De acordo as análises realizadas, a solubilização sob HHP (2,4 kbar / 0,4 kbar) em pH 10 (com ou sem adição de arginina) apresentou melhor recuperação proteica a partir dos IBs (Dados não mostrados). Essas duas condições foram então selecionadas, sendo ao final dialisadas para tampão PBS (pH 7,4). Após a remoção dos agregados proteicos por centrifugação, as amostras proteicas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida. Apesar da ocorrência de precipitação durante o procedimento de diálise, foi possível recuperar a proteína alvo a partir de ambas as condições, com reduzida presença de contaminantes (Figura 24). Devido à instabilidade observada após descongelamento das amostras, o tampão final da referida proteína foi alterado para PBS, com acréscimo 10 % de glicerol, de forma a aumentar sua solubilidade, principalmente, em condições de recongelamento.

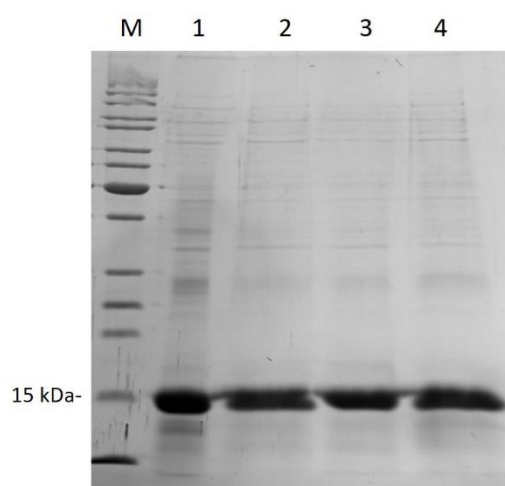


Figura 24. Diálise da proteína EDIII ZIKV para tampão PBS após renaturação *in vitro* utilizando alta pressão hidrostática. Os corpos de inclusão insolúveis contendo a proteína EDIII ZIKV foram submetidos à renaturação *in vitro* utilizando técnica de alta pressão hidrostática em condições alcalinas (pH 10) com ou sem adição de arginina. Após renaturação a proteína solubilizada foi dialisada para tampão PBS (pH 7.4 + glicerol 10%). Alíquotas das preparações proteicas coletadas antes e após procedimento de diálise foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% (SDS-PAGE).

Descrição: M, marcador de peso molecular; 1, EDIII ZIKV renaturada em pH 10 pré-diálise; 2, EDIII ZIKV renaturada em pH 10 após-diálise; 3, EDIII ZIKV renaturada em pH 10+Arg pré-diálise; 2, EDIII ZIKV renaturada em pH 10+Arg após-diálise.

Após diálise a proteína EDIII ZIKV foi submetida à purificação por CAN. Como é possível observar na figura 25, a proteína foi purificada e apresentou banda única com peso molecular esperado de 14,7 kDa. Além disso, os ciclos de lavagens dos IBs propiciaram a retirada da maior parte de contaminantes do extrato bacteriano, elemento que justifica a reduzida quantidade de proteína eluída nos passos de limpezas (25-100 mM de Imidazol) (Figuras 24 e 25). As frações correspondentes à proteína alvo foram então reunidas e, após diálise para retirada do imidazol remanescente, o rendimento estimado foi de 111,3 (pH 10) e 91,3 (pH 10 + Arg) mg/litro de cultura. Estes resultados demonstram excelente recuperação da EDIII ZIKV junto à fração insolúvel, sendo muito superior ao descrito previamente (< 1 mg/litro de cultura) quando obtida a partir da fração solúvel do extrato bacteriano (Sessão 4.2.1).

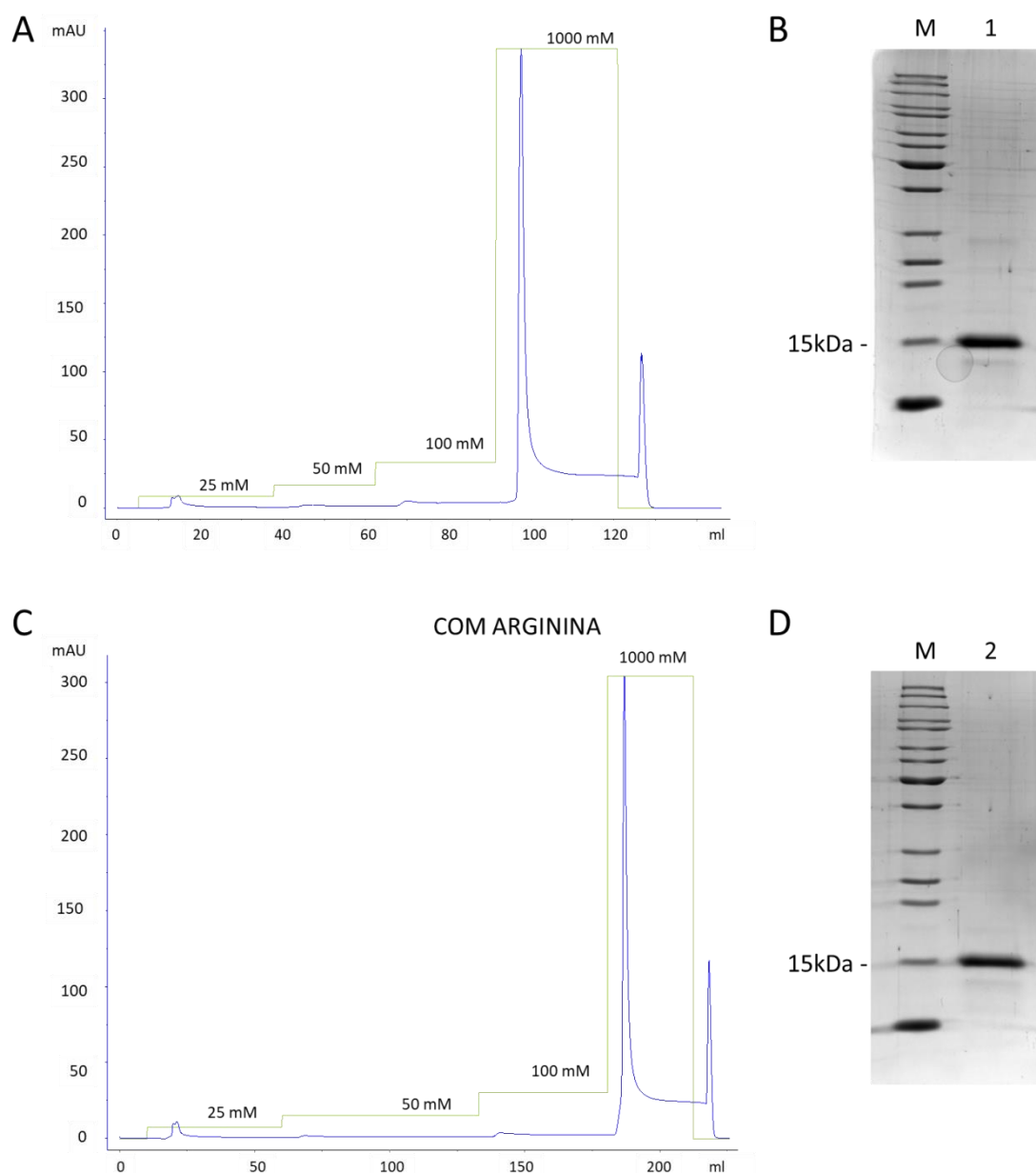


Figura 25. Purificação da proteína EDIII ZIKV obtida sob HHP. A proteína EDIII ZIKV foi renaturada por técnica de alta pressão hidrostática em tampão sem (A e B) ou com (C e D) adição de arginina. Após o procedimento de renaturação as preparações proteicas foram dialisadas para tampão PBS (pH 7.4 + glicerol 10%) e submetida à purificação por cromatografia de afinidade ao níquel (A e C). As alíquotas correspondentes à proteína alvo foram reunidas, dialisadas para retirada do imidazol remanescente e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) (B e D). Descrição: M, marcador de peso molecular; 1, alíquota da proteína EDIII ZIKV renaturada em tampão sem adição de arginina e purificada por CAN; 2, alíquota da proteína EDIII ZIKV renaturada em tampão com adição de arginina e purificada por CAN.

Com objetivo de avaliar a qualidade da proteína produzida, a sua reatividade, frente a soros provenientes de pacientes previamente infectados ou não pelo ZIKV, foi

mensurada por ELISA (Figura 26). A proteína solubilizada em pH 10, com ou sem adição de Arg, preservou antigenicidade após renaturação e purificação, as quais foram reconhecidas especificamente por soro ZIKV⁺. Por outro lado, embora a proteína EDIII produzida em pH 10+Arg tenha apresentado maior reatividade detectada junto ao ELISA, essa demonstrou-se instável em solução, principalmente após descongelamento.

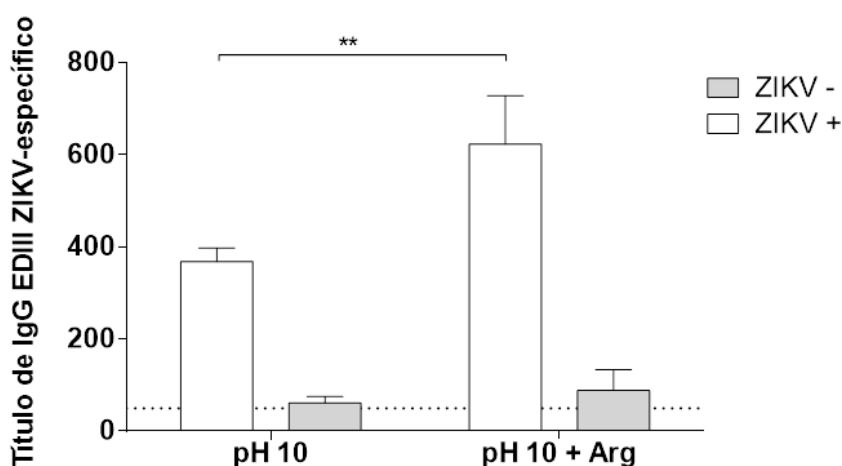


Figura 26. Avaliação da antigenicidade da proteína EDIII ZIKV obtida em diferentes condições de renaturação in vitro. A reatividade da proteína EDIII ZIKV com amostras de soro provenientes de pacientes previamente infectados pelo ZIKV ou não foi mensurada por ELISA utilizando a mesma como antígeno de fase sólida. Os resultados são representados como valores médios (barras) \pm DP dos títulos anticorpos IgG antígeno-específico obtidos em dois experimentos independentes. ** $p < 0,01$ (Teste t).

O domínio três da proteína E do ZIKV (EDIII) consiste na região da proteína responsável pela interação com os receptores celulares. Assim, com objetivo de avaliar a preservação da função biológica da proteína EDIII recombinante produzida nesta etapa do trabalho, a capacidade de ligação da mesma em células VERO (linhagem susceptível à infecção pelo ZIKV) foi avaliada por citometria de fluxo (Figura 27). A proteína EDIII renaturada em ambas as condições (pH 10 com ou sem Arg) preservou a capacidade de ligação às células VERO de maneira dose-dependente. Por outro lado, a proteína obtida em pH 10+Arg apresentou reduzida capacidade de ligação quando comparada a EDIII obtida na ausência de arginina. As proteínas BSA (não apresenta HisTag em sua sequência) e Bib A recombinante (adesina do *S. agalactiae*, que apresenta HisTag), utilizadas no ensaio como controles, não apresentaram significativa capacidade de ligação conforme esperado. Assim, a solubilização da EDIII ZIKV por HHP em pH 10 consistiu na condição que melhor propiciou a recuperação da proteína

alvo preservando sua estabilidade em solução, bem como sua qualidade antigênica e funcional. Estas características são fundamentais para a sua aplicação junto a estratégias vacinais e/ou ensaios de sorodiagnóstico a serem avaliadas nas próximas etapas previstas do trabalho.

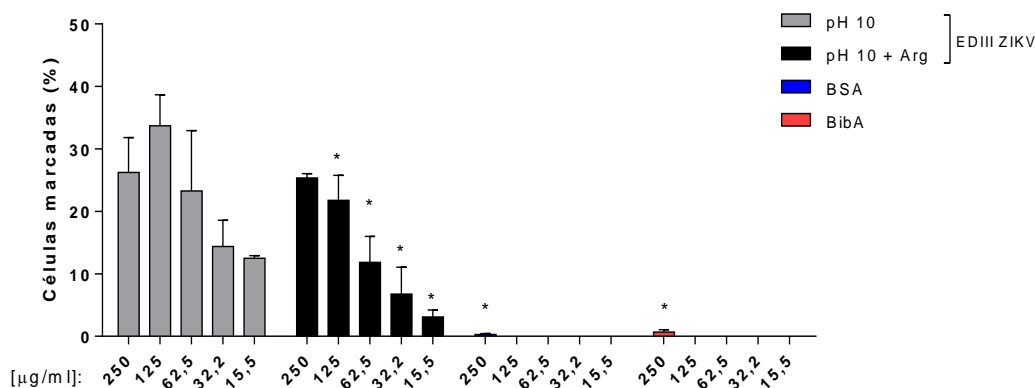


Figura 27. Avaliação da atividade biológica da proteína EDIII ZIKV. Concentrações decrescentes da proteína EDIII ZIKV obtida em diferentes condições de renaturação *in vitro* (pH 10 ou pH 10 + Arg) foram incubadas com suspensões de células VERO. A ligação da proteína EDIII ZIKV à superfície celular foi avaliada por citometria de fluxo utilizando protocolo de marcação com anticorpos anti-HisTag. Como controles foram utilizadas as proteínas BSA e BibA em igual concentração. Os resultados são representados como valores médios (barras) \pm DP da porcentagem de células marcadas. * $p < 0,05$, comparando-se as diferentes amostras com a proteína EDIII ZIKV obtida em pH 10 sem adição de arginina (ANOVA de duas vias com correção de Bonferroni).

4.2.3. Desenho e obtenção da proteína Δ EDIII ZIKV.

Diante das dificuldades encontradas para produção da proteína EDIII ZIKV, alternativamente avaliamos a sequência da mesma com auxílio de ferramentas de bioinformática. Esta análise teve por objetivo a modificação ou retirada de regiões da proteína de forma a aumentar a sua solubilidade. Assim, a sequência de aminoácidos da proteína alvo foi utilizada para determinação do perfil de hidrofobicidade de Parker (Figura 28A). Foi possível observar que as regiões destacadas na porção N-terminal (aa 1-21) e C-terminal (aa 87-93) apresentou maior proporção de epítomos lineares com caráter hidrofóbico, as quais podem ajudar na desestabilização da proteína em meio aquoso. Diante disso, uma nova construção foi proposta, aqui denominada Δ EDIII ZIKV, para a qual as regiões citadas anteriormente foram removidas da proteína.

Conforme predito, a retirada das regiões indicadas promoveu o aumento da solubilidade da proteína, sendo possível recuperar e purificar a mesma a partir da fração

solúvel do extrato bacteriano após expressão em linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) (Figura 28, B-D). Embora as modificações realizadas tenham permitido a obtenção da Δ EDIII ZIKV de forma solúvel, as mesmas podem exercer impacto significativo sobre sua estrutura e, conseqüentemente, sobre sua antigenicidade e função biológica. Neste sentido, os parâmetros de antigenicidade e capacidade de ligação a receptores celulares da referida proteína foram avaliados por ELISA e citometria de fluxo, respectivamente, conforme descrito anteriormente (Sessão 4.2.2). Nós observamos que a proteína Δ EDIII ZIKV apresentou reduzida reatividade com soro ZIKV⁺, a qual foi acompanhada também por ausência de ligação em células VERO quando comparada a proteína EDIII ZIKV renaturada por HHP (Figura 28). Desta forma, apesar da facilidade de obtenção da proteína em questão, seu uso demonstrou-se limitado.

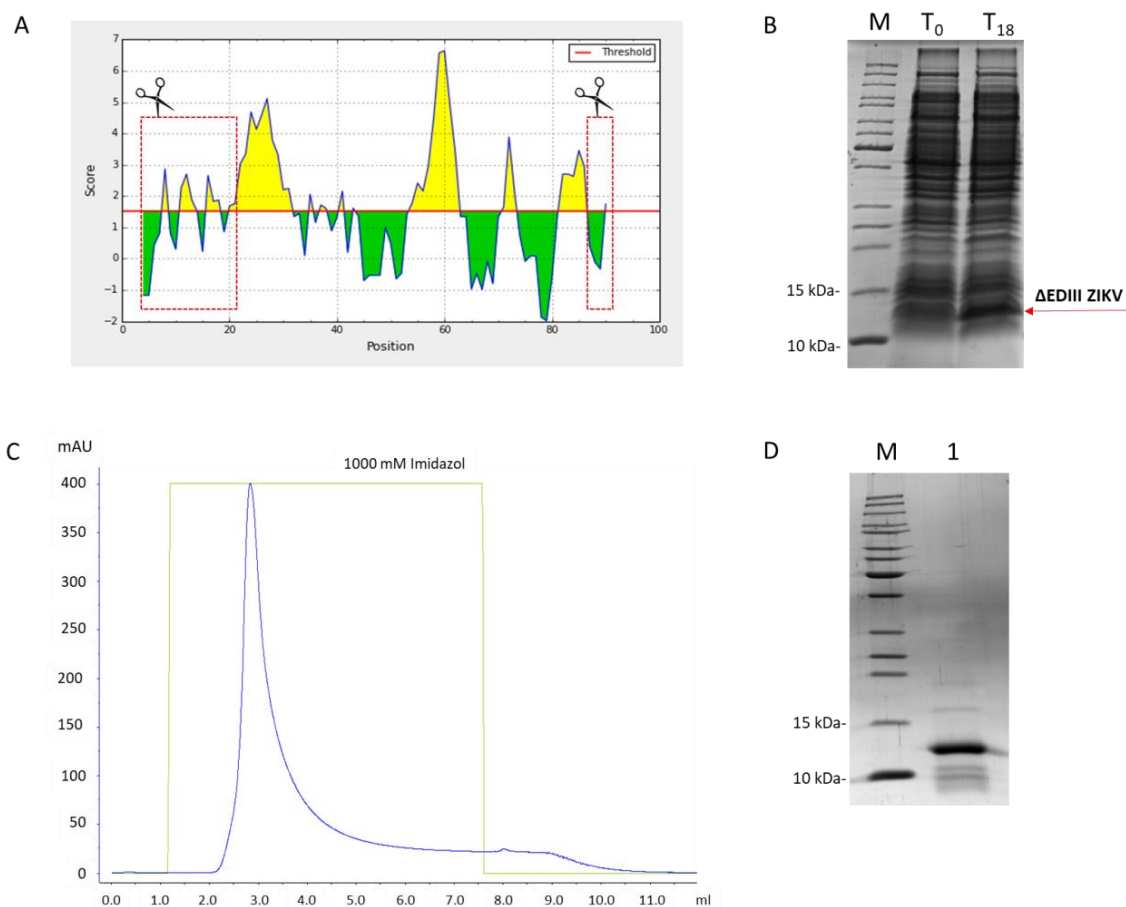


Figura 28. Desenho, expressão e purificação da proteína Δ EDIII ZIKV. (A) Predição de hidrofobicidade de Parker obtido por análise computacional da sequência de aminoácidos da proteína EDIII ZIKV. As regiões hidrofóbicas presentes nas porções N e C terminal da proteína EDIII (porções destacadas pelos retângulos vermelhos) foram retidas e a sequência remanescente, denominada Δ EDIII ZIKV, utilizada para clonagem e expressão da proteína correspondente. (B) A linhagem de *E. coli* BL21

(DE3) capaz de expressar a proteína Δ EDIII ZIKV foi induzida a 18 °C/18 h. Aliquotas antes e após a indução foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (15%). (C) Cromatograma de purificação por CAN da proteína Δ EDIII ZIKV obtida a partir da fração solúvel do extrato bacteriano. (D) Perfil eletroforético da proteína Δ EDIII ZIKV purificada. Descrição: canaleta M, corresponde ao marcador de massa molecular; canaleta T0, extrato celular antes da indução; canaleta T18, extrato celular obtido 18 h após o início da indução da expressão proteica; 1, alíquota de 2 μ g da proteína Δ EDIII ZIKV purificada.

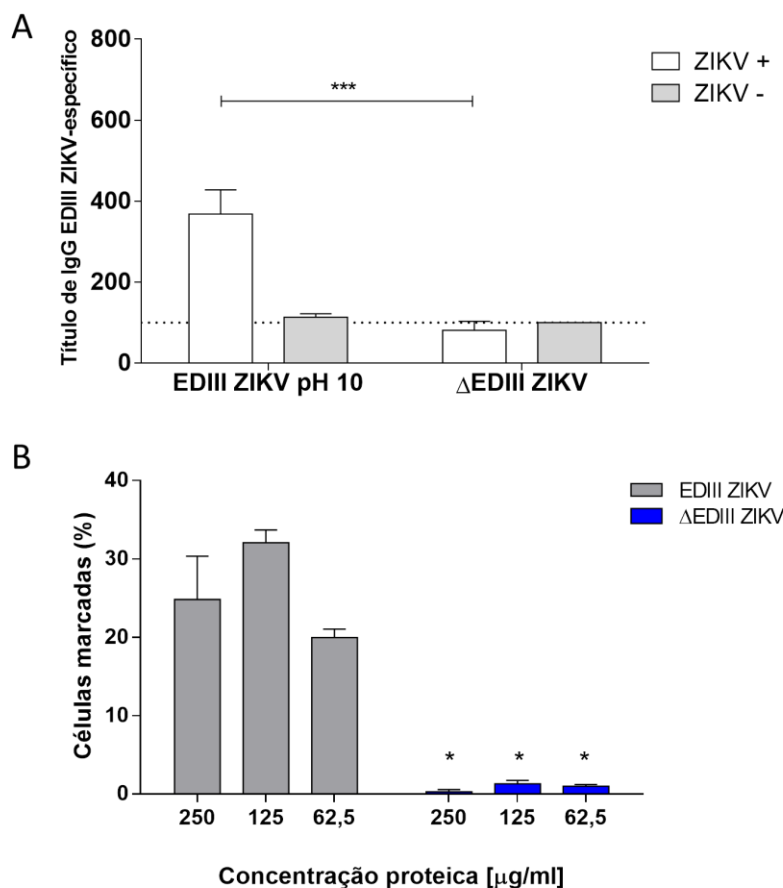


Figura 29. Avaliação da antigenicidade e atividade biológica da proteína Δ EDIII ZIKV. (A) Reatividade da proteína Δ EDIII ZIKV com amostras de soro provenientes pacientes previamente infectados pelo ZIKV ou não foi mensurada por ELISA utilizando a mesma como antígeno de fase sólida. Os resultados são representados como valores médios (barras) \pm DP dos títulos anticorpos IgG antígeno-específico. (B) Avaliação da capacidade de ligação da proteína Δ EDIII ZIKV em células Vero. A proteína alvo foi incubada com suspensões de células Vero, marcadas com anticorpo anti-HisTag e analisadas por citometria de fluxo de forma análoga ao descrito na figura 8. Como controle dos ensaios foi utilizada a proteína EDIII ZIKV renaturada em pH 10 conforme descrito anteriormente. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$, comparando-se as diferentes amostras com a proteína EDIII ZIKV pH 10 (ANOVA de duas vias com correção de Bonferroni).

4.2.4. Discussão Parcial.

Nesta etapa do trabalho buscamos obter a proteína EDIII ZIKV de forma solúvel e com antigenicidade preservada. Essa proteína representa um importante alvo para a produção de anticorpos neutralizantes. Sua reduzida homologia de sequência comparada a de outros arbovírus fazem da mesma um promissor antígeno para uso em diagnóstico. Assim, diversas estratégias de obtenção dessa proteína na fração solúvel do extrato bacteriano foram testadas, incluindo diferentes linhagem de *E. coli*, condições de cultivo (meio, temperatura de indução e concentração de IPTG), tampão de recuperação e edição de sequência com retirada de regiões hidrofóbicas. Entretanto, embora tenha sido possível purificá-la a partir da fração solúvel do extrato bacteriano, o rendimento obtido foi extremamente baixo (~0,3 mg/L cultura), bem como a proteína não se manteve estável em solução. Por outro lado, a recuperação da EDIII ZIKV por renaturação *in vitro*, utilizando a técnica HHP, se mostrou eficiente, sendo o rendimento proteico aumentado em mais de 100x (111,3 mg/L). Além disso, a proteína preservou antigenicidade e função biológica, sendo esses parâmetros indicativos de qualidade compatíveis com a aplicação em ensaios de diagnóstico e uso em formulações vacinais.

A elevada taxa de expressão proteica pode impactar negativamente na eficiência de enovelamento proteico e, conseqüentemente, o acúmulo da proteína produzida em IBs. Por outro lado, a taxa de expressão proteica pode ser modulada por diferentes parâmetros, como a concentração de agente indutor disponível para a célula, bem como pelo tempo, temperatura e meio de cultivo (153,155,156). Neste contexto, o meio TB demonstrou melhor desempenho em relação a outros meios de cultura para a produção de proteínas recombinantes. Esse meio apresenta capacidade de tamponamento, mantendo um pH controlado durante o crescimento bacteriano e a presença de glicerol como fonte adicional de carbono (157,158). Avaliamos também, o impacto dos meios de cultivo TB ou LB sobre a expressão da EDIII ZIKV. Entretanto, nas condições aqui testadas não houve diferença quanto ao crescimento final das culturas pós-indução, bem como na recuperação proteica a partir da fração solúvel do extrato bacteriano, mesmo sob temperatura reduzida (18°C). Por outro lado, a indução da expressão proteica com elevada concentração de IPTG (0,75 mM) foi a que apresentou melhor recuperação da proteína alvo na fração solúvel. Estes resultados estão compatíveis com achado recente,

no qual a expressão proteica induzida com 0,7 mM de IPTG e reduzida temperatura (16 °C) resultou em maior recuperação da proteína alvo a partir da fração solúvel do extrato bacteriano (153).

A literatura suporta a recuperação da EDIII de diferentes *Flavivirus* por técnicas de renaturação *in vitro*, especialmente para DENV, WNV e ZIKV (38). Diante do reduzido rendimento proteico observado a partir da fração solúvel do extrato bacteriano, a recuperação da EDIII ZIKV foi explorada também a partir de IBs. Neste contexto, a aplicação de HHP em pH alcalino foi a técnica de escolha devido à sua elevada capacidade de renaturação proteica *in vitro* com preservação de propriedades imunológicas, conforme descrito para as proteínas NS1 ZIKV e DENV (121,152). Observamos um elevado rendimento proteico para a EDIII ZIKV quando submetida à essa técnica, sendo que a proteína obtida demonstrou-se estável em solução e reativa frente a soros ZIKV⁺.

Um fator crucial na indução de anticorpos neutralizantes baseados na proteína E do ZIKV consiste na preservação de epítomos conformacionais em sua estrutura. Por outro lado, os anticorpos anti-EDIII tem como principal alvo o bloqueio da interação desta proteína com receptor da célula hospedeira. Embora sem avaliar os parâmetros estruturais da EDIII ZIKV obtida neste trabalho, a mesma demonstrou ter capacidade de interação específica com a superfície de células susceptíveis à infecção pelo ZIKV. Essa característica é sugestiva de manutenção da conformação estrutural compatível com a sua interação ao receptor celular. Em contrapartida, a retirada de regiões hidrofóbicas das porções C e N terminais da EDIII ZIKV impactou drasticamente na antigenicidade e interação dessa proteína com a superfície celular, sugerindo a importância dessas regiões para o correto enovelamento proteico. Diante do exposto, a proteína EDIII ZIKV obtida por HHP foi selecionada para as próximas etapas do trabalho.

4.3.CAPÍTULO III. Avaliação da especificidade sorológica das proteínas EDIII e NS1 ZIKV.

As proteínas recombinantes obtidas de acordo ao apresentado nos capítulos 1 e 2 deste trabalho foram utilizadas na padronização de ensaios sorológicos baseados na plataforma de ELISA. Os resultados obtidos estão descritos a seguir.

4.3.1. Padronização de um protocolo de ELISA baseado na proteína Δ NS1 ZIKV.

Com objetivo de avaliar a especificidade sorológica da proteína Δ NS1 ZIKV um protocolo de ELISA foi padronizado utilizando a mesma como antígeno de fase sólida. Este ensaio foi baseado na detecção de anticorpos anti-ZIKV da classe IgG, visto o seu potencial de aplicação na detecção de exposição prévia ao ZIKV, especialmente no contexto de mulheres gestantes e eminente risco de transmissão vertical deste vírus. Inicialmente buscamos avaliar se a utilização da proteína Δ NS1 ZIKV, em substituição a proteína NS1 ZIKV, reduz a reatividade cruzada de anticorpos IgG direcionados a outros flavivirus (Figura 30). Ao avaliar a reatividade da proteína Δ NS1 ZIKV frente a amostras de ascites monoespecíficos obtidas de animais infectados com o DENV, YFV, CHIKV ou ZIKV, os resultados mostraram reatividade cruzada reduzida (DENV e YFV) ou nula (CHIKV) quando utilizada a proteína Δ NS1 ZIKV (Figura 30B). Em contraste, os anticorpos de camundongos infectados com o ZIKV reagiram fortemente com a proteína Δ NS1 ZIKV, apresentando uma reatividade reduzida com a proteína NS1 DENV2. Esta última foi produzida de acordo ao descrito previamente pelo nosso grupo de pesquisa (159) e utilizada como controle de reatividade cruzada.

Para melhor avaliar o perfil de reatividade da proteína Δ NS1 ZIKV frente à imunidade prévia contra o DENV, avaliamos sua reatividade com amostras de soro monoespecíficas para os diferentes sorotipos de DENV. Para isso, amostras de soro de camundongos infectados separadamente com os vírus da dengue (sorotipos 1-4) foram obtidas, sendo a reatividade com a proteína Δ NS1 ZIKV, bem como com as sequências correspondentes de DENV, mensuradas por ELISA. Como é possível observar na figura 30B-E, elevada reatividade foi observada quando as amostras de soro DENV+ foram reagidas com as proteínas Δ NS1 DENV1-4, conforme esperado. Por outro lado, a utilização da proteína Δ NS1 ZIKV reduziu drasticamente a detecção de anticorpos anti-

DENV (Figura 30B-E). Nas condições avaliadas, somente amostras com anticorpos direcionados ao DENV2 e DENV3 foram detectadas cruzadamente quando reagidas com a proteína Δ NS1 ZIKV (Figura 30, C e D). Além disso, como esperado as proteínas utilizadas não apresentaram reatividade significativa com amostras de soro obtidas de animais não infectados (*Naive*). Assim, esses resultados indicam que a proteína Δ NS1 ZIKV reduz a detecção de anticorpos direcionados a DENV e YFV.

Em seguida avaliamos o desempenho do protocolo de ELISA baseado na proteína Δ NS1 ZIKV utilizando amostras de soro humano. Para isso, o padrão de reatividade da proteína Δ NS1 ZIKV foi avaliado frente a um painel de amostras de soros de indivíduos infectados pelo DENV, as quais foram coletadas antes da entrada do ZIKV no Brasil (116,160). Como é possível observar na Figura 31A, estes soros apresentaram reatividade significativamente menor com a Δ NS1 ZIKV quando comparado à utilização das proteínas NS1 ZIKV e NS1 DENV2. Assim, esses resultados confirmam que a reatividade cruzada de anticorpos observada em pacientes infectados com DENV pode ser reduzida quando a Δ NS1 ZIKV é utilizada.

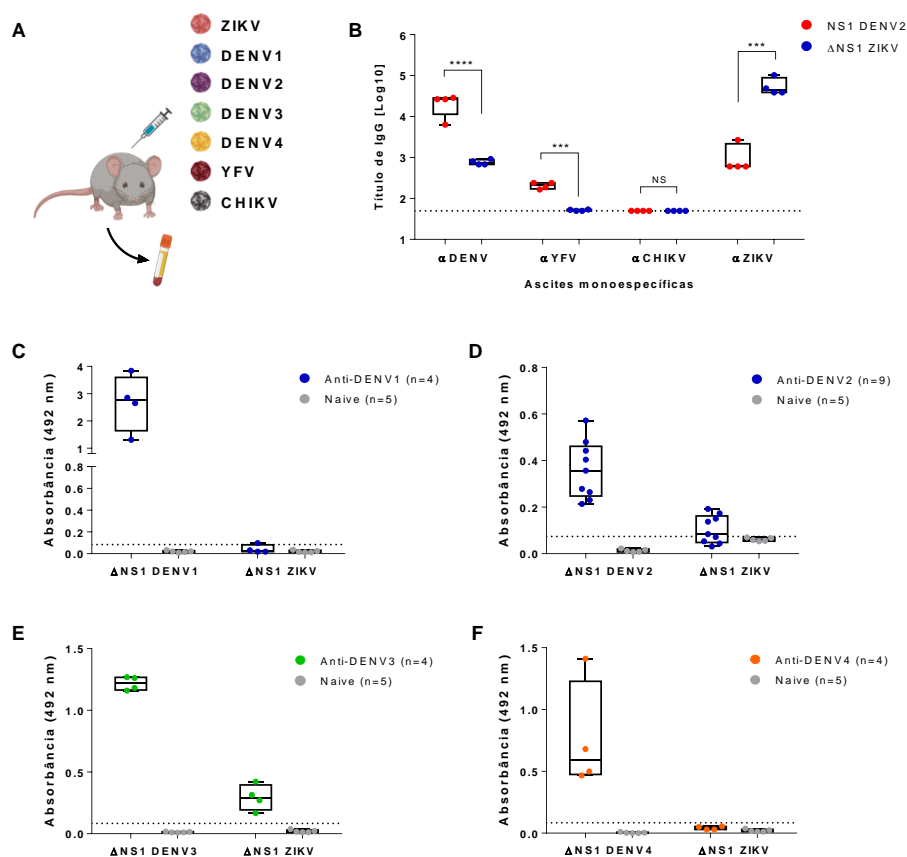


Figura 30. Avaliação da reatividade da proteína Δ NS1 ZIKV frente a soros mono-específicos para diferentes flavivirus. Protocolo de ELISA foi estabelecido tendo a proteína Δ NS1 ZIKV como antígeno de fase sólida. As proteínas Δ NS1 DENV (sorotipos 1-4) ou quantidades equimolares das proteínas NS1 inteira dos vírus DENV2 e ZIKV foram utilizadas como controles. (A) Representação esquemática ilustrando a infecção de camundongos com os vírus da dengue (sorotipos 1-4), Zika, Febre Amarela ou Chikungunya. (B) Padrão de reconhecimento das proteínas Δ NS1 ZIKV e NS1 DENV2 por amostras de ascites murinas mono-específicas para os vírus DENV, YFV, CHYKV ou ZIKV. (C-F) Reatividade de amostras de soro provenientes de camundongos infectados pelo vírus da dengue (sorotipos 1-4) ou ZIKV com as proteínas Δ NS1 do ZIKV ou DENV (1-4), conforme indicado nas figuras. Amostras de soro de camundongos não infectados (*Naive*) foram utilizadas como controle negativo. Os resultados foram expressos pelos valores de mediana (box plot) ou individuais (símbolos) do título ou absorvância de anticorpos IgG direcionados aos antígenos. A figura A foi criada com BioRender.com.* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; NS = Não significativo (ANOVA de duas vias com correção de Bonferroni).

Para melhor compreender a natureza da especificidade sorológica promovida pela proteína Δ NS1 ZIKV e, levando em consideração a presença de epítomos conformacionais indicados pela análise computacional (Figura 13B; Tabela 8) e ensaios de antigenicidade (Figura 16B), a reatividade de amostras provenientes de indivíduos infectados pelo ZIKV, com imunidade prévia para o DENV (ZIKV⁺DENV⁺) ou não (ZIKV⁺DENV⁻), foi avaliada com as proteínas Δ NS1 ZIKV, NS1 ZIKV ou NS1 DENV

nas formas nativas ou desnaturadas termicamente (Figura 31, B e C). As amostras de soro utilizadas nesta etapa foram confirmadas previamente pela detecção de anticorpos neutralizantes (PRNT) para DENV e ZIKV. Assim, corroborando os resultados apresentados anteriormente, a utilização da proteína Δ NS1 ZIKV reduziu significativamente a detecção de anticorpos de reatividade cruzada direcionados ao DENV (Figura 31B). A desnaturação dos antígenos reduziu drasticamente a reatividade dos anticorpos de indivíduos previamente infectados com o ZIKV e/ou DENV (Figura 31, B e C). Além disso, a detecção de anticorpos específicos para o ZIKV foi perdida após a desnaturação do antígeno Δ NS1 ZIKV (Figura 31C). Desta forma, os resultados obtidos indicam que os anticorpos anti-NS1 que se ligam a epítomos conformacionais, agrupados na região C-terminal da proteína NS1 ZIKV, conferem maior especificidade para detectar infecções por ZIKV. A proteína Δ NS1 ZIKV configura, portanto, um antígeno alternativo a ser aplicado em ensaios de sorodiagnóstico a serem utilizados em regiões onde DENV e ZIKV circulam.

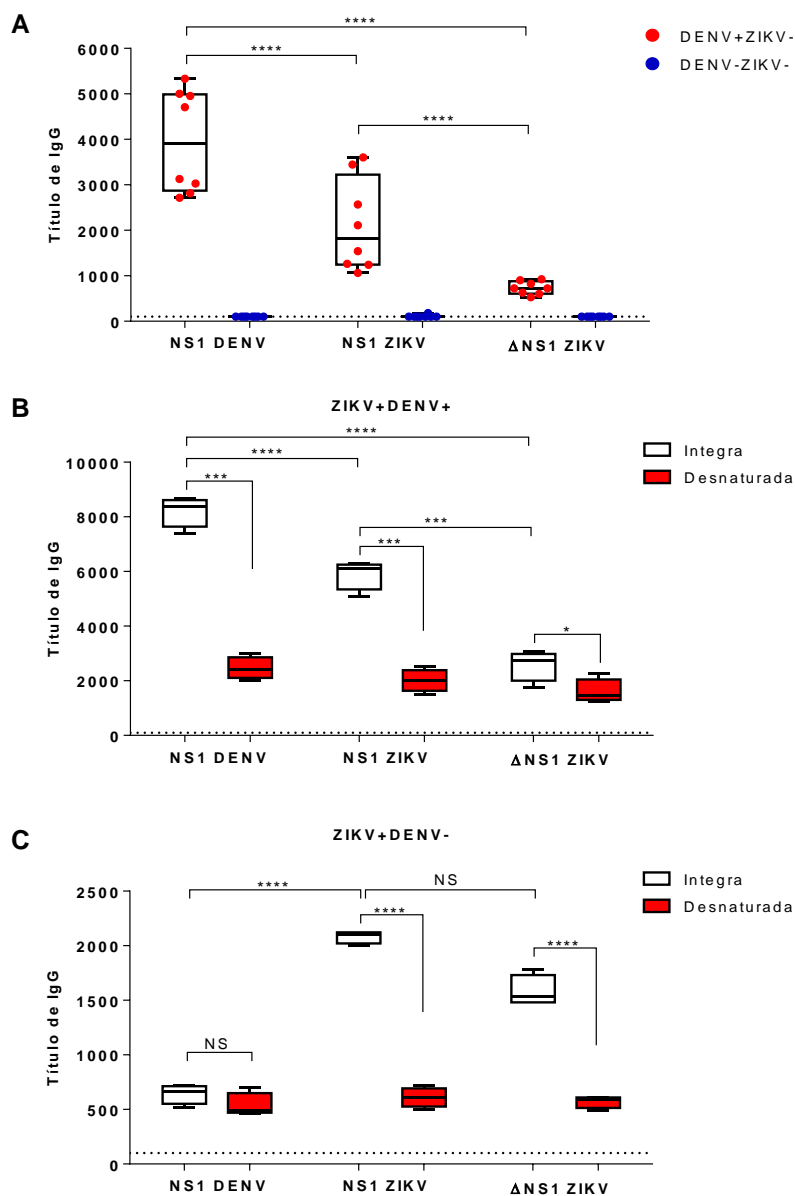


Figura 31. Avaliação da especificidade sorológica da proteína Δ NS1 ZIKV utilizando amostras de humano. (A) Reatividade de amostras de soro provenientes de indivíduos ($n=8$) previamente infectados pelo vírus da dengue (coletadas em período pré-epidêmico no Brasil) com as proteínas NS1 DENV2, NS1 ZIKV ou Δ NS1 ZIKV. (B e C) Padrão de reatividade das proteínas frente a soros humanos infectados pelo ZIKV, previamente expostos ao DENV (ZIKV+DENV+, B) ou não (ZIKV+DENV-, C). Os resultados foram expressos em título de anticorpos IgG médio (Box plot) ou individuais (símbolos) obtidos em dois experimentos independentes. * $p<0.05$; *** $p<0.001$; **** $p<0.0001$; NS = Não significativo (ANOVA de duas vias com correção de Bonferroni).

Apesar da proteína Δ NS1 ZIKV ter reduzido a detecção de anticorpos de reatividade cruzada, algumas amostras DENV positivas apresentaram reatividade remanescente acima do *cut-off* estabelecido para o ensaio (Figura 30, B e D-E; Figura

31 A). Assim, visando remover a reatividade cruzada do ensaio baseado na proteína Δ NS1 ZIKV, aplicamos um protocolo de depleção dos anticorpos anti-DENV por meio da adsorção prévia das amostras de soro com uma combinação das proteínas Δ NS1 de DENV (sorotipos 1-4), seguido da incubação dos mesmos com a proteína Δ NS1 ZIKV imobilizada em placa de ELISA (Figura 32A). A seleção desta técnica de adsorção foi baseada em estudos prévios que demonstrou a eficiência da mesma em aumentar a especificidade de ensaios sorológicos para outros patógenos como *Borrelia burgdorferi* e *Fasciola* spp. (161,162).

De posse das proteínas purificadas Δ NS1 do DENV (1, 2, 3 e 4), as mesmas foram então utilizadas em testes de ELISA para detecção de anticorpos IgG tendo a proteína Δ NS1 ZIKV como antígeno de fase sólida. Para isso, um tampão contendo uma mistura das proteínas Δ NS1 DENV foi formulado e utilizado para adsorção dos anticorpos de reatividade cruzada presentes nas amostras de soro (Figura 32A). A aplicação da referida estratégia permitiu eliminar especificamente a reatividade cruzada remanescente presente em amostras de indivíduos previamente infectados pelo DENV (Figura 32B). Por outro lado, a reatividade dos anticorpos específicos para o ZIKV ($\text{ZIKV}^+\text{DENV}^-$ e $\text{ZIKV}^+\text{DENV}^+$) permaneceu preservada, demonstrando que a depleção, nas condições testadas, não afeta a sensibilidade do ensaio para a detecção de anticorpos IgG anti-NS1 ZIKV (Figura 32B). Assim, os dados obtidos abriram perspectiva da utilização da proteína Δ NS1 ZIKV, em associação à técnica de adsorção descrita, na detecção específica da imunidade prévia ao ZIKV. A etapa seguinte do trabalho consistiu na validação do referido teste de ELISA com amostras de soros humanos provenientes, principalmente, de regiões endêmicas para outros *Flavivirus*.

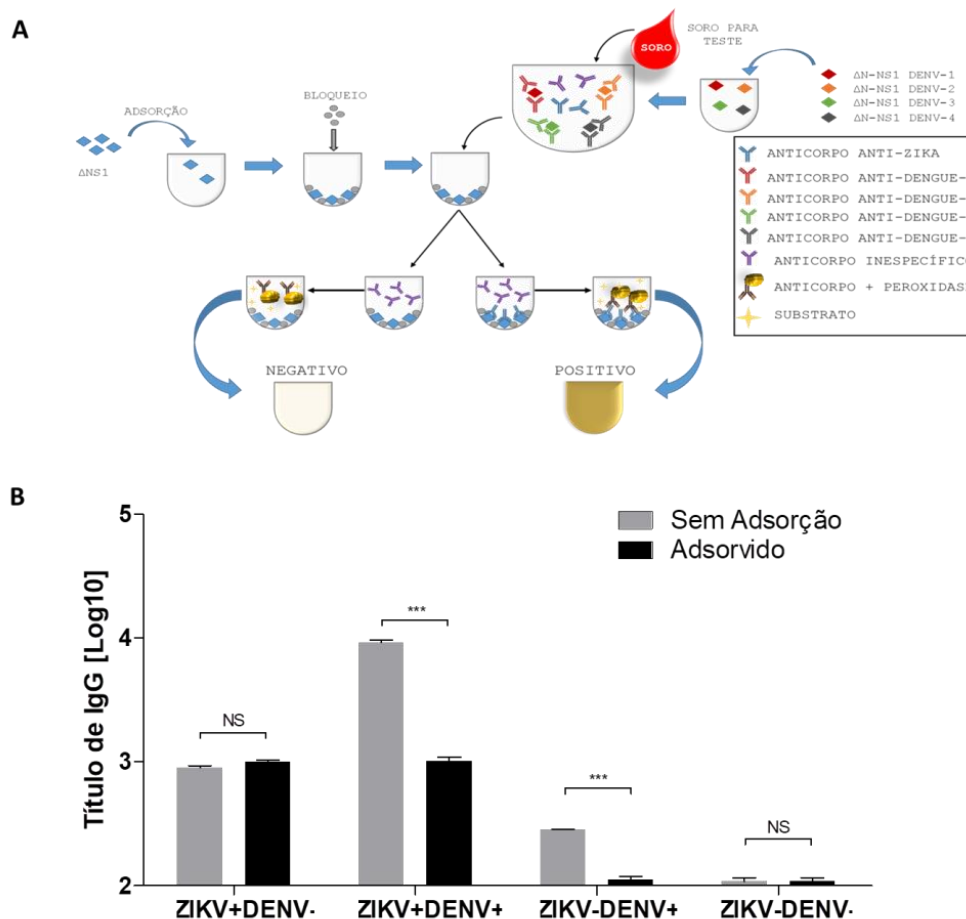


Figura 32. Avaliação da adsorção prévia de amostras de soros com as proteínas Δ NS1 de DENV. (A) Esquema ilustrativo do teste de ELISA utilizando a proteína Δ NS1 ZIKV como antígeno de fase sólida e amostras de soro pré-adsorvidas com as proteínas Δ NS1 referentes aos DENV 1, 2, 3 e 4. (B) Reatividade de amostras de soro, provenientes de indivíduos infectados pelo ZIKV e/ou DENV (conforme indicado na figura), pré-adsorvidas ou não com uma mistura das proteínas Δ NS1 referentes aos DENV 1, 2, 3 e 4. Os resultados foram expressos em título de anticorpos IgG médio anti- Δ NS1 ZIKV (Barras) \pm DP. Descrição: NS, não significativo; *** $p < 0,001$ (Teste t).

A etapa de validação do teste de ELISA foi realizada em colaboração com equipe dos professores Dr. Edison Luiz Durigon e Dra. Danielle Bruna L. O. Durigon (LVCM-ICB/USP), bem como da Dra. Viviane Fongaro Botosso (LV/Instituto Butantan). O protocolo de ELISA baseado na proteína Δ NS1 ZIKV padronizado, denominado como *in house*, foi modificado com objetivo de substituir algumas das soluções por reagentes comerciais (solução de bloqueio, diluente de amostra e revelação), tendo-se, portando, sua composição compatível com um kit comercial. Assim, após a realização de ensaios de otimização e substituição das soluções utilizadas no teste de ELISA (dados não mostrados), definimos a configuração das condições de

ensaio que preservaram a reatividade de amostras controles, como avaliados previamente no protocolo estabelecido *in house*, de acordo ao descrito na tabela 5. O teste de ELISA otimizado foi denominado ELISA ZIKA-v IgG.

Após otimização do protocolo do teste ELISA ZIKA-v IgG, procedemos com a validação do mesmo utilizando painel de soros humanos caracterizados quanto à imunidade prévia contra DENV, YFV e ZIKV (Sessão 3.13.4; Tabela 7). Inicialmente, a ocorrência de reatividade cruzada do ELISA ZIKA-v IgG foi avaliada frente a um painel de soros (n=85) contendo amostras sabidamente positivas para os vírus citados anteriormente. Conforme ilustrado na tabela 9, todos os soros dos grupos G1 (DENV⁺) e G3 (YFV⁺) não foram reagentes quanto triados com o ELISA ZIKA-v IgG padronizado. Estes resultados demonstram que o mesmo não apresenta reatividade cruzada com anticorpos de pessoas previamente infectadas pelo DENV ou YFV, detectando especificamente amostras de pacientes infectados pelo ZIKV (grupo G2) nas condições testadas.

Tabela 9. Distribuição dos resultados obtidos das amostras testadas na validação do teste de ELISA baseado na proteína Δ NS1 ZIKV.

Grupo de amostras	Reagente	Não reagente	Inconclusivo	Total
G1 (DENV ⁺)	0	47	0	35
G2 (ZIKV ⁺)	10	0	0	10
G3(YFV ⁺)	0	50	0	40

Para estabelecimento dos parâmetros de sensibilidade e especificidade do ensaio utilizamos um grupo de 150 amostras obtidas de um estudo de coorte liderado pelo Dr. Albert Ko (Instituto Gonçalo Moniz – Fiocruz, Bahia/Universidade de Yale), as quais foram por ele gentilmente cedidas. Estas amostras foram triadas quanto à presença de anticorpos prévios para o ZIKV, pela técnica de PRNT₉₀, a qual consiste no padrão ouro estabelecido para sorologia de indivíduos infectados pelo ZIKV (48,52). Assim, as amostras foram caracterizadas como 85 negativas e 65 como positivas para a infecção prévia pelo ZIKV pela técnica de PRNT₉₀. Ao comparar a desempenho das metodologias de ELISA ZIKA-v IgG e PRNT₉₀, somente 5 amostras foram

classificadas como falso negativas e 6 com falso positivas pelo ELISA (Tabela 10). Os resultados obtidos permitiram estimar os valores de especificidade e sensibilidade do teste de ELISA em, respectivamente, 94,12% e 90,7%, os quais foram determinados mediante o estabelecimento da curva ROC (Figura 33; Tabela 11) utilizando um ponto de corte de 0,2295 (Ab_{8450nm}).

Tabela 10. Comparação dos resultados do teste de ELISA com a metodologia considerada padrão – PRNT₉₀.

Teste (ELISA)	Número de amostras		Total
	Padrão ouro – PRNT ₉₀		
	Reagente	Não reagente	
Reagente	59 (A)	6 (B)	65
Não reagente	5 (C)	80 (D)	85
Total	64	86	150

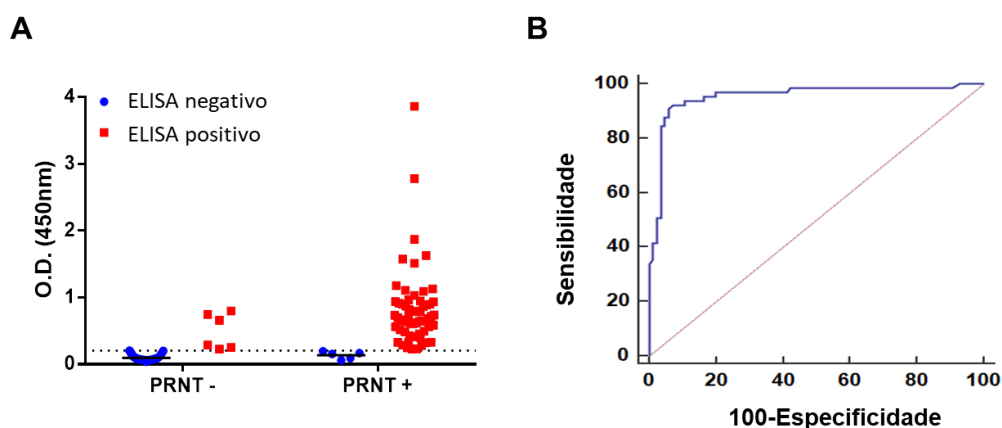


Figura 33. Avaliação da especificidade e sensibilidade do teste de ELISA baseado na proteína Δ NS1 ZIKV. (A) Amostras positivas ($n=85$) e negativas ($n=65$) para anticorpos anti-ZIKV, caracterizadas previamente por PRNT₉₀, foram pareadas quanto aos resultados obtidos utilizando teste de ELISA baseado na proteína Δ NS1 ZIKV. Os resultados obtidos foram utilizados para determinação da curva ROC Curva ROC (B). O valor de corte definido para ELISA foi de absorbância (450nm) $\geq 0,2295$.

Tabela 11. Parâmetros do teste de ELISA baseado na proteína Δ NS1 ZIKV.

Parâmetro	95%
Sensibilidade (%)	90,7 (80,98 – 98,57)
Especificidade (%)	94,12 (86,8 – 98,06)
Valor preditivo positivo	90,90 (82,1 – 95,50)
Valor preditivo negativo	94,05 (87,1 – 97,30)

A elevada especificidade e sensibilidade observada aqui demonstra que o referido kit de ELISA pode ser aplicado para determinação da infecção prévia pelo ZIKV, especialmente em regiões endêmicas para outros *Flavivirus* como DENV.

4.3.2. Avaliação da especificidade do monoclonal 4H2 direcionado ao antígeno Δ NS1 ZIKV.

A seleção de anticorpos monoclonais (mAbs) antígeno-específicos abre perspectiva de aplicação e padronização de metodologias diagnósticas incluindo imunofluorescência, ELISA, testes imunocromatográficos, entre outras. Neste contexto, soros hiperimunes e/ou mAbs produzidos e direcionados ao antígeno Δ NS1 ZIKV apresentam potencial aplicação em testes de diagnóstico para este patógeno. Assim, a proteína Δ NS1 ZIKV foi utilizada para a produção de mAbs específicos ao ZIKV em colaboração com o grupo de pesquisa liderado pela Dra. Roxane Maria Fontes Piazza (Instituto Butantan). Para isso, ensaios de imunização utilizando camundongos BALB/c foram realizados com a referida proteína, sendo a obtenção, seleção e manutenção de hibridomas produtores de mAbs direcionados ao antígeno Δ NS1 ZIKV realizado de acordo ao descrito previamente (163). Dentre os hibridomas e respectivos mAbs obtidos, o mAb denominado 4H2 apresentou capacidade de ligação à proteína NS1 nativa do ZIKV (Figura 34). Assim, este monoclonal foi utilizado na implementação de ensaios de detecção específica da proteína NS1 ZIKV.

Além da capacidade de reconhecimento da proteína NS1 ZIKV, a especificidade do mAb 4H2 foi avaliada utilizando células infectadas pelo ZIKV e DENV. Assim, a primeira etapa do trabalho consistiu na padronização do ensaio de imunofluorescência

utilizando o mAb 4H2. Monocamadas de células VERO previamente infectadas ou não (mock) pelo ZIKV foram submetidas a protocolo de marcação utilizando diferentes concentrações do referido mAb. Devido à reduzida porcentagem de marcação observada por ensaio de citometria utilizando a concentração de 5 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 34), as concentrações aqui testadas foram proporcionalmente maiores (10, 20 e 40 $\mu\text{g/ml}$). Assim, como ilustrado na Figura 35, todas as concentrações testadas no ensaio de imunofluorescência foram capazes de promover a marcação das células infectadas de maneira específica, com ausência de reatividade em células não infectadas. Diante desses resultados a concentração intermediária de 20 $\mu\text{g/ml}$ foi selecionada para a próxima etapa do trabalho.

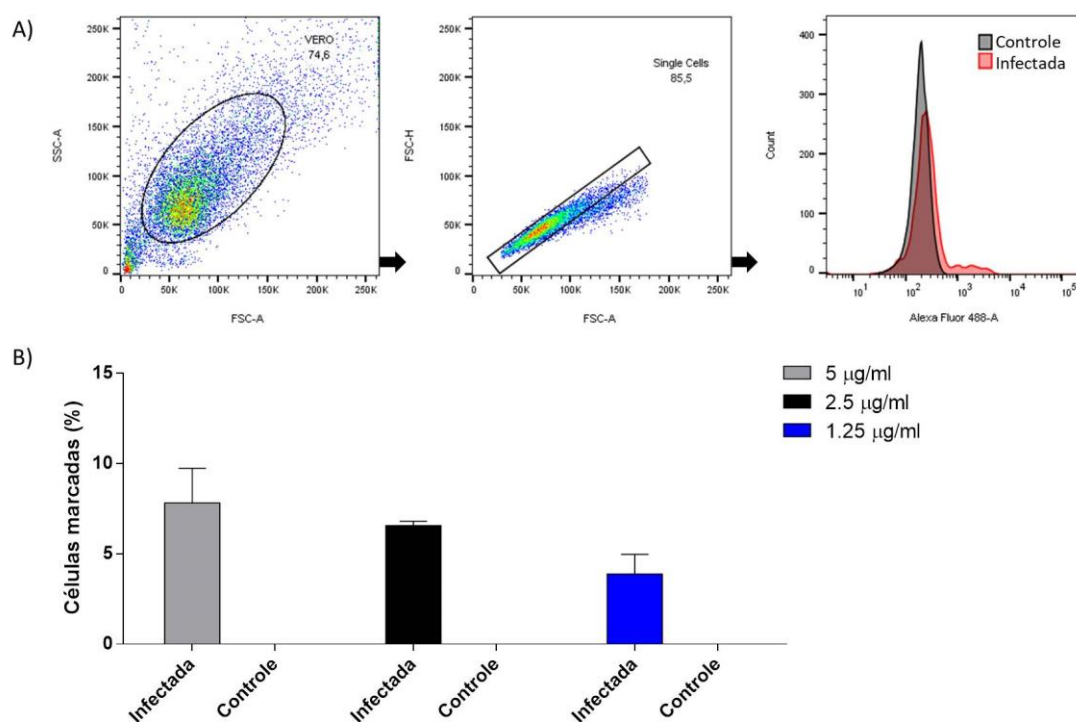


Figura 34. Avaliação da capacidade de ligação do mAb 4H2 à proteína NS1 ZIKV nativa. (A) Estratégia de análise dos ensaios de citometria de fluxo utilizados na avaliação de mAb 4H2 anti- ΔNS1 ZIKV. (B) Amostras de células VERO foram infectadas com o ZIKV e, posteriormente, utilizadas para marcação com diferentes diluições do anticorpo monoclonal 4H2 (5, 2.5 ou 1.25 $\mu\text{g/ml}$), sendo as amostras analisadas por citometria de fluxo. Como controle negativo foram utilizadas células VERO não infectadas. Os valores são apresentados como média da fluorescência \pm DP da porcentagem de células marcadas.

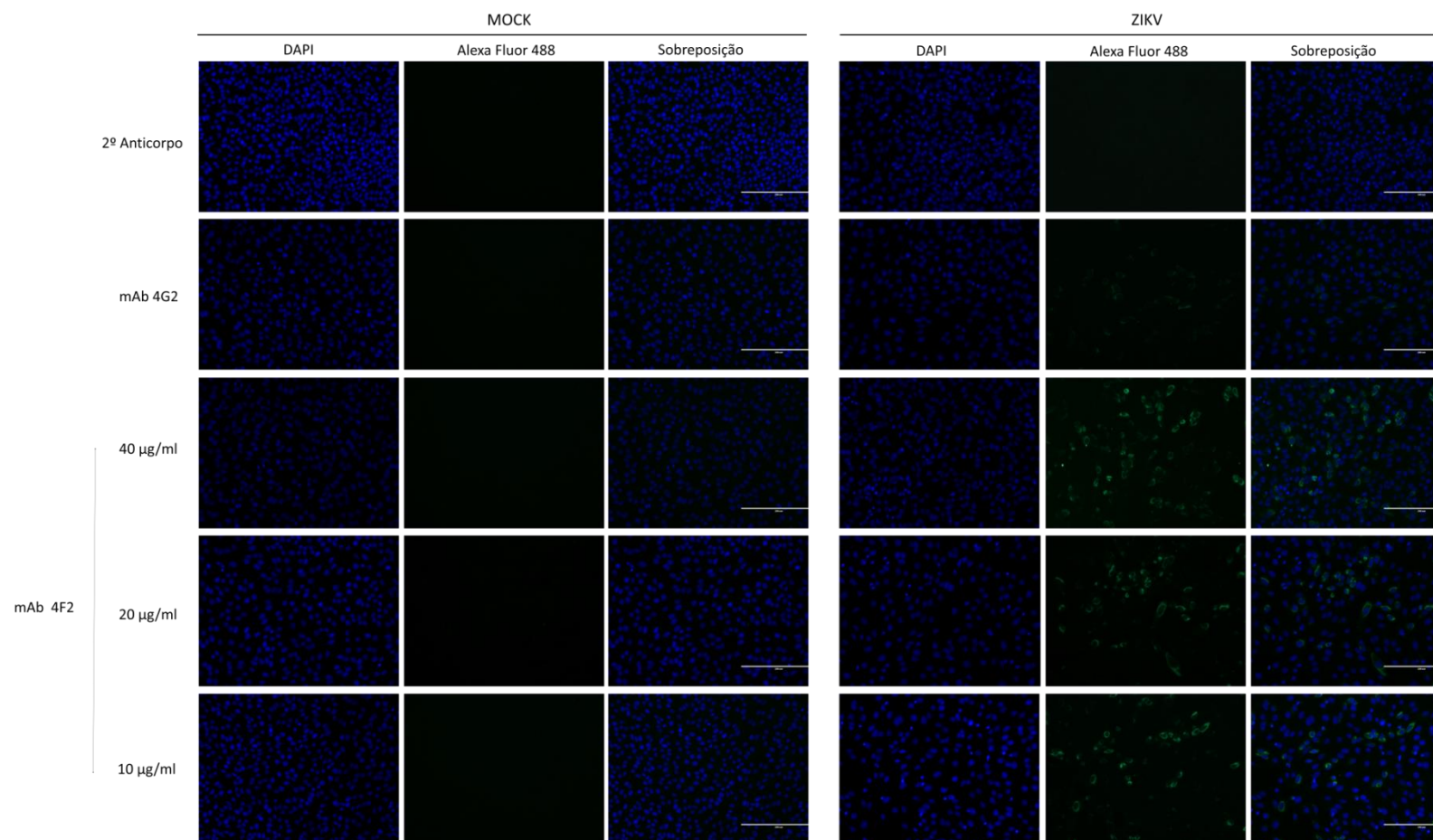


Figura 35. Padronização do ensaio de imunofluorescência utilizando o mAb 4H2. Diferentes concentrações do anticorpo monoclonal anti-NS1 ZIKV 4H2 (10, 20 e 40 µg/ml) foram utilizadas para marcação de monocamadas de células Vero previamente infectadas pelo ZIKV (24 hs, M.O.I = 1,0) ou não (MOCK). O mAb 4G2 anti-E de Flavivirus foi utilizado como controle do ensaio. Para marcação secundária foi utilizado o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com AlexaFluor 488 (florescência verde). Os núcleos das células foram marcados com Hoechst 33342 (florescência azul).

RESULTADOS E DISCUSSÕES – PARTE 3

Posteriormente à marcação, as células foram visualizadas em microscópio de fluorescência (Evos FL Thermo Scientific, USA) e fotos foram capturadas em aumento de 100 X (Barra de escala = 200 µm). Os resultados ilustrados são representativos de dois experimentos independentes.

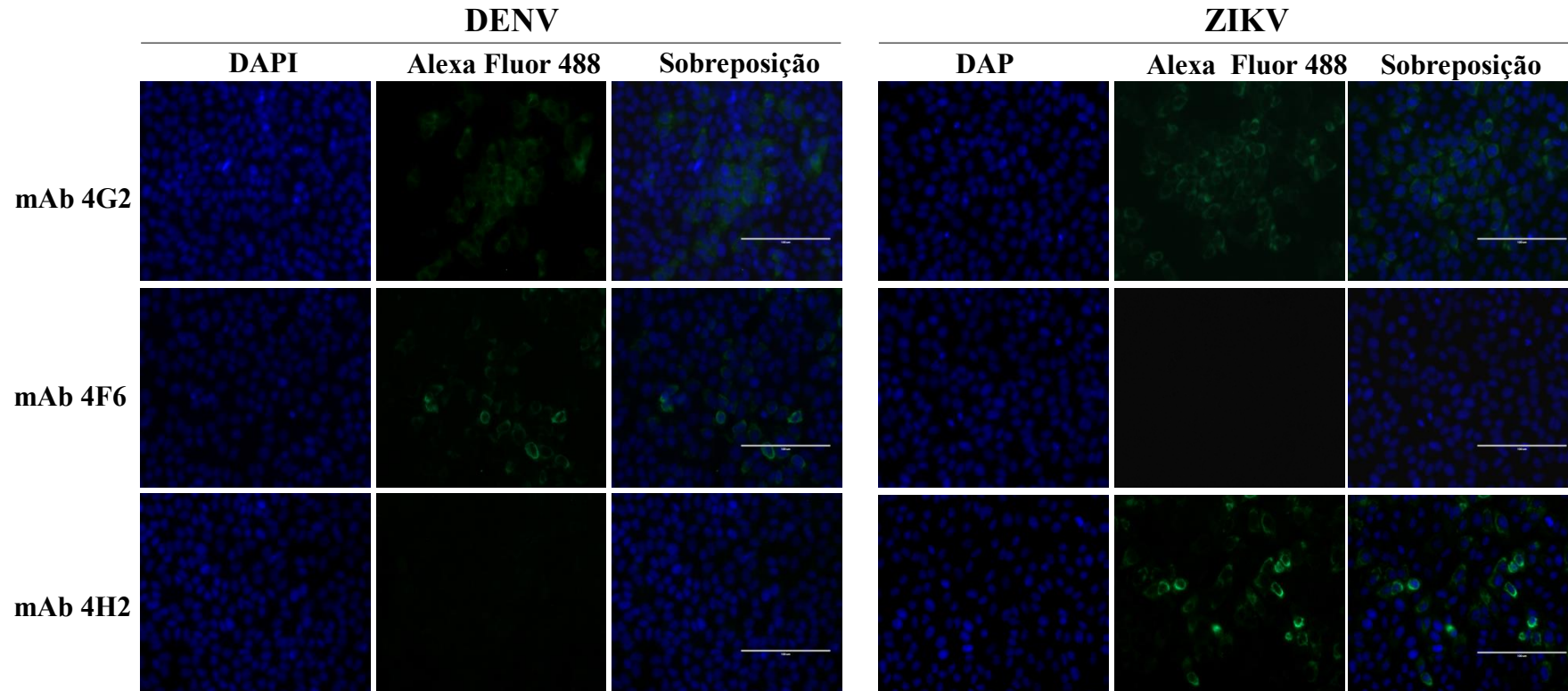


Figura 36. Avaliação da especificidade do anticorpo monoclonal 4H2 frente a células Vero infectados com o DENV2. A reatividade dos anticorpos monoclonais 4F6 (Anti-NS1 DENV2) e 4H2 (Anti-NS1 ZIKV) foi avaliada em ensaio de imunofluorescência utilizando monocamadas de células Vero previamente infectadas (M.O.I = 1,0) com os vírus DENV2 NGC ou ZIKV. O mAb 4G2 (anti-E de Flavivirus) foi utilizado como controle do ensaio. Para marcação secundária foi utilizado anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com AlexaFluor 488 (floreescência verde). Os núcleos das células foram marcados com Hoechst 33342 (floreescência azul). Posteriormente à marcação, as células foram visualizadas em microscópio de fluorescência (Evos FL Thermo Scientific) e fotos foram capturadas em aumento de 200 X (Barra de escala = 100 µm). Os resultados ilustrados são representativos de dois experimentos independentes.

Com objetivo de avaliar a especificidade do anticorpo monoclonal 4H2 a sua reatividade foi testada frente a células infectadas com o DENV2 (cepa NGC). Como controles de marcação foram utilizados os mAbs 4G2 (direcionado à proteína E de *Flavivirus*) e 4F6 (Anti-NS1 DENV2), este último descrito previamente pelo nosso grupo de pesquisa (163). Nas condições avaliadas o mAb 4H2 não apresentou reatividade cruzada com células DENV2 infectadas, sendo detectada reatividade somente em células ZIKV+ (Figura 36). O mAb 4G2 promoveu a marcação das células infectadas por ambos os vírus, sendo que o mAb 4F6 marcou somente as células DENV2+, conforme esperado. Assim, os resultados apresentados ilustram a especificidade do mAb 4H2, o qual preserva potencial aplicabilidade no desenvolvimento de métodos de diagnóstico para o ZIKV baseados em ensaios de imunofluorescência, dentre outras plataformas.

4.3.3. Avaliação da especificidade sorológica da proteína EDIII ZIKV.

A sequência do domínio III da proteína de envelope do ZIKV apresenta reduzida homologia quando comparada à região correspondente de outros *Flavivirus*. Esta característica destaca a EDIII ZIKV como um potencial antígeno a ser utilizado em testes de diagnóstico sorológico diferencial do ZIKV. Assim, visando avaliar a especificidade sorológica da proteína EDIII ZIKV, um protocolo de ELISA foi estabelecido utilizando-a como antígeno de fase sólida. Interessantemente, ao avaliarmos a reatividade da proteína EDIII ZIKV frente a soros monoespecíficos obtidos de camundongos infectados separadamente com os quatro sorotipos do vírus da dengue, todas as amostras DENV positivas apresentaram reatividade abaixo do *cut-off* estabelecido para o ensaio (Figura 37). Assim, esses resultados indicam ausência de reatividade cruzada com anticorpos anti-DENV. Por outro lado, confirmando a presença de imunidade prévia ao DENV, as amostras testadas nesta etapa foram reativas para as respectivas proteínas Δ NS1 DENV (1-4) ou partículas do DENV (Figura 37).

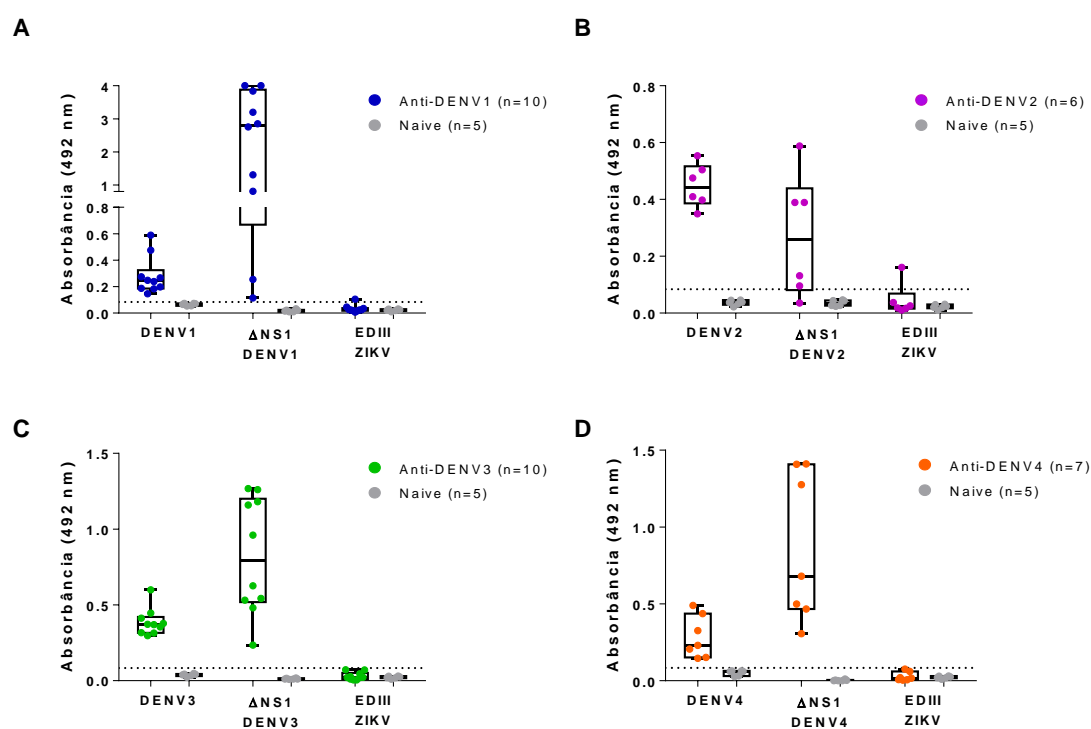


Figura 37. Avaliação da reatividade da proteína EDIII ZIKV frente a soros de camundongos previamente infectados pelo DENV. Camundongos AG129 foram infectados com os vírus da dengue (sorotipos 1-4) ou Zika. Amostras de soro dos foram coletadas dos animais infectados e utilizadas nos ensaios de ELISA baseadas na proteína EDIII ZIKV e nos respectivos antígenos controles. (A-D) Reatividade dos soros hiperimunes vírus específicos frente à proteína EDIII ZIKV ou com antígenos controles (partículas do DENV ou as proteínas Δ NS1 DENV1-4), conforme indicado nas figuras.

Na etapa seguinte do trabalho buscamos confirmar os resultados obtidos utilizando soro humano provenientes de indivíduos infectados previamente pelo ZIKV ou DENV. Como esperado, as amostras ZIKV⁺ apresentaram reatividade acima (4/5) do *cut-off* estabelecido para o ensaio (Figura 38A). Entretanto, todas as amostras de soro DENV⁺ foram positivas (4/4) quando avaliadas no teste de ELISA baseado na EIII (Figura 38B). Da mesma forma, as amostras DENV⁺ testadas foram reativas para a proteína Δ NS1 DENV2 conforme previsto (Figura 38B). Assim, nas condições estabelecidas, o ensaio apresentou reatividade cruzada com anticorpos direcionados ao DENV. Modificações no protocolo serão necessárias para a melhora do mesmo, bem como avaliar o desempenho do teste frente a um painel contendo maior número de amostras.

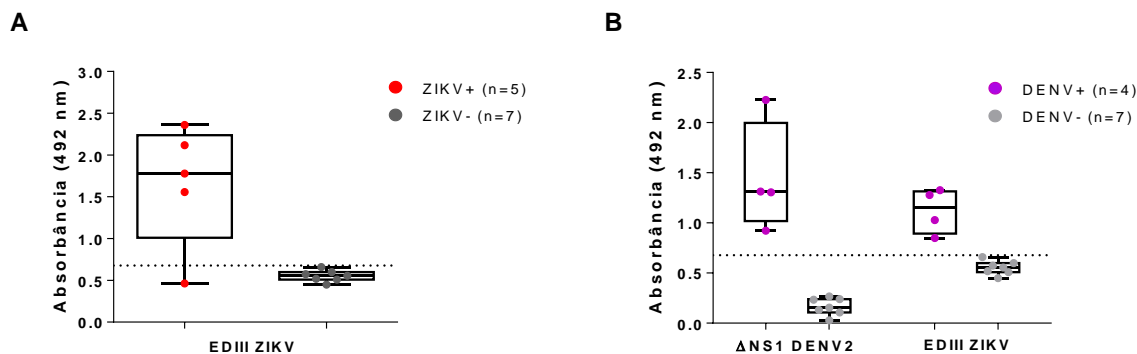


Figura 38. Avaliação do teste de ELISA baseado na proteína EDIII ZIKV com painel de soros humanos. (A) Padrão de reatividade de amostras humanas oriundas de indivíduos previamente infectados ou não pelo ZIKV. (B) Reatividade de amostras DENV+. Todas as amostras utilizadas foram validadas por PRNT90 (ZIKV e DENV).

4.3.4. Discussão Parcial.

Os arbovírus pertencentes ao gênero *Flavivirus* são relacionados filogeneticamente e apresentam elevada similaridade antigênica. Essa característica representa um obstáculo no estabelecimento de ensaios sorológicos específicos devido à consequente reatividade cruzada de anticorpos (40,46,47). Neste contexto, a busca por antígenos que permitam a detecção específica de anticorpos direcionados a esses patógenos é desafiadora. Assim, nesta etapa do trabalho protocolos de ELISA baseados nas proteínas Δ NS1 ZIKV e EDIII ZIKV foram padronizados visando à detecção de anticorpos IgG ZIKV-específicos. Os resultados obtidos demonstraram que a implementação da Δ NS1 ZIKV reduziu significativamente a reatividade cruzada de anticorpos direcionados ao DENV e ao YFV, sendo essa especificidade correlacionada à presença de epítomos conformacionais na Δ NS1 ZIKV. Além disso, a configuração final do teste baseado na referida proteína apresentou elevada sensibilidade e especificidade em níveis equivalentes ou superiores aos kits comerciais disponíveis. Alternativamente, um monoclonal anti- Δ NS1 ZIKV foi desenvolvido, o qual não apresentou reatividade cruzada com células infectadas com DENV. Por outro lado, embora a proteína EDIII ZIKV não tenha apresentado reatividade cruzada com soros murinos anti-DENV, adaptações ainda se fazem necessárias à sua aplicação na detecção de anticorpos IgG ZIKV-específicos utilizando amostras de soro humano. Assim, esses resultados abrem

perspectivas da utilização dos testes baseados na proteína Δ NS1 ZIKV na confirmação da infecção pelo ZIKV, especialmente em regiões endêmicas para o DENV e YFV.

A proteína NS1 é largamente utilizada no diagnóstico de DENV, mais recentemente, para o ZIKV (47,58,123,124). Entretanto, esse antígeno apresenta elevada homologia entre os *Flavivirus*, característica que pode impactar a especificidade de ensaios baseados na sequência inteira. Desde a introdução do ZIKV no Brasil estudos avaliaram a especificidade dos ensaios de ELISA baseados na NS1, sendo os resultados conflitantes. Enquanto os primeiros testes para o ZIKV lançados no Brasil divulgaram resultados de validação com parâmetros de sensibilidade e especificidade de até 100% (55,65), estudos posteriores contestaram os mesmos, demonstrando reduzida especificidade quando amostras oriundas de regiões endêmicas para DENV, validadas por PRNT90, foram utilizadas (58,59). De fato, os resultados apresentados aqui corroboram esses achados. A utilização da sequência completa da proteína NS1 ZIKV em protocolo de ELISA demonstrou ser altamente reativa com amostras de soro de indivíduos previamente infectados pelo DENV. Neste contexto, o uso de fragmentos da NS1 em substituição à sua sequência inteira poderia aumentar a especificidade dos ensaios baseados nesse antígeno.

O desenho de antígenos proteicos por análises computacionais tem sido uma estratégia utilizada no melhoramento de vacinas e ensaios diagnósticos. Assim, uma análise do perfil de epítomos de células B baseada na sequência da proteína NS1 ZIKV revelou a presença de epítomos conformacionais específicos ao ZIKV, bem como um maior perfil de hidrofobicidade na região C-terminal da mesma, permitindo a seleção e predição do antígeno Δ NS1 ZIKV²⁵¹⁻³⁵² como potencial alvo diagnóstico. De fato, esse antígeno foi capaz de reduzir drasticamente a reatividade cruzada com anticorpos IgG direcionados ao DENV e ao YFV, quando comparada à proteína homóloga inteira. Além disso, a especificidade observada foi dependente da configuração estrutural do referido fragmento proteico. Esses achados estão alinhados com estudos prévios que demonstraram que, apesar do elevado grau de conservação entre as proteínas NS1 do ZIKV, DENV e WNV, a porção C-terminal da proteína NS1 ZIKV (aa 271-352) retém características físico-estruturais distintas que a diferencia dos ortólogos presentes nos demais vírus analisados, como o perfil eletrostático de superfície (143,144). Além disso,

uma estratégia recente baseada em fragmentos (172–339 aa) contemplados na proteína Δ NS1 ZIKV também apresentou reduzida reatividade cruzada com amostras DENV⁺ (66). Desta forma, os resultados aqui descritos destacam a região C-terminal da proteína NS1 como potencial alvo para a predição de antígenos mais específicos ao ZIKV.

O domínio *β -ladder* (182–352aa) da proteína NS1 ZIKV foi relatado como um dos mais conservados em análise comparativa com a de outros 73 *Flavivirus* (139). Alinhado a isso, embora a proteína Δ NS1 ZIKV tenha apresentado reduzida reatividade com soros DENV⁺, a mesma não foi capaz de eliminar totalmente a reatividade cruzada de anticorpos. O padrão de reatividade da Δ NS1 ZIKV com amostras de camundongos monoespecíficas aos DENVs sugerem que a reatividade remanescente ocorre principalmente com anticorpos direcionados aos sorotipos 2 e 3 do DENV. Esses achados levaram a padronização de uma nova versão do teste de ELISA baseado na Δ NS1 ZIKV, incluindo uma etapa de adsorção das amostras de soro com a combinação das proteínas Δ NS1 DENV1-4, bem como a transposição dos reagentes para soluções comerciais. Corroborando outros trabalhos que utilizaram a técnica de adsorção como alternativa (161,162), o teste final proposto foi capaz de eliminar a reatividade cruzada remanescente, sem impacto negativo sobre a sensibilidade. Por outro lado, a especificidade apresentada foi superior a de testes já disponíveis comercialmente (58,59). Essas características abrem perspectivas para a sua implementação comercial. Além disso, esse teste apresenta potencial de aplicação em áreas endêmicas para outros *Flavivirus* e, especialmente, poderá ser adotado na triagem de gestantes para detecção da infecção prévia pelo ZIKV. Essa última permitirá o correto manejo das gestantes no que se refere aos riscos associados aos efeitos congênitos do ZIKV.

A seleção de anticorpos monoclonais específicos abre perspectiva de aplicação e padronização de metodologias diagnósticas incluindo imunofluorescência, ELISA de captura/competição e testes imunocromatográficos. Diante dos resultados obtidos na validação do antígeno Δ NS1 ZIKV, mAbs direcionados a esse antígeno foram produzidos e avaliados quanto à especificidade em ensaios de detecção do ZIKV. O mAb 4H2 foi capaz de se ligar à proteína NS1 nativa do ZIKV em ensaio de imunofluorescência, sem ligação cruzada com células infectadas com DENV2. Assim, o mAb 4H2 apresenta potencial de aplicabilidade no desenvolvimento de métodos de

diagnóstico para o ZIKV em ensaios de imunofluorescência (aplicáveis na confirmação de isolamento viral em cultura de células) ou na detecção/captura do antígeno NS1 ZIKV por ELISA ou ensaios imunocromatográficos. Além disso, esses resultados corroboram a presença de epítomos específicos ao ZIKV na proteína Δ NS1 ZIKV. Por outro lado, embora não tenha sido observada reatividade cruzada do mAb 4H2 contra células infectadas pelo DENV2, outros ensaios utilizando células infectadas pelos outros sorotipos do DENV (1, 3 e 4) deverão ser conduzidos com objetivo de confirmar a especificidade do mAb aqui apresentado.

Os dados descritos aqui embasaram um pedido de patente que foi depositado junto ao INPI (processo: BR 10 2016 011318 0) e PCT (processo: PCT/BR2017/050119). O referido pedido de patente, que solicita a proteção intelectual sobre a utilização da proteína Δ NS1 ZIKV, foi licenciado para a empresa privada Advagen LTDA-ME. A empresa, por sua vez, desenvolveu o produto que foi aprovado recentemente pela ANVISA (Registro nº 81472060013 - Adva Femme Zika-v IgG) (ANEXO A) e encontra-se atualmente disponível para comercialização junto à referida empresa. Além disso, o protocolo de ELISA baseado na proteína Δ NS1 ZIKV foi utilizado em outros trabalhos de coautoria do aluno visando à caracterização de amostras de soro humano quanto à infecção prévia pelo ZIKV (20,118). Por fim, demonstramos também que as proteínas Δ NS1 DENV1-4 retêm especificidade sorológica compatível com a detecção da imunidade prévia ao DENV, sem reatividade cruzada com o ZIKV. Esses resultados foram publicados recentemente no periódico *International Journal of Infectious Diseases* (Anexo C)(164) e corroboram, mais uma vez, o potencial da região C-terminal da proteína NS1 na predição de antígenos mais específicos ao patógeno relacionado.

Além da proteína NS1, ensaios sorológicos baseados na EDIII ZIKV têm demonstrado promissora aplicabilidade na detecção de anticorpos IgG direcionados ao ZIKV (67). Entretanto, a detecção de anticorpos anti-EDIII ZIKV específicos sem reatividade cruzada com anticorpos direcionados ao DENV pode ser dependente do período de coleta da amostra após a infecção pelo patógeno (56). Assim, o teste baseado na EDIII ZIKV estabelecido em nosso trabalho apresentou elevada reatividade cruzada com amostras de soro humano obtidas de indivíduos previamente infectados pelo

DENV. Embora as amostras utilizadas tenham sido confirmadas para imunidade prévia ao DENV por PRNT90, o período exato de convalescência para essas amostras é desconhecido, sendo este um fator limitante do estudo. Desta forma, uma validação com maior número de amostras de soro, de preferência com coletas sequenciais, é necessária à padronização do teste aqui apresentado.

4.4.CAPÍTULO IV. Avaliação do potencial vacinal dos antígenos recombinantes baseados nas proteínas EDIII e NS1 do ZIKV.

Além de avaliar o potencial diagnóstico das proteínas EDIII e NS1 ZIKV, nesta etapa do trabalho avaliamos a imunogenicidade e capacidade protetora de formulações vacinais baseadas nas mesmas. Assim, ensaios de imunização em modelo murino e desafio letal com cepa do ZIKV foram realizados, os quais estão descritos a seguir.

4.4.1. Avaliação de formulações vacinais baseadas na proteína EDIII ZIKV.

Conforme descrito anteriormente, diferentes construções e estratégias de padronização da expressão, renaturação *in vitro* e purificação foram realizadas com objetivo de obter a EDIII ZIKV com antigenicidade e imunogenicidade preservadas. Dentre as proteínas obtidas, as construções que compreendem a sequência total da EDIII ZIKV (renaturada sob HHP) ou um fragmento denominado Δ EDIII ZIKV (com retirada de regiões hidrofóbicas em suas extremidades C- e N-terminais), foram obtidas com rendimento e pureza satisfatórios. Assim, para esta etapa do trabalho selecionamos as proteínas Δ EDIII ZIKV e EDIII ZIKV como antígenos vacinais. Camundongos da linhagem C57BL/6 foram então submetidos a um regime vacinal que consistiu na administração de três doses vacinais por via subcutânea (Figura 39A). O adjuvante Alum foi utilizado tendo por base trabalhos prévios que demonstraram a indução de anticorpos neutralizantes anti-EDIII ZIKV quando em associação com este adjuvante (74,91). Além disso, as toxinas termolábeis de *E. coli* enterotoxigênica apresentam papel imunomodulatório bem descrito na literatura (110), sendo aqui avaliada de forma inédita a capacidade do variante atóxico LTK63 em potencializar a resposta humoral antígeno-específica em associação com Alum.

Ao avaliarmos a resposta humoral antígeno específica gerada nos animais imunizados, ambas as versões da proteína EDIII ZIKV testadas preservaram a imunogenicidade, sendo observada a produção de anticorpos antígeno-específicos de maneira dose dependente (Figura 39, B e C). Os maiores títulos de anticorpos foram detectados após a terceira dose vacinal, não sendo observado impacto significativo da incorporação do adjuvante LTK63 nos títulos de anticorpos gerados (Figura 39, B e C).

Além disso, os soros produzidos frente às diferentes formulações vacinais também foram testados quanto à capacidade de reconhecer a proteína de envelope E nativa presente em partículas do ZIKV. Como é possível observar na figura 39D, somente as formulações vacinais baseadas na proteína EDIII ZIKV induziram níveis detectáveis de anticorpos capazes de se ligar às partículas do ZIKV. Além disso, não houve diferença significativa nos títulos de anticorpos anti-ZIKV entre os grupos contendo Alum ou a associação de Alum+LT como adjuvantes.

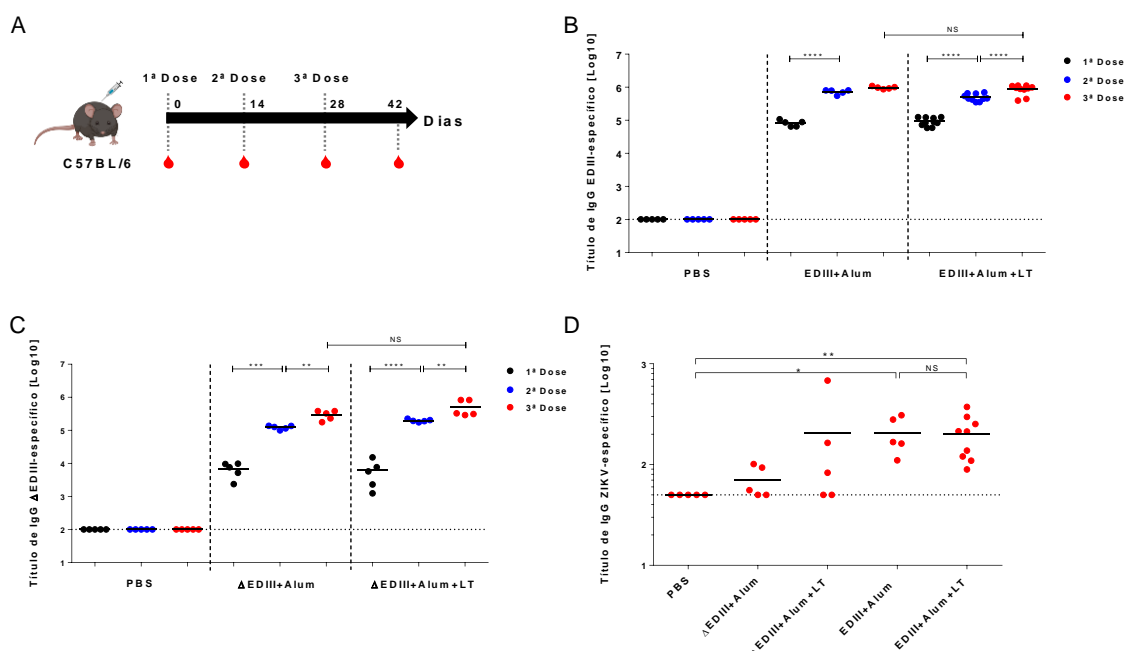


Figura 39. Determinação da resposta de IgG antígeno-específica induzida por formulações vacinais baseadas nas proteínas EDIII ZIKV. (A) Esquema representativo do protocolo de imunização adotado com as proteínas Δ EDIII, EDIII e E ZIKV utilizando camundongos C57BL/6. As curvas dose-resposta de anticorpos IgG séricos antígeno-específicos desenvolvidos durante o protocolo de imunização com as proteínas EDIII ZIKV obtida por HHP (B) e Δ EDIII ZIKV (C) foram mensuradas por ELISA. Os resultados são representados como valores médios (linhas) e individuais (símbolos) de título de IgG sérico antígeno específico. A reatividade dos soros obtidos após a última dose vacinal também foi avaliada tendo partículas do ZIKV como antígeno de fase sólida (D). A figura A foi criada com BioRender.com. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (ANOVA de duas vias com correção de Bonferroni).

Uma das dificuldades observadas na obtenção de proteínas recombinantes a partir da fração insolúvel do extrato bacteriano, utilizando estratégias de renaturação *in vitro*, consiste na preservação da conformação estrutural da proteína obtida de forma semelhante à nativa. Por outro lado, a preservação de epítomos conformacionais ou lineares, com potencial neutralizante, consiste em uma característica essencial na aplicação de antígenos estruturais de *Flavivirus* em formulações vacinais (165,166).

Assim, embora elevados títulos de anticorpos (entre 10^5 e 10^6 , aproximadamente) tenham sido detectados nos soros dos animais imunizados, para acessarmos o potencial vacinal dos antígenos aqui produzidos, decidimos avaliar também a capacidade dos soros gerados em neutralizar o ZIKV *in vitro* por PRNT. Conforme listado na Tabela 12, os soros produzidos por todas as formulações vacinais não apresentaram potencial neutralizante, sendo detectada neutralização somente no controle positivo do ensaio, o qual foi obtido de indivíduo previamente infectado pelo ZIKV.

Tabela 12. Avaliação da capacidade de neutralização viral dos soros dos animais imunizados*.

GRUPO VACINAL	PRNT ₅₀	PRNT ₉₀
PBS	<10	<10
ΔEDIII ZIKV + Alum	<10	<10
ΔEDIII ZIKV + Alum + LTK63	<10	<10
EDIII ZIKV + Alum	<10	<10
EDIII ZIKV + Alum + LTK63	<10	<10
P19D	>1280	640

* Os soros dos animais vacinados com formulações baseadas nas proteínas ΔEDIII e EDIII ZIKV, obtidos ao final do protocolo vacinal, foram avaliados quanto à capacidade de neutralização do ZIKV^{BR} *in vitro*. O título neutralizante foi determinado como a última diluição com capacidade de reduzir 50 % (PRNT₅₀) ou 90 % (PRNT₉₀) a formação de placas de lise viral. O soro P19D obtido de paciente previamente infectado pelo ZIKV foi utilizado como controle positivo de neutralização.

Como todos os antígenos testados não apresentaram capacidade neutralizante, levantamos a hipótese de que a conformação estrutural dos mesmos, um importante parâmetro para indução de anticorpos neutralizantes, não esteja plenamente conservada. Diante disso, repetimos o protocolo de imunização utilizando partículas inativadas do ZIKV (piZIKV) como antígeno controle. Para isso, piZIKV foram obtidas após processo adaptado de purificação e inativadas com formalina, em colaboração com a Dr^a Viviane Fongaro Botosso (Laboratório de Virologia/Instituto Butantan). Camundongos da linhagem C57BL/6 foram então imunizados com piZIKV em combinação ou não com Alum e LTK63. O regime vacinal consistiu em três doses

(i.m.) de forma análoga ao utilizado para a proteína EDIII ZIKV (Figura 39A). Como é possível observar na figura 40, os anticorpos direcionados ao ZIKV foram induzidos de forma dose-dependente, sendo os níveis mais elevados encontrados após a terceira dose vacinal, especialmente nos grupos que receberam Alum como adjuvante. Por outro lado, a associação dos adjuvantes Alum e LTK63 potencializou a indução de resposta humoral antígeno-específica, sendo observado título médio de anticorpos superior aos demais grupos ao final do protocolo vacinal.

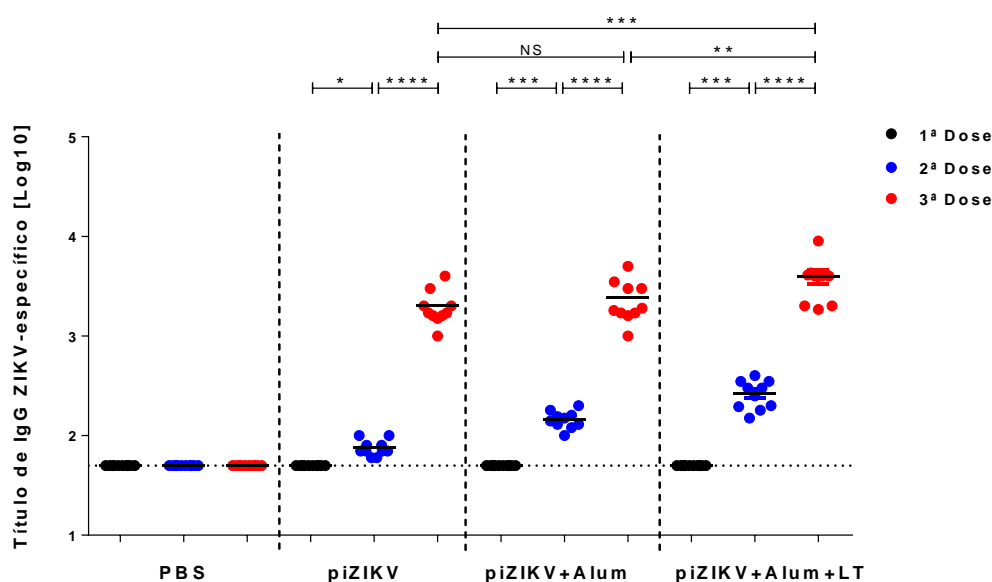


Figura 40. Determinação da resposta de IgG antígeno-específica induzida por formulações vacinais baseadas no ZIKV inativado. Camundongos C57BL/6 foram imunizados com partículas do ZIKV^{BR} inativadas (10 µg/animal) assoadas ou não com os adjuvantes Alum e LTK63 em um regime vacinal de três doses. Os títulos de anticorpos IgG séricos antígeno-específicos desenvolvidos após cada dose vacinal foram mensurados por ELISA. Os resultados são representados como valores médios (Linhas) e individuais (símbolos). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (ANOVA de duas vias com correção de Bonferroni).

Visando avaliar a qualidade da resposta ZIKV-específica induzida, os soros dos animais imunizados, referentes à terceira dose vacinal, foram avaliados também quanto à capacidade de neutralização viral *in vitro*. Conforme ilustrado na Tabela 13, a associação de Alum com piZIKV quadruplicou o título neutralizante (PRNT₅₀) dos soros dos animais imunizados. Além disso, a incorporação da proteína LTK63 à formulação com Alum e piZIKV potencializou de forma significativa a capacidade neutralizante dos soros, sendo este aumento de 4 vezes (PRNT₅₀) e 2x (PRNT₉₀), quando comparado ao grupo que recebeu somente Alum como adjuvante. Assim, a

detecção de anticorpos neutralizantes anti-piZIKV confirma a eficácia do protocolo e adjuvantes utilizados, sendo um indicativo de que a ausência de neutralização dos soros anti-EDIII pode estar relacionada à qualidade dos antígenos utilizados. Além disso, estes resultados ilustram o potencial inovador e promissor da associação da LTK63 em formulações vacinais contendo Alum como adjuvante.

Tabela 13. Avaliação da capacidade de neutralização viral dos soros dos animais imunizados com piZIKV*.

GRUPO VACINAL	PRNT ₅₀	PRNT ₉₀
PBS	<10	<10
piZIKV	10	<10
piZIKV + Alum	40	10
piZIKV + Alum + LTK63	160	20
P19D	>1280	640

* Os soros dos animais vacinados com formulações baseadas no ZIKV inativado, obtidos ao final do protocolo vacinal, foram avaliados quanto à capacidade de neutralização do ZIKV^{BR} in vitro. O título neutralizante foi determinado como a última diluição com capacidade de reduzir 50 % (PRNT₅₀) ou 90 % (PRNT₉₀) a formação de placas de lise viral. O soro P19D obtido de indivíduo previamente infectado pelo ZIKV foi utilizado como controle positivo de neutralização.

4.4.2. Avaliação da imunogenicidade e capacidade protetora de formulações vacinais baseadas na proteína NS1 ZIKV.

Após caracterizar a especificidade sorológica da proteína Δ NS1 ZIKV na plataforma de ELISA, o passo seguinte do trabalho consistiu na avaliação da imunogenicidade e capacidade protetora desta proteína bem como da NS1 ZIKV em modelo murino. Para isso, experimentos de imunização utilizando camundongos imunocompetentes da linhagem C57BL/6 foram realizados tendo como adjuvantes Poly (I:C) e LT-B (Figura 41A). Ao final do protocolo vacinal a imunidade humoral e celular antígeno específica foi então mensurada nos animais imunizados. Como é possível observar na figura 41C, as formulações vacinais contendo a proteína NS1 ZIKV foram capazes de induzir potente resposta de anticorpos IgG antígeno-específicos nos animais imunizados, com perfil dose-dependente, não sendo observada diferença significativa nos níveis de anticorpos IgG obtidos sob estímulo com os dois adjuvantes testados. Por outro lado, a proteína Δ NS1 ZIKV apresentou baixa imunogenicidade nas condições

testadas, no qual apenas 1 animal dos grupos Δ NS1+POLY(I:C) e Δ NS1+LT-B apresentaram níveis detectáveis de anticorpos IgG direcionados ao antígeno somente após a administração da terceira dose vacinal (Figura 41D).

O perfil de resposta imunológica correlacionado com o controle da infecção pelos *Flavivirus* ainda permanece em estudo. Entretanto, a ativação de uma resposta com perfil Th1, o qual está correlacionado com a produção de interferons tipo I e II, tem demonstrado papel importante no controle da infecção (100). Desta forma, na tentativa de avaliar o perfil de resposta imunológica desencadeado nos animais imunizados com a proteína NS1 ZIKV, os títulos das subclasses de IgG (IgG1 e IgG2c) foram mensurados por ELISA no soro dos animais, sendo ambas subclasses de anticorpos detectadas nos três grupos vacinais (Figura 41E). Ao calcular a razão entre os títulos de anticorpos IgG1 e IgG2c, observa-se que todos os grupos de imunização apresentaram valores abaixo de 1 (Figura 41F), tendo-se, portanto, um predomínio de imunoglobulinas IgG1. Este resultado serve de indicativo da polarização da resposta imune para um perfil do tipo T-helper 2 (Th2) em todos os grupos de imunização.

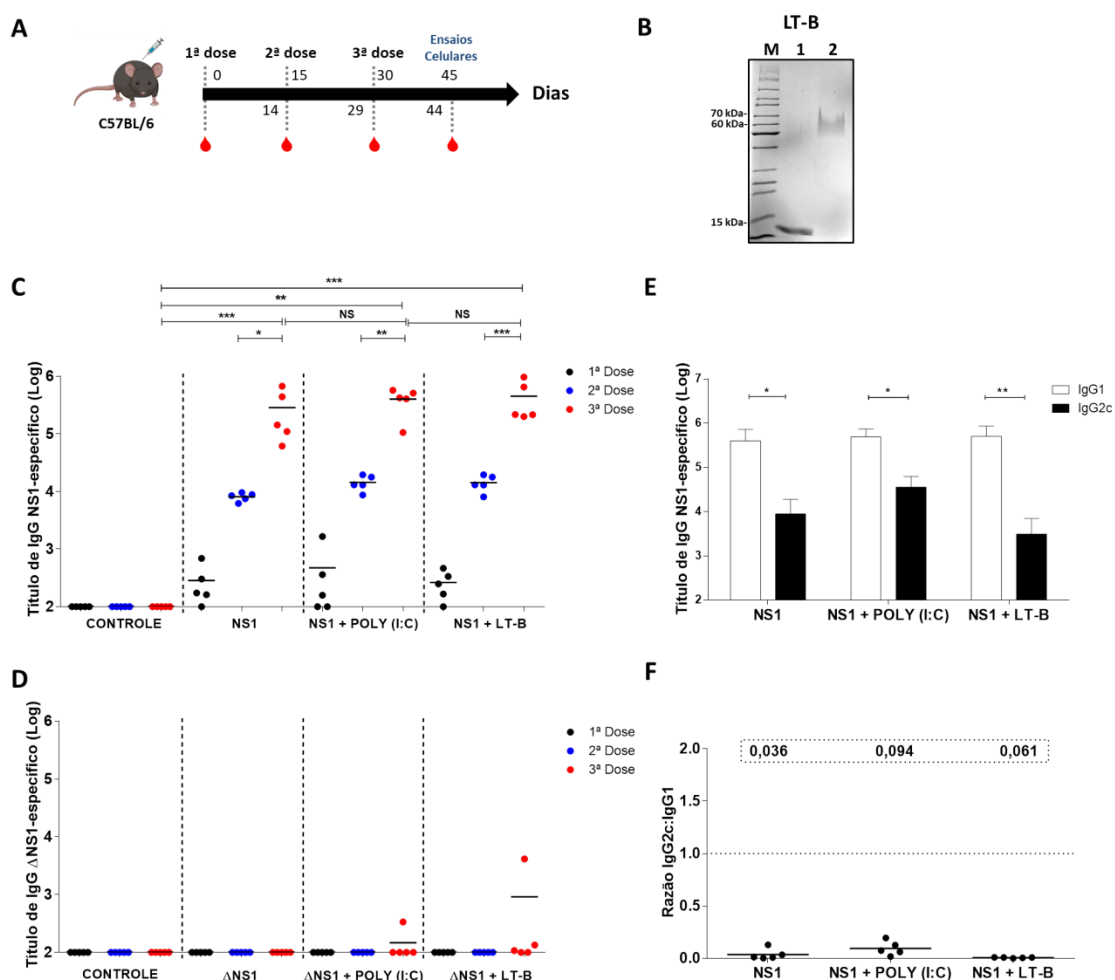


Figura 41. Determinação da resposta de IgG NS1-específica induzida na linhagem de camundongo imunocompetente C57BL/6. Esquema representativo do protocolo de imunização adotado com as proteínas NS1 ZIKV e ΔNS1 ZIKV utilizando camundongos C57BL/6 (n=5) e análise da resposta imunológica antígeno específica desenvolvida. (B) Alíquotas do adjuvante LT-B submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% (SDS-PAGE). (C e D) Curva dose-resposta de anticorpos IgG séricos antígeno-específicos desenvolvidos durante o protocolo de imunização com as proteínas NS1 ZIKV e ΔNS1 ZIKV, respectivamente, mensurados por ELISA. Os resultados são representados como valores médios (barras) e individuais (símbolos) de título (Log₁₀) de IgG sérico NS1 reagentes. (E) Títulos das subclasses de anticorpo IgG (IgG1 e IgG2c) NS1-específicos mensurados em amostras de soro individuais dos camundongos imunizados (referentes à última dose do regime vacinal) por ELISA. As barras representam a média ± DP do título de subclasses de anticorpos IgG (Log₁₀) dos animais imunizados. (F) Razão dos títulos de anticorpos IgG2c/IgG1 obtidos para cada grupo de imunização utilizando o antígeno NS1 ZIKV, representados como valores médios (enumerado na parte superior do gráfico) ou individuais (símbolos). *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 (ANOVA de duas vias com correção de Bonferroni). Descrição: canaleta M corresponde ao marcador de massa molecular; canaleta 1, 2 μg da proteína LT-B submetida previamente à desnaturação térmica (10 min./100°C seguido de 1 min./0 °C); canaleta 2, 2 μg da proteína LT-B. A figura A foi criada com BioRender.com.

A proteína NS1 durante sua produção e tráfego intracelular pode ser processada e apresentada pelas vias de MHC de classe I e II e, conseqüentemente, promover a

ativação de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos ou linfócitos T CD4⁺ capazes de contribuir para a eliminação das células infectadas (100,167,168). Assim, a ativação de linfócitos T antígeno-específicos foi também avaliada em esplenócitos dos camundongos imunizados obtidos após a administração da última dose vacinal. Como estímulo ex vivo foi utilizado um peptídeo restrito ao MHC de classe I ¹²⁵AAKTNSFV¹³³ desenhado tendo como base a sequência da proteína NS1 ZIKV ou a própria infecção pelo vírus ZIKV de acordo ao descrito por Shan e colaboradores (2017). Entretanto, como é possível observar na Figura 42 (A-D), as formulações não foram capazes de induzir a ativação de células T CD8⁺ NS1-específicas produtoras de IFN- γ ou células T CD4⁺ produtoras das citocinas IFN- γ ou IL-4. De forma semelhante, os grupos imunizados com a proteína Δ NS1 ZIKV também não induziram a ativação das populações celulares citadas anteriormente (Figura 43, E-G), elemento que corrobora a baixa imunogenicidade desta proteína nas condições avaliadas.

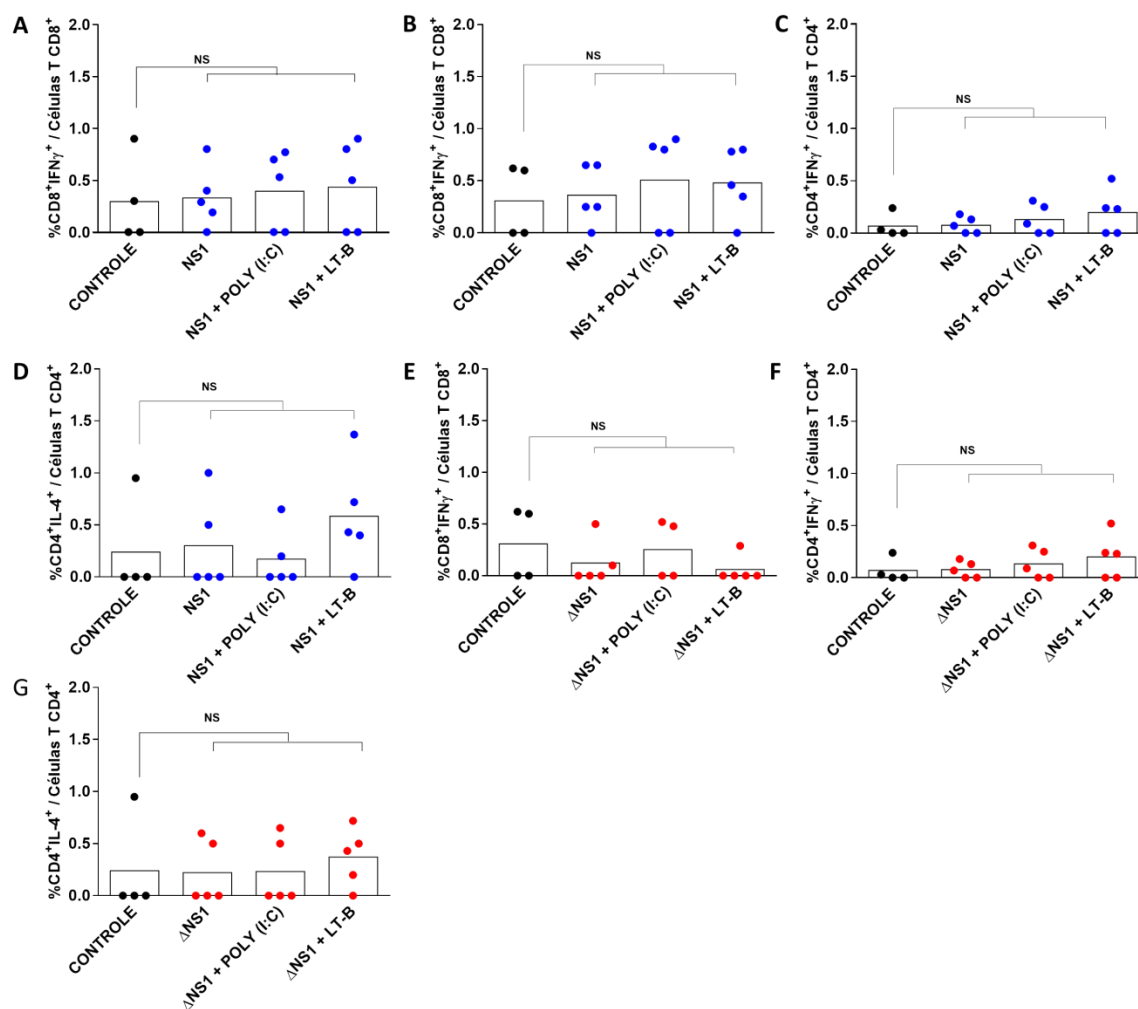


Figura 42. Ativação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ antígeno-específico nos animais C57BL/6 imunizados. A detecção das células T CD8⁺ e T CD4⁺ antígeno-específicas foi realizada em esplenótos dos camundongos imunizados, re-estimulados *in vitro* por até 12 h com o peptídeo NS1 sintético restrito ao MHC de classe I (A) ou 48h com o ZIKV (B-G). As células foram fenotipadas com marcação para as moléculas CD8, CD4 e acúmulo intracelular das tonas IFN- γ e IL-4, sendo as amostras analisadas por técnica de citometria de fluxo. Os resultados estão apresentados na forma de porcentagem de células T CD8⁺IFN- γ ⁺ ou CD4⁺ (IFN- γ ⁺ ou IL-4⁺) sobre a população total de células T CD8⁺ ou T CD4⁺, respectivamente. Valores médios (barras) e individuais (símbolos) foram obtidos para cada grupo de imunização (n=5). (ANOVA de uma via com correção de Bonferroni).

Após caracterização da imunogenicidade das formulações vacinais, o passo seguinte consistiu na avaliação da capacidade protetora das mesmas frente ao desafio letal com o ZIKV. Visto que camundongos selvagens da linhagem C57BL/6 apresentam as vias de interferon tipo I e II preservadas, os mesmos são refratários para a infecção com ZIKV e, conseqüentemente, não reproduzem os sinais clínicos da doença. Deste modo, uma alternativa consiste na utilização de linhagens imunodeficientes para uma ou

mais vias de produção ou receptores de interferon. Neste contexto, a linhagem AG129 não apresenta receptores para IFN- α/β e IFN- γ , sendo altamente susceptível à infecção viral. Desta forma, decidimos avaliar primeiramente a susceptibilidade desta linhagem ao isolado viral disponível em nosso laboratório. Além disso, realizamos a padronização da infecção de camundongos com idade superior à 8 semanas, visto que os animais submetidos ao protocolo vacinal aqui descrito (45 dias, figura 41A) apresentam ao final do experimento aproximadamente 11 semanas de idade.

Para selecionar a dose viral e avaliar a susceptibilidade da linhagem ao ZIKV, grupos de camundongos AG129 com idades de 8 a 11 semanas foram infectados por via subcutânea com diferentes doses virais. Como esperado, a linhagem AG129 demonstrou ser altamente susceptível à infecção pelo ZIKV, sendo que todas as doses testadas foram 100% letais, levando os animais à morte em até 13 dias após a infecção (Figura 43). Sinais de morbidade durante o curso da infecção foram também observados incluindo, pelo eriçado, paralisia de um ou mais membros e arqueadura da coluna (dados não mostrados). Além disso, a perda de peso nos animais infectados foi detectada a partir do quinto dia de infecção, a qual se apresentou mais acentuada nos animais que receberam a maior dose viral (10^7 UFP) (Figura 44). Um perfil semelhante foi observado quando monitorada a viremia dos mesmos, no qual partículas viáveis do ZIKV foram detectadas no soro dos animais infectados entre os dias 1 e 7 após infecção (Figura 45, A-D). Por outro lado, a detecção de cópias de genoma viral foi mais prolongada (>7 dias) (Figura 45, E-H). Assim, os dados aqui apresentados demonstram que o desafio dos animais com até 11 semanas de idade é efetivo e reproduz os sinais de infecção. A dose de 10^5 UFP do ZIKV (a menor testada nos animais com 11 semanas de idade) foi selecionada, a qual também foi relatada previamente como efetiva no desafio de animais de 8 a 14 semanas (117,169).

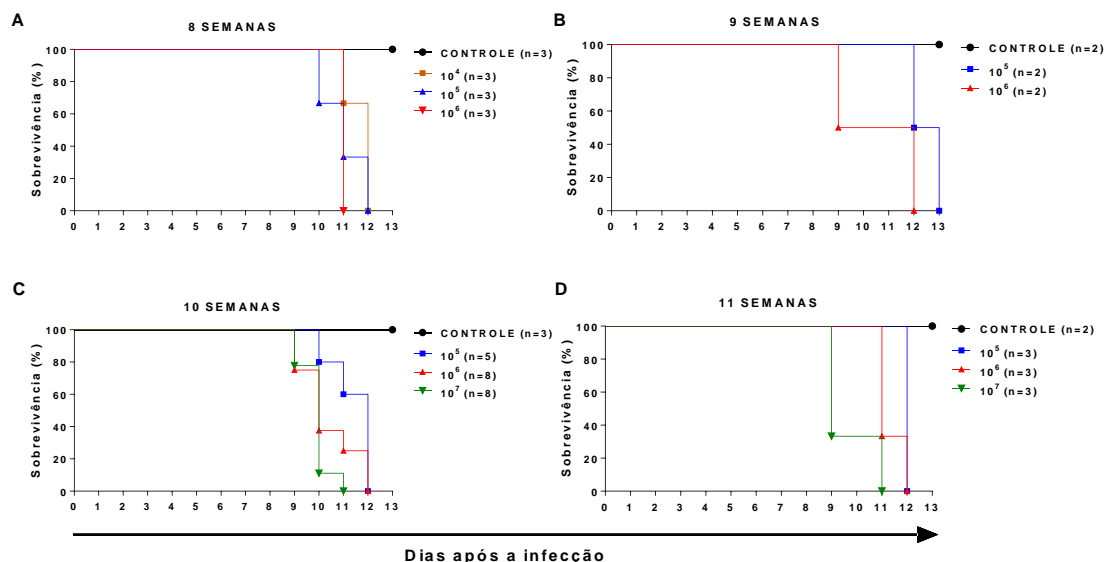


Figura 43. Mortalidade dos animais da linhagem AG129 infectados com diferentes doses do ZIKV. Camundongos AG129 de 8 (A), 9 (B), 10 (C) ou 11 (D) semanas de idade foram infectados por via subcutânea com doses crescentes do vírus Zika (10^4 - 10^7 UFP/animal) de acordo ao representado na figura. A mortalidade dos animais foi avaliada ao longo de 13 dias e o número de animais/grupo está indicado nas legendas dos gráficos (Mantel-Cox).

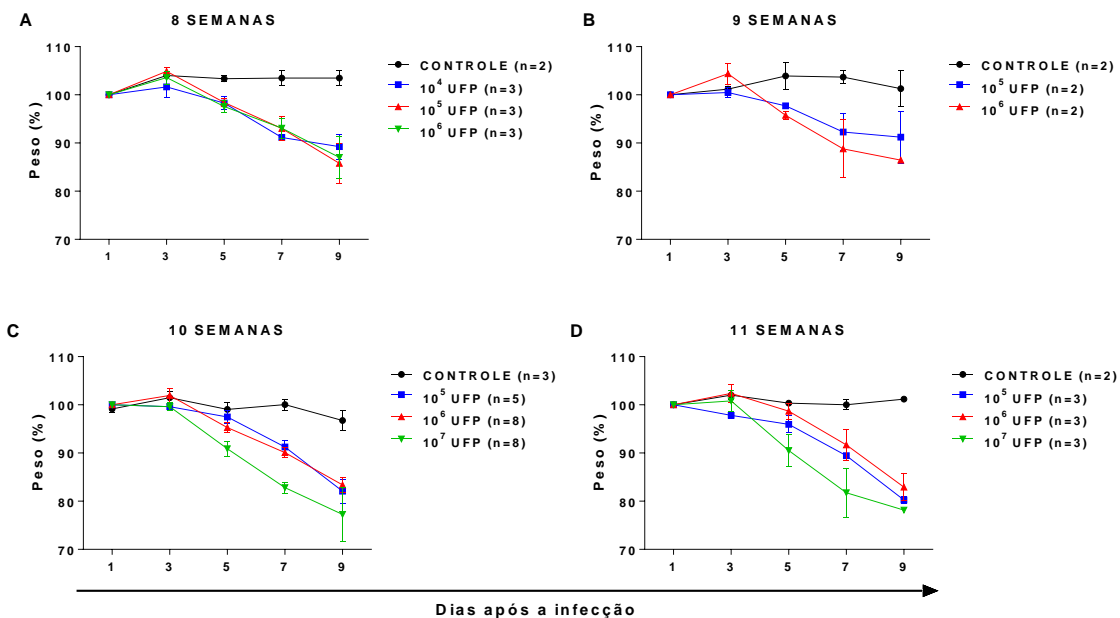


Figura 44. Acompanhamento do peso dos animais da linhagem AG129 infectados com diferentes doses do ZIKV. A variação de peso dos animais AG129 de 8 (A), 9 (B), 10 (C) ou 11 (D) semanas de idade infectados com o ZIKV foi aferida com auxílio de balança analítica em dias alternados. Os dados

são expressos em % do peso corporal animal relativo ao mensurado um dia após a infecção. (ANOVA de duas vias com correção de Bonferroni).

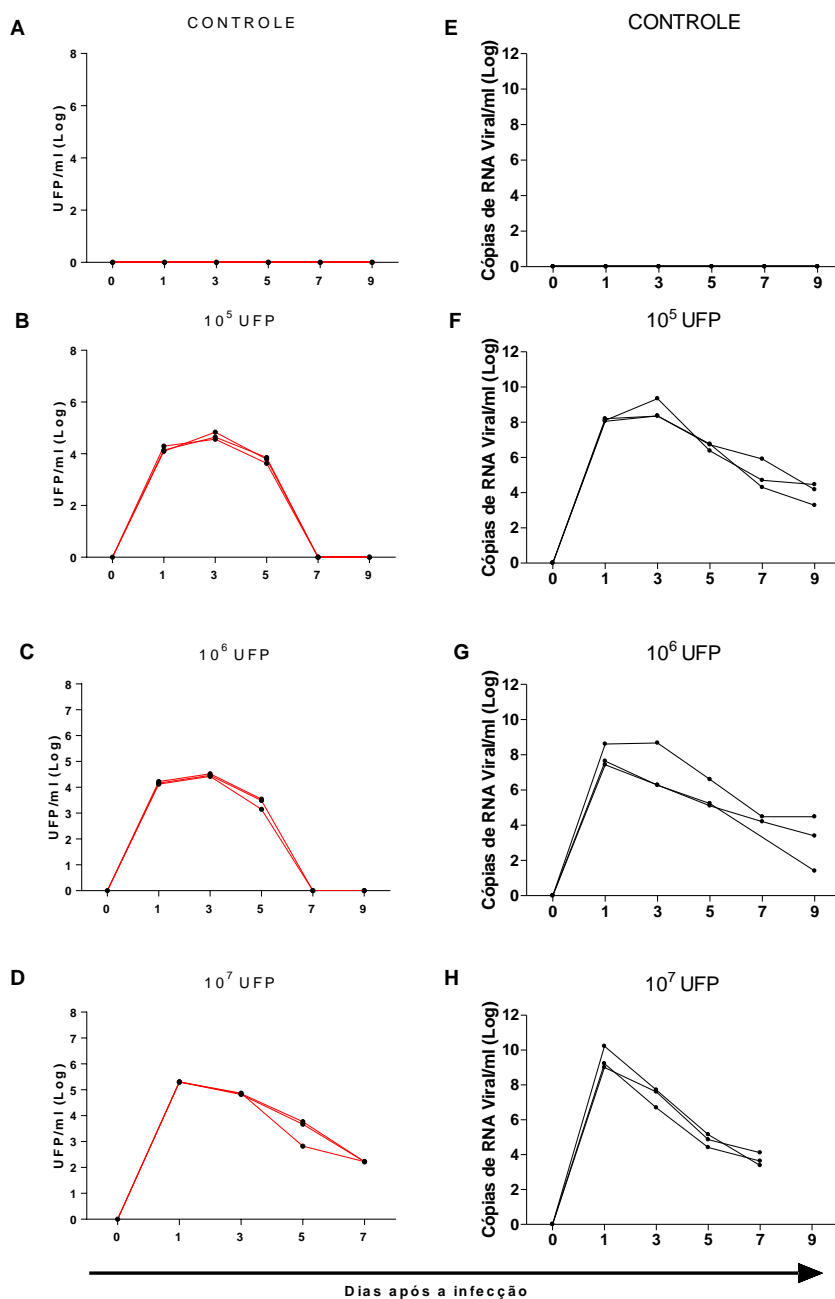


Figura 45. Avaliação da viremia nos animais AG129 infectados com o ZIKV. A viremia dos camundongos da linhagem AG129 infectados com 11 semanas de idade foi monitorada por titulação de partículas virais viáveis (A-D) ou quantificação de cópias de RNA viral pela técnica de qRT-PCR (E-H) em amostras de soro. Os dados são expressos em UFP/ml ou N° de Cópias de RNA viral/ml, mensurados individualmente até o dia nove após a infecção dos animais com o ZIKV, nas doses indicadas na figura. (ANOVA de duas vias com correção de Bonferroni).

Depois de padronizado o modelo de desafio, a capacidade protetora das formulações pôde então ser avaliada. Para isso, camundongos da linhagem AG129 foram imunizados com as formulações vacinais baseadas nas proteínas NS1 e Δ NS1 ZIKV de acordo ao descrito anteriormente. A imunogenicidade das mesmas foi avaliada pela detecção de anticorpos antígeno específicos e a indução de resposta imune celular mensurada em amostras de sangue coletadas dos animais 14 dias após administração da última dose vacinal (Figura 46A). Como é possível observar na figura 46B, todas as formulações contendo a proteína NS1 ZIKV induziram elevados títulos de anticorpos direcionados ao antígeno alvo de maneira dose-dependente. Entretanto, a magnitude desta resposta foi menor quando comparada à imunização de camundongos C57BL/6 selvagens (~1 log. De diferença). O adjuvante LT-B foi capaz de potencializar a produção de anticorpos IgG anti-NS1, sendo detectados maiores títulos de anticorpos desde a administração da segunda dose vacinal quando comparado aos demais grupos (Figura 46B). De forma análoga ao observado para a imunização de camundongos C57BL/6, para todos os grupos vacinais a subclasse de anticorpo IgG prevalente foi IgG1, sendo este um indicativo de polarização da resposta para um perfil Th2 (Figura 46, C e D). Além disso, não foram detectados anticorpos direcionados à proteína Δ NS1 ZIKV.

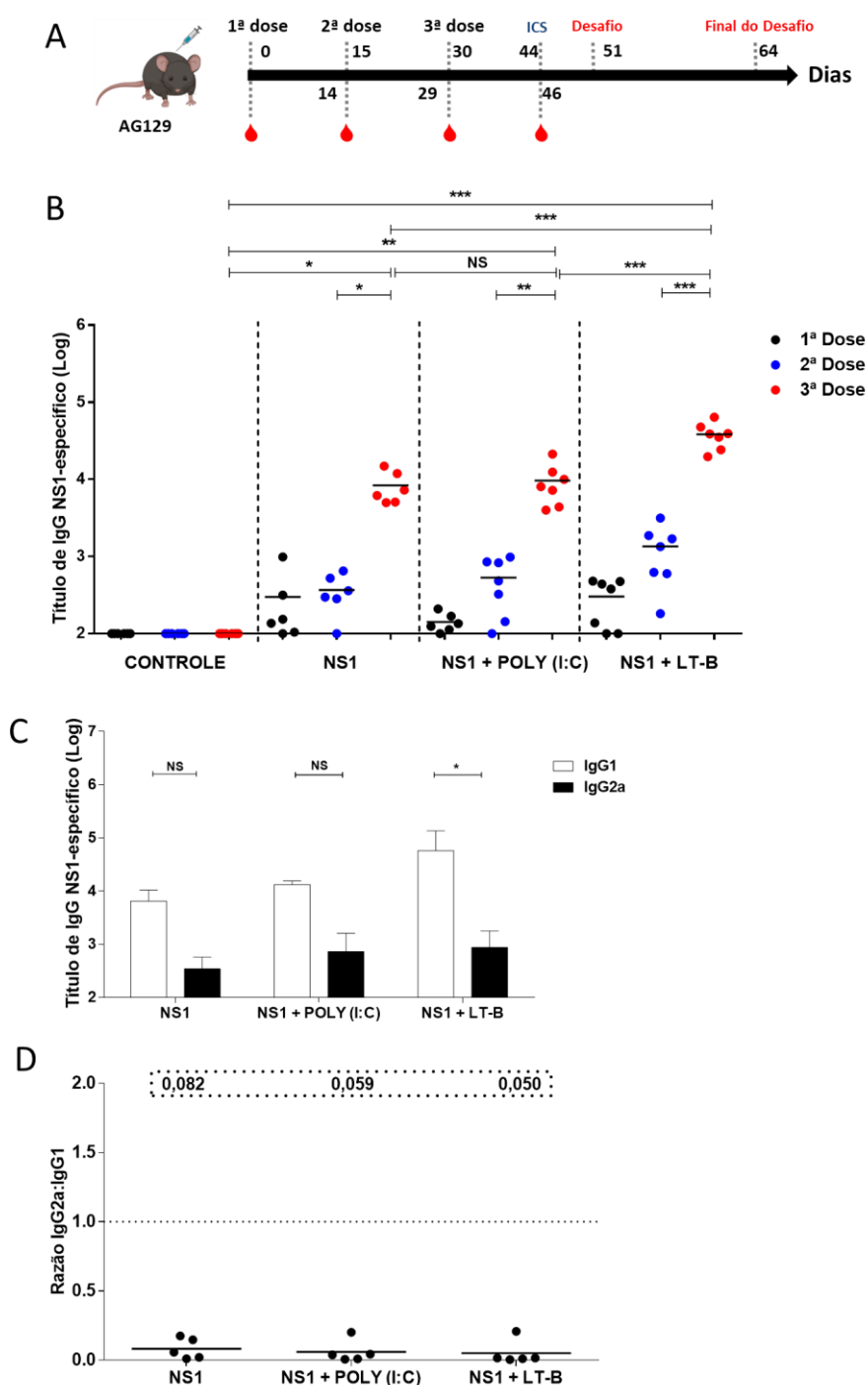


Figura 46. Determinação da resposta de IgG NS1-específica induzida na linhagem de camundongo AG129. (A) Esquema representativo do protocolo de imunização adotado com as proteínas NS1 ZIKV e Δ NS1 ZIKV utilizando camundongos AG129 (n=6-7). (B) Curva dose-resposta de anticorpos IgG séricos antígeno-específicos desenvolvidos durante o protocolo de imunização com a proteína NS1ZIKV mensurados por ELISA. Os resultados são representados como valores médios (barras) e individuais (símbolos) de título (Log. 10) de IgG sérico NS1 reagentes. (C) Títulos das subclasses de anticorpo IgG (IgG1 e IgG2a) NS1-específicos mensurados em amostras de soro individuais dos camundongos imunizados (referentes à última dose do regime vacinal) por ELISA. As barras representam a média \pm DP

RESULTADOS E DISCUSSÕES – PARTE 4

do título de subclasses de anticorpos IgG (Log10) dos animais imunizados. (D) Razão dos títulos de anticorpos IgG2a/IgG1, representados como valores médios (enumerado na parte superior do gráfico) ou individuais (símbolos), obtidos para cada grupo de imunização utilizando o antígeno NS1 ZIKV. A figura A foi criada com BioRender.com. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (ANOVA de duas vias com correção de Bonferroni ou Test t).

Na tentativa de avaliar o potencial das formulações em induzir a ativação de células T $CD8^+$ NS1-específicas produtoras de $IFN-\gamma$ ou $TCD4^+$ produtoras das citocinas $IFN-\gamma$ ou IL-4, estas populações foram também mensuradas em ensaio de ICS utilizando amostras de sangue coletadas ao final do protocolo de imunização. Entretanto, nas condições avaliadas, não foram detectadas de forma significativa a ativação das populações de células T mencionadas para ambos os antígenos testados (NS1 e Δ NS1 ZIKV) (Figura 47).

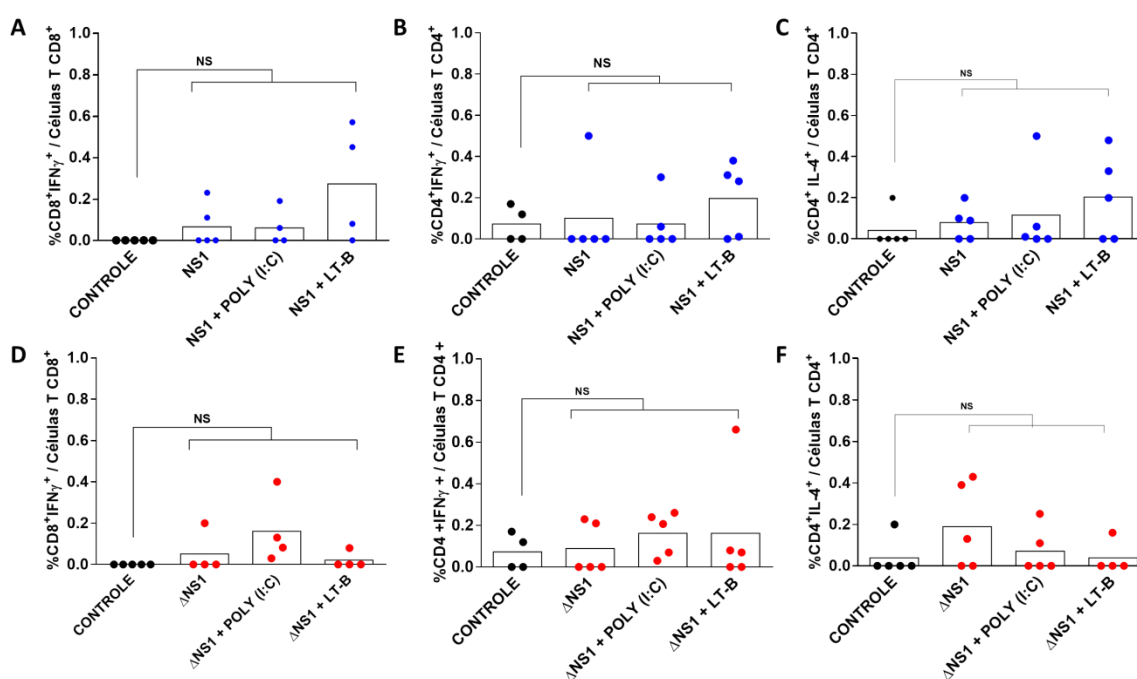


Figura 47. Ativação de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ antígeno-específico nos animais AG129 imunizados. A detecção das células T $CD8^+$ e T $CD4^+$ antígeno-específicas foi realizada em amostras de PBMC de camundongos AG129 imunizados com a proteína NS1 ZIKV (A-C) ou Δ NS1 ZIKV (D-E) reestimuladas *in vitro* por até 48h com o vírus Zika (M.O.I = 0,5). As células foram fenotipadas com marcação para as moléculas CD8, CD4 e acúmulo intracelular das tonas $IFN-\gamma$ e IL-4, sendo as amostras analisadas por técnica de citometria de fluxo. Os resultados estão apresentados na forma de porcentagem de células T $CD8^+IFN-\gamma^+$ ou $CD4^+(IFN-\gamma^+$ ou IL-4 $^+)$ sobre a população total de células T $CD8^+$ ou T $CD4^+$, respectivamente. Valores médios (barras) e individuais (símbolos) foram obtidos para cada grupo de imunização (n=5). (ANOVA de uma via com correção Bonferroni).

Após caracterizar a imunogenicidade das formulações na linhagem de camundongos AG129, a capacidade protetora das mesmas foi então avaliada em modelo

de desafio letal com o ZIKV, conforme estabelecido anteriormente. Os parâmetros de viremia, aparecimento de sinais clínicos relacionados à infecção, mortalidade e perda de peso foram monitorados nos animais imunizados e desafiados. Ao analisar os resultados obtidos é possível observar que todos os animais imunizados sucumbiram para infecção de forma equiparável aos controles, apresentando pico de viremia entre 1 e 3 dpi (dia após a infecção) (Figura 48 e 49), assim como expressiva perda de peso a partir de 3 dpi (Figura 51A). Após o período de viremia, todos os grupos vacinais apresentaram complicações clínicas progressivas, incluindo o arqueamento da coluna e paralisia de membros (Figura 50). Na mesma linha, as complicações observadas progrediram para morte dos animais em até 13 dpi (Figura 51B). Desta forma, esses resultados ilustram o controle ineficiente da replicação viral promovida pela resposta imune antígeno específica desenvolvida e, conseqüentemente, a ausência de proteção vacinal nas condições avaliadas.

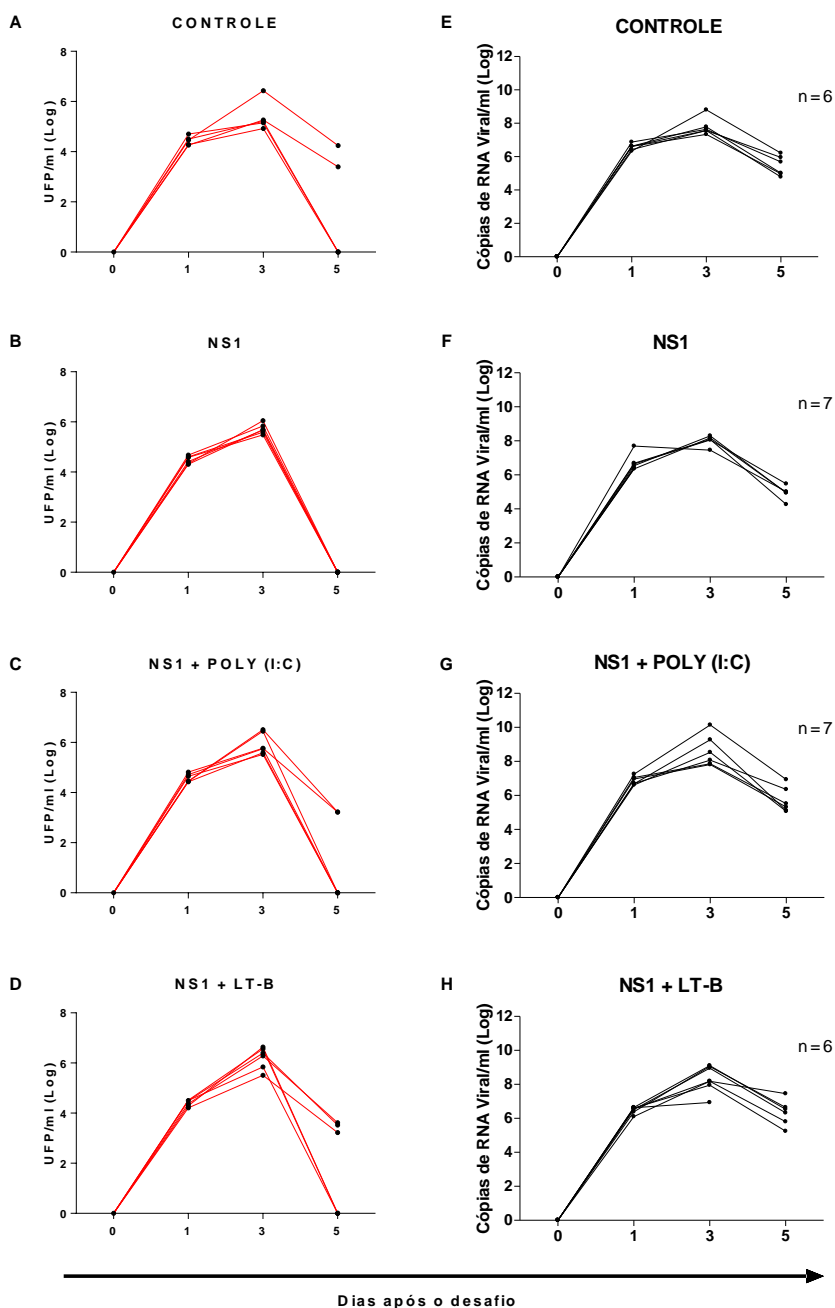


Figura 48. Avaliação da viremia nos animais AG129 imunizados com a proteína NS1 ZIKV e desafiados com o ZIKV. Duas semanas após a última dose do protocolo vacinal (dia 51) os animais imunizados com as formulações vacinais baseadas na proteína NS1 ZIKV foram desafiados pela via s.c. com o vírus Zika (10^5 UFP/animal). A ocorrência de viremia foi monitorada por titulação de partículas virais viáveis (A-D) ou quantificação de cópias de RNA viral pela técnica de qRT-PCR (E-H) em amostras de soro. Os dados são expressos em UFP/ml ou N° de Cópias de RNA viral/ml, mensurados individualmente até o dia cinco após a infecção dos animais. (ANOVA de duas via com correção Bonferroni).

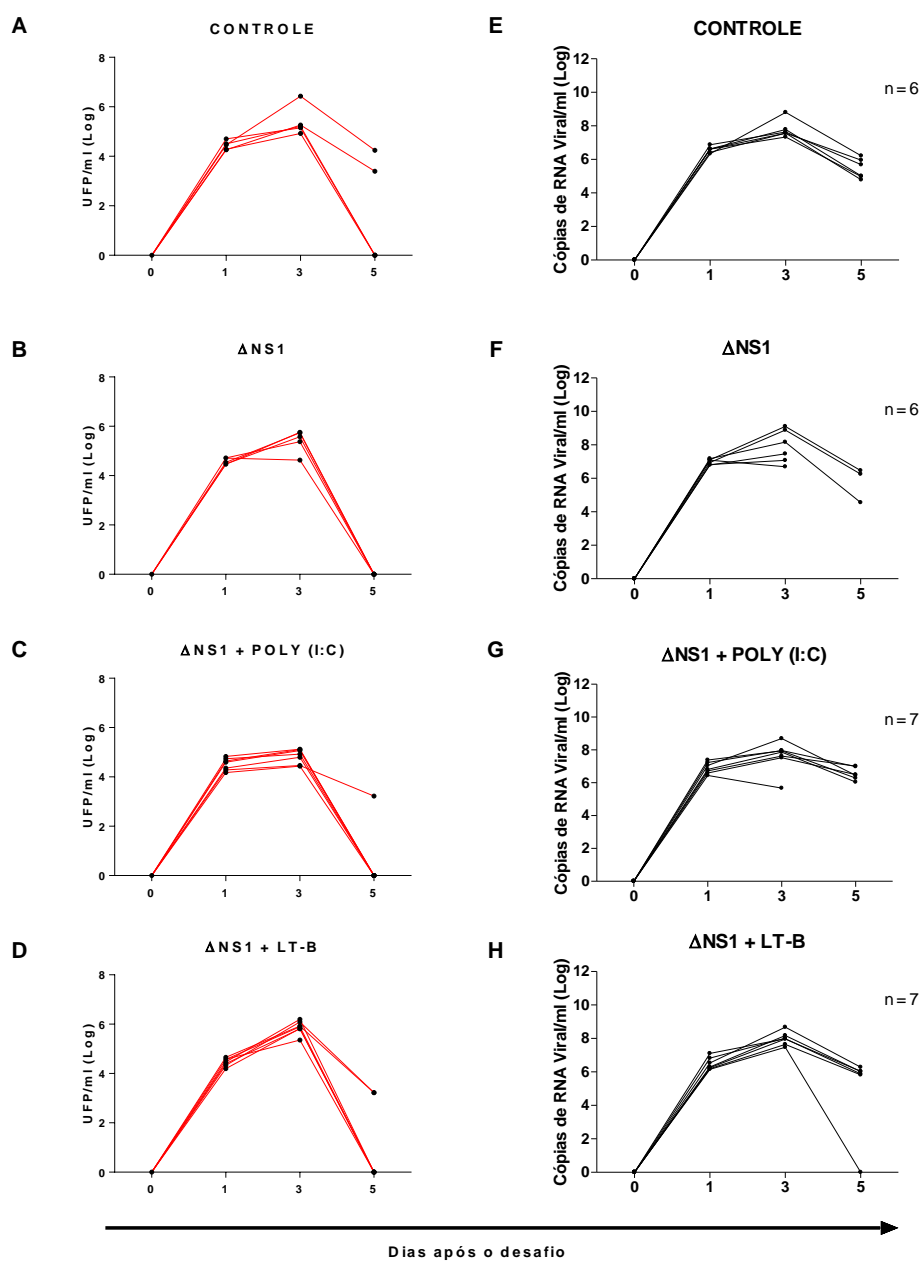


Figura 49. Avaliação da viremia nos animais AG129 imunizados com a proteína Δ NS1 ZIKV e desafiados com o ZIKV. Duas semanas após a última dose do protocolo vacinal (dia 51) os animais imunizados com as formulações vacinais baseadas na proteína Δ NS1 ZIKV foram desafiados pela via s.c. com o ZIKV (10^5 UFP/animal). A ocorrência de viremia foi monitorada por titulação de partículas virais viáveis (A-D) ou quantificação de cópias de RNA viral pela técnica de qRT-PCR (E-H) em amostras de soro. Os dados são expressos em UFP/ml ou N° de Cópias de RNA viral/ml, mensurados individualmente até o dia cinco após a infecção dos animais. (ANOVA de duas vias com correção Bonferroni).

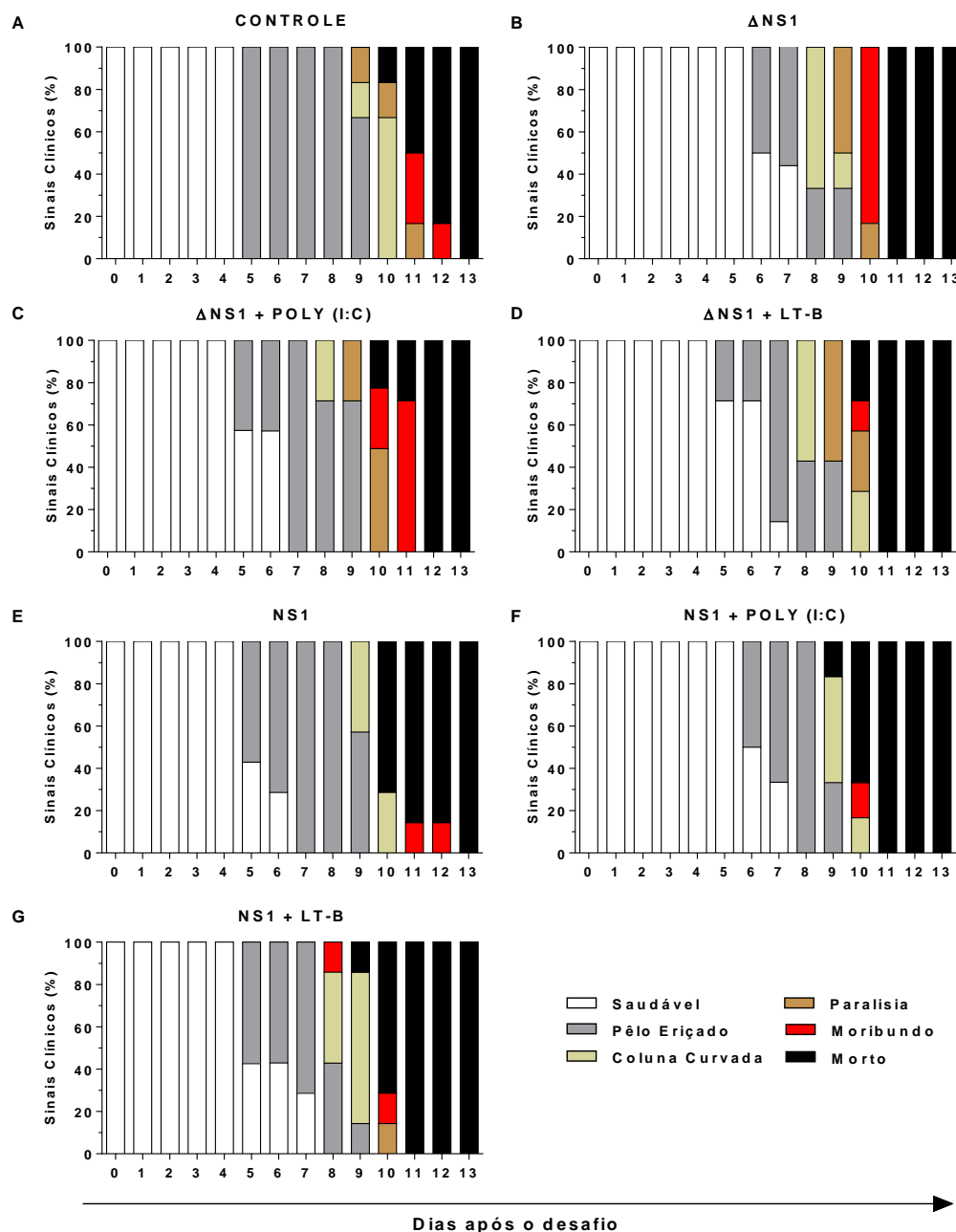


Figura 50. Avaliação da morbidade dos animais AG129 imunizados e desafiados. A ocorrência de sinais clínicos correlacionados à infecção viral nos animais imunizados previamente com o veículo vacinal (A) ou com as formulações vacinais baseadas na proteína Δ NS1 ZIKV (B-D) e NS1 ZIKV (E-G) foi monitorada diariamente por até 13 dias após o desafio com o ZIKV. Os resultados estão representados como % dos animais classificados com determinado estado clínico (Saudável; Pêlo eriçado; Curvatura de coluna; Paralisia de membros; Moribundo ou Morto), em escala de cores, conforme indicado na figura.

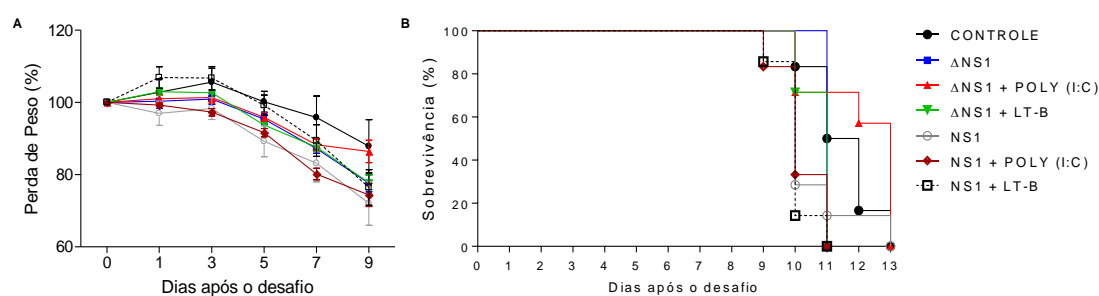


Figura 51. Avaliação da mortalidade e perda de peso dos animais AG129 imunizados e desafiados. A mudança de peso (A) e mortalidade (B) dos animais imunizados e desafiados foram monitoradas por até 13 dias após infecção com o ZIKV. Os dados estão representados como porcentagem média (%) \pm DP dos respectivos parâmetros acompanhados nos diferentes grupos de imunização (Mantel-Cox e ANOVA de duas vias com correção Bonferroni).

4.4.3. Desenho e avaliação da imunogenicidade e eficácia protetora de vacinas de DNA baseadas na proteína NS1 ZIKV.

Conforme descrito anteriormente, a proteína NS1 ZIKV recombinante foi produzida satisfatoriamente em sistema procarioto. A utilização em formulações vacinais contra o ZIKV baseadas proteína NS1 ZIKV recombinante produzida em sistema procarioto se mostrou ineficiente mesmo em consórcio com diferentes adjuvantes. Estas não foram capazes de induzir a ativação de células T CD8⁺ ou CD4⁺, bem como conferir proteção frente à infecção viral dos animais imunizados. Neste contexto, recentes estudos demonstraram que a imunidade protetora frente ao ZIKV, baseada na proteína NS1, é dependente tanto da indução de resposta imune humoral quanto celular (96,99,100,125). Assim, na busca por alternativas que promovam a indução deste perfil mais completo de resposta anti-NS1 e a imunidade protetora contra o ZIKV, utilizamos de forma inédita uma nova estratégia de vacina de DNA baseada na expressão da NS1 ZIKV, geneticamente fusionada à proteína gD de HSV-1. Esta estratégia de fusão mostrou-se eficiente em melhorar a indução de respostas imunológicas humorais e celulares específicas do antígeno, com base na plataforma de vacina de DNA ou de proteína recombinante purificada (170–172). Os resultados obtidos para esta etapa do trabalho, os quais estão descritos a seguir, foram compilados e publicados junto ao periódico *Frontiers in Medical Technology* (Apêndice B).

Para avaliar o impacto da fusão genética da sequência da proteína NS1 à gD, dois plasmídeos que codificam para a proteína NS1 ZIKV isolada (pNS1-ZIKV) (Figura 52A) ou geneticamente fusionada à proteína gD do HSV-1 (pgDNS1-ZIKV) (Figura 48B), foram desenhados e obtidos. Os plasmídeos foram submetidos a análises de restrição com as enzimas *BglIII* e *PstI*, e os fragmentos liberados apresentaram as mobilidades eletroforéticas esperadas (NS1: 1.056 pb; gDNS1: 2.262 pb) (Figura 52C). A construção do plasmídeo pgDNS1-ZIKV foi desenhada de forma a obter sequência da proteína NS1 ZIKV entre as posições aa 267-268 da proteína gD HSV1 (Figura 53, A e B), conforme descrito previamente (107). A expressão das proteínas codificadas pelo pNS1-ZIKV ou pgDNS1-ZIKV foi avaliada em células HEK 293 transfectadas, as quais foram marcadas com anticorpos específicos para NS1 ZIKV e detectadas por citometria de fluxo ou imunofluorescência (Figura 53C-E). Curiosamente, as células transfectadas com pgDNS1-ZIKV apresentaram expressão aumentada da proteína NS1 ZIKV em relação às células transfectadas com o pNS1-ZIKV (Figura 53D). Como esperado, a expressão da gD HSV-1 em células transfectadas com pgDNS1-ZIKV foi confirmada por *western blot* utilizando anticorpo anti-gD (Figura 54). Tomados em conjunto, esses resultados demonstram que as construções plasmidiais apresentam perfil eletroforético adequado, bem como as proteínas recombinantes codificadas pelos mesmos foram adequadamente expressas em células de mamíferos.

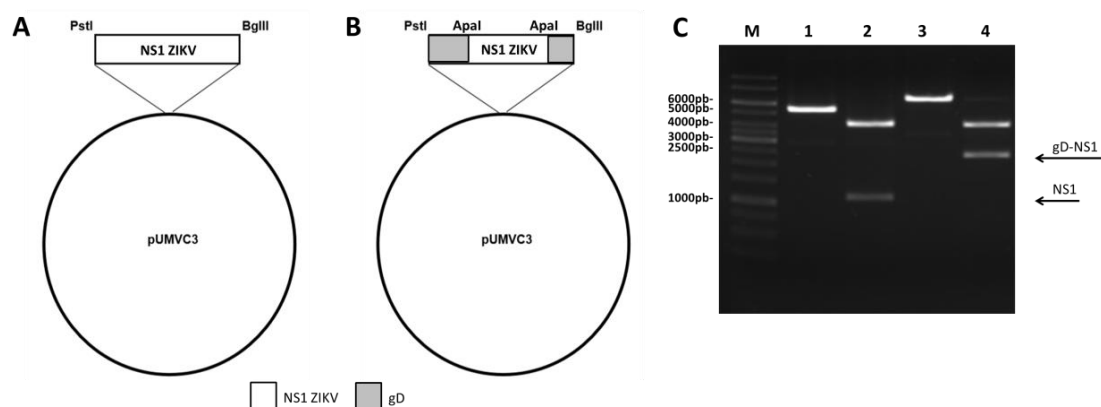


Figura 52. Construção dos plasmídeos que codificam para a proteína NS1 ZIKV. (A e B) Representações esquemáticas dos plasmídeos pNS1-ZIKV e pgDNS1-ZIKV, bem como os sítios das enzimas de restrição que flanqueiam os genes que codificam as sequências das proteínas NS1-ZIKV e gDNS1-ZIKV, respectivamente. NA Análise de restrição com as enzimas *PstI* e *BglIII*. A mobilidade eletroforética dos fragmentos gerados após digestão com as enzimas de restrição foi avaliada utilizando gel de agarose (0,8%). Descrição: M, marcador de massa molecular (SM0314, Thermo Scientific, USA);

RESULTADOS E DISCUSSÕES – PARTE 4

1, pNS1-ZIKV digerido com a enzima *PstI*; 2, pNS1-ZIKV digerido com as enzimas *PstI* e *BglII*; 3, pgDNS1-ZIKV digerido com a enzima *PstI*; 4, pgDNS1-ZIKV digerido com as enzimas *PstI* e *BglII*.

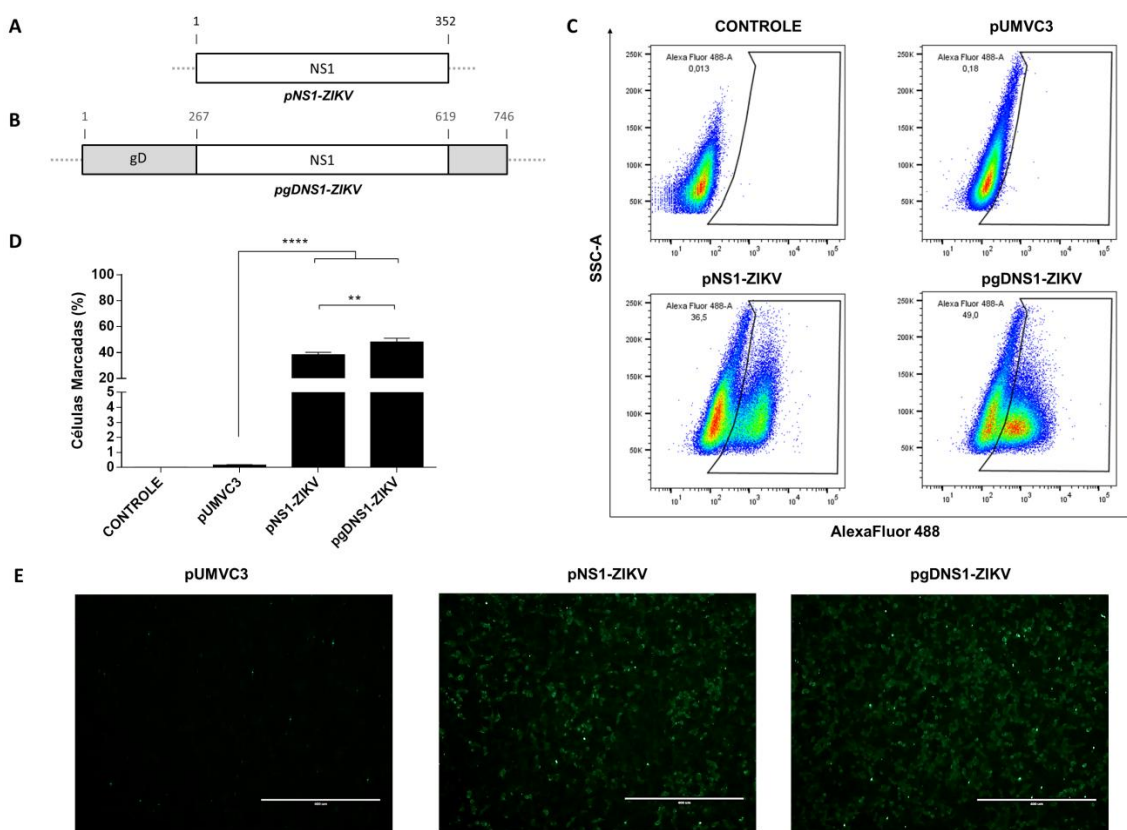


Figura 53. Expressão da proteína NS1 ZIKV isolada ou fusionada à proteína gD HSV-1. (A e B) Representações esquemáticas das sequências de aminoácidos das proteínas NS1 ZIKV isolada (A) e gDNS1-ZIKV (B). (C-E) Detecção da proteína NS1 ZIKV expressa em células HEK293-T 24 h após a transfecção com os plasmídeos testados. As células foram marcadas com mAb anti-NS1 ZIKV, seguido por anticorpos anti-IgG de camundongo conjugados com Alexa Fluor 488 e análise por citometria de fluxo (C e D) ou imunofluorescência (E). Os dados estão expressos como média \pm SEM de dois experimentos independentes realizadas em duplicata. Barra de escala = 400 μ m. A significância estatística foi calculada usando ANOVA de uma via com correção de Bonferroni (** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$, NS = não significante).

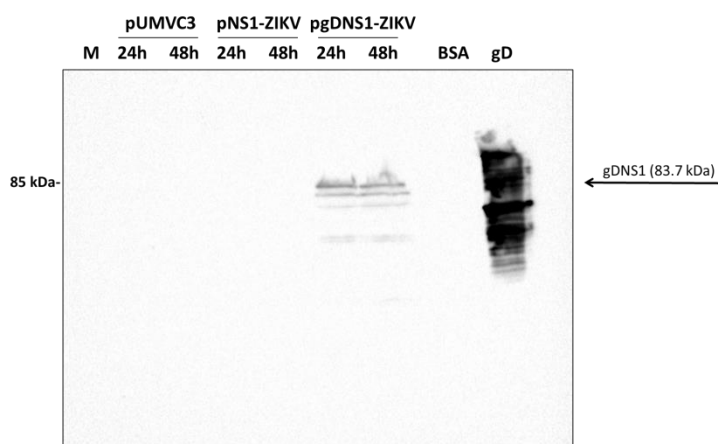


Figura 54. Avaliação da expressão da proteína gD em células de mamífero transfectadas. Células HEK293 foram transfectadas com os plasmídeos pUMVC3, pNS1-ZIKV ou pgDNS1-ZIKV. A expressão da proteína gD foi avaliada 24h e 48h após a transfecção por imunoblot. Os extratos celulares, obtidos após a lise, foram marcados com mAb anti-gD HSV-1 seguido por anti-IgG de camundongo conjugado com HRP. Descrição: BSA, albumina de soro bovino; gD, proteína gDE7h recombinante.

Em seguida, avaliamos a imunogenicidade das vacinas de DNA em camundongos da linhagem C57BL/6. Os animais foram imunizados com duas doses por via intramuscular em associação com eletroporação (Figura 55A). Como pode ser observado na Figura 55B, os títulos de anticorpos IgG séricos específicos para NS1 foram semelhantes quando detectados após a última dose vacinal em camundongos imunizados com pNS1-ZIKV ou pgDNS1-ZIKV. As análises das respostas das subclasses de IgG anti-NS1 no soro indicaram que os camundongos vacinados desenvolveram respostas de subclasses IgG1 e IgG2c semelhantes (Figura 55D). Além disso, também investigamos a capacidade das amostras de soro anti-NS1 reconhecerem a proteína NS1 nativa expressa em células Vero, previamente infectadas com o ZIKV. Como representado na Figura 55C, os anticorpos anti-NS1 produzidos em camundongos imunizados com o pgDNS1-ZIKV apresentaram maior capacidade de ligação celular em relação às amostras de soro coletadas de camundongos imunizados com pNS1-ZIKV. Por outro lado, como esperado, não detectamos respostas de anticorpos anti-NS1 nos animais imunizados com o vetor pUMVC3 (Figura 55B-C). Assim, como os anticorpos anti-NS1 gerados são capazes de reconhecer dímeros NS1 associados à membrana em células infectadas com ZIKV, espera-se que, em condições in vivo, isso favoreça a eliminação das células infectadas.

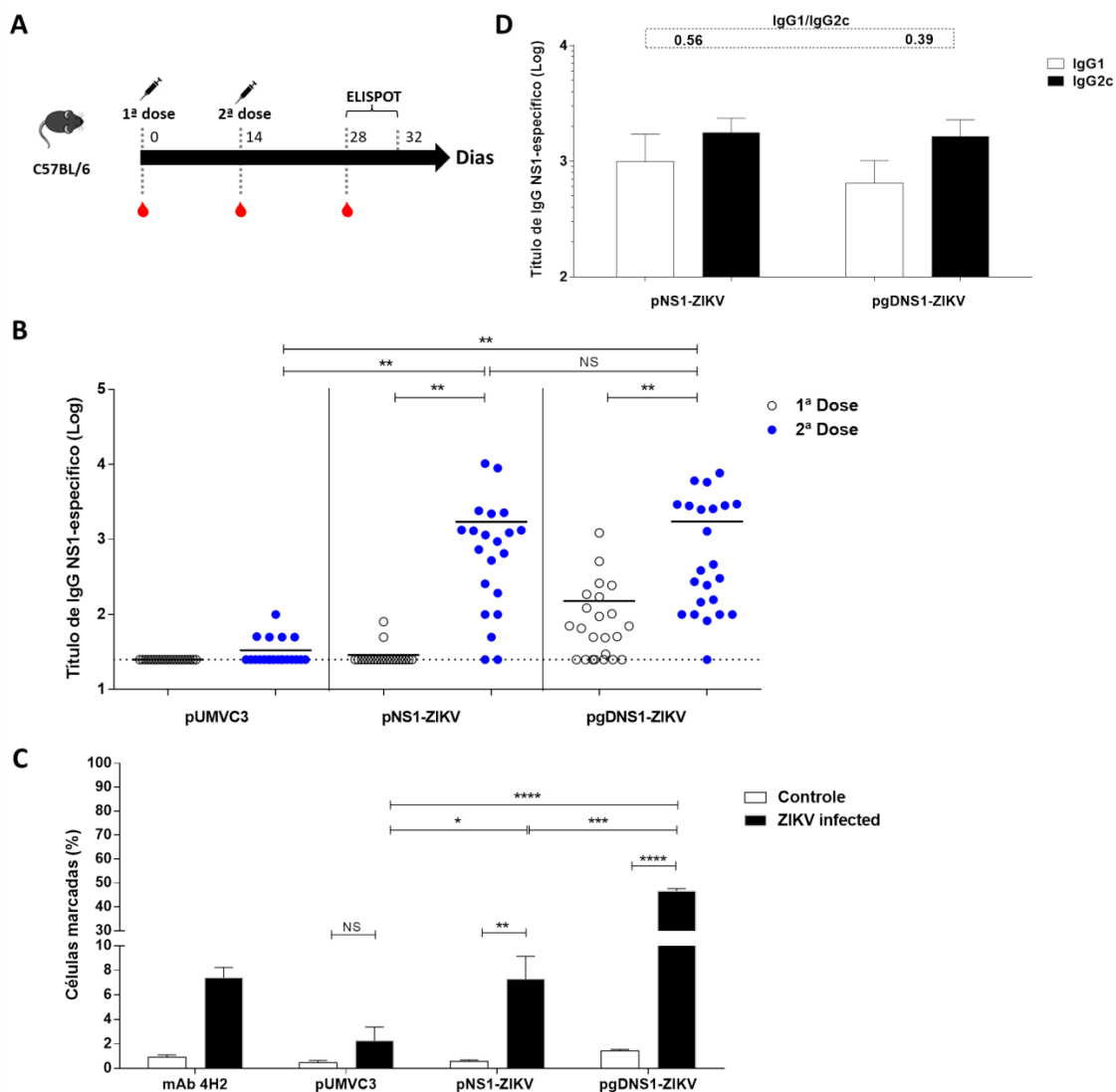


Figura 55. Avaliação da resposta imune humoral induzida pelas formulações em camundongos imunocompetentes C57BL/6. (A) Representação esquemática do regime de vacinação. Camundongos C57BL/6 foram imunizados por via i.m. com duas doses das vacinas de DNA administradas em associação à eletroporação. Amostras de soro foram coletadas 13 dias após cada dose de vacina e as respostas de células T específicas foram mensuradas duas semanas após a última dose de vacina por ELISpot. (B) Perfis de dose-resposta de anticorpos IgG anti-NS1 mensurados por ELISA nas amostras de soro coletadas dos camundongos vacinados. Os dados estão expressos como médias (barras) e títulos de IgG individuais (símbolos) (Log₁₀) obtidos em três experimentos independentes. (C) Perfil de ligação dos anticorpos séricos anti-NS1 à proteína NS1 nativa do ZIKV. Amostras diluídas de soro coletadas de camundongos vacinados (n = 10) foram reagidas com células VERO, previamente infectadas com ZIKV, e analisadas por citometria de fluxo. O mAb 4H2 (específico para NS1) foi usado como controle. (D) Respostas da subclasse de IgG mensuradas 14 dias após a segunda dose vacinal em amostras de soro dos camundongos imunizados (n = 10). As razões dos anticorpos IgG1 e IgG2c são indicadas no topo da figura. A significância estatística foi calculada usando ANOVA de uma ou duas vias com correção de Bonferroni. O teste T foi usado para analisar as respostas da subclasse de IgG (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001, NS = não significante).

Uma vez que a plataforma de fusão de antígenos à proteína gD foi amplamente explorada para aumentar as respostas imunes protetoras mediadas por células T (107,170,171,173,174), nós avaliamos se, no contexto das formulações vacinais propostas nesta neste trabalho, tal abordagem levaria ao aumento de células T produtoras de IFN- γ NS1-específicas. Para esse fim, peptídeos da proteína NS1 ZIKV restritos ao MHC-I foram desenhados *in silico* e validados em ensaio de detecção intracelular de citocinas utilizando esplenócitos de camundongos previamente infectados com o ZIKV (Figura 56). A predição de peptídeos foi realizada utilizando a região C-terminal da proteína NS1 com base em um estudo recente que descreve a presença de epítomos de células T CD8⁺ imunodominantes em camundongos (96). Assim, como ilustrado na Figura 56, os peptídeos de número 36 e 128 foram capazes de estimular os esplenócidos de animais infectados, sendo detectável a produção intracelular das citocinas IFN- γ e TNF α .

Tendo por objetivo maximizar a detecção de células T específicas para a NS1, os camundongos imunizados foram infectados com ZIKV e, três dias depois, o número de células produtoras de IFN γ foi determinado. Esse raciocínio foi baseado em evidências anteriores que demonstram que a expansão de células T CD8⁺ de memória, específicas para o antígeno, pode ser acessada neste momento após a infecção do vírus (175). Assim, os peptídeos selecionados foram aplicados em ensaios de IFN γ -ELISPOT realizados com esplenócitos de camundongos imunizados colhidos em 3 dpi (Figura 55^a). Como ilustrado na Figura 57, apenas os animais imunizados com pgDNS1-ZIKV apresentaram aumento estatisticamente significativo no número de células secretoras de IFN- γ . Visto que os peptídeos utilizados para estimular as células *in vitro* são restritos ao MHC-I, esses resultados também sugerem ativação células T CD8⁺ nos camundongos vacinados. Tomados em conjunto, esses resultados indicam que a estratégia de fusão à gD é uma alternativa promissora para aumentar a resposta celular específica à NS1 induzida por vacinação.

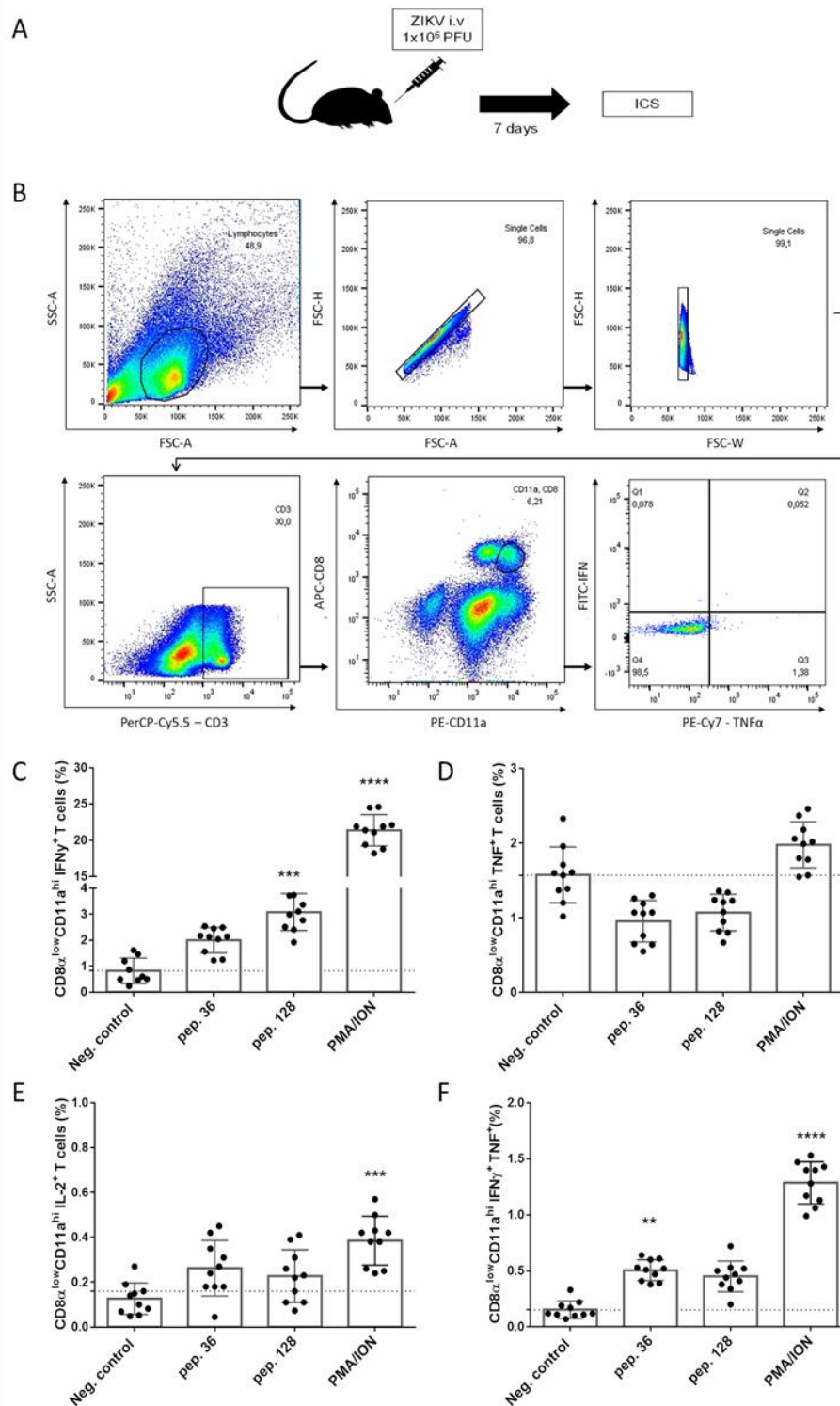


Figura 56. Validação da atividade estimuladora dos peptídeos restritos a MHC-I desenhados com base na proteína NS1 ZIKV. Camundongos C57BL/6 foram i.v. infectados com ZIKV^{BR}. Os esplenótos dos animais infectados foram isolados 7 dias após infecção, os quais foram estimulados *in vitro* com os peptídeos preditos e a produção de tonas intracelular avaliada por marcação intracelular de tonas (ICS) (A). Os esplenótos isolados de animais foram estimulados com cada peptídeo separadamente, sendo a

combinação de PMA/Ionomina utilizados como controle positivo de estímulo. As células foram analisadas por citometria de fluxo (B) para o acúmulo intracelular de tonas $\text{IFN}\gamma$ (C), $\text{TNF}\alpha$ (D) e IL-2 (E). Os dados são expressos em média \pm DP (barras) ou porcentagem individual (símbolos) de células T CD8^+ ($\text{CD3}^+\text{CD8}^{\text{low}}\text{CD11a}^{\text{high}}$) que produzem as diferentes tonas. A significância estatística foi calculada usando ANOVA de uma via com correção de Kruskal-Wallis. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ em comparação com o controle negativo).

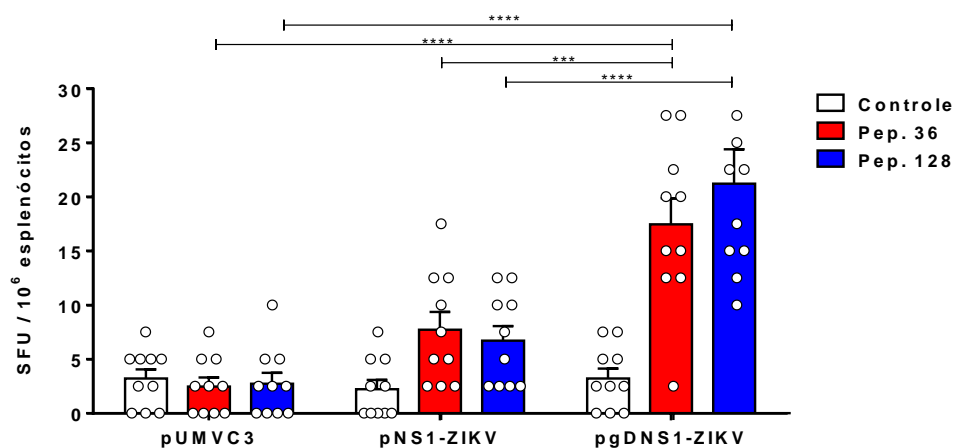


Figura 57. Análise da resposta imunológica celular induzida nos camundongos imunocompetentes vacinados. Os camundongos imunizados ($n = 10$) foram infectados com ZIKV^{BR} , sendo os esplenócitos dos mesmos colhidos 3 dpi. As células isoladas foram estimuladas *in vitro* com peptídeos NS1 ZIKV e analisadas quanto à produção de citonas via $\text{IFN}\gamma$ -ELISpot. Os dados estão apresentados como média \pm SEM (barras) ou valores individuais (símbolos) do número de células produtoras de $\text{IFN}\gamma$. A significância estatística foi calculada usando ANOVA de duas vias com correção de Bonferroni (** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

Após avaliar a imunogenicidade das formulações vacinais, a etapa seguinte do trabalho consistiu na caracterização da capacidade protetora das mesmas frente à infecção pelo ZIKV. Para esta etapa do trabalho nós testamos a imunidade protetora induzida pelas vacinas de DNA codificadoras para NS1 na linhagem de camundongo AB6, a qual é deficiente na expressão do receptor de interferon tipo I ($\text{IFNAR1}^{-/-}$) (176,177). Para isso, camundongos AB6 foram imunizados seguindo o mesmo regime vacinal. Os animais foram então desafiados por inoculação i.v. com 10^6 UFP de ZIKV^{BR} , duas semanas após a última dose vacinal (Figura 58A). Conforme representado na figura 58B, antes do desafio com vírus, os níveis séricos de anticorpos IgG anti-NS1 detectados nos camundongos imunizados com pgDNS1-ZIKV foram superiores quando comparados com os animais inoculados com pNS1-ZIKV (Figura 58B). Além disso, os camundongos imunizados com pNS1-ZIKV ou pgDNS1-ZIKV

mostraram respostas de subclasse IgG2c prevalentes (razões IgG1/IgG2c de 0,074 e 0,161, respectivamente) (Figura 58C).

Os camundongos vacinados e desafiados foram monitorados quanto à proteção induzida pelas formulações vacinais contra a ocorrência de viremia, morbidade e mortalidade, resultantes da infecção com o ZIKV. Conforme ilustrado na figura 58D-F, os animais imunizados com as vacinas de DNA que codificam para NS1 ou gDNS1 apresentaram redução da viremia em relação aos camundongos imunizados com o grupo pUMVC3. Da mesma forma, os camundongos imunizados com pNS1-ZIKV ou pgDNS1-ZIKV apresentaram um reduzido período de viremia em relação ao grupo pUMVC3 (Figura 54D-F). Assim, estes resultados demonstram claramente que a imunização com vacinas de DNA que codificam para NS1 ZIKV tem um impacto direto na duração e na intensidade do estado virêmico, conforme detectado nos camundongos AB6 vacinados.

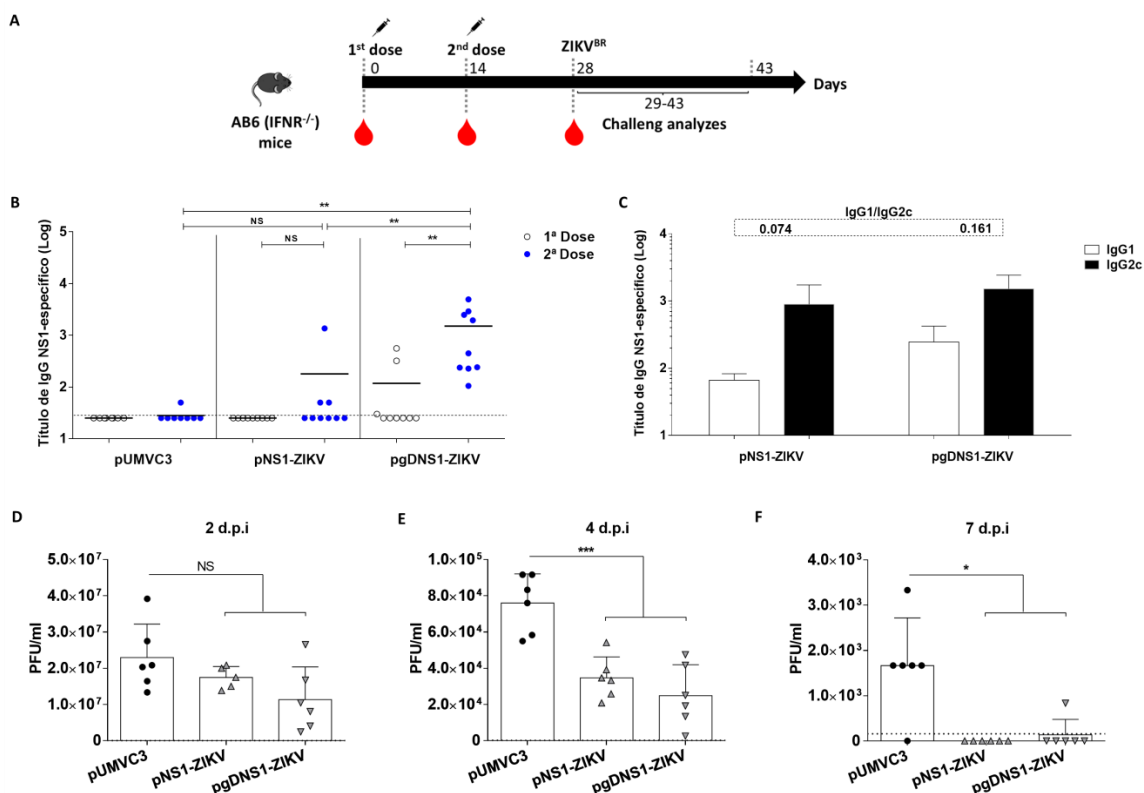


Figura 58. Avaliação da resposta imune e imunidade protetora induzida pelas vacinas de DNA em camundongos imunodeficientes. (A) Representação esquemática do regime de vacinação. Camundongos AB6 foram imunizados duas vezes por via i.m. em associação com eletroporação. Amostras de soro foram coletadas 13 dias após cada dose da vacina. Os camundongos foram infectados por via i.v. com 10^6 PFU de ZIKV^{BR} duas semanas após a última dose da vacina e monitorado para viremia, morbidade e

mortalidade por 15 dias. As respostas de IgG total (B) e subclasse (C) anti-NS1 foram mesuradas por ELISA com amostras de soro coletadas de camundongos imunizados (n = 9). Os dados foram obtidos a partir de três experimentos independentes e estão expressos como média (barras) ± SEM ou valores individuais (símbolos) de títulos de anticorpos (Log10). As razões de IgG1 e IgG2c estão indicadas no topo da figura. (D-F) Duas semanas após a última dose, os camundongos imunizados (n = 5) estavam i.v. desafiado com ZIKV (10^6 PFU/animal). Os dados de viremia estão expressos como média ± DP de PFU/ml, mesurada individualmente até o dia sete após a infecção. Os resultados são representativos de três experimentos independentes. A significância estatística foi calculada usando ANOVA de duas/uma- via com correção de Bonferroni. O teste T foi usado para analisar os resultados da subclasse de IgG (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p <0,0001, NS = não significativo).

Usando uma classificação de escala de sintomas, os camundongos imunizados com pgDNS1-ZIKV mostraram morbidade reduzida em comparação com os animais vacinados com pUMVC3 ou com os animais imunizados com pNS1-ZIKV (Figura 55A-D). Os animais vacinados com pgDNS1-ZIKV recuperaram peso corporal em aproximadamente 10 dias após a infecção, enquanto aqueles imunizados com pNS1-ZIKV recuperaram o peso corporal duas semanas após o desafio (Figura 59E). Também medimos a proteção anti-ZIKV induzida pela vacina em camundongos AB6 desafiados i.v. com uma dose letal de vírus. Conforme indicado na figura 59F, a imunização com pgDNS1-ZIKV conferiu maior sobrevivência (46%) à infecção letal por ZIKV em comparação com camundongos imunizados com pNS1-ZIKV (27%). Por outro lado, nenhuma proteção foi observada em camundongos imunizados com o vetor controle. Tomados em conjunto, esses resultados indicam que as vacinas de DNA que codificam para a proteína NS1 ZIKV conferem proteção parcial à infecção por ZIKV em camundongos AB6 imunodeficientes. Além disso, os presentes resultados demonstraram que a fusão genética da NS1 com a proteína gD melhora a indução de respostas imunes específicas do antígeno e a imunidade protetora contra o ZIKV.

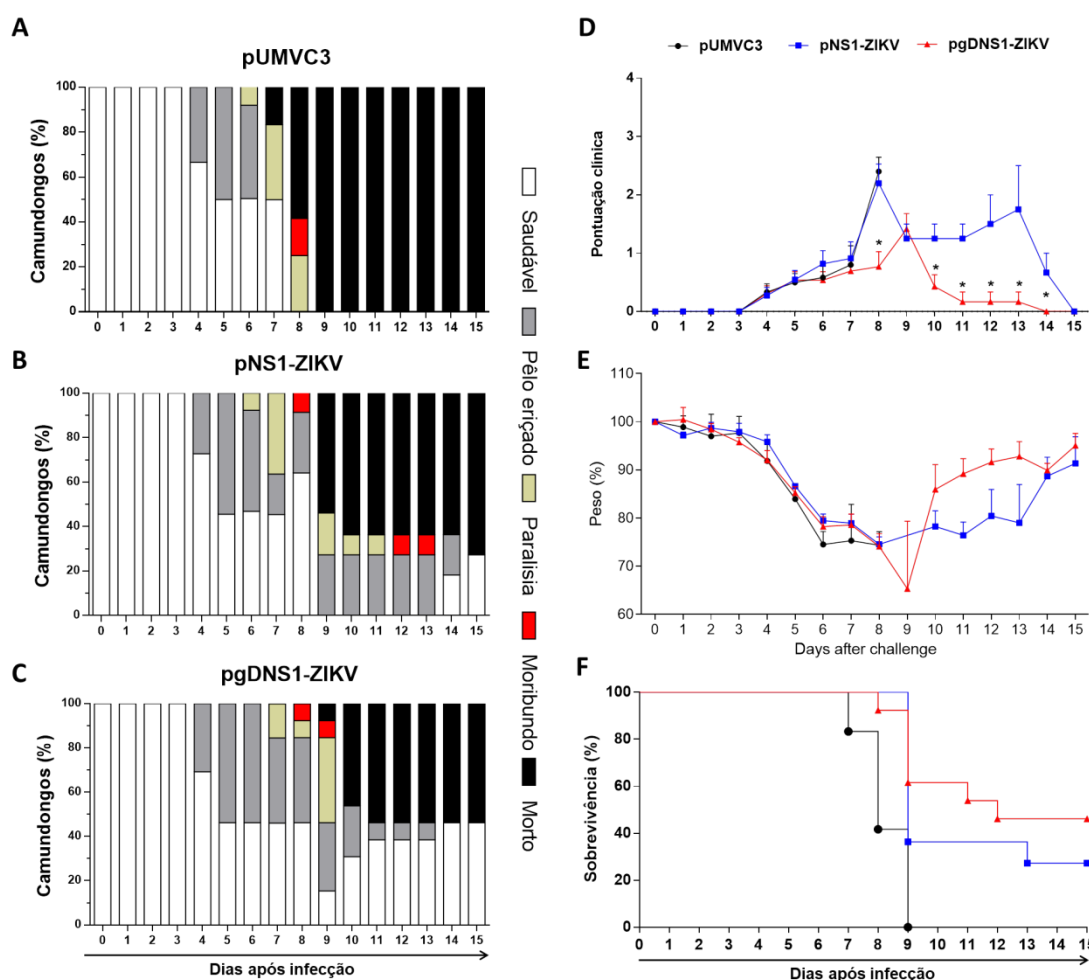


Figura 59. Avaliação da imunidade protetora induzida pelas vacinas de DNA que codificam para NS1 ZIKV. Animais AB6 foram imunizados com plasmídeos pUMVC3 (n = 12) (A), pNS1-ZIKV (n = 11) (B) ou pgDNS1-ZIKV (n = 13) (C) e monitorados diariamente por até 15 dias após o desafio com ZIKV. Os resultados estão representados como a porcentagem de animais classificados com a condição do escore clínico (Saudáveis, pelagem despenteada, paralisia, moribundos ou mortos), em escala de cores, conforme indicado na figura. A pontuação clínica (D), a alteração do peso corporal (E) e os perfis de mortalidade (F) foram avaliados nos animais desafiados. Os dados representam resultados de três experimentos independentes e são apresentados como médias \pm SEM da porcentagem dos respectivos parâmetros seguidos nos diferentes grupos de imunização. A significância estatística foi avaliada usando ANOVA de duas vias com correção de Bonferroni. O teste de Mantel-Cox foi usado para analisar os resultados de sobrevivência (*p < 0.001).

4.4.4. Discussão Parcial

Diversos candidatos vacinais contra o ZIKV foram propostos, sendo que partes deles avançou para testes clínicos. Entretanto, ainda não existem vacinas contra o ZIKV licenciadas para o uso em humanos. Avanços recentes demonstram que as respostas imunológicas celular e humoral desempenham papéis importantes no desenvolvimento da imunidade protetora aos *Flavivirus* em condições experimentais e clínicas. Assim,

vacinas voltadas para doenças associadas à essas infecções devem ativar preferencialmente ambos os braços do sistema imunológico (43,178,179). Nesta etapa do trabalho, descrevemos o uso de vacinas de subunidades baseadas nas proteínas recombinantes NS1 e EDIII ZIKV, bem como estratégias de vacina de DNA codificando para a NS1 ZIKV. Essas vacinas foram avaliadas quanto à imunogenicidade e papel ao protetor em condições experimentais. Os resultados demonstraram claramente que, apesar da imunização utilizando proteínas purificadas induzirem elevados títulos de anticorpos nos animais imunizados, as mesmas não promoveram a ativação de resposta celular antígeno-específica, bem como não foram capazes de controlar a infecção pelo ZIKV. Por outro lado, um candidato vacinal baseado em DNA codificando para a proteína NS1 fusionada geneticamente à proteína gD do HSV-1 induziu respostas humoral e celular específicas para NS1 com maior eficiência. A vacina conferiu proteção parcial contra desafio letal com o ZIKV. Coletivamente, esses resultados destacam o uso de vacinas de DNA codificando a fusão genética de antígenos à gD-HSV1 como uma plataforma mais promissora ao desenvolvimento de vacinais contra o ZIKV. Além disso, esses validam os efeitos adjuvantes da proteína gD nas respostas imunes NS1-específicas induzidas em vacinas de DNA direcionadas ao ZIKV.

Os principais candidatos vacinais contra o ZIKV que chegaram a testes clínicos são baseados em proteínas estruturais do mesmo, especialmente as proteínas prM e E (38). Essas proteínas são apresentadas sob diferentes formas (vírus inativado, DNA, mRNA e vetores virais) tendo como alvo principal a indução de anticorpos neutralizantes (38,79,91,180). Neste contexto, a EDIII ZIKV também tem sido explorada como candidato vacinal e foi capaz de induzir anticorpos neutralizantes quando associada a adjuvantes ou sob diferentes plataformas de entrega antigênica (74,90,93,181,182). Nesta tese o potencial vacinal da proteína EDIII ZIKV foi avaliado utilizando os adjuvantes Alum e LTK63. Esse último consiste em um mutante atóxico da toxina termolábel (LT) de *E. coli* enterotoxigênica, o qual apresenta capacidade de potencializar a resposta imune humoral e celular contra antígenos co-administrados (183–185).

Os resultados obtidos demonstram que apesar de altamente imunogênicas, as formulações propostas baseadas nas proteínas EDIII ZIKV e Δ EDIII ZIKV não

induziram a produção detectável de anticorpos com capacidade neutralizante. Diante da importância da conformação estrutural proteica e preservação de epítomos descontínuos na proteína E sobre a indução nAbs, especulamos que os achados aqui apresentados podem estar relacionados ao dobramento incorreto das proteínas produzidas, especialmente a Δ EDIII ZIKV, e consequente impacto negativo nos parâmetros de antigenicidade e imunogenicidade.

Embora conflitantes, outros trabalhos também demonstraram reduzida ou nula capacidade neutralizante em vacinas de subunidade baseadas na EDIII ZIKV purificada, mesmo quando produzida em células eucarióticas ou apresentada na plataforma de vacina de DNA (74,186). Por outro lado, ao utilizar o ZIKV inativado, como antígeno em substituição à proteína EDIII ZIKV, foi possível observar a produção de nAbs, especialmente quando utilizada a associação dos adjuvantes Alum e LTK63. Esses achados por sua vez indicam que a combinação de adjuvantes e o regime vacinal adotado promovem efeitos sinérgicos sobre a indução de anticorpos neutralizantes. Essa estratégia poderá ser explorada e melhor estudada em ensaios posteriores que visem à indução de anticorpos neutralizantes contra o ZIKV, bem como o mecanismo associado ao fenômeno observado.

O potencial da NS1 ZIKV como um antígeno alvo foi investigado quanto à indução de respostas imunes humorais e celulares (96,99,100,125). A proteína é alvo de anticorpos anti-NS1 quando circulante no plasma em sua forma hexamérica, bem como na membrana citoplasmática de células infectadas, como dímeros, que podem levar à lise celular (98). Uma vez que a proteína NS1 não está presente na partícula do vírus, os anticorpos anti-NS1 não são capazes de induzir o fenômeno ADE (80,95,98,187). Embora os anticorpos anti-DENV-NS1 tenham sido implicados em efeitos colaterais associados à reatividade cruzada com proteínas de endotélio (154,188,189), tais efeitos parecem ser vírus-específicos, uma vez que nenhum efeito semelhante foi relatado com anticorpos anti-NS1 do vírus da encefalite japonesa (JEV) (189). Além disso, existem evidências conflitantes em relação aos efeitos protetores e deletérios associados aos anticorpos específicos para NS1, tanto nas infecções por DENV quanto por ZIKV (167,190). Por outro lado, a imunização passiva de camundongos com anticorpos policlonais ou monoclonais anti-NS1 ZIKV promoveu um claro efeito protetor contra a

infecção viral (95,98,187). Adicionalmente, mAbs anti-NS1 derivados de humanos também foram capazes de conferir proteção parcial a camundongos imunodeficientes desafiados com ZIKV por meio de imunidade passiva (95,98). A imunidade mediada por células T desempenha um papel importante na proteção induzida por vacinas de DNA baseadas em NS1 contra a infecção pelo ZIKV (96). Recentemente, o vírus Vaccinia Ankara (MVA) modificado para expressar a NS1 do ZIKV induziu proteção após um desafio intracraniano, a qual foi correlacionada a indução de anticorpos IgG2a e de células T CD8⁺ NS1-específicas polifuncionais (99,100). Assim, a indução de anticorpos anti-NS1 associados à ativação de respostas de células T representam características importantes para uma vacina baseada em NS1 capaz de gerar imunidade protetora ao ZIKV.

As formulações vacinais baseadas em proteínas recombinantes purificadas têm como limitante a reduzida imunogenicidade (38). Neste sentido, os adjuvantes utilizados nas formulações baseadas na NS1 purificada foram o Poly (I:C), um agonista de TLR3 e MDA5, constituído de sequências sintéticas de dsRNA. Devido ao seu efetivo na indução da produção de interferons tipo I, com propriedade antivirais, o Poly (I:C) pode também contribuir para maturação de células dendríticas, com consequente ativação de linfócitos antígeno-específicos e polarização da resposta imunológica para um perfil Th1 (191). Por outro lado, o adjuvante LT-B, o qual consiste na subunidade B recombinante atóxica derivada da toxina termolábel de *E. coli* enterotoxigênica, apresenta capacidade de modular a especificidade da resposta de anticorpos direcionadas ao antígeno (110). Embora as formulações baseadas na NS1 ZIKV tenham sido capazes de induzir elevados títulos de anticorpos antígeno-específicos, não foi detectada a ativação de resposta imune celular NS1-específica nos animais imunizados. Apesar dos adjuvantes utilizados, um predomínio da imunoglobulina IgG1 foi observado, o que sugere uma polarização da resposta imune para um perfil do tipo T-helper 2 (Th2), indesejável para o modelo aqui testado. Atrelado a isso, as formulações propostas não foram capazes de controlar a infecção pelo ZIKV em modelo de infecção utilizando camundongos imunodeficiente. Assim, a busca por outras plataformas vacinais capazes de induzir um perfil mais completo de resposta imunológica anti-NS1 ainda se fez necessária.

Estudos anteriores mostraram que a fusão genética de antígenos na região C-terminal da glicoproteína D (gD) do vírus herpes simplex tipo I (HSV-1) pode melhorar a indução de respostas imunológicas humorais e celulares específicas ao antígeno, com base na plataforma de vacina de DNA ou como vacinas baseadas em proteína recombinante purificada (170–172). No presente estudo, avaliamos se tal abordagem levaria ao aumento de anticorpos e células T produtoras de IFN- γ específicos à NS1. Nossos dados indicam que, embora respostas de IgG anti-NS1 séricas semelhantes tenham sido induzidas com as diferentes vacinas de DNA baseadas em NS1 testadas, os camundongos imunocompetentes vacinados com pgDNS1-ZIKV geraram anticorpos anti-NS1 com maior capacidade de ligação à NS1 expressa em células infectadas em comparação com aqueles imunizados com pNS1-ZIKV. Como esses anticorpos são capazes de reconhecer dímeros de NS1 associados à membrana das células infectadas com o ZIKV, espera-se que, em condições *in vivo*, isso favoreça a eliminação das células infectadas. Da mesma forma, a presença de níveis mais elevados de IgG2c em camundongos AB6 imunizados com pgDNS1-ZIKV também apoia essa hipótese, uma vez que anticorpos IgG2c são conhecidos por se ligarem fortemente ao receptor Fc γ RIV, um mediador de ADCC (192,193). Assim, o aumento da imunidade observada neste grupo pode estar relacionado ao papel da gD na modulação das respostas antígeno-específicas induzidas. Além disso, a transfecção de células com pgDNS1-ZIKV aumentou a expressão *in vitro* de NS1 em comparação com células transfectadas com pNS1-ZIKV, uma característica que também pode impactar a imunogenicidade das proteínas codificadas. Assim, esses achados destacam os efeitos adjuvantes da gD na imunogenicidade da NS1 codificada por vacinas de DNA.

As respostas imunológicas mediadas por células T induzidas pela vacinação com NS1 foram descritas como uma característica chave no controle de infecções por ZIKV em condições pré-clínicas (96,100). Achados semelhantes também foram relatados em estudos clínicos que demonstram que a NS1 é capaz de induzir a produção robusta de IFN- γ por células T durante a infecção pelo ZIKV (194,195). Neste contexto, visto que a plataforma de fusão do antígeno à gD foi amplamente utilizada para aumentar as respostas imunes protetoras mediadas por células T (107,170,171,173,174), avaliamos se essa abordagem levaria ao aumento na indução de células T produtoras de IFN- γ

específicas à NS1. Ao utilizarmos peptídeos restritos ao MHC-I, baseados na NS1 ZIKV, para ativar *in vitro* esplenócitos de camundongos C57BL/6 imunizados, observamos que apenas a expressão de NS1 fusionada com a proteína gD promoveu aumento significativo das respostas celulares secretoras de IFN- γ . Uma vez que usamos peptídeos restritos ao MHC-I para estimular as células *in vitro*, esses resultados também sugerem a ativação de respostas de células T CD8⁺ nos camundongos vacinados e abrem perspectivas para o uso desses peptídeos em estudos futuros que tratam da indução de respostas de células T específicas à NS1 em condições experimentais. Tomados em conjunto, esses resultados indicaram que a estratégia de fusão antigênia à gD é uma alternativa promissora para aumentar a resposta celular específica à NS1 induzida por vacinação.

Nossos dados também corroboram resultados obtidos em um estudo recente que descreveu o uso de vacinas de DNA que codificam para a proteína ZIKV NS1 (96). Apesar das diferenças no regime vacinal testado, incluindo número de doses (total de três), via de imunização (intradérmica) e base genética dos camundongos (BALB/c), os autores observaram que apenas a expressão de uma forma modificada de NS1 (pVAX-tpaNS1) foi capaz de induzir altos títulos de anticorpos capazes de reconhecer a NS1 em células infectadas e promover a ativação de respostas de células T. Além disso, os autores relataram a presença de epítomos de células T CD4⁺ e CD8⁺ imunodominantes na região C-terminal da NS1 (aa 172 a 352) (96). Da mesma forma, os epítomos restritos ao MHC-I preditos e validados em nosso trabalho estão mapeados na mesma região da proteína. Além disso, a fusão genética com a proteína gD HSV-1 levou a uma ativação aumentada de células secretoras de IFN- γ específicas à NS1 em camundongos vacinados. As diferenças nos epítomos de células T CD8⁺ usados nos dois estudos podem ser reflexo das origens genéticas distintas das cepas de camundongos vacinados testados (BALB/c \times C57BL/6). Por outro lado, como a validação dos peptídeos descritos em nosso estudo foi realizada após a infecção pelo ZIKV, esses achados podem refletir parte do repertório de epítomos imunodominantes detectados em condições mais naturais. No entanto, uma vez que não avaliamos as respostas imunes induzidas com a sequência total da proteína NS1, outros epítomos também podem ser alvos após a imunização com pgDNS1-ZIKV. Da mesma forma, outros estudos podem

ser conduzidos para elucidar os impactos positivos da fusão do antígeno gD com a indução de respostas de células T CD4⁺ NS1-específicas.

Camundongos do tipo selvagem, como C57BL/6, preservaram respostas de IFN tipo I que fornecem defesa contra infecções virais e, conseqüentemente, não permitem a replicação viral eficiente, bem como a geração de efeitos de morbidade e letalidade relacionados à infecção por ZIKV (196,197). Para acessar a capacidade protetora das formulações aqui testadas, usamos uma cepa de camundongo AB6 deficiente em receptor de IFN tipo I (IFNAR1^{-/-}), que é suscetível à infecção por ZIKV (177). Adotando o mesmo protocolo de vacinação utilizado em animais selvagens, detectamos títulos de IgG anti-NS1 séricos mais elevados em camundongos AB6 imunizados com o pgDNS1-ZIKV quando comparados a camundongos imunizados com o pNS1-ZIKV. Após infecção com o ZIKV, os camundongos vacinados com pgDNS1-ZIKV mostraram níveis de morbidade e letalidade reduzidos em comparação com os animais imunizados com pNS1-ZIKV. Além disso, ambas as vacinas de DNA baseadas em NS1 induziram resposta predominante da subclasse de IgG2c no soro e reduziram a viremia após a infecção. Essas observações confirmaram os efeitos adjuvantes da estratégia de fusão à gD aplicada nas vacinas de DNA, com impactos positivos sobre a indução de respostas imunológicas de base celular e humoral específicas à NS1 em camundongos imunocompetentes e imunidade protetora em camundongos AB6. Adicionalmente, os perfis de proteção mediados pela NS1 observados estão alinhados com estudos anteriores que avaliaram a imunidade mediada pela NS1 ZIKV em camundongos imunodeficientes (99), bem como em camundongos imunocompetentes BALB/c (96,125) ou CD-1/ICR (100). Além disso, em contraste com os achados descritos por um estudo utilizando vacina de DNA baseada em NS1 (96), nossas formulações foram capazes de conferir proteção em camundongos IFNAR1^{-/-} mesmo após o desafio letal com uma alta dose de infecção (10⁶ UFP).

Apesar das vantagens das vacinas de DNA em relação a outras abordagens vacinais, que incluem fabricação e custos, as vacinas de DNA geralmente apresentam imunogenicidade reduzida quando testadas em condições clínicas (198). Por outro lado, a eletroporação representa uma das estratégias mais eficazes para aumentar a imunogenicidade das vacinas de DNA tanto em camundongos quanto em humanos

(199). Evidências anteriores demonstraram que a eletroporação aumenta a ativação de respostas protetoras mediadas por células T em um modelo de desafio de tumor murino (200). No presente estudo, a administração das vacinas de DNA via eletroporação contribuiu para a indução de respostas imunes com redução das doses vacinais administradas nos animais em relação a outro estudo baseado na vacina de DNA codificando a NS1 ZIKV (96). Assim, as evidências apresentadas aqui suportam ainda mais a relevância da eletroporação como um método de entrega preferido para a administração de vacinas de DNA em condições experimentais ou clínicas.

Embora o papel adjuvante da gD seja evidente em todas as estratégias exploradas até o momento, os mecanismos relacionados aos efeitos adjuvantes observados permanecem obscuros. Os efeitos imunomoduladores da gD baseiam-se principalmente na capacidade de ligação a receptores específicos localizados na superfície das células apresentadoras de antígenos, como o receptor HVEM em células dendríticas (DC) (173). A ligação da gD interfere na interação do HVEM com seus ligantes imunossupressores nativos, levando ao aumento da ativação de células B e T (173). A ligação da gD ao HVEM também desencadeia a ativação da via de NF-kappa B, promovendo sinais de pró-sobrevivência em células T (201–203). Além disso, proteínas quiméricas purificadas baseadas na gD são capazes de ativar um subconjunto de DC especializado na apresentação cruzada de antígeno, levando ao aumento da geração de linfócitos T CD8⁺ antígenos-específicos (171). Esses efeitos estão em linha com os resultados relatados aqui, para os quais a geração da proteína NS1-gD quimérica promoveu o aumento de respostas mediadas por células específicas à NS1 ZIKV.

Diante do exposto, os achados aqui relatados descrevem pela primeira vez a estratégia baseada no uso de vacinas de DNA que codificam para a NS1 ZIKV geneticamente fusionada com a proteína gD HSV-1. Os efeitos adjuvantes observados com a quimera NS1-gD, em relação à indução de respostas imunológicas NS1-específicas, apoiam o uso de tal abordagem em novas tentativas de aumentar a imunidade ao ZIKV induzida por vacinas de DNA. Além disso, esses achados abrem perspectivas para o desenvolvimento de vacinas mais eficazes contra o ZIKV, bem como para outros flavivirus.

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

Na presente tese de doutorado avaliamos a especificidade sorológica e potencial vacinal de formas recombinantes do domínio III da proteína do envelope (EDIII) e da proteína não estrutural 1 (NS1) do ZIKV. As principais conclusões obtidas a partir dos resultados apresentados são:

- 1- As proteínas recombinantes propostas (NS1 ZIKV, Δ NS1 ZIKV, EDIII ZIKV, Δ NS1 DENV1, Δ NS1 DENV2, Δ NS1 DENV3 e Δ NS1 DENV4) foram expressas em sistema procarioto, purificadas e validadas quando à preservação da antigenicidade e funcionalidade. As mesmas apresentaram qualidade compatível com a aplicação em ensaios de diagnósticos e antígenos vacinais.
- 2- A solubilização de IBs pela técnica de alta pressão hidrostática, associada a pH alcalino, demonstrou ser eficiente na recuperação de proteínas recombinantes insolúveis, com antigenicidade e funcionalidade preservadas;
- 3- Um protocolo de ELISA baseado na proteína Δ NS1 ZIKV foi estabelecido para detecção de anticorpos IgG NS1 ZIKV-específicos. Esse método apresentou elevada sensibilidade e especificidade quando validado frente a painel de soros humanos, sendo sua comercialização aprovada pela ANVISA.
- 4- Formulações vacinais baseadas nas proteínas NS1 ZIKV e EDIII ZIKV, em associação com diferentes adjuvantes (Alum, LT-B ou Poly [I:C]), foram altamente imunogênicas, induzindo elevados títulos de anticorpos antígeno-específicos. Entretanto, nos modelos testados as formulações não foram capazes de conferir imunidade protetora frente ao ZIKV.
- 5- Uma estratégia de vacina de DNA (pgDNS1-ZIKV) baseada na expressão da proteína NS1 ZIKV geneticamente fusionada à glicoproteína D do vírus Herpes Simplex Tipo I foi capaz de potencializar a indução de respostas imunológicas humorais e celulares direcionadas à proteína NS1, bem como aumentou a eficácia protetora frente à infecção pelo ZIKV.

REFERÊNCIAS*

*De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

REFERÊNCIAS

1. Tognarelli J, Ulloa S, Villagra E, Lagos J, Aguayo C, Fasce R, et al. A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. *Arch Virol* [Internet]. 2015 Nov 26; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26611910>
2. Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekcharyawat P, Neyret A, Natthanej L, et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J Virol* [Internet]. 2015;89(17):JVI.00354-15-. Available from: <http://jvi.asm.org/content/early/2015/06/11/JVI.00354-15.abstract>
3. Moore DL, Causey OR, Carey DE, Reddy S, Cooke AR, Akinkugbe FM, et al. Arthropod-borne viral infections of man in Nigeria, 1964-1970. *Ann Trop Med Parasitol* [Internet]. 1975 Mar;69(1):49–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1124969>
4. Discussion. *Trans R Soc Trop Med Hyg* [Internet]. 1964 Jul;58(4):335–8. Available from: [https://academic.oup.com/trstmh/article-lookup/doi/10.1016/0035-9203\(64\)90200-7](https://academic.oup.com/trstmh/article-lookup/doi/10.1016/0035-9203(64)90200-7)
5. Pielnaa P, Al-Saadawe M, Saro A, Dama MF, Zhou M, Huang Y, et al. Zika virus-spread, epidemiology, genome, transmission cycle, clinical manifestation, associated challenges, vaccine and antiviral drug development. *Virology* [Internet]. 2020 Apr;543:34–42. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682220300210>
6. Metsky HC, Matranga CB, Wohl S, Schaffner SF, Freije CA, Winnicki SM, et al. Zika virus evolution and spread in the Americas. *Nature* [Internet]. 2017 May 24;546(7658):411–5. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature22402>
7. Vasudevan J, Skandhan A, Skandhan AKP, Balakrishnan S, Skandhan KP. Zika virus. *Rev Med Microbiol* [Internet]. 2018 Feb;1. Available from: <http://insights.ovid.com/crossref?an=00013542-900000000-99837>
8. Cao-Lormeau V-M, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry A-L, Mallet H-P, et al. Zika Virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2014 Jun;20(6):1084–6. Available from: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/20/6/14-0138_article.htm
9. Price J V., Jarrell JA, Furman D, Kattah NH, Newell E, Dekker CL, et al. Characterization of Influenza Vaccine Immunogenicity Using Influenza Antigen Microarrays. Turner SJ, editor. *PLoS One* [Internet]. 2013 May 29;8(5):e64555. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0064555>
10. Duffy MR, Chen T-H, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med* [Internet]. 2009 Jun 11;360(24):2536–43. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0805715>

11. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(8):1232–9.
12. Hennessey M, Fischer M, Staples JE. Zika Virus Spreads to New Areas - Region of the Americas, May 2015-January 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* [Internet]. 2016;65(3):55–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26820163>
13. Ioos S, Mallet H-P, Leparac Goffart I, Gauthier V, Cardoso T, Herida M. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Médecine Mal Infect* [Internet]. 2014 Jul;44(7):302–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25001879>
14. WHO. Neurological syndrome, congenital malformations, and Zika virus infection. Implications for public health in the Americas. [Internet]. *Epidemiological Alert*. 2015. Available from: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2015/2015-dec-1-cha-epi-alert-zika-neuro-syndrome.pdf>
15. Baud D, Gubler DJ, Schaub B, Lanteri MC, Musso D. An update on Zika virus infection. *Lancet* [Internet]. 2017 Nov;390(10107):2099–109. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673617314502>
16. Li R, Ding J, Ding G, Fan X, He Y, Wang X, et al. Zika virus infections, a review. *Radiol Infect Dis* [Internet]. 2017 Jun;4(2):88–93. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352621116300638>
17. Saúde M da. Situação epidemiológica da síndrome congênita associada à infecção pelo vírus Zika em 2020, até a SE 45. *Bol epidemiológico* [Internet]. 2020; Available from: https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/media/pdf/2020/dezembro/11/boletim_epidemiologico_svs_47.pdf
18. Faye O, Freire CCM, Iamarino A, Faye O, de Oliveira JVC, Diallo M, et al. Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(1):36.
19. Hayes EB. Zika Virus Outside Africa. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2009 Sep;15(9):1347–50. Available from: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/15/9/09-0442_article.htm
20. Oliveira DBL, Almeida FJ, Durigon EL, Mendes ÉA, Braconi CT, Marchetti I, et al. Prolonged Shedding of Zika Virus Associated with Congenital Infection. *N Engl J Med* [Internet]. 2016 Sep 22;375(12):1202–4. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMc1607583>
21. Deckard DT, Chung WM, Brooks JT, Smith JC, Woldai S, Hennessey M, et al. Male-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus — Texas, January 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* [Internet]. 2016 Apr 15;65(14):372–4. Available from: <http://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/wr/mm6514a3.htm>

22. Foy BD, Kobylinski KC, Foy JLC, Blitvich BJ, Travassos da Rosa A, Haddow AD, et al. Probable Non-Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2011 May;17(5):880–2. Available from: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/17/5/10-1939_article.htm
23. Magnus MM, Espósito DLA, Costa VA da, Melo PS de, Costa-Lima C, Fonseca BAL da, et al. Risk of Zika virus transmission by blood donations in Brazil. *Hematol Transfus Cell Ther* [Internet]. 2018 Jul;40(3):250–4. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2531137918300671>
24. Pierson TC, Diamond MS. The emergence of Zika virus and its new clinical syndromes. *Nature* [Internet]. 2018 Aug 29;560(7720):573–81. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41586-018-0446-y>
25. Krauer F, Riesen M, Reveiz L, Oladapo OT, Martínez-Vega R, Porgo T V., et al. Zika Virus Infection as a Cause of Congenital Brain Abnormalities and Guillain-Barré Syndrome: Systematic Review. von Seidlein L, editor. *PLOS Med* [Internet]. 2017 Jan 3;14(1):e1002203. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pmed.1002203>
26. Tan TY, Fibriansah G, Kostyuchenko VA, Ng T-S, Lim X-X, Zhang S, et al. Capsid protein structure in Zika virus reveals the flavivirus assembly process. *Nat Commun* [Internet]. 2020 Dec 14;11(1):895. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41467-020-14647-9>
27. Riedl W, Acharya D, Lee J-H, Liu G, Serman T, Chiang C, et al. Zika Virus NS3 Mimics a Cellular 14-3-3-Binding Motif to Antagonize RIG-I- and MDA5-Mediated Innate Immunity. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2019 Oct;26(4):493-503.e6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931312819304792>
28. Sirohi D, Chen Z, Sun L, Klose T, Pierson TC, Rossmann MG, et al. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science* (80-) [Internet]. 2016 Apr 22;352(6284):467–70. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aaf5316>
29. Kostyuchenko VA, Lim EXY, Zhang S, Fibriansah G, Ng T-S, Ooi JSG, et al. Structure of the thermally stable Zika virus. *Nature* [Internet]. 2016;533(7603):425–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27093288>
30. Meertens L, Labeau A, Dejarnac O, Cipriani S, Sinigaglia L, Bonnet-Madin L, et al. Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. *Cell Rep* [Internet]. 2017 Jan;18(2):324–33. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124716317521>
31. Hou W, Armstrong N, Obwolo LA, Thomas M, Pang X, Jones KS, et al. Determination of the Cell Permissiveness Spectrum, Mode of RNA Replication, and RNA-Protein Interaction of Zika Virus. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2017 Dec 31;17(1):239. Available from:

- <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-017-2338-4>
32. Tabata T, Petitt M, Puerta-Guardo H, Michlmayr D, Wang C, Fang-Hoover J, et al. Zika Virus Targets Different Primary Human Placental Cells, Suggesting Two Routes for Vertical Transmission. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2016 Aug;20(2):155–66. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931312816303006>
 33. Miner JJ, Diamond MS. Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2017 Feb;21(2):134–42. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931312817300264>
 34. Munjal A, Khandia R, Dhama K, Sachan S, Karthik K, Tiwari R, et al. Advances in Developing Therapies to Combat Zika Virus: Current Knowledge and Future Perspectives. *Front Microbiol* [Internet]. 2017 Aug 3;8. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.01469/full>
 35. Elshahawi H, Syed Hassan S, Balasubramaniam V. Importance of Zika Virus NS5 Protein for Viral Replication. *Pathogens* [Internet]. 2019 Sep 30;8(4):169. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-0817/8/4/169>
 36. Coutard B, Barral K, Lichière J, Selisko B, Martin B, Aouadi W, et al. Zika Virus Methyltransferase: Structure and Functions for Drug Design Perspectives. Diamond MS, editor. *J Virol* [Internet]. 2017 Mar;91(5). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.02202-16>
 37. Xu S, Ci Y, Wang L, Yang Y, Zhang L, Xu C, et al. Zika virus NS3 is a canonical RNA helicase stimulated by NS5 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2019 Sep 19;47(16):8693–707. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article/47/16/8693/5541095>
 38. Araujo SC, Pereira LR, Alves RPS, Andreato-Santos R, Kanno AI, Ferreira LCS, et al. Anti-Flavivirus Vaccines: Review of the Present Situation and Perspectives of Subunit Vaccines Produced in *Escherichia coli*. *Vaccines* [Internet]. 2020 Aug 31;8(3):492. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-393X/8/3/492>
 39. Wen J, Tang WW, Sheets N, Ellison J, Sette A, Kim K, et al. Identification of Zika virus epitopes reveals immunodominant and protective roles for dengue virus cross-reactive CD8⁺ T cells. *Nat Microbiol* [Internet]. 2017 Jun;2(6):17036. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28288094>
 40. Priyamvada L, Quicke KM, Hudson WH, Onlamoon N, Sewatanon J. Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. 2016;113(28).
 41. Rogers TF, Goodwin EC, Briney B, Sok D, Beutler N, Strubel A, et al. Zika virus activates de novo and cross-reactive memory B cell responses in dengue-experienced donors. *Sci Immunol* [Internet]. 2017 Aug 4;2(14). Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/sciimmunol.aan6809>

42. Elong Ngonu A, Shresta S. Cross-Reactive T Cell Immunity to Dengue and Zika Viruses: New Insights Into Vaccine Development. *Front Immunol* [Internet]. 2019 Jun 11;10. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.01316/full>
43. Wen J, Wang Y-T, Valentine KM, dos Santos Alves RP, Xu Z, Regla-Nava JA, et al. CD4+ T Cells Cross-Reactive with Dengue and Zika Viruses Protect against Zika Virus Infection. *Cell Rep* [Internet]. 2020 Apr;31(4):107566. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124720305155>
44. Barba-Spaeth G, Dejnirattisai W, Rouvinski A, Vaney M-C, Medits I, Sharma A, et al. Structural basis of potent Zika–dengue virus antibody cross-neutralization. *Nature* [Internet]. 2016 Aug 4;536(7614):48–53. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature18938>
45. Dejnirattisai W, Supasa P, Wongwiwat W, Rouvinski A, Barba-Spaeth G, Duangchinda T, et al. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. *Nat Immunol* [Internet]. 2016 Sep 23;17(9):1102–8. Available from: <http://www.nature.com/articles/ni.3515>
46. Felix AC, Souza NCS, Figueiredo WM, Costa AA, Inenami M, da Silva RMG, et al. Cross reactivity of commercial anti-dengue immunoassays in patients with acute Zika virus infection. *J Med Virol* [Internet]. 2017 Aug;89(8):1477–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jmv.24789>
47. Balmaseda A, Stettler K, Medialdea-Carrera R, Collado D, Jin X, Zambrana JV, et al. Antibody-based assay discriminates Zika virus infection from other flaviviruses. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2017 Aug 1;114(31):8384–9. Available from: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1704984114>
48. Singh RK, Dhama K, Karthik K, Tiwari R, Khandia R, Munjal A, et al. Advances in Diagnosis, Surveillance, and Monitoring of Zika Virus: An Update. *Front Microbiol* [Internet]. 2018 Jan 19;8. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.02677/full>
49. Bingham AM, Cone M, Mock V, Heberlein-Larson L, Stanek D, Blackmore C, et al. Comparison of Test Results for Zika Virus RNA in Urine, Serum, and Saliva Specimens from Persons with Travel-Associated Zika Virus Disease — Florida, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* [Internet]. 2016 May 13;65(18):475–8. Available from: <http://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/wr/mm6518e2.htm>
50. Rossini G, Gaibani P, Vocale C, Cagarelli R, Landini MP. Comparison of Zika virus (ZIKV) RNA detection in plasma, whole blood and urine – Case series of travel-associated ZIKV infection imported to Italy, 2016. *J Infect* [Internet]. 2017 Sep;75(3):242–5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163445317302098>
51. Lequin RM. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clin Chem* [Internet]. 2005 Dec 1;51(12):2415–8. Available

- from: <https://academic.oup.com/clinchem/article/51/12/2415/5629720>
52. Panning M. Zika Virus Serology: More Diagnostic Targets, more Reliable Answers? *EBioMedicine* [Internet]. 2017 Feb;16:12–3. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S235239641730049X>
 53. Baden LR, Petersen LR, Jamieson DJ, Powers AM, Honein MA. Zika Virus. *N Engl J Med* [Internet]. 2016 Apr 21;374(16):1552–63. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1602113>
 54. Montoya M, Collins M, Dejnirattisai W, Katzelnick LC, Puerta-Guardo H, Jardi R, et al. Longitudinal Analysis of Antibody Cross-neutralization Following Zika Virus and Dengue Virus Infection in Asia and the Americas. *J Infect Dis* [Internet]. 2018 Jul 13;218(4):536–45. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article/218/4/536/4958207>
 55. Gao X, Wen Y, Wang J, Hong W, Li C, Zhao L, et al. Delayed and highly specific antibody response to nonstructural protein 1 (NS1) revealed during natural human ZIKV infection by NS1-based capture ELISA. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2018 Dec 14;18(1):275. Available from: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-018-3173-y>
 56. Premkumar L, Collins M, Graham S, Liou G-JA, Lopez CA, Jardi R, et al. Development of Envelope Protein Antigens To Serologically Differentiate Zika Virus Infection from Dengue Virus Infection. McAdam AJ, editor. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2017 Dec 20;56(3):e01504-17. Available from: <http://jcm.asm.org/lookup/doi/10.1128/JCM.01504-17>
 57. Balmaseda A, Zambrana JV, Collado D, García N, Saborío S, Elizondo D, et al. Comparison of Four Serological Methods and Two Reverse Transcription-PCR Assays for Diagnosis and Surveillance of Zika Virus Infection. Tang Y-W, editor. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2018 Jan 5;56(3). Available from: <http://jcm.asm.org/lookup/doi/10.1128/JCM.01785-17>
 58. Wong SJ, Furuya A, Zou J, Xie X, Dupuis AP, Kramer LD, et al. A Multiplex Microsphere Immunoassay for Zika Virus Diagnosis. *EBioMedicine* [Internet]. 2017 Feb;16:136–40. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352396417300087>
 59. L’Huillier AG, Hamid-Allie A, Kristjanson E, Papageorgiou L, Hung S, Wong CF, et al. Evaluation of Euroimmun Anti-Zika Virus IgM and IgG Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Zika Virus Serologic Testing. McAdam AJ, editor. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2017 Aug;55(8):2462–71. Available from: <http://jcm.asm.org/lookup/doi/10.1128/JCM.00442-17>
 60. Charrel RN, Leparac-Goffart I, Pas S, de Lamballerie X, Koopmans M, Reusken C. Background review for diagnostic test development for Zika virus infection. *Bull World Health Organ* [Internet]. 2016 Aug 1;94(8):574-584D. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27516635>

61. Andreato-Santos R, Pereira SS, Pereira LR, Félix AC, Romano CM, Ferreira LC de S. Specificity of NS1-based immunochromatographic tests for dengue virus with regard to the Zika virus protein. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2020 Jun;95:276–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1201971220302289>
62. Kikuti M, Tauro LB, Moreira PSS, Campos GS, Paploski IAD, Weaver SC, et al. Diagnostic performance of commercial IgM and IgG enzyme-linked immunoassays (ELISAs) for diagnosis of Zika virus infection. *Virology* [Internet]. 2018 Dec 13;15(1):108. Available from: <https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12985-018-1015-6>
63. Pasquier C, Joguet G, Mengelle C, Chapuy-Regaud S, Pavili L, Prisant N, et al. Kinetics of anti-ZIKV antibodies after Zika infection using two commercial enzyme-linked immunoassays. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2018 Jan;90(1):26–30. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0732889317302754>
64. Lustig Y, Zelena H, Venturi G, Van Esbroeck M, Rothe C, Perret C, et al. Sensitivity and Kinetics of an NS1-Based Zika Virus Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in Zika Virus-Infected Travelers from Israel, the Czech Republic, Italy, Belgium, Germany, and Chile. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2017;55(6):1894–901. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28381608>
65. Steinhagen K, Probst C, Radzimski C, Schmidt-Chanasit J, Emmerich P, van Esbroeck M, et al. Serodiagnosis of Zika virus (ZIKV) infections by a novel NS1-based ELISA devoid of cross-reactivity with dengue virus antibodies: a multicohort study of assay performance, 2015 to 2016. *Eurosurveillance* [Internet]. 2016 Dec 15;21(50):30426. Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=22670>
66. Yap TL, Hong SY, Soh JH, Ravichandraprabhu L, Lim VWX, Chan H-M, et al. Engineered NS1 for Sensitive, Specific Zika Virus Diagnosis from Patient Serology. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2021 May;27(5):1427–37. Available from: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/27/5/19-0121_article.htm
67. Denis J, Attoumani S, Gravier P, Tenebray B, Garnier A, Briolant S, et al. High specificity and sensitivity of Zika EDIII-based ELISA diagnosis highlighted by a large human reference panel. Rodriguez-Barraquer I, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2019 Sep 20;13(9):e0007747. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0007747>
68. Dai L, Song J, Lu X, Deng Y-Q, Musyoki AM, Cheng H, et al. Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2016 May;19(5):696–704. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931312816301494>
69. Richner JM, Diamond MS. Zika virus vaccines: immune response, current status,

- and future challenges. *Curr Opin Immunol*. 2018 Aug;53:130–6.
70. Dowd KA, Ko S-Y, Morabito KM, Yang ES, Pelc RS, DeMaso CR, et al. Rapid development of a DNA vaccine for Zika virus. *Science* (80-) [Internet]. 2016 Oct 14;354(6309):237–40. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.aai9137>
 71. Li X-F, Dong H-L, Wang H-J, Huang X-Y, Qiu Y-F, Ji X, et al. Development of a chimeric Zika vaccine using a licensed live-attenuated flavivirus vaccine as backbone. *Nat Commun* [Internet]. 2018 Dec 14;9(1):673. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41467-018-02975-w>
 72. Larocca RA, Abbink P, Peron JPS, Zannotto PM de A, Iampietro MJ, Badamchi-Zadeh A, et al. Vaccine protection against Zika virus from Brazil. *Nature* [Internet]. 2016 Aug 25;536(7617):474–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27355570>
 73. Abbink P, Larocca RA, De La Barrera RA, Bricault CA, Moseley ET, Boyd M, et al. Protective efficacy of multiple vaccine platforms against Zika virus challenge in rhesus monkeys. *Science* [Internet]. 2016 Sep 9;353(6304):1129–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27492477>
 74. Yang M, Dent M, Lai H, Sun H, Chen Q. Immunization of Zika virus envelope protein domain III induces specific and neutralizing immune responses against Zika virus. *Vaccine* [Internet]. 2017 Jun 29; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28669618>
 75. Richner JM, Jagger BW, Shan C, Fontes CR, Dowd KA, Cao B, et al. Vaccine Mediated Protection Against Zika Virus-Induced Congenital Disease. *Cell* [Internet]. 2017 Jul;170(2):273-283.e12. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867417307596>
 76. To A, Medina LO, Mfuh KO, Lieberman MM, Wong TAS, Namekar M, et al. Recombinant Zika Virus Subunits Are Immunogenic and Efficacious in Mice. Pasetti MF, editor. *mSphere* [Internet]. 2018 Jan 10;3(1). Available from: <http://msphere.asm.org/lookup/doi/10.1128/mSphere.00576-17>
 77. Modjarrad K, Lin L, George SL, Stephenson KE, Eckels KH, De La Barrera RA, et al. 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* [Internet]. 2018 Feb;391(10120):563–71. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673617331069>
 78. Tebas P, Roberts CC, Muthumani K, Reuschel EL, Kudchodkar SB, Zaidi FI, et al. Safety and Immunogenicity of an Anti-Zika Virus DNA Vaccine — Preliminary Report. *N Engl J Med* [Internet]. 2017 Oct 4;NEJMoa1708120. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1708120>
 79. Gaudinski MR, Houser K V, Morabito KM, Hu Z, Yamshchikov G, Rothwell

- RS, et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of two Zika virus DNA vaccine candidates in healthy adults: randomised, open-label, phase 1 clinical trials. *Lancet* [Internet]. 2018 Feb;391(10120):552–62. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673617331057>
80. Stettler K, Beltramello M, Espinosa DA, Graham V, Cassotta A, Bianchi S, et al. Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. *Science* (80-) [Internet]. 2016 Aug 19;353(6301):823–6. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.aaf8505>
 81. Sapparapu G, Fernandez E, Kose N, Bin Cao, Fox JM, Bombardi RG, et al. Neutralizing human antibodies prevent Zika virus replication and fetal disease in mice. *Nature* [Internet]. 2016 Dec 15;540(7633):443–7. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature20564>
 82. Robbiani DF, Bozzacco L, Keeffe JR, Khouri R, Olsen PC, Gazumyan A, et al. Recurrent Potent Human Neutralizing Antibodies to Zika Virus in Brazil and Mexico. *Cell* [Internet]. 2017 May 4;169(4):597-609.e11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28475892>
 83. Wang Q, Yang H, Liu X, Dai L, Ma T, Qi J, et al. Molecular determinants of human neutralizing antibodies isolated from a patient infected with Zika virus. *Sci Transl Med* [Internet]. 2016;8(369):369ra179. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27974667>
 84. Zhao H, Fernandez E, Dowd KA, Speer SD, Platt DJ, Gorman MJ, et al. Structural Basis of Zika Virus-Specific Antibody Protection. *Cell* [Internet]. 2016 Aug 11;166(4):1016–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27475895>
 85. Chiang C-Y, Huang M-H, Hsieh C-H, Chen M-Y, Liu H-H, Tsai J-P, et al. Dengue-1 Envelope Protein Domain III along with PELC and CpG Oligodeoxynucleotides Synergistically Enhances Immune Responses. Michael SF, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2012 May 15;6(5):e1645. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0001645>
 86. Etemad B, Batra G, Raut R, Dahiya S, Khanam S, Swaminathan S, et al. An envelope domain III-based chimeric antigen produced in *Pichia pastoris* elicits neutralizing antibodies against all four dengue virus serotypes. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2008 Sep;79(3):353–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18784226>
 87. Khanam S, Etemad B, Khanna N, Swaminathan S. Induction of neutralizing antibodies specific to dengue virus serotypes 2 and 4 by a bivalent antigen composed of linked envelope domains III of these two serotypes. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2006 Feb;74(2):266–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16474083>
 88. Apt D, Raviprakash K, Brinkman A, Semyonov A, Yang S, Skinner C, et al. Tetravalent neutralizing antibody response against four dengue serotypes by a

- single chimeric dengue envelope antigen. *Vaccine* [Internet]. 2006 Jan 16;24(3):335–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16125280>
89. Guzman MG, Hermida L, Bernardo L, Ramirez R, Guillén G. Domain III of the envelope protein as a dengue vaccine target. *Expert Rev Vaccines* [Internet]. 2010 Feb;9(2):137–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20109025>
90. Tai W, He L, Wang Y, Sun S, Zhao G, Luo C, et al. Critical neutralizing fragment of Zika virus EDIII elicits cross-neutralization and protection against divergent Zika viruses. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2018 Dec 24;7(1):7. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41426-017-0007-8>
91. Han J-F, Qiu Y, Yu J-Y, Wang H-J, Deng Y-Q, Li X-F, et al. Immunization with truncated envelope protein of Zika virus induces protective immune response in mice. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Dec 30;7(1):10047. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-10595-5>
92. Zhang W, Qu P, Li D, Zhang C, Liu Q, Zou G, et al. Yeast-produced subunit protein vaccine elicits broadly neutralizing antibodies that protect mice against Zika virus lethal infection. *Antiviral Res* [Internet]. 2019 Oct;170:104578. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166354219302013>
93. Yang M, Lai H, Sun H, Chen Q. Virus-like particles that display Zika virus envelope protein domain III induce potent neutralizing immune responses in mice. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Dec 9;7(1):7679. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-08247-9>
94. Muller DA, Young PR. The flavivirus NS1 protein: Molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Res*. 2013;98(2):192–208.
95. Wessel AW, Kose N, Bombardi RG, Roy V, Chantima W, Mongkolsapaya J, et al. Antibodies targeting epitopes on the cell-surface form of NS1 protect against Zika virus infection during pregnancy. *Nat Commun* [Internet]. 2020 Dec 19;11(1):5278. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41467-020-19096-y>
96. Grubor-Bauk B, Wijesundara DK, Masavuli M, Abbink P, Peterson RL, Prow NA, et al. NS1 DNA vaccination protects against Zika infection through T cell-mediated immunity in immunocompetent mice. *Sci Adv* [Internet]. 2019 Dec 11;5(12):eaax2388. Available from: <https://advances.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/sciadv.aax2388>
97. Zhan Y, Pang Z, Du Y, Wang W, Yang Y, Wang W, et al. NS1-based DNA vaccination confers mouse protective immunity against ZIKV challenge. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2020 Nov;85:104521. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S156713482030352X>

98. Bailey MJ, Duehr J, Dulin H, Broecker F, Brown JA, Arumemi FO, et al. Human antibodies targeting Zika virus NS1 provide protection against disease in a mouse model. *Nat Commun* [Internet]. 2018 Dec 1;9(1):4560. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41467-018-07008-0>
99. Li A, Yu J, Lu M, Ma Y, Attia Z, Shan C, et al. A Zika virus vaccine expressing premembrane-envelope-NS1 polyprotein. *Nat Commun* [Internet]. 2018 Dec 3;9(1):3067. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41467-018-05276-4>
100. Brault AC, Domi A, McDonald EM, Talmi-Frank D, McCurley N, Basu R, et al. A Zika Vaccine Targeting NS1 Protein Protects Immunocompetent Adult Mice in a Lethal Challenge Model. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Dec 7;7(1):14769. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-15039-8>
101. Cugola FR, Fernandes IR, Russo FB, Freitas BC, Dias JLM, Guimarães KP, et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature* [Internet]. 2016 May 11; Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature18296>
102. Parker JM, Guo D, Hodges RS. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry* [Internet]. 1986 Sep 23;25(19):5425–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2430611>
103. Lundegaard C, Lamberth K, Harndahl M, Buus S, Lund O, Nielsen M. NetMHC-3.0: accurate web accessible predictions of human, mouse and monkey MHC class I affinities for peptides of length 8–11. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2008 Jul 1;36(suppl_2):W509–12. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkn202>
104. Moutaftsi M, Peters B, Pasquetto V, Tschärke DC, Sidney J, Bui H-H, et al. A consensus epitope prediction approach identifies the breadth of murine T(CD8+)-cell responses to vaccinia virus. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2006 Jul;24(7):817–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16767078>
105. Krieger E, Vriend G. YASARA View - molecular graphics for all devices - from smartphones to workstations. *Bioinformatics* [Internet]. 2014 Oct 15;30(20):2981–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24996895>
106. Haste Andersen P, Nielsen M, Lund O. Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein 3D structures. *Protein Sci* [Internet]. 2006 Nov;15(11):2558–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17001032>
107. Diniz MO, Cariri FAMO, Aps LRMM, Ferreira LCS. Enhanced Therapeutic Effects Conferred by an Experimental DNA Vaccine Targeting Human Papillomavirus-Induced Tumors. *Hum Gene Ther* [Internet]. 2013

- Oct;24(10):861–70. Available from:
<http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/hum.2013.102>
108. Sambrook J, W Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harb Lab Press Cold Spring Harb NY [Internet]. 2001;999. Available from:
<http://books.google.com/books?id=YTxKwWUiBeUC&printsec=frontcover%5Cnpapers2://publication/uuid/BBBF5563-6091-40C6-8B14-06ACC3392EBB>
 109. Amorim JH, Porchia BFMM, Balan A, Cavalcante RCM, da Costa SM, de Barcelos Alves AM, et al. Refolded dengue virus type 2 NS1 protein expressed in *Escherichia coli* preserves structural and immunological properties of the native protein. *J Virol Methods*. 2010;167(2):186–92.
 110. Maeda DLNF, Batista MT, Pereira LR, de Jesus Cintra M, Amorim JH, Mathias-Santos C, et al. Adjuvant-Mediated Epitope Specificity and Enhanced Neutralizing Activity of Antibodies Targeting Dengue Virus Envelope Protein. *Front Immunol* [Internet]. 2017 Sep 25;8. Available from:
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.01175/full>
 111. Braga CJM, Rodrigues JF, Medina-Armenteros Y, Farinha-Arcieri LE, Ventura AM, Boscardin SB, et al. Parenteral Adjuvant Effects of an Enterotoxigenic *Escherichia coli* Natural Heat-Labile Toxin Variant. *Front Immunol* [Internet]. 2014;4. Available from:
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2013.00487/abstract>
 112. Whitmore L, Wallace BA. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2004 Jul 1;32(Web Server):W668–73. Available from:
<https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkh371>
 113. Sreerama N, Venyaminov SY, Woody RW. Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Inclusion of Denatured Proteins with Native Proteins in the Analysis. *Anal Biochem* [Internet]. 2000 Dec;287(2):243–51. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269700948796>
 114. Srivastava AK, Putnak JR, Lee SH, Hong SP, Moon SB, Barvir DA, et al. A purified inactivated Japanese encephalitis virus vaccine made in vero cells. *Vaccine* [Internet]. 2001 Aug;19(31):4557–65. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X01002080>
 115. Shan C, Muruato AE, Nunes BTD, Luo H, Xie X, Medeiros DBA, et al. A live-attenuated Zika virus vaccine candidate induces sterilizing immunity in mouse models. *Nat Med* [Internet]. 2017 Apr 10;23(6):763–7. Available from:
<http://www.nature.com/doi/10.1038/nm.4322>
 116. Alves RP dos S, Pereira L, Fabris DLN, Salvador FS, Santos RA, Zanotto PM de A, et al. Production of a recombinant Dengue virus 2 NS5 protein and the potential use as a vaccine antigen. *Clin Vaccine Immunol* [Internet]. 2016 Mar

- 30;CVI.00081-16. Available from:
<http://cvi.asm.org/lookup/doi/10.1128/CVI.00081-16>
117. Aliota MT, Caine EA, Walker EC, Larkin KE, Camacho E, Osorio JE. Characterization of Lethal Zika Virus Infection in AG129 Mice. Harris E, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2016 Apr 19;10(4):e0004682. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0004682>
 118. Oliveira DBL, Durigon GS, Mendes ÉA, Ladner JT, Andreato-Santos R, Araujo DB, et al. Persistence and intra-host genetic evolution of zika virus infection in symptomatic adults: A special view in the male reproductive system. *Viruses* [Internet]. 2018 Nov;10(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30405055/>
 119. Wagner D, de With K, Huzly D, Hufert F, Weidmann M, Breisinger S, et al. Nosocomial Acquisition of Dengue. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2004 Oct;10(10):1872–3. Available from: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/10/10/03-1037_article.htm
 120. DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics* [Internet]. 1988 Sep;44(3):837–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3203132>
 121. Rosa da Silva CM, Chura-Chambi RM, Ramos Pereira L, Cordeiro Y, de Souza Ferreira LC, Morganti L. Association of high pressure and alkaline condition for solubilization of inclusion bodies and refolding of the NS1 protein from zika virus. *BMC Biotechnol* [Internet]. 2018 Dec 12;18(1):78. Available from: <https://bmcbiotechnol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12896-018-0486-2>
 122. Pereira LR, Alves RP dos S, Sales NS, Andreato-Santos R, Venceslau-Carvalho AA, Pereira SS, et al. Enhanced Immune Responses and Protective Immunity to Zika Virus Induced by a DNA Vaccine Encoding a Chimeric NS1 Fused With Type 1 Herpes Virus gD Protein. *Front Med Technol* [Internet]. 2020 Dec 3;2. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmedt.2020.604160/full>
 123. Balmaseda A, Zambrana JV, Collado D, García N, Saborío S, Elizondo D, et al. Comparison of Four Serological Methods and Two Reverse Transcription-PCR Assays for Diagnosis and Surveillance of Zika Virus Infection. Tang Y-W, editor. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2018 Jan 5;56(3):e01785-17. Available from: <http://jcm.asm.org/lookup/doi/10.1128/JCM.01785-17>
 124. Huzly D, Hanselmann I, Schmidt-Chanasit J, Panning M. High specificity of a novel Zika virus ELISA in European patients after exposure to different flaviviruses. *Eurosurveillance* [Internet]. 2016 Apr 21;21(16):30203. Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=21450>
 125. Liu X, Qu L, Ye X, Yi C, Zheng X, Hao M, et al. Incorporation of NS1 and prM/M are important to confer effective protection of adenovirus-vectored Zika

- virus vaccine carrying E protein. *npj Vaccines* [Internet]. 2018 Dec 24;3(1):29. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41541-018-0072-6>
126. Yamaguchi H, Miyazaki M. Refolding techniques for recovering biologically active recombinant proteins from inclusion bodies. *Biomolecules* [Internet]. 2014;4(1):235–51. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4030991&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 127. De Bernardez Clark E. Refolding of recombinant proteins. *Curr Opin Biotechnol*. 1998;9(2):157–63.
 128. Perrett S, Zhou JM. Expanding the pressure technique: Insights into protein folding from combined use of pressure and chemical denaturants. *Biochim Biophys Acta - Protein Struct Mol Enzymol*. 2002;1595(1–2):210–23.
 129. Mozhaev V V, Heremans K, Frank J, Masson P, Balny C. High pressure effects on protein structure and function. *Proteins*. 1996;24(1):81–91.
 130. Rodrigues D, Farinha-Arcieri LE, Ventura AM, Chura-Chambi RM, Malavasi N V., Lemke LS, et al. Effect of pressure on refolding of recombinant pentameric cholera toxin B. *J Biotechnol*. 2014;173(1):98–105.
 131. Sen P, Ahmad B, Khan RH. Formation of a molten globule like state in bovine serum albumin at alkaline pH. *Eur Biophys J* [Internet]. 2008 Oct 8;37(8):1303–8. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00249-008-0335-7>
 132. Singh SM, Upadhyay AK, Panda AK. Solubilization at high pH results in improved recovery of proteins from inclusion bodies of *E. coli*. *J Chem Technol Biotechnol* [Internet]. 2008 Aug;83(8):1126–34. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.1945>
 133. Chura-Chambi RM, Cordeiro Y, Malavasi NV, Lemke LS, Rodrigues D, Morganti L. An analysis of the factors that affect the dissociation of inclusion bodies and the refolding of endostatin under high pressure. *Process Biochem* [Internet]. 2013 Feb;48(2):250–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511312004588>
 134. Malavasi N V., Foguel D, Bonafe CFS, Braga C a C a, Chura-Chambi RM, Vieira JM, et al. Protein refolding at high pressure: Optimization using eGFP as a model. *Process Biochem* [Internet]. 2011;46(2):512–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2010.10.002>
 135. Bajorunaite E, Sereikaite J, Bumelis VA. L-arginine suppresses aggregation of recombinant growth hormones in refolding process from *E. coli* inclusion bodies. *Protein J*. 2007;26(8):547–55.
 136. Tsumoto K, Umetsu M, Kumagai I, Ejima D, Philo JS, Arakawa T. Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification. *Biotechnol Prog*. 2004;20(5):1301–8.

137. Chen J, Liu Y, Wang Y, Ding H, Su Z. Different effects of L-arginine on protein refolding: Suppressing aggregates of hydrophobic interaction, not covalent binding. *Biotechnol Prog* [Internet]. 2008 Nov;24(6):1365–72. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/btpr.93>
138. Wang SS-S, Chang C-K, Peng M-J, Liu H-S. Effect of Glutathione Redox System on Lysozyme Refolding in Size Exclusion Chromatography. *Food Bioprod Process* [Internet]. 2006 Mar;84(1):18–27. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960308506705119>
139. Xu X, Song H, Qi J, Liu Y, Wang H, Su C, et al. Contribution of intertwined loop to membrane association revealed by Zika virus full-length NS1 structure. *EMBO J* [Internet]. 2016 Oct 17;35(20):2170–8. Available from: <http://emboj.embopress.org/lookup/doi/10.15252/emboj.201695290>
140. Athmaram TN, Saraswat S, Misra P, Shrivastava S, Singh AK, Verma SK, et al. Optimization of Dengue-3 recombinant NS1 protein expression in *E. coli* and in vitro refolding for diagnostic applications. *Virus Genes*. 2013;46(2):219–30.
141. Sahdev S, Khattar SK, Saini KS. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: A review of the existing biotechnology strategies. *Mol Cell Biochem*. 2008;307(1–2):249–64.
142. Baneyx F, Mujacic M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol*. 2004;22(11):1399–408.
143. Song H, Qi J, Haywood J, Shi Y, Gao GF. Zika virus NS1 structure reveals diversity of electrostatic surfaces among flaviviruses. *Nat Struct Mol Biol* [Internet]. 2016 Apr 18;23(5):456–8. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nsmb.3213>
144. Freire MCLC, Pol-Fachin L, Coêlho DF, Viana IFT, Magalhães T, Cordeiro MT, et al. Mapping Putative B-Cell Zika Virus NS1 Epitopes Provides Molecular Basis for Anti-NS1 Antibody Discrimination between Zika and Dengue Viruses. *ACS Omega* [Internet]. 2017 Jul 31;2(7):3913–20. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.7b00608>
145. Tripathi NK. Production and Purification of Recombinant Proteins from *Escherichia coli*. *ChemBioEng Rev* [Internet]. 2016 Jun;3(3):116–33. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cben.201600002>
146. Huang JL, Huang JH, Shyu RH, Teng CW, Lin YL, Kuo MD, et al. High-level expression of recombinant dengue viral NS-1 protein and its potential use as a diagnostic antigen. *J Med Virol*. 2001;65(3):553–60.
147. Kao Y-S, Yu C-Y, Huang H-J, Tien S-M, Wang W-Y, Yang M, et al. Combination of Modified NS1 and NS3 as a Novel Vaccine Strategy against Dengue Virus Infection. *J Immunol* [Internet]. 2019 Oct 1;203(7):1909–17. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1900136>

148. Tsumoto K, Ejima D, Kumagai I, Arakawa T. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expr Purif* [Internet]. 2003 Mar;28(1):1–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046592802006411>
149. Singh SM, Panda AK. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioeng* [Internet]. 2005 Apr;99(4):303–10. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389172305703728>
150. Patra AK, Mukhopadhyay R, Mukhija R, Krishnan A, Garg L., Panda AK. Optimization of Inclusion Body Solubilization and Renaturation of Recombinant Human Growth Hormone from *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* [Internet]. 2000 Mar;18(2):182–92. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046592899911798>
151. Wang Q, Liu Y, Zhang C, Guo F, Feng C, Li X, et al. High hydrostatic pressure enables almost 100% refolding of recombinant human ciliary neurotrophic factor from inclusion bodies at high concentration. *Protein Expr Purif* [Internet]. 2017 May;133:152–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046592817300281>
152. Chura-Chambi RM, da Silva CMR, Pereira LR, Bartolini P, Ferreira LC de S, Morganti L. Protein refolding based on high hydrostatic pressure and alkaline pH: Application on a recombinant dengue virus NS1 protein. Sahoo MK, editor. *PLoS One* [Internet]. 2019 Jan 25;14(1):e0211162. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0211162>
153. Kanno AI, Leite LC de C, Pereira LR, de Jesus MJR, Andreato-Santos R, Alves RP dos S, et al. Optimization and scale-up production of Zika virus Δ NS1 in *Escherichia coli*: application of Response Surface Methodology. *AMB Express* [Internet]. 2020;10(1):1. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31893321/>
154. Wan S-W, Lin C-F, Chen M-C, Lei H-Y, Liu H-S, Yeh T-M, et al. C-Terminal Region of Dengue Virus Nonstructural Protein 1 Is Involved in Endothelial Cell Cross-Reactivity via Molecular Mimicry. *Am J Infect Dis*. 2008;4(1):85–91.
155. Yee L, Blanch HW. Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnology (N Y)* [Internet]. 1992 Dec;10(12):1550–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1369204>
156. Einsfeldt K, Severo Júnior JB, Corrêa Argondizzo AP, Medeiros MA, Alves TLM, Almeida RV, et al. Cloning and expression of protease ClpP from *Streptococcus pneumoniae* in *Escherichia coli*: study of the influence of kanamycin and IPTG concentration on cell growth, recombinant protein production and plasmid stability. *Vaccine* [Internet]. 2011 Sep 22;29(41):7136–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21651937>
157. Osadská M, Boňková H, Krahulec J, Stuchlík S, Turňa J. Optimization of

- expression of untagged and histidine-tagged human recombinant thrombin precursors in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2014 Nov;98(22):9259–70. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-014-5840-2>
158. Zamani M, Berenjian A, Hemmati S, Nezafat N, Ghoshoon MB, Dabbagh F, et al. Cloning, Expression, and Purification of a Synthetic Human Growth Hormone in *Escherichia coli* Using Response Surface Methodology. *Mol Biotechnol* [Internet]. 2015 Mar 8;57(3):241–50. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12033-014-9818-1>
 159. Amorim JH, Porchia BFMM, Balan A, Cavalcante RCM, da Costa SM, de Barcelos Alves AM, et al. Refolded dengue virus type 2 NS1 protein expressed in *Escherichia coli* preserves structural and immunological properties of the native protein. *J Virol Methods* [Internet]. 2010;167(2):186–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20399232>
 160. Villabona-Arenas CJ, de Oliveira JL, de Sousa-Capra C, Balarini K, Pereira da Fonseca CRT, Zanotto PM de A. Epidemiological dynamics of an urban Dengue 4 outbreak in São Paulo, Brazil. *PeerJ* [Internet]. 2016 Apr 5;4:e1892. Available from: <https://peerj.com/articles/1892>
 161. Noureldin MS, el-Shinnawy H, Abou Elenin A. Serum pretreatment with *Schistosoma mansoni* antigens for serological diagnosis of fascioliasis. *J Egypt Soc Parasitol* [Internet]. 2000 Apr;30(1):157–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10786027>
 162. Magnarelli LA, Miller JN, Anderson JF, Riviere GR. Cross-reactivity of nonspecific treponemal antibody in serologic tests for Lyme disease. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1990 Jun;28(6):1276–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2380356>
 163. Rocha L, Alves R, Caetano B, Pereira L, Mitsunari T, Amorim J, et al. Epitope Sequences in Dengue Virus NS1 Protein Identified by Monoclonal Antibodies. *Antibodies* [Internet]. 2017 Oct 15;6(4):14. Available from: <http://www.mdpi.com/2073-4468/6/4/14>
 164. Pereira SS, Andreato-Santos R, Pereira LR, Soares CP, Félix AC, de Andrade P de MJC, et al. NS1-based ELISA test efficiently detects dengue infections without cross-reactivity with Zika virus. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2021 Nov;112:202–4. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1201971221007190>
 165. Pierson TC, Fremont DH, Kuhn RJ, Diamond MS. Structural Insights into the Mechanisms of Antibody-Mediated Neutralization of Flavivirus Infection: Implications for Vaccine Development. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2008 Sep;4(3):229–38. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931312808002606>
 166. Slon Campos JL, Mongkolsapaya J, Screaton GR. The immune response against

- flaviviruses. *Nat Immunol* [Internet]. 2018 Nov 17;19(11):1189–98. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41590-018-0210-3>
167. Amorim JH, Alves RPDS, Boscardin SB, Ferreira LCDS. The dengue virus non-structural 1 protein: Risks and benefits. *Virus Res* [Internet]. 2014;181:53–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2014.01.001>
 168. Henriques HR, Rampazo E V, Gonçalves AJS, Vicentin ECM, Amorim JH, Panatieri RH, et al. Targeting the Non-structural Protein 1 from Dengue Virus to a Dendritic Cell Population Confers Protective Immunity to Lethal Virus Challenge. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(7):233008648–903079.
 169. Zmurko J, Marques RE, Schols D, Verbeken E, Kaptein SJF, Neyts J. The Viral Polymerase Inhibitor 7-Deaza-2'-C-Methyladenosine Is a Potent Inhibitor of In Vitro Zika Virus Replication and Delays Disease Progression in a Robust Mouse Infection Model. Powers AM, editor. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2016 May 10;10(5):e0004695. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0004695>
 170. Lasaro MO, Diniz MO, Reyes-Sandoval A, Ertl HC, Ferreira LCS. Anti-tumor DNA vaccines based on the expression of human papillomavirus-16 E6/E7 oncoproteins genetically fused with the glycoprotein D from herpes simplex virus-1. *Microbes Infect* [Internet]. 2005 Dec;7(15):1541–50. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1286457905002443>
 171. Porchia BFMM, Moreno ACR, Ramos RN, Diniz MO, de Andrade LHTM, Rosa DS, et al. Herpes Simplex Virus Glycoprotein D Targets a Specific Dendritic Cell Subset and Improves the Performance of Vaccines to Human Papillomavirus-Associated Tumors. *Mol Cancer Ther* [Internet]. 2017 Sep;16(9):1922–33. Available from: <http://mct.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1535-7163.MCT-17-0071>
 172. Connolly SA, Jackson JO, Jardetzky TS, Longnecker R. Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2011 May 11;9(5):369–81. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrmicro2548>
 173. Lasaro MO, Tatsis N, Hensley SE, Whitbeck JC, Lin S-W, Rux JJ, et al. Targeting of antigen to the herpesvirus entry mediator augments primary adaptive immune responses. *Nat Med* [Internet]. 2008 Feb 13;14(2):205–12. Available from: <http://www.nature.com/articles/nm1704>
 174. Porchia BFMM, Diniz MO, Cariri F a MO, Santana VC, Amorim JH, Balan A, et al. Purified herpes simplex type 1 glycoprotein D (gD) genetically fused with the type 16 human papillomavirus E7 oncoprotein enhances antigen-specific CD8 + T cell responses and confers protective antitumor immunity. *Mol Pharm*. 2011;8(6):2320–30.
 175. Elong Ngono A, Vizcarra EA, Tang WW, Sheets N, Joo Y, Kim K, et al. Mapping and Role of the CD8 + T Cell Response During Primary Zika Virus

- Infection in Mice. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2017 Jan;21(1):35–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2016.12.010><http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2016.12.010>
176. Caine E, Jagger B, Diamond M. Animal Models of Zika Virus Infection during Pregnancy. *Viruses* [Internet]. 2018 Oct 31;10(11):598. Available from: <http://www.mdpi.com/1999-4915/10/11/598>
 177. Miner JJ, Cao B, Govero J, Smith AM, Fernandez E, Cabrera OH, et al. Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise. *Cell* [Internet]. 2016 May;165(5):1081–91. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867416305566>
 178. Subramaniam KS, Lant S, Goodwin L, Grifoni A, Weiskopf D, Turtle L. Two Is Better Than One: Evidence for T-Cell Cross-Protection Between Dengue and Zika and Implications on Vaccine Design. *Front Immunol* [Internet]. 2020 Mar 25;11. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.00517/full>
 179. Pinheiro-Michelsen JR, Souza R da SO, Santana IVR, da Silva P de S, Mendez EC, Luiz WB, et al. Anti-dengue Vaccines: From Development to Clinical Trials. *Front Immunol* [Internet]. 2020 Jun 18;11. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.01252/full>
 180. Stephenson KE, Tan CS, Walsh SR, Hale A, Ansel JL, Kanjilal DG, et al. Safety and immunogenicity of a Zika purified inactivated virus vaccine given via standard, accelerated, or shortened schedules: a single-centre, double-blind, sequential-group, randomised, placebo-controlled, phase 1 trial. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2020 Sep;20(9):1061–70. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309920300852>
 181. Tai W, Chen J, Zhao G, Geng Q, He L, Chen Y, et al. Rational Design of Zika Virus Subunit Vaccine with Enhanced Efficacy. Heise MT, editor. *J Virol* [Internet]. 2019 Sep;93(17). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.02187-18>
 182. Cabral-Miranda G, Lim SM, Mohsen MO, Pobelov I V., Roesti ES, Heath MD, et al. Zika Virus-Derived E-DIII Protein Displayed on Immunologically Optimized VLPs Induces Neutralizing Antibodies without Causing Enhancement of Dengue Virus Infection. *Vaccines* [Internet]. 2019 Jul 23;7(3):72. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-393X/7/3/72>
 183. Braga CJM, Rodrigues JF, Medina-Armenteros Y, Farinha-Arcieri LE, Ventura AM, Boscardin SB, et al. Parenteral Adjuvant Effects of an Enterotoxigenic *Escherichia coli* Natural Heat-Labile Toxin Variant. *Front Immunol* [Internet]. 2014 Jan 7;4:487. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24432018>
 184. PARTIDOS CD, PIZZA M, RAPPUOLI R, STEWARD MW. The adjuvant

- effect of a non-toxic mutant of heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* for the induction of measles virus-specific CTL responses after intranasal co-immunization with a synthetic peptide. *Immunology* [Internet]. 1996 Dec 30;89(4):483–7. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-2567.1996.d01-790.x>
185. dos Santos NFB, da Silva LR, Costa FJMD, de Mattos DM, de Carvalho E, Ferreira LC de S, et al. Immunization with a recombinant BibA surface protein confers immunity and protects mice against group B *Streptococcus* (GBS) vaginal colonization. *Vaccine* [Internet]. 2020 Jul;38(33):5286–96. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X20307313>
 186. López-Camacho C, De Lorenzo G, Slon-Campos JL, Dowall S, Abbink P, Laroocca RA, et al. Immunogenicity and Efficacy of Zika Virus Envelope Domain III in DNA, Protein, and ChAdOx1 Adenoviral-Vectored Vaccines. *Vaccines* [Internet]. 2020 Jun 16;8(2):307. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-393X/8/2/307>
 187. Bailey MJ, Broecker F, Duehr J, Arumemi F, Krammer F, Palese P, et al. Antibodies Elicited by an NS1-Based Vaccine Protect Mice against Zika Virus. Griffin DE, editor. *MBio* [Internet]. 2019 Apr 2;10(2). Available from: <http://mbio.asm.org/lookup/doi/10.1128/mBio.02861-18>
 188. Lin C-F, Lei H-Y, Shiau a.-L, Liu H-S, Yeh T-M, Chen S-H, et al. Endothelial cell apoptosis induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 via production of nitric oxide. *J Immunol* [Internet]. 2002;169(2):657–64. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0037100398&partnerID=40&md5=2b2b8da28d6a4a51d52e8f7575acd3ef>
 189. Chen M-C, Lin C-F, Lei H-Y, Lin S-C, Liu H-S, Yeh T-M, et al. Deletion of the C-terminal region of dengue virus nonstructural protein 1 (NS1) abolishes anti-NS1-mediated platelet dysfunction and bleeding tendency. *J Immunol*. 2009;183(3):1797–803.
 190. Reyes-Sandoval A, Ludert JE. The Dual Role of the Antibody Response Against the Flavivirus Non-structural Protein 1 (NS1) in Protection and Immunopathogenesis. *Front Immunol* [Internet]. 2019 Jul 18;10. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.01651/full>
 191. Longhi MP, Trumpfheller C, Idoyaga J, Caskey M, Matos I, Kluger C, et al. Dendritic cells require a systemic type I interferon response to mature and induce CD4 + Th1 immunity with poly IC as adjuvant. *J Exp Med* [Internet]. 2009 Jul 6;206(7):1589–602. Available from: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20090247>
 192. Nimmerjahn F, Bruhns P, Horiuchi K, Ravetch J V. Fc γ RIV: A Novel FcR with Distinct IgG Subclass Specificity. *Immunity* [Internet]. 2005 Jul;23(1):41–51. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761305002037>
 193. Falconer DJ, Barb AW. Mouse IgG2c Fc loop residues promote greater receptor-

- binding affinity than mouse IgG2b or human IgG1. Permyakov EA, editor. *PLoS One* [Internet]. 2018 Feb 6;13(2):e0192123. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0192123>
194. El Sahly HM, Gorchakov R, Lai L, Natrajan MS, Patel SM, Atmar RL, et al. Clinical, Virologic, and Immunologic Characteristics of Zika Virus Infection in a Cohort of US Patients: Prolonged RNA Detection in Whole Blood. *Open Forum Infect Dis* [Internet]. 2019 Jan 1;6(1). Available from: <https://academic.oup.com/ofid/article/doi/10.1093/ofid/ofy352/5253673>
 195. Waggoner JJ, Roupheal N, Xu Y, Natrajan M, Lai L, Patel SM, et al. Pericarditis Associated With Acute Zika Virus Infection in a Returning Traveler. *Open Forum Infect Dis* [Internet]. 2017 Apr 1;4(2). Available from: <https://academic.oup.com/ofid/article/doi/10.1093/ofid/ofx103/3831307>
 196. Alves dos Santos E, Fink K. Animal Models for Dengue and Zika Vaccine Development. In 2018. p. 215–39. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-981-10-8727-1_16
 197. Lazear HM, Govero J, Smith AM, Platt DJ, Fernandez E, Miner JJ, et al. A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2016 May;19(5):720–30. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931312816301020>
 198. MacGregor RR, Boyer JD, Ugen KE, Lacy KE, Gluckman SJ, Bagarazzi ML, et al. First Human Trial of a DNA-Based Vaccine for Treatment of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection: Safety and Host Response. *J Infect Dis* [Internet]. 1998 Jul 1;178(1):92–100. Available from: <http://jid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1086/515613>
 199. Low L, Mander A, McCann K, Dearnaley D, Tjelle T, Mathiesen I, et al. DNA Vaccination with Electroporation Induces Increased Antibody Responses in Patients with Prostate Cancer. *Hum Gene Ther* [Internet]. 2009 Nov;20(11):1269–78. Available from: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/hum.2009.067>
 200. Sales NS, Silva JR, Aps LRMM, Silva MO, Porchia BFMM, Ferreira LCS, et al. In vivo electroporation enhances vaccine-mediated therapeutic control of human papilloma virus-associated tumors by the activation of multifunctional and effector memory CD8⁺ T cells. *Vaccine* [Internet]. 2017 Dec;35(52):7240–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X17315700>
 201. Steinberg MW, Cheung TC, Ware CF. The signaling networks of the herpesvirus entry mediator (TNFRSF14) in immune regulation. *Immunol Rev* [Internet]. 2011 Nov;244(1):169–87. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-065X.2011.01064.x>
 202. Cheung TC, Steinberg MW, Osborne LM, Macauley MG, Fukuyama S, Sanjo H, et al. Unconventional ligand activation of herpesvirus entry mediator signals cell

- survival. *Proc Natl Acad Sci [Internet]*. 2009 Apr 14;106(15):6244–9. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0902115106>
203. Reske A, Pollara G, Krummenacher C, Chain BM, Katz DR. Understanding HSV-1 entry glycoproteins. *Rev Med Virol [Internet]*. 2007 May;17(3):205–15. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/rmv.531>

APÊNDICES E ANEXOS

APÊNDICE A – Súmula Curricular

LENNON RAMOS PEREIRA

1- Formação

Ano	Título	Instituição
2010	Técnico em Informática	Instituto Federal da Bahia/IFBA (Eunápolis, Bahia)
2014	Biomédico (Habilitação em Análises Clínicas e Microbiologia)	Universidade Estadual de Santa Cruz/UESC (Ilhéus, Bahia)
2016	Mestre em Ciências (Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro)	Universidade de São Paulo/USP (São Paulo, SP)
Atual	Doutorado em Ciências (Microbiologia)	Universidade de São Paulo/USP (São Paulo, SP)

2- Histórico profissional

2.1. Estágios

- **BEPE/FAPESP**

Laboratório de Virologia Experimental da University Medical Center Groningen (UMCG)/University of Groningen.

Supervisores: Dra. Jolanda M. Smit e Dra. Izabela Rodenhuis-Zybert.

Período: 01/03/2020 até 28/02/2021. Groningen, The Netherlands.

- **Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE)**

Disciplina: BACTERIOLOGIA (BMM 0584) – Curso de Biomedicina – Instituto de Ciências Biomédicas/USP.

- **Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas/ICB/USP**

Supervisor: Dra. Luís Carlos de Souza Ferreira.

Período: 2013 até 2013. São Paulo, São Paulo.

- **Laboratório de Imunologia/Centro de Biotecnologia e Genética/UESC**

Supervisor: Dra. Carla Cristina Romano.

Período: 2011 até 2013. Ilhéus, Bahia.

2.2. Aulas/Palestras

- Ministrou a aula “Prática de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)” no evento Dia de Práticas e Habilidades Biomédicas da Faculdades Metropolitanas Unidas – FMU. São Paulo/SP. 2017

- Ministrou a aula intitulada “Vírus emergentes e reemergentes” na disciplina do Programa de Pós-Graduação em Biologia e Biotecnologia de Microrganismos (PPGGBM). Universidade Estadual de Santa Cruz/UESC. 24 a 26 de outubro de 2016.

- Ministrou a palestra “Flavivirus do novo mundo: Desafios no diagnóstico” no Encontro de Biomedicina do Sul da Bahia. Universidade Estadual de Santa Cruz/UESC. 2016.

• Participou da mesa redonda intitulada “Biomédicos no enfrentamento de endemias”. Encontro de Biomedicina do Sul da Bahia. Universidade Estadual de Santa Cruz/UESC. 2016.

3- Publicações (total de 21)

- 1) PEREIRA, S. S.; ANDREATA-SANTOS, R.; **PEREIRA, L. R.**; SOARES, C. P.; FÉLIX, A. C.; ANDRADE, P. M. J. C.; DURIGON, E. L.; ROMANO, C. M.; FERREIRA, L. C. S. NS1-based ELISA capable of efficiently distinguishing DENV and ZIKV infections. *International Journal of Infectious Diseases*. 2021.
- 2) VENCESLAU-CARVALHO, A. A.; FAVARO, M. T. P.; **PEREIRA, L. R.**; RODRIGUES-JESUS, M. J.; PEREIRA, S. S.; ALVES, R. P. S.; ANDREATA-SANTOS, ROBERT; ALVES, R. P. S.; AMARANTE, M. F.; RODRIGUES, K. B.; SILVA, J. R.; MACHADO, R. R. G.; CUNHA, M. P.; ZANOTTO, P. M. A.; Fotorand, W. L.; WUNDERLICH, G.; DURIGON, E. L.; FERREIRA, L. C. S. Nano-multilamellar lipid vesicles loaded with a recombinant 203ormo f the chikungunya virus E2 protein improve the induction of virus-neutralizing antibodies. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*. 2021.
- 3) FAVARO, M. T. P.; RODRIGUES-JESUS, M. J.; VENCESLAU-CARVALHO, A. A.; ALVES, R. P. S.; **PEREIRA, L. R.**; PEREIRA, S. S.; ANDREATA-SANTOS, ROBERT; FERREIRA, L. C. S.; Nanovaccine based on self-assembling nonstructural protein 1 boosts antibody responses to Zika virus. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*, v. 32, p. 102334, 2021.
- 4) **PEREIRA, L. R.**; ALVES, R. P. S.; SALES, N. S.; ANDREATA-SANTOS, R.; VENCESLAU-CARVALHO, A. A.; PEREIRA, S. S., CASTRO-AMARANTE, M. F.; RODRIGUES-JESUS, M. J.; FAVARO, M. T. P.; CHURA-CHAMBI, R. M.; MORGANTI, L.; FERREIRA, L. C. S. Enhanced Immune Responses and Protective Immunity to Zika Virus Induced by a DNA Vaccine Encoding a Chimeric NS1 Fused With Type 1 Herpes Virus gD Protein. *Frontiers in Medical Technology*. 2020.
- 5) **PEREIRA, L. R.**; VICENTIN, E. C. M.; PEREIRA, S. A.; MAEDA, D. L. N. F.; ALVES, R. P. S.; ANDREATA-SANTOS, R.; SOUSA, F. T. G.; YAMAMOTO, M. M.; CASTRO-AMARANTE, M. F.; FAVARO, M. T. P.; ROMANO, C. M.; SABINO, E. C.; BOSCARDIN, S. B.; FERREIRA, L. C. S.. Intradermal Delivery of Dendritic Cell-Targeting Chimeric mAbs Genetically Fused to Type 2 Dengue Virus Nonstructural Protein 1. *Vaccines*, v. 8, p. 565, 2020.
- 6) ARAUJO, S. C.; **PEREIRA, L. R.**; ALVES, R. P. S.; ANDREATA-SANTOS, R.; KANNO, A. I.; FERREIRA, L. C. S. ; GONÇALVES, V. M. . Anti-Flavivirus Vaccines: Review of the Present Situation and Perspectives of Subunit Vaccines Produced in *Escherichia coli*. *Vaccines*, v. 8, p. 492, 2020.
- 7) ALVES, R. P. S.; ANDREATA-SANTOS, R.; DE FREITAS, C. L.; **PEREIRA, L. R.**; FABRIS-MAEDA, D. L. N.; RODRIGUES-JESUS, M. J.; PEREIRA, S. S.; CARVALHO, A. A. V. B.; SALES, N. S.; PERON, J. P. S.; AMORIM, J. H.; FERREIRA, L. C. S. Protective Immunity to Dengue Virus Induced by DNA Vaccines Encoding Nonstructural Proteins in a Lethal Challenge Immunocompetent Mouse Model. *Frontiers in Medical Technology*, v. 2, p. 558984, 2020.
- 8) KAI, C.; MADI, R. A. S.; ASTRAY, R.; GOULART, E.; CAIRES-JUNIOR, L. C.; MITSUGI, T. G.; MORENO, A. C. R.; CASTRO-AMARANTE, M. F.; **PEREIRA, L. R.**; PORCHIA, B. F. M. M.; ANDRADE, T. O.; LANDINI, V.; SANCHES, D. S.; PIRES, C. G.; TANIOKA, R. K. O.; PEREIRA, M. C.L. ; BARBOSA, I. N.; MASSOCO, C. O. ; FERREIRA, L. C. S.; OKAMOTO, O. K.; ZATZ, M. Safety, Tumor Reduction, and Clinical Impact of Zika Virus Injection in Dogs with Advanced-Stage Brain Tumors. *MOLECULAR THERAPY*, v. 28, p. 1276-1286, 2020.
- 9) ANDREATA-SANTOS. R.; PEREIRA, S. S.; **PEREIRA, L. R.**; FELIX, A. C.; ROMANO, C. M.; FERREIRA, L. C. S. Specificity of NS1-based Immunochromatographic Tests for Dengue Virus With Regard to the Zika Virus Protein. *Int J Infect Dis*. 2020.V.95:276-278.
- 10) ANDREATA-SANTOS. R.; ALVES, R. P. S.; PEREIRA, S. A.; **PEREIRA, L. R.**; FREITAS, C. L.; PEREIRA, S. S.; VENCESLAU-CARVALHO, A. A.; CASTRO-AMARANTE, M. F.; FAVARO, M. T. P.; MATHIAS-SANTOS, C.; AMORIM, J. H.; FERREIRA, L. C. S. Transcutaneous Administration of Dengue Vaccines. *Viruses*. 2020. V. 6;12(5):514.

- 11) KANNO, A. I.; LEITE, L. C. C.; **PEREIRA, L. R.**; JESUS, M. J. R.; ANDREATA-SANTOS, R.; ALVES, R. P. S.; FERREIRA, L. C. S.; GONÇALVES, V. Optimization and scale-up production of Zika virus [DELTA]NS1 in Escherichia coli: application of Response Surface Methodology. *AMB Express*. 2019.
- 12) CHURA-CHAMBI, R. M.; DA SILVA, C. M. R.; **PEREIRA, L. R.**; BARTOLINI, PAOLO; FERREIRA, L. C. S.; MORGANTI, LIGIA Protein refolding based on high hydrostatic pressure and alkaline pH: Application on a recombinant dengue virus NS1 protein. *PloS One.* , v.14, p.e0211162. 2019.
- 13) DA SILVA, C. M. R.; CHURA-CHAMBI, R. M.; **PEREIRA, L. R.**; CORDEIRO, Y.; FERREIRA, L. C. S.; MORGANTI, LIGIA. Association of high pressure and alkaline condition for solubilization of inclusion bodies and refolding of the NS1 protein from zika virus. *BMC BIOTECHNOLOGY.* , v.18, p.75. 2018.
- 14) CINTRA, M. J.; MAEDA, D. L. N. F.; MATHIAS-SANTOS, CAMILA; **PEREIRA, L. R.**; BARROS, W. L.; FERREIRA, L. C.S.; RODRIGUES, J. F. Impact of Toxin-Specific Antibodies on the Adjuvanticity and Inflammatory Effects Induced by Parenterally Administered Escherichia coli heat-Labile Toxin. *International Journal of Vaccine Research.* , v.3, p.1 – 9. 2018.
- 15) OLIVEIRA, D.; DURIGON, G.; MENDES, E.; LADNER, J.; ANDREATA-SANTOS, R.; ARAUJO, D.; BOTOSSO, V.; PAOLA, N.; NETO, D.; CUNHA, M.; BRACONI, C.; ALVES, R.; JESUS, M.; **PEREIRA, L.**; MELO, S.; MESQUITA, F.; SILVEIRA, V.; THOMAZELLI, L.; FAVORETTO, S.; ALMONFREY, F.; ABDULKADER, R.; GABRILI, J.; TAMBOURGI, D.; OLIVEIRA, S.; PRIETO, K.; WILEY, M.; FERREIRA, L.; SILVA, M.; PALACIOS, G.; ZANOTTO, P.; DURIGON, E.. Persistence and Intra-Host Genetic Evolution of Zika Virus Infection in Symptomatic Adults: A Special View in the Male Reproductive System. *Viruses-Basel.* , v.10, p.615. 2018.
- 16) MAEDA, D. L. N. F.; BATISTA, M. TAVARES; **PEREIRA, L. R.**; CINTRA, M. J.; AMORIM, J. H.; MATHIAS-SANTOS, C; PEREIRA, S. A.; BOSCARDIN, S. B.; SILVA, S. R.; FAQUIM-MAURO, E. L.; SILVEIRA, V. B.; OLIVEIRA, D. B. L.; JOHNSTON, S. A; FERREIRA, L. C. S.; RODRIGUES, J. F. Adjuvant-Mediated Epitope Specificity and Enhanced Neutralizing Activity of Antibodies Targeting Dengue Virus Envelope Protein. *Frontiers in Immunology.* , v.8, p.1175. 2017.
- 17) ROCHA, L.; ALVES, R.; CAETANO, B.; **PEREIRA, L.**; MITSUNARI, T.; AMORIM, J.; POLATTO, J.; BOTOSSO, V.; GALLINA, N.; PALACIOS, R.; PRECIOSO, A.; GRANATO, C.; OLIVEIRA, D.; SILVEIRA, V.; LUZ, D.; FERREIRA, L.; PIAZZA, R. Epitope Sequences in Dengue Virus NS1 Protein Identified by Monoclonal Antibodies. *Antibodies.* , v.6, p.14. 2017.
- 18) MELO, T. A.; SANTOS, T. F.; **PEREIRA, L. R.**; PASSOS, H. M.; REZENDE, R. P.; ROMANO, C. C.. Functional Profile Evaluation of Lactobacillus fermentum TCUESC01: A New Potential Probiotic Strain Isolated during Cocoa Fermentation. *Biomed Research International.* , v.2017, p.1 – 7. 2017.
- 19) OLIVEIRA, D. B.L.; ALMEIDA, F. J.; DURIGON, E. L.; MENDES, E. A.; BRACONI, C. T.; MARCHETTI, I.; ANDREATA-SANTOS, R.; CUNHA, M. P.; ALVES, RÚBENS P. S.; **PEREIRA, L. R.**; MELO, STELLA R.; NETO, DANIEL F.L.; MESQUITA, FLÁVIO S.; ARAUJO, DANIELLE B.; FAVORETTO, SILVANA R.; SÁFADI, MARCO A.P.; FERREIRA, LUÍS C.S.; ZANOTTO, PAOLO M.A.; BOTOSSO, V. F.; BEREZIN, E. N. Prolonged Shedding of Zika Virus Associated with Congenital Infection. *NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE*, v.375, p.1202 – 1204. 2016.
- 20) AMORIM, J. H.; ALVES, RÚBENS P. S.; BIZERRA, R.; PEREIRA, S. A.; **PEREIRA, L. R.**; FABRIS, D. L. N.; SANTOS, R. A.; ROMANO, CAMILA MALTA; DE SOUZA FERREIRA, LUÍS CARLOS. Antibodies are not required to a protective immune response against dengue virus elicited in a mouse encephalitis model. *Virology.* , v.487, p.41 – 49. 2016.
- 21) ALVES, R. P. S.; **PEREIRA, L.**; FABRIS, D. L. N.; SALVADOR, F. S.; SANTOS, R. A.; ZANOTTO, P. M. A.; ROMANO, C. M.; AMORIM, J. H.; FERREIRA, L. C. S. Production of a recombinant Dengue virus 2 NS5 protein and the potential use as a vaccine antigen. *Clinical and Vaccine Immunology.* 2016.

4- Auxílios de pesquisa vigentes

- **Projeto de Doutorado do curso de Pós-graduação em Microbiologia**

Título: “Utilização de proteínas recombinantes do vírus Zika no desenvolvimento de métodos de diagnóstico e aplicações vacinais”

Agência Financiadora: FAPESP (Processo N° 16/05570-8).

Instituição: Universidade de São Paulo / 2016-Atual.

5- Indicadores quantitativos

Artigos publicados em periódicos: 21.

Pedidos de patentes: 2.

Comunicações em eventos: 18.

Índice H: 9

Citações: 261 (Google scholar)

6- Links

- **Página MyCitations (Google Scholar):**

<https://scholar.google.com/citations?user=DhXVwM8AAAAJ&hl=pt-BR&hl=pt-BR>

- **Lattes:**

<http://lattes.cnpq.br/7245701563528320>

- **ORCID:**

<https://orcid.org/0000-0002-8070-7772>

7- Pedidos de Patentes Depositados

- INPI (Processo n°: BR 102016011318-0). Título da Invenção: SEQUÊNCIA DE ÁCIDO NUCLEICO, ANTÍGENO RECOMBINANTE, KITS DE DIAGNÓSTICO, E USOS DOS MESMOS. Inventores: Luís C. de S. Ferreira, Rúbens P. S. Alves, **Lennon R. Pereira** e Robert A. Santos. 2016

- INPI (Processo n°: BR 102018067345-9). Título da Invenção: PROCESS FOR PRODUCING A RECOMBINANT FRAGMENT OF THE C-TERMINAL REGION OF THE FLAVIVIRUS PROTEIN NS1. Luís C. de S. Ferreira, **Lennon R. Pereira**, Mônica J. R. de Jesus, Luciana C. de C. Leite, Alex I. Kanno, Viviane M. Gonçalves. 2018.

8- Prêmios

- 2016 – Destaque em apresentação de pôster 2016 – “Desenvolvimento de formulações vacinais contra a dengue baseadas na proteína não estrutural 1 (NS1) administrada pela via intradérmica”, Instituto de Ciências Biomédicas / Universidade de São Paulo.

- 2012 – Trabalho “Viabilidade de *Lactobacillus fermentum* Isolado da Fermentação do Cacao em Condições que Mimetizam a Fisiologia Gastrointestinal Humana” destaque no I Workshop de Biologia e Biotec., UESC.

9- Outras informações

9.1. Participações em bancas e avaliações de trabalhos

- Membro de Comissão Julgadora do Trabalho de Conclusão de Curso de Ana Carolina M. F. Patta, intitulado “O estado da arte da pesquisa brasileira sobre o Zika vírus” no curso de graduação em Ciências Biológicas. Instituto Federal de São Paulo. São Paulo, SP. 2017.

9.2. Trabalhos apresentados em eventos

- 1) **PEREIRA, L. R.**; CARVALHO, A. A. V. B. ; PEREIRA, S. S. ; CHURA-CHAMBI, R. M. ; CASTRO-AMARANTE, M. F. ; ALVES, R. P. S. ; SANTOS, R. A. ; MORGANTI, LIGIA ; FERREIRA, L. C. S. . Refolding of recombinant EDIII ZIKV protein generated under high pressure conditions preserves antigenicity and immunogenicity in mice. 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
- 2) ARAUJO, SERGIO C. ; **PEREIRA, L. R.** ; GRABARZ, F. ; FIGUEIREDO, D. ; ZANE, L. ; FERREIRA, L. C. S. ; GONCALVES, V. M. . Production and Purification of Domain III Envelope Protein of Zika virus (EDIII) Fused with the solubility Tag FH8: an exemple of solubility increase. 2019. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
- 3) TAVARES, S. P. ; **PEREIRA, L. R.** ; FERREIRA, L. C. S. . Expressão e purificação da proteína recombinante não estrutural 1 (NS1) do vírus Zika para o desenvolvimento de abordagens vacinais.. 2018. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
- 4) GUERRA, G. ; **PEREIRA, L. R.** ; MORENO, A. C. R. ; BALAN, A. . Expression of Permease Periplasmic loops from E. coli ABC Importers for Antibody Production and Inhibition Assays.. 2018. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
- 5) XALEGA, A. L. ; CBERNADINO, T. ; ASTRAY, R. M. ; **PEREIRA, L. R.** ; ALVES, RÚBENS P.S. ; FERREIRA, LUÍS CARLOS DE SOUZA ; FERREIRA, L. ; BOTOSSO, V. F. ; SAC, J. . Immunodetection of Envelope Protein Domain III (EDIII) of Zika Virus.. 2018. (Apresentação de Trabalho/Outra).
- 6) ARAUJO, S. C.; **PEREIRA, L. R.** ; EGUIA, F. A. P. ; CRIVELLENTI, M. C. ; ZANE, L. ; FERREIRA, L. C. S. ; GONCALVES, V. M. . Purification and refolding of EDIII ZIKV from inclusion bodies produced in recombinant Escherichia coli. 2018. (Apresentação de Trabalho/Outra).
- 7) **PEREIRA, L. R.**; VICENTIN, E. C. M. ; ALVES, R. P. S. ; ARAÚJO PEREIRA, SARA ; YAMAMOTO, M. M. ; FABRIS, DENICAR LINA NASCIMENTO ; SANTOS, R. A. ; SILVIA, A. M. M. ; BOSCARDIN, S. B. ; FERREIRA, L. C. S. . Intradermal Delivery of Anti-Dengue Vaccine Formulations Based on the Non-Structural Protein 1 Induce Potent Antigen-Specific Immune Responses. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
- 8) BIZERRA, R. S. P. ; **PEREIRA, L. R.** ; AMORIM, J. H. ; ALVES, R. P. S. ; FERREIRA, L. C. S. . Funcional and immunological features of a recombinant dengue virus nonstructural protein 3 (NS3) helicase domain. 2014. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
- 9) MELO, T. A. ; **PEREIRA, L. R.** ; PASSOS, H. M. ; SANTOS, T. F. ; REZENDE, R. P. ; ROMANO, C. C. . Caracterização do perfil de hidrofobicidade e pH de superfície celular do Lactobacillus plantarum TCUESC02 isolado da fermentação do cacau.. 2013. (Apresentação de Trabalho/Outra).
- 10) ROMANO, C. C. ; PASSOS, H. M. ; **PEREIRA, L. R.** ; SANTOS, T. F. ; MELO, T. . Avaliação in vitro da capacidade de autoagregação e coagregação do Lactobacillus fermentum isolado da fermentação do cacau. 2012. (Apresentação de Trabalho/Outra).
- 11) **PEREIRA, L. R.**; MELO, T. ; ROMANO, C. C. ; SANTOS, T. F. ; PASSOS, H. M. ; REZENDE, R. P. . Avaliação in vitro da capacidade de autoagregação e coagregação do Lactobacillus plantarum isolado da fermentação do cacau. 2012. (Apresentação de Trabalho/Outra).
- 12) PASSOS, H. M. ; **PEREIRA, L. R.** ; MELO, T. ; SANTOS, T. F. ; REZENDE, R. P. ; ROMANO, C. C. . Viabilidade de Lactobacillus fermentum Isolado da Fermentação do Cacau em Condições que Mimetizam a Fisiologia Gastrointestinal Humana. 2012. (Apresentação de Trabalho/Outra).
- 13) MELO, T. A. ; **PEREIRA, L. R.** ; PASSOS, H. M. ; SANTOS, T. F. ; REZENDE, R. P. ; ROMANO, C. C. . Suscetibilidade a antibióticos da cepa de Lactobacillus fermentum isolada durante a fermentação do cacau. 2012. (Apresentação de Trabalho/Outra).
- 14) **PEREIRA, L. R.**. Sreenning de pressão arterial sistêmica em mulheres residentes em uma cidade do sul da Bahia, Brasil. 2012. (Apresentação de Trabalho/Seminário).
- 15) SANTOS, T. F. ; MELO, T. A. ; PASSOS, H. M. ; **PEREIRA, L. R.** ; REZENDE, R. P. ; ROMANO, C. C. . Lactobacillus isolados do cacau estimulam a liberação de IL-10 em células mononucleares humanas.. 2012. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

- 16) MELO, T. A. ; **PEREIRA, L. R.** ; PASSOS, H. M. ; SANTOS, T. F. ; REZENDE, R. P. ; ROMANO, C. C. . Suscetibilidade a antibióticos da cepa de *Lactobacillus plantarum* isolada durante a fermentação do cacau. 2012. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
- 17) **PEREIRA, L. R.;** SANTOS, T. F. ; ROMANO, C. C. . Avaliação preliminar in vitro da capacidade de autoagregação dos *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus plantarum* isolados da fermentação do cacau. 2011. (Apresentação de Trabalho/Seminário).
- 18) L., A. L. ; **PEREIRA, L. R.** ; SANTANA, I. V ; CARVALHO, S. M. S. ; MARIANO, APM ; SANTOS, E. N. . ANÁLISE PARASITOLÓGICA DE HORTALIÇAS, ALFACE E COUVE, EM RESTAURANTES SELF SERVICE NA CIDADE DE ITABUNA E ILHÉUS, BAHIA. 2010. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

APÊNDICE B – Artigos científicos que compõem a tese publicados até o
dotouramento

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Association of high pressure and alkaline condition for solubilization of inclusion bodies and refolding of the NS1 protein from zika virus



Cleide Mara Rosa da Silva¹, Rosa Maria Chura-Chambi¹, Lennon Ramos Pereira², Yraima Cordeiro³, Luís Carlos de Souza Ferreira² and Ligia Morganti^{1*}

Abstract

Background: Proteins in inclusion bodies (IBs) present native-like secondary structures. However, chaotropic agents at denaturing concentrations, which are widely used for IB solubilization and subsequent refolding, unfold these secondary structures. Removal of the chaotropes frequently causes reaggregation and poor recovery of bioactive proteins. High hydrostatic pressure (HHP) and alkaline pH are two conditions that, in the presence of low level of chaotropes, have been described as non-denaturing solubilization agents. In the present study we evaluated the strategy of combination of HHP and alkaline pH on the solubilization of IB using as a model an antigenic form of the zika virus (ZIKV) non-structural 1 (NS1) protein.

Results: Pressure-treatment (2.4 kbar) of NS1-IBs at a pH of 11.0 induced a low degree of NS1 unfolding and led to solubilization of the IBs, mainly into monomers. After dialysis at pH 8.5, NS1 was refolded and formed soluble oligomers. High (up to 68 mg/liter) NS1 concentrations were obtained by solubilization of NS1-IBs at pH 11 in the presence of arginine (Arg) with a final yield of approximately 80% of total protein content. The process proved to be efficient, quick and did not require further purification steps. Refolded NS1 preserved biological features regarding reactivity with antigen-specific antibodies, including sera of ZIKV-infected patients. The method resulted in an increase of approximately 30-fold over conventional IB solubilization-refolding methods.

Conclusions: The present results represent an innovative non-denaturing protein refolding process by means of the concomitant use of HHP and alkaline pH. Application of the reported method allowed the recovery of ZIKV NS1 at a condition that maintained the antigenic properties of the protein.

Keywords: Protein refolding, Inclusion bodies, NS1, Dengue virus and Zika virus, High hydrostatic pressure, Alkaline pH

Background

Inclusion bodies (IBs) are composed of both active and inactive polypeptides. Polypeptides in IBs exhibit both properly folded domains, which account for the native-like structure and misfolded stretches, which are responsible for non-native intermolecular β -sheet organization that supports the IB architecture [1, 2]. The IBs produced by transformed bacteria can thus present a certain percentage of

proteins with native-like structure and even biological activity [3]. The classical recovery of biologically active proteins from IBs involves refolding by solubilization of protein aggregates under denaturing conditions. However, significant reaggregation often occurs once the concentration of the denaturant agent goes below a critical level [4]. A method for reducing reaggregation is the use of a solubilization process that avoids complete denaturation and exposure of the hydrophobic patches, which can be achieved using mild conditions without generation of unfolded domains. As an example of these mild conditions is the utilization of HHP at up to 3 kbar that solubilizes IBs by diminishing

* Correspondence: lmorganti@ipen.br

¹Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, Centro de Biotecnologia, Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, São Paulo 05508-000, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

hydrophobic and electrostatic interactions and does not induce loss of secondary structure [5, 6]. There are some reports about the use of HHP (1–3 kbar) for dissociation of IBs and protein refolding. However, chaotropic reagents are frequently added to improve the efficacy of solubilization, although at lower concentrations than those used in conventional refolding protocols [7–11].

Alkaline pH can solubilize aggregated proteins by electrostatic repulsion, a condition that is less denaturing than high levels of chaotropic reagents [12]. High pH has also been described as a mild technique to solubilize IBs with efficient subsequent refolding. Also, in this case the presence of a denaturing agent at low concentrations (2 M urea) is required for efficient refolding [13–15]. The concomitant use of physical and chemical treatments, i.e., high hydrostatic pressures and alkaline pH, is described in the present study for the solubilization and subsequent refolding of protein aggregates.

ZIKV is a single-stranded RNA virus of the Flaviviridae family [16]. ZIKV genome is composed of 2 non-coding regions (5' and 3') flanking a region encoding a polyprotein that is cleaved into three structural proteins and 7 non-structural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B and NS5) [17]. The NS1 proteins of flavivirus present a molecular mass of 46 to 55 kDa depending on the degree of glycosylation and six intramolecular disulfide bonds [18, 19]. The secondary structure consists of 21 β -sheets and two α -helices and the protein has three distinct domains: a N-terminal β -roll, an epitope-rich wing domain and a C-terminal β -ladder [20]. Flavivirus NS1 are proteins that associate with cell membrane lipids forming homodimers exposed in the membrane of the host cells. Recombinant NS1 produced by mammalian or insect cells are dimers that are converted to monomers by heating but not by SDS treatment [20–22]. Three dimeric NS subunits form soluble hexamers held together by weak hydrophobic interactions, a form that is readily dissociated into dimeric subunits in the presence of SDS [21, 23]. Flavivirus NS1, expressed by recombinant *E. coli*, appears however mainly as a monomer in SDS-PAGE [24–29], even without heating [24, 27].

NS1 is one of the most used markers for the detection of acute or convalescent infection by flaviviruses [22, 30]. This protein is used as an antigen in serological tests and has also interesting features for use in subunit vaccines [31]. Thus, production of a ZIKV NS1 with preserved structural and antigenic features may find different biotechnological applications.

In the present study, we applied HHP and alkaline pH for solubilization of NS1-IBs without chaotrope addition, allowing the efficient refolding of the ZIKV NS1 protein with preserved antigenic properties.

Results

Solubilization of NS1-IB

The first step in establishing an efficient protein refolding protocol is the efficient solubilization of protein aggregates. To determine whether the association of HHP and guanidine hydrochloride (GdnHCl) promote efficient solubilization of ZIKV NS1-IBs, suspensions were submitted to 2.4 kbar for 90 min and to 0.4 kbar for 14 h 30 min (2.4 kbar/0.4 kbar). We used this protocol since we have previously demonstrated that incubation at 2.4 kbar is sufficient for solubilization of aggregates, and incubation at lower pressure levels (0.35–0.7 kbar) is useful since refolding can occur and reaggregation is still impaired [10, 32]. As a control, the suspensions were maintained at atmospheric pressure (1 bar) for 16 h (Fig. 1a). The decrease in light scattering (LS) values at 320 nm, which indicates aggregate solubilization, was more evident for NS1-IB suspensions subjected to high pressure than those kept at 1 bar. The association of HHP with 1 M GdnHCl (at pH 8.5) enabled solubilization of ZIKV NS1-IB, as shown by the decay of more than 90% in LS values. To determine if association of alkaline pH and HHP was also capable to solubilize the NS1-IBs, suspensions were subjected to HHP or at 1 bar at a pH within the range of 7.0 to 12.0. As shown in Fig. 1b, LS decay was evident in suspensions incubated at HHP and at a pH of 10.0 and higher and the decay in LS values was lower for suspensions incubated at 1 bar. Recombinant ZIKV NS1 presents a molecular mass of 44,735 Da. The presence of NS1 band cannot be detected in the supernatants of the suspensions in the SDS-PAGE (Fig. 1c), indicating that dissociation of NS1-IBs at atmospheric pressure was not efficient. The presence of NS1 was observed, however, in the supernatant of the samples subjected to HHP at pH values 10 to 12 (Fig. 1d).

Considering the use of Arg in the refolding process of other proteins [18, 24, 33], we also tested this amino acid for the solubilization of ZIKV NS1. Protein solubilization at pH 10.5 was efficient even in the absence of Arg (Fig. 1e), as expected. However, the presence of this amino acid, even at a lowest concentration (0.1 M), further aided the solubilization of NS1-IBs subjected to high pressure (Fig. 1e).

Analysis of solubilized NS1

Tryptophan (Trp) is an intrinsic fluorescence sensor of protein conformational changes [34]. The ZIKV NS1 contains 14 Trp residues [35]. An intrinsic fluorescence peak with maximum intensity (λ maximum) at a wavelength of approximately 344 nm was described for DENV NS1 in its native conformation, while a wavelength shift to 355 nm was observed for chemical-induced denatured DENV NS1 [24]. To determine the degree of unfolding of ZIKV NS1 generated by treatments to solubilize the IBs, the shifts in the intrinsic fluorescence peaks were monitored. A λ

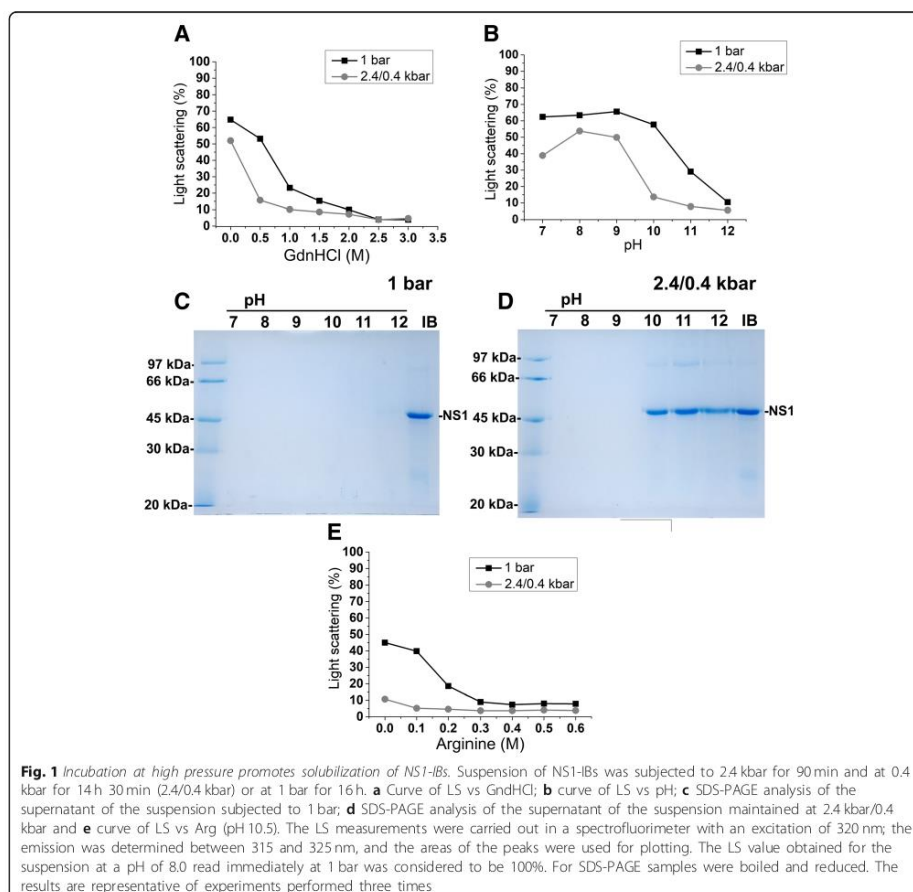
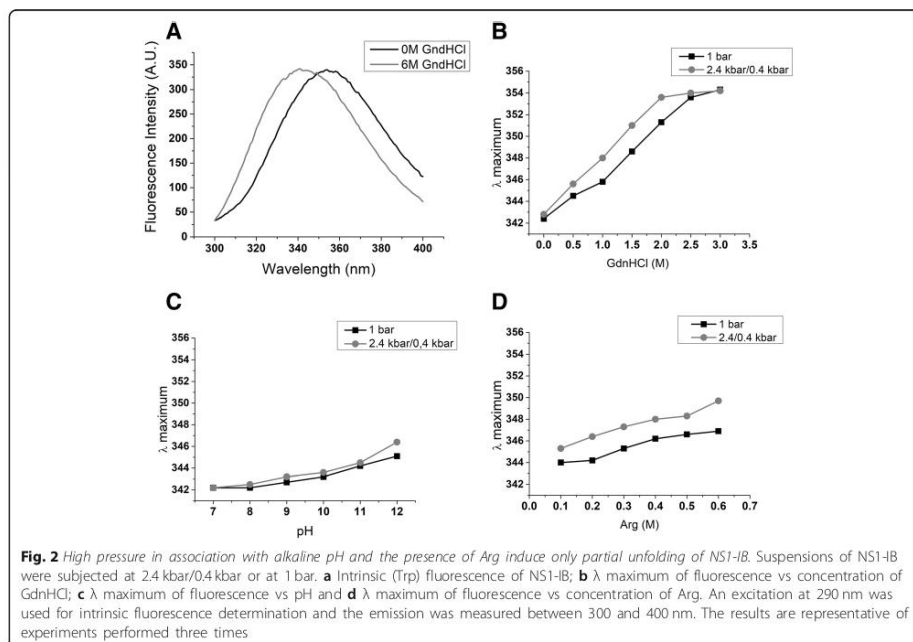


Fig. 1 Incubation at high pressure promotes solubilization of NS1-IBs. Suspension of NS1-IBs was subjected to 2.4 kbar for 90 min and at 0.4 kbar for 14 h 30 min (2.4/0.4 kbar) or at 1 bar for 16 h. **a** Curve of LS vs GdnHCl, **b** curve of LS vs pH, **c** SDS-PAGE analysis of the supernatant of the suspension subjected to 1 bar; **d** SDS-PAGE analysis of the supernatant of the suspension maintained at 2.4 kbar/0.4 kbar and **e** curve of LS vs Arg (pH 10.5). The LS measurements were carried out in a spectrofluorimeter with an excitation of 320 nm; the emission was determined between 315 and 325 nm, and the areas of the peaks were used for plotting. The LS value obtained for the suspension at a pH of 8.0 read immediately at 1 bar was considered to be 100%. For SDS-PAGE samples were boiled and reduced. The results are representative of experiments performed three times

maximum of 342.2 nm was observed for the suspension of NS1-IBs at a pH of 7.0 at 1 bar and a shift of 12.8 nm (to 354.0 nm) was observed when the IBs were denatured by the presence of 6 M GdnHCl (Fig. 2a). The shifts in λ maximum observed for the NS1-IB subjected to HHP in the presence of GdnHCl were more pronounced than the shifts obtained for the samples subjected to compression at alkaline pH (Fig. 2b and c). It is noteworthy that NS1 that was subjected to HHP in the presence of 2 M GdnHCl present a displacement of the λ maximum of 11.4 nm (to 353.6 nm), indicating a high degree of unfolding, while the shift of the samples subjected to HHP at a pH of 11.0 was only 2.3 nm (to 344.5 nm) relative to the untreated suspension (Fig. 2c). A displacement of 5.8 nm

(to 348 nm) was obtained for the λ maximum of NS1-IBs subjected to pressure at a pH of 10.5 in the presence of 0.4 M Arg (Fig. 2d). These results indicate that NS1 solubilization at alkaline pH is accompanied only by partial unfolding.

The analysis of the NS1 protein solubilized at alkaline pH and HHP was also performed by size exclusion chromatography (SEC). The chromatograms of Fig. 3 show the presence of peaks with retention volumes of approximately 8.4 mL, the column exclusion volume, which are probably soluble oligomers of NS1. The peaks presenting retention volumes of approximately 11.5 mL (86.5 kDa according to the linear regression equation obtained for SEC column calibration) are likely dimers, and the peaks



that exhibit elution volumes of approximately 12.8 mL (52.6 kDa according to the linear regression equation) probably corresponding to ZIKV NS1 monomers. The peaks of NS1 solubilized at pH 10.0 in the absence of Arg have lower absorbance intensity than the samples treated with higher pH, suggesting that NS1 solubilization was not complete. Application of HHP to the IBs at pH from 11.0 to 12.5 solubilized the aggregates mainly into dimers and monomers. The presence of Arg contributed to the dissociation of NS1 oligomers. At higher pH, the volume of elution of NS1 monomers was slightly lower. The displacement was most evident at pH 12.0 and 12.5. Our explanation for this phenomenon is that the unfolding of the NS1 protein is higher at a more alkaline pH with increased volume of the protein. Thus, further solubilization attempts were carried out at pH lower than 12.0.

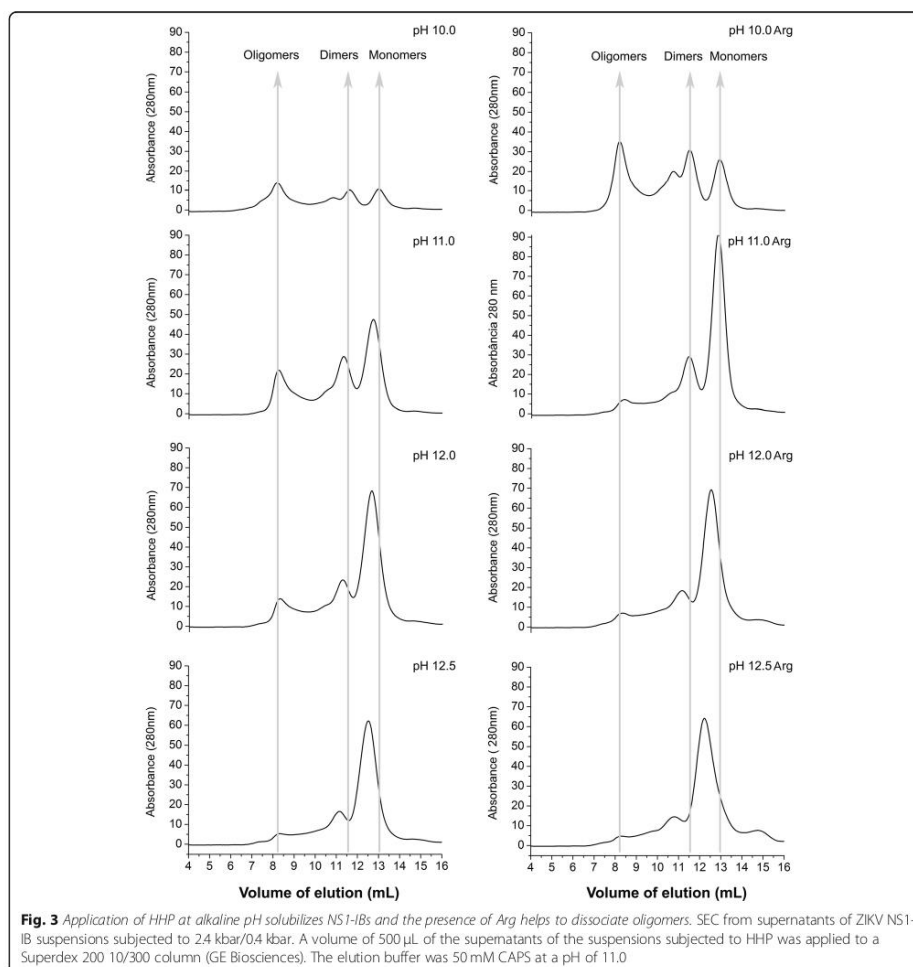
Refolding of NS1

NS1-IB suspensions subjected to HHP under the conditions shown in Figs. 1 and 2 were centrifuged, dialyzed to a lower pH (8.5), and the insoluble aggregates were removed by centrifugation. More than 6-fold higher levels of NS1 were observed for the samples subjected to HHP and alkaline pH than for the samples subjected to

compression in the presence of GdnHCl, indicating lower degree of reaggregation after dialysis (Fig. 4). This result is possibly related to the lower degree of unfolding of these samples.

The supernatant of NS1-IBs subjected to HHP at pH 11.5 and dialysis to a pH of 8.5 was analysed by SEC. To our surprise, the protein eluted as a peak in a volume of 8.1 mL, which corresponds to the void volume of the column and a molecular mass of more than 500 kDa (Fig. 5). This result indicates that dimers/monomers of NS1 self-associated to form soluble oligomers upon dialysis to lower pH. ZIKV NS1 refolded at atmospheric pressure using an established protocol for DENV NS1 [27] was also observed mainly as oligomers in SEC (data not shown). Flavivirus NS1 are dimers that present a hydrophobic surface responsible for membrane association. The hydrophobic surface of ZIKV NS1 dimer is elongated in relation to the hydrophobic surface of West Nile virus NS1 [35]. Therefore, the property of ZIKV NS1 of forming oligomers can possibly be associated with its highly hydrophobic character.

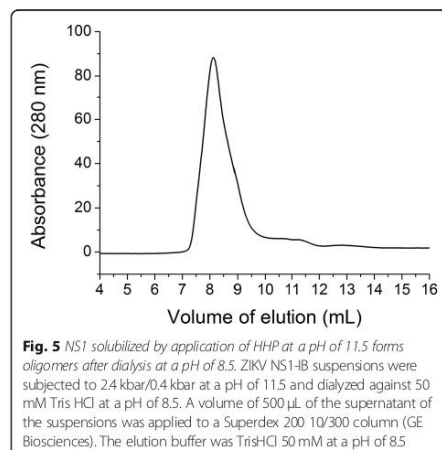
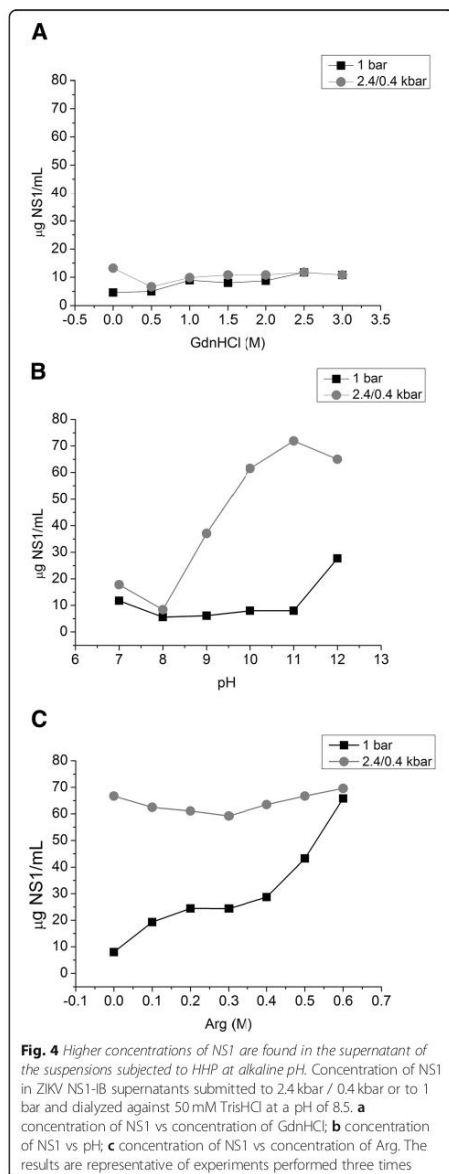
To determine the yield of refolded NS1 after dialysis to pH 8.5, supernatants of the suspensions subjected to HHP were compared to the same volume of the original NS1 IB suspension in SDS-PAGE. Bands with similar intensity



were obtained for soluble NS1 and the protein in the NS1-IBs (Fig. 6a). The NS1 solubilized at HHP and a pH of 11.0 and 11.5 has a yield between 76 and 89% of the protein present in the NS1-IBs. The NS1 obtained was not purified, but it is 90–95% pure, as determined by the analysis of the image shown in the Fig. 6a. This high purity is due to the extensive washing of the NS1-IBs to eliminate soluble bacterial contaminants. The presence of the redox pair reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathiones, which is frequently used to improve the formation

of disulfide bonds in refolding protocols [36] or of the reducing reagent dithiothreitol (DTT) was also analyzed in relation to the refolding at pH 11 in the presence of Arg (Fig. 6a), with similar yields.

The recovery yield of refolded NS1 from IBs subjected to HHP either at pH 11.0 or 11.5 in the presence of 0.4 M arg reached up to 68 mg NS1/ per liter of bacterial culture. Such recovery yield is 27.2-fold higher than the yield (2.5 mg/L) obtained by refolding of NS1-IBs at atmospheric pressure using the protocol established for DENV NS1 refolding [27].



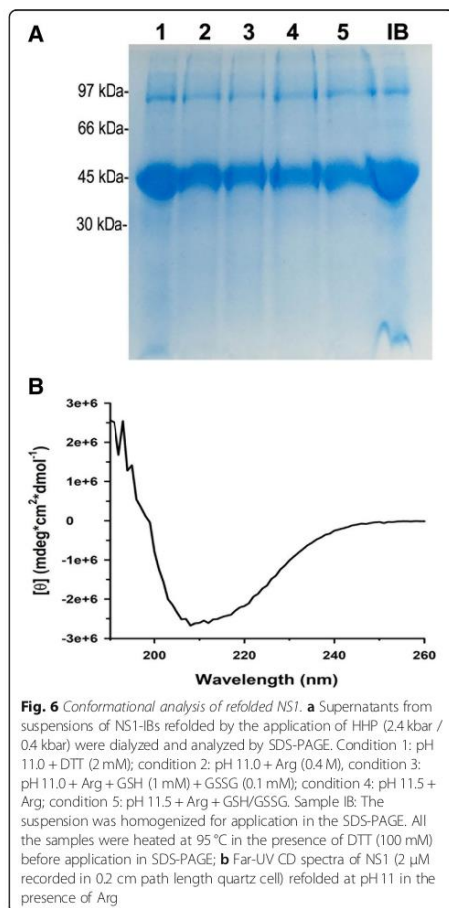
Circular dichroism spectrum (far-UV) of NS1 solubilized at pH 11.0 in the presence of Arg and refolded by dialysis indicates that the protein is recovered with its native conformation (Fig. 6b). Percentages of secondary structure components of NS1 protein were obtained by fitting the experimental CD spectrum. A total content of $14.6 \pm 3.5\%$ α -helices and 34.2 ± 2.3 β -sheets was obtained, which is in accordance with the 14% α -helices and 30% β -sheets present in ZIKV NS1 (PDB 5GS6).

Reactivity of ZIKV-positive human serum against refolded NS1

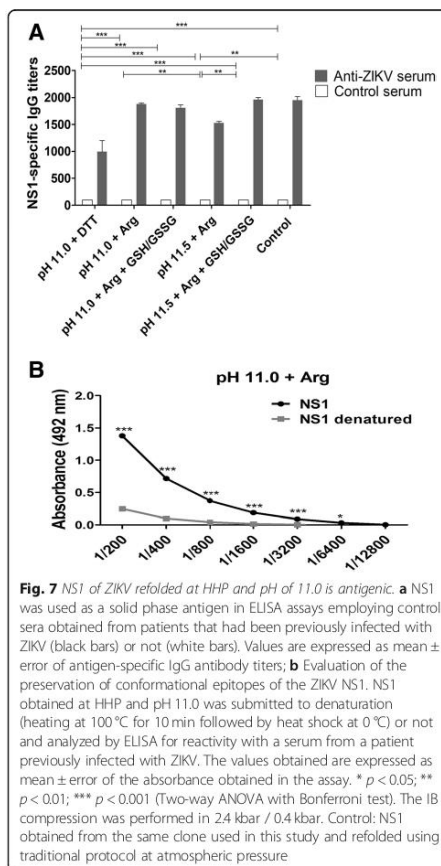
To determine the antigenicity of solubilized NS1, we performed ELISA tests with this antigen and serum samples from ZIKV-positive patients. The samples refolded at HHP presented high antibody titres with ZIKV-positive sera and low reactivity with sera from non-infected subjects. The titres were similar to those achieved with NS1 refolded with the established protocol carried out at atmospheric pressure (Fig. 7a). The presence of DTT (2 mM) during compression was shown to induce little enhancement of NS1 refolding yield (Fig. 6), but led to a decay of the NS1 antigenicity and the presence of glutathione pair did not significantly improve the antigenicity of the NS1. Higher titres of ZIKV-positive antibodies were obtained for refolded NS1 (black lines in Fig. 7b) than those obtained with the same protein that had been denatured by heating (gray lines in Fig. 7b), which suggests that the refolded protein preserves conformational epitopes.

Discussion

The present study describes a solubilization method, based on HHP and alkaline pH, in which, at rather mild solubilization conditions, the ZIKV NS1 was



recovered from IBs expressed in bacterial cells at high recovery yields and preserved immunological features. The combination of alkaline pH, that prompt the disruption of polar interactions induced by electrostatic repulsion [37] and HHP, that induce rupture of intermolecular hydrophobic interactions [5], proved to be quite efficient and led to the solubilization of insoluble aggregates with a low degree of protein unfolding. The process resulted in 6-fold higher yields of soluble protein than the achieved by association of HHP with GdnHCl. The final yield of refolded ZIKV NS1 was approximately 30-fold higher than a previously reported standard refolding method for DENV NS1 [27]. The



refolding process of ZIKV NS1 using HHP and alkaline pH involves only two steps that, altogether, take less than 24 h. The refolding process was accomplished with the protein at a relatively high concentration (above 0.4 mg/mL) with final yields of approximately 70 mg/liter of bacterial culture. There was no need for dilution of the protein to avoid reaggregation and, consequently, no need for further protein concentration steps, usually required in protein refolding processes at atmospheric pressure. The refolded protein did not require further purification steps since it was recovered in a rather good purity (from 90 to 95%), which further contributes for reduced final costs and labor effort of the process.

ZIKV NS1 refolding has not been previously described. The refolding of the DENV NS1 required the use of 8 M urea for IB solubilization [24, 25, 27, 29]. Notably, the reported recovery yields were lower than the values achieved in the present study with ZIKV NS1-IBs (from 75 to 90%). The higher yields previously reported by Das et al. [25] were 60% and by Allonso et al. [24] that obtained a yield of 67% immunologically active NS1 from DENV NS1-IBs. In addition, all these processes are more time-consuming and laborious than the one described in this study.

The reactivity of human anti-ZIKV antibodies with purified ZIKV NS1 was comparable with the one obtained with the protein obtained using a protocol of IB solubilization with 8 M urea followed by metal affinity chromatography purification and refolding by further dilution [27]. Sera from ZIKV-infected subjects showed similar reactions with proteins obtained by the two methods. These results indicate that proteins obtained by the use of HHP in association with alkaline pH can be successfully applied in the generation of recombinant proteins for immunodiagnostic assays and vaccine development.

Methods

Expression of recombinant proteins, bacterial lysis and NS1-IB washes

For the expression of the ZIKV NS1 protein, the plasmid pETNS1ZIKV containing the sequence of the ZIKV NS1 (residues 797–1148) protein (access genbank: ALU33341.1) in the vector pET28a was designed and obtained commercially from GenScript (USA). This plasmid contains the gene that codifies for the full-length protein with 395 residues and two histidine tags at the N- and C-terminal residues. *Escherichia coli*, strain BL21 (DE3) (Novagen EMD Biosciences, Inc.), was used as host. The bacterial cultures for protein expression were grown in LB medium and expression induction was performed by addition of 0.5 mM IPTG when cultures reached an optical density (at 600 nm) of 0.5, as described [27]. Activated cultures (1 l) were centrifuged at 8000 x g for 10 min at 4 °C. The precipitated pellet was resuspended in 50 mL of buffer A1 (0.1 M Tris-HCl pH 8.5 + 5 mM EDTA). Lysozyme (50 µg / mL) was then added to the suspension and incubated at room temperature for 15 min. Sodium deoxycholate was then added to reach a concentration of 0.1%. Bacterial lysis was performed by sonicating the suspension on ice to avoid heating until the solution lost viscosity and was then centrifuged at 4000 x g for 10 min at 4 °C. The supernatant was discarded. The pellet was resuspended in 50 mL of buffer A2 (0.1 M Tris-HCl pH 8.5 containing 5 mM EDTA and 0.1% sodium deoxycholate), and the suspension was sonicated rapidly to disrupt the lumps. The suspension was centrifuged at 8000 x g for 10 min at 4 °C, and NS1-IBs was washed again. The suspension

was washed once with 0.1 M Tris HCl buffer at pH 8.5 containing 1 mM EDTA and resuspended in 10–20 mL of the same buffer. The absorbance was read on a spectrophotometer at 350 nm, and the suspensions were separated into 1 mL aliquots that were kept in a freezer (–20 °C) until time of use.

High hydrostatic pressure

The optical density of the suspension of NS1-IBs was determined by spectrophotometer at 350 nm and diluted in the appropriate buffer containing 1 mM EDTA to optical density of 1.0, 2.0 or 5.0, which corresponds to approximately 0.08, 0.16 and 0.4 mg NS1/mL, respectively. The buffers used were 50 mM Tris HCl for pH 7.0 to 9.0 and 50 mM CAPS for pH 10.0 to 12.0. Arg generates an alkaline character (pH 11.1) in aqueous solution. Therefore, buffers were prepared by adding Arg to Tris HCl and titulated to the adequate pH. The suspensions of IBs were maintained at 1 bar for 16 h or plastic bags were filled with the samples and further sealed and included inside a larger plastic bag that was vacuum sealed and placed in the pressure vessel (R4–6-40, High Pressure Equipment). The vessel was pressurized at 2.4 kbar using suitable high-pressure pump (PS-50, High Pressure Equipment) using oil as a transmission fluid and was incubated in this condition for 90 min. The decompression was performed slowly until 0.4 kbar or to 1 bar. After decompression, the samples were centrifuged at 11,000 x g for 15 min to remove insoluble aggregates and dialyzed against 50 mM Tris HCl buffer at a pH of 8.5 to lower the pH and for removal of additives. The solution was centrifuged again and stored at –20 °C for further analysis.

Fluorescence and light scattering (LS)

Fluorescence and LS measurements were performed on a Cary Eclipse (Varian) spectrofluorimeter. Data were collected using 1 cm optical path cuvettes, and the measures were performed at a 90° angle relative to the incident light using a 1 s response time and reading speed of 240 nm/minute. LS measurements were performed with excitation at 320 nm, and scattering was collected from 315 to 325 nm. The intrinsic fluorescence emission of tryptophan (Trp) was collected between 300 and 400 nm, with excitation at 290 nm. LS curves were produced by increasing concentrations of GndHCl (0 to 3 M) or Arg (0 to 0.6 M) or increasing the pH (7 to 12).

Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE was performed using 12% gel containing SDS and stained with Coomassie Blue G-250 [38]. The IB suspensions were heated at 95 °C for 5 min in sample buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.5 and 0.01% bromophenol). For protein analysis in the reducing condition, the sample buffer also contained 100 mM

dithiothreitol (DTT). Determination of the intensity of the bands of NS1 was performed by the analysis of the image using the ImageJ program.

Size exclusion chromatography (SEC) analysis

Analysis of NS1 samples of ZIKV was performed on a Superdex 200 10/300 (GE Healthcare) SEC coupled to an AKTA (GE Healthcare) system. The buffer used for elution was Tris 50 mM at a pH of 8.5 or CAPS 50 mM at a pH of 11.0. Ovalbumin monomer (44.3 kDa), dimer (88.6 kDa) and bovine serum albumin monomer (66.4 kDa) were used to calibrate the column Superdex 200 10/300 (Additional file 1: Figure S1). We obtained a linear regression line of $Y = -0.03838 X + 14.82$ ($N = 3$, $r^2 = 0.9989$), where Y is the elution volume and X is the molecular mass.

Circular dichroism (CD)

Circular dichroism measurements were carried out with a Jasco J-720 spectropolarimeter. Spectra were recorded in 0.2 cm path length quartz cells at a protein concentration of 2 μ M in 10 mM phosphate buffer at pH 8.5. Three consecutive scans from 260 to 190 nm were performed. The observed raw ellipticities were converted into the molar ellipticities (θ). The secondary structure was estimated from fitted far-UV spectra using the DichroWeb server [39]. The total percentage of secondary structure components was obtained using different analysis programs (SELCON3, Contin-LL and CDSSTR) with different protein reference sets [40]. The results shown are the mean \pm SD.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ELISAs were performed in 96-well plates. For plaque sensitization, 100 μ L of NS1 diluted to 2 ng/ μ L in phosphate saline buffer (PBS) was applied to each well in duplicate. Plates were incubated at 4 °C for 16 to 18 h and washed in wash buffer (PBS containing 0.05% Tween-20). A volume of 200 μ L of blocking buffer (PBS containing 0.05% Tween 20, 3% milk and 1% BSA) was added and incubated at 37 °C for 2 h. The blocking buffer was then discarded. Serum from patients positive or negative for ZIKV antibodies were diluted (PBS containing 0.05% Tween 20, 3% milk and 0.25% BSA) from 1: 200 to 1: 12,800, and 100 μ L were added to each well and incubated at room temperature for 1 h. The wells were washed 3 times with 300 μ L of wash buffer and 100 μ L of peroxidase-conjugated goat anti-human IgG antibody (A0170, Sigma Aldrich) diluted 3000-fold in dilution buffer were added to each well. The plates were incubated at room temperature for 1 h. The plates were then washed 3 more times in wash buffer. The reaction was performed by the addition of the substrate,

0.04% of 1,2-diaminobenzene 1,2-phenylenediamine (OPD) and 0.04% hydrogen peroxide in 100 μ L of 33 mM citrate-phosphate buffer at a pH of 5.5 to each well and incubated in the dark for 15 min at room temperature. The reaction was blocked by the addition of 50 μ L of 1 M sulfuric acid. The plates were read in a spectrophotometer at 492 nm.

Additional files

Additional file 1: Figure S1. Data used for calibration of SEC column. Volumes of elution of ovalbumin and BSA utilized for calibration of the column Superdex 200 10/300. (JPG 539 kb)

Additional file 2: Raw data of Figs. 1, 2, 4 and 7. Data used for preparation of the Figs. 1, 2, 4 and 7. (DOCX 17 kb)

Abbreviations

CD: Circular dichroism; DENV: Dengue virus; DTT: Dithiothreitol; EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid; ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay; GdnHCl: Guanidine hydrochloride; GSH: Reduced glutathione; GSSG: Oxidated glutathione; HHP: High hydrostatic pressure; IPTG: Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside; LB: Luria-Bertani broth; LS: Light scattering; NS1: Non-structural protein 1; NS1-IB: Inclusion bodies of NS1; SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis; ZIKV: Zika virus

Acknowledgements

We thank Dr. Edson Luiz Durigon, (Department of Microbiology of the Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo) for the human serum samples.

Funding

>FAPESP grant (Process number 2015/02574-0) was used for design of the study, collection, analysis and interpretation of data. CNPq-Brasil fellowship (Process number 130256/2015-3) was for CMRS postgraduate work (MS degree).

Availability of data and materials

The figures and tables supporting the conclusions of this study are included in this published article and its Additional files 1 and 2.

Authors' contributions

LM, CMRS and RMCC designed the research; CMRS and RMCC were involved in all aspects of the experimental design, data collection, analysis and interpretation of refolding experiments and SEC. They also drafted the manuscript. LRP was involved in acquisition of data and analysis of ELISA and drafted the manuscript. YC analyzed CD experiments and drafted the manuscript. LM, YC and LCSF wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

The Institute of Biosciences of the University of São Paulo review board approved this study and all human sera were collected under the approval of the Ethics Committee (CEPSH - Off.011616).

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, Centro de Biotecnologia, Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, São Paulo 05508-000, Brazil. ²Departamento de Microbiologia, Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, São Paulo 05508-000, Brazil. ³Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Av. Carlos Chagas Filho 373, Rio de Janeiro 21941-902, Brazil.

Received: 8 February 2018 Accepted: 23 November 2018
Published online: 12 December 2018

References

- Ami D, Natalello A, Gatti-Lafrancioni P, Lotti M, Doglia SM. Kinetics of inclusion body formation studied in intact cells by FT-IR spectroscopy. *FEBS Lett*. 2005;5791:63433–6.
- Ami D, Natalello A, Taylor G, Tonon G, Maria Doglia S. Structural analysis of protein inclusion bodies by Fourier transform infrared microspectroscopy. *Biochim Biophys Acta*. 2006;17644:793–9.
- Peterel S, Grdadolnik J, Gaberc-Porekar V, Komel R. Engineering inclusion bodies for non denaturing extraction of functional proteins. *Microb Cell Factories*. 2008;7:34.
- Rathore AS, Bade P, Joshi V, Pathak M, Pattanayek SK. Refolding of biotech therapeutic proteins expressed in bacteria: review. *J Chem Technol Biotechnol*. 2013;8810:1794–806.
- Crisman RL, Randolph TW. Refolding of proteins from inclusion bodies is favored by a diminished hydrophobic effect at elevated pressures. *Biotechnol Bioeng*. 2009;1022483–92.
- Silva JL, Oliveira AC, Vieira TCRG, de Oliveira GAP, Suarez MC, Foguel D: High-pressure chemical biology and biotechnology. *Chem Rev* 2014; 11414: 7239–7267.
- St John RJ, Carpenter JF, Balny C, Randolph TW. High pressure refolding of recombinant human growth hormone from insoluble aggregates. Structural transformations, kinetic barriers, and energetics. *J Biol Chem*. 2001;27650: 46856–63.
- St John RJ, Carpenter JF, Randolph TW. High pressure fosters protein refolding from aggregates at high concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;9623:13029–33.
- St John RJ, Carpenter JF, Randolph TW. High-pressure refolding of disulfide-cross-linked lysozyme aggregates: thermodynamics and optimization. *Biotechnol Prog*. 2002;183565–71.
- Chura-Chambi RM, Cordeiro Y, Malavasi NV, Lemke LS, Rodrigues D, Morganti L. An analysis of the factors that affect the dissociation of inclusion bodies and the refolding of endostatin under high pressure. *Process Biochem*. 2013;482:250–9.
- Chura-Chambi RM, Genova LA, Alfonso R, Morganti L. Refolding of endostatin from inclusion bodies using high hydrostatic pressure. *Anal Biochem*. 2008;3791:32–9.
- Sen P, Ahmad B, Khan RH. Formation of a molten globule like state in bovine serum albumin at alkaline pH. *Eur Biophys J Biophys*. 2008;378: 1303–8.
- Singh SM, Upadhyay AK, Panda AK. Solubilization at high pH results in improved recovery of proteins from inclusion bodies of *E. coli*. *J Chem Technol Biotechnol*. 2008;838:1126–34.
- Patra AK, Mukhopadhyay R, Mukhija R, Krishnan A, Garg LC, Panda AK. Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*. 2000;182:182–92.
- Singh SM, Panda AK. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioeng*. 2005;994:303–10.
- Lancioti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, Stanfield SM, Duffy MR. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap state, Micronesia. 2007. *Emerg Infect Dis*. 2008;148:1232–9.
- Kuno G, Chang GJ. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Arch Virol*. 2007;1524:687–96.
- Edeling MA, Diamond MS, Fremont DH. Structural basis of Flavivirus NS1 assembly and antibody recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;11111: 4285–90.
- Wallis TP, Huang CY, Nimkar SB, Young PR, Gorman JJ. Determination of the disulfide bond arrangement of dengue virus NS1 protein. *J Biol Chem*. 2004; 27920:20729–41.
- Akey DL, Brown WC, Dutta S, Konwerski J, Jose J, Jurkiw TJ, DelProposto J, Ogata CM, Skiniotis G, Kuhn RJ, et al. Flavivirus NS1 structures reveal surfaces for associations with membranes and the immune system. *Science*. 2014;3436173:881–5.
- Flamand M, Megret F, Mathieu M, Lepault J, Rey FA, Deubel V. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. *J Virol*. 1999;73: 6104–10.
- Muller DA, Young PR. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antivir Res*. 2013;982:192–208.
- Gutsche I, Coulibaly F, Voss JE, Salmon J, d'Alayer J, Ermonval M, Larquet E, Charneau P, Krey T, Megret F, et al. Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108198003–8.
- Allonso D, da Silva Rosa M, Coelho DR, da Costa SM, Nogueira RM, Bozza FA, Santos FB, de Barcelos Alves AM, Mohana-Borges R. Polyclonal antibodies against properly folded dengue virus NS1 protein expressed in *E. coli* enable sensitive and early dengue diagnosis. *J Virol Methods*. 2011;175:109–16.
- Das D, Mongkolklaungkoon S, Suresh MR. Super induction of dengue virus NS1 protein in *E. coli*. *Protein Expr Purif*. 2009;661:66–72.
- Huang JL, Huang JH, Shyu RH, Teng CW, Lin YL, Kuo MD, Yao CW, Shiao MF. High-level expression of recombinant dengue viral NS-1 protein and its potential use as a diagnostic antigen. *J Med Virol*. 2001;653:553–60.
- Amorim JH, Porchia BFMM, Balan A, Cavalcante RCM, da Costa SM, Alves AMD, Ferreira LCD. Refolded dengue virus type 2 NS1 protein expressed in *Escherichia coli* preserves structural and immunological properties of the native protein. *J Virol Methods*. 2010;1672:186–92.
- Sankar SG, Dhanrajayan KJ, Paramasivan R, Thenmozhi V, Tyagi BK, Vennison SJ. High-level expression of functionally active Dengue-2 non-structural antigen 1 production in *Escherichia coli*. *Biomed Res Int*. 2013.
- Atharamam TN, Saraswat S, Misra P, Shrivastava S, Singh AK, Verma SK, Gopalan N, Behara PK, Rao PV. Optimization of Dengue-3 recombinant NS1 protein expression in *E. coli* and in vitro refolding for diagnostic applications. *Virus Genes*. 2013;462219–30.
- Young PR, Hilditch PA, Bletchly C, Halloran W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J Clin Microbiol*. 2000;383:1053–7.
- Amorim JH, Alves RP, Boscardin SB, Ferreira LC. The dengue virus non-structural 1 protein: risks and benefits. *Virus Res*. 2014;181:53–60.
- Malavasi NV, Foguel D, Bonafe CFS, Braga CACA, Chura-Chambi RM, Vieira JM, Morganti L. Protein refolding at high pressure: optimization using eGFP as a model. *Process Biochem*. 2011;462:512–8.
- Song H, Qi J, Haywood J, Shi Y, Gao GF. Zika virus NS1 structure reveals diversity of electrostatic surfaces among flaviviruses. *Nat Struct Mol Biol*. 2016;235:456–8.
- Lacowicz JR. Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd edn: Springer; 2006.
- Brown WC, Akey DL, Konwerski JR, Tarrasch JT, Skiniotis G, Kuhn RJ, Smith JL. Extended surface for membrane association in Zika virus NS1 structure. *Nat Struct Mol Biol*. 2016;239:865–7.
- Clark ED. Protein refolding for industrial processes. *Curr Opin Biotechnol*. 2001;122:202–7.
- Yongsawatdigul J, Park JW. Effects of alkali and acid solubilization on gelation characteristics of rockfish muscle proteins. *J Food Sci*. 2004;69: C499–505.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;2275259:680–5.
- Whitmore L, Wallace BA. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res*. 2004;32:W668–73.
- Sreerama N, Veenyaninov SY, Woody RW. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: inclusion of denatured proteins with native proteins in the analysis. *Nucleic Acids Res*. 2000;2872:243–51.



Enhanced Immune Responses and Protective Immunity to Zika Virus Induced by a DNA Vaccine Encoding a Chimeric NS1 Fused With Type 1 Herpes Virus gD Protein

Lennon Ramos Pereira¹, Rúbens Prince dos Santos Alves¹, Natiely Silva Sales¹, Robert Andreato-Santos¹, Aléxia Adrienne Venceslau-Carvalho¹, Samuel Santos Pereira¹, Maria Fernanda Castro-Amarante¹, Mônica Josiane Rodrigues-Jesus¹, Marianna Teixeira de Pinho Favaro¹, Rosa Maria Chura-Chambi², Ligia Morganti² and Luís Carlos de Souza Ferreira^{1*}

OPEN ACCESS

Edited by:
 Jorge Fuentealba,
 University of Concepcion, Chile

Reviewed by:
 Roberto Lins,
 Aggeu Magalhães Institute
 (IAM), Brazil
 Angel Alejandro Oñate,
 University of Concepcion, Chile

***Correspondence:**
 Luis Carlos de Souza Ferreira
 lcsf@usp.br

Specialty section:
 This article was submitted to
 Pharmaceutical Innovation,
 a section of the journal
 Frontiers in Medical Technology

Received: 08 September 2020

Accepted: 11 November 2020

Published: 03 December 2020

Citation:
 Pereira LR, Alves RPdS, Sales NS,
 Andreato-Santos R,
 Venceslau-Carvalho AA, Pereira SS,
 Castro-Amarante MF,
 Rodrigues-Jesus MJ, Favaro MTdP,
 Chura-Chambi RM, Morganti L and
 Ferreira LCdS (2020) Enhanced
 Immune Responses and Protective
 Immunity to Zika Virus Induced by a
 DNA Vaccine Encoding a Chimeric
 NS1 Fused With Type 1 Herpes Virus
 gD Protein.
 Front. Med. Technol. 2:604160.
 doi: 10.3389/fmed.2020.604160

¹Laboratory of Vaccine Development, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ²Biotechnology Center, Institute of Energy and Nuclear Research (IPEN), São Paulo, Brazil

Zika virus (ZIKV) is a globally-distributed flavivirus transmitted to humans by *Aedes* mosquitoes, usually causing mild symptoms that may evolve to severe conditions, including neurological alterations, such as neonatal microcephaly and Guillain-Barré syndrome. Due to the absence of specific and effective preventive methods, we designed a new subunit vaccine based on a DNA vector (pgDNS1-ZIKV) encoding the non-structural protein 1 (NS1) genetically fused to the Herpes Simplex Virus (HSV) glycoprotein D (gD) protein. Recombinant plasmids were replicated in *Escherichia coli* and the expression of the target protein was confirmed in transfected HEK293 cells. C57BL/6 and AB6 (IFNAR1^{-/-}) mice were i.m. immunized by electroporation in order to evaluate pgDNS1-ZIKV immunogenicity. After two doses, high NS1-specific IgG antibody titers were measured in serum samples collected from pgDNS1-ZIKV-immunized mice. The NS1-specific antibodies were capable to bind the native protein expressed in infected mammalian cells. Immunization with pgDNS1-ZIKV increased both humoral and cellular immune responses regarding mice immunized with a ZIKV NS1 encoding vaccine. Immunization with pgDNS1-ZIKV reduced viremia and morbidity scores leading to enhanced survival of immunodeficient AB6 mice challenged with a lethal virus load. These results give support to the use of ZIKV NS1 as a target antigen and further demonstrate the relevant adjuvant effects of HSV-1 gD.

Keywords: Zika virus, NS1 protein, gD protein, DNA vaccine, HSV-1, flavivirus

INTRODUCTION

Zika virus (ZIKV) is an arthropod-borne virus with a positive single-stranded RNA that codes for three structural and seven non-structural proteins (1). While the ZIKV classical transmission cycle mainly involves *Aedes* mosquitoes (1, 2), intrauterine and sexual transmission routes have also been demonstrated (3). According to the WHO, ZIKV has been reported in more than 80 countries.

Infections related to this virus causes a plethora of symptoms ranging from flu-like symptoms such as fever, rash, conjunctivitis, headache and eye pain to severe forms such as Guillan-Barré Syndrome (GBS) and Zika Congenital Syndrome (CZS) (4). The latter is a set of malformations that deeply impact the development of newborns and may lead to microcephaly (5–7). Despite the burden of the disease and the urge to develop approaches to prevent virus dissemination, there are no licensed therapies or vaccines to ZIKV infection so far.

Despite the absence of a clear protection correlate against ZIKV infection, recent evidences indicate that an optimal ZIKV vaccine should induce both cellular and humoral immune responses (8–10). The induction of ZIKV-specific neutralizing antibodies (nAb) by vaccines was capable to confer protection in mice and non-human primates (NHP). In addition, passive immunization with sera isolated from vaccinated or infected NHP or humans conferred protection under experimental conditions (11–15). On the other hand, T cell mediated immune responses also contribute to the control of ZIKV infection. Increased viral loads and mortality rates are observed in CD8⁺ T cell-deficient mice while transfer of ZIKV-specific CD8⁺ T cells to T cell deficient mice reduced infection and conferred protection (16–18). Recently, the role of type I CD4⁺ T helper cells has also shown to contribute to the control of ZIKV infection (19–21). Further published evidences repeatedly demonstrated that both nAbs and T cells responses contribute to protective immunity to ZIKV infection (14, 19, 22–24).

The abnormally high incidence of GBS and CZS in certain locations raised the question whether the pre-existing immunity to other flavivirus, such as DENV, could be implicated in such a phenomenon, likely through Antibody-Dependent Enhancement (ADE). It is well-known that ZIKV and DENV share antigen cross-reactivity at both antibody (Ab) and T cell levels, and since Abs can play a dual role in protection and in DENV pathogenesis, the same might be true for ZIKV (17, 25). In fact, studies using mouse models and, more recently, human data have already shown a direct role of anti-structural protein Abs in both DENV and ZIKV pathogenesis (26–28). Despite these evidences, most ZIKV vaccines tested under experimental conditions target generation of neutralizing antibodies against structural antigens (13, 14, 29–33). An alternative would be the use of non-structural proteins in vaccine formulations, since these antigens may trigger both B and T cell protective responses without the undesirable risks of ADE (9).

The flavivirus non-structural proteins 1 (NS1) are glycoproteins, with molecular weight ranging from 46 to 55 kDa, implicated in several mechanisms, such as replication, negative RNA strand synthesis and evasion from the host's immune response (34). NS1 is highly immunogenic and may be associated to the cytoplasmic membrane as dimers or hexamers that are secreted to extracellular medium. It has been reported that anti-NS1 Abs target infected cells and induce virus clearance by Antibody-dependent Cytotoxicity (ADCC) and deposition of complement system proteins. In addition, ZIKV-infected cells may also be targeted by T cells through MHC presentation of NS1-derived epitopes. In fact, both immunological responses generate protective immunity to ZIKV. Anti-ZIKV vaccine

strategies based on recombinant vesicular stomatitis virus (rVSV) (35), DNA vaccines (23, 36) or Modified Vaccinia Ankara virus (37) showed different protection levels by inducing either one or both humoral and cellular responses. Furthermore, mice and human isolated NS1-specific monoclonal antibodies (mAbs) showed Fc-dependent protection to ZIKV challenges, including non-pregnant and pregnant mice (38, 39). These results show that ZIKV NS1 protein is a suitable antigen for vaccines based on different delivery platforms.

Previous studies showed that the genetic fusion of antigens at the C-terminal region of the herpes simplex virus type I (HSV-1) glycoprotein D (gD) may improve the induction of antigen-specific humoral and cellular immune responses, either based on the DNA vaccine platform or as purified recombinant protein-based vaccines (40–42). The HSV-1 gD is capable to bind with high affinity to several antigen presenting cell receptors, including nectin-1, and the herpes virus entry mediator (HVEM) (43), which is a member of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) family. Interaction of gD and HVEM induces NF- κ B RelA expression in a TRAF2-dependent-way, resulting in pro-survival signals within activated T cells (44, 45). The binding of gD to HVEM induces strong immunomodulatory effects on T cells as previously demonstrated by our group and others (40, 41, 46–49).

In this study we designed and tested a DNA vaccine based on expression of a chimeric ZIKV NS1 protein genetically fused to the HSV-1 gD protein in order to enhance the anti-NS1 immune responses and protective immunity to ZIKV. Immunization of immunocompetent mice with the DNA-vaccine induced increased serum NS1-specific IgG titers as well as NS1-specific IFN γ -secreting cells, in comparison with mice immunized with a vector encoding only NS1. The presence of gD was also correlated to the reduced morbidity and mortality induced in immunodeficient AB6 mice challenged with ZIKV. These results support the use of the NS1 antigen in anti-ZIKV vaccine strategies and validate the adjuvant effects associated with co-expression of HSV-1 gD protein.

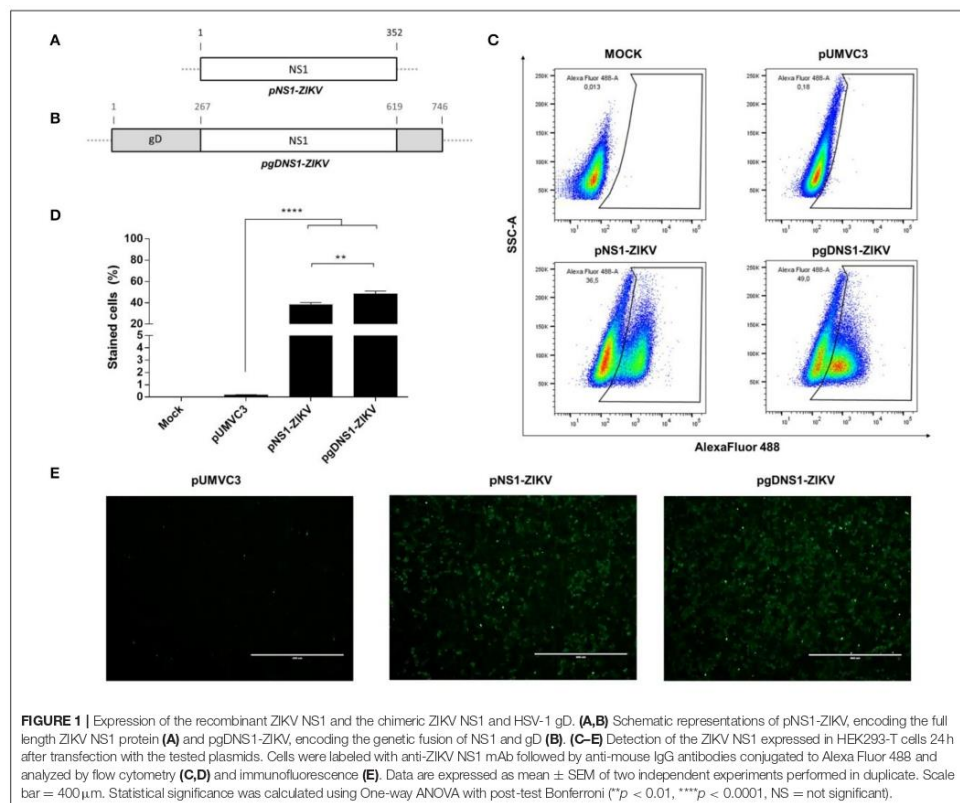
MATERIALS AND METHODS

Ethics Statement

Male or female C57BL/6 (6–8 weeks-old) or AB6 (IFNAR1^{-/-}) (4 weeks-old) mice were bred under specific pathogen-free conditions at the Isogenic Mouse Facility of the Microbiology Department, University of São Paulo, Brazil. The protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (CEUA) of the University of São Paulo (protocol number 96/2016) and conducted according to the Ethical Principles of Animal Experimentation established by the Brazilian College of Animal Experimentation. Animal group size was determined to achieve 80% resolution power using the Experimental Design Assistant (EDA) platform (<https://eda.nc3rs.org.uk/>).

Plasmids and Recombinant Proteins

The DNA vaccines encoding the full-length ZIKV NS1 (GenBank: ALU33341) isolated (pNS1-ZIKV) or as a chimeric



protein genetically fused the HSV-1 gD protein (pgDNS1-ZIKV) were synthesized at GenScript, USA (Figure 1A). The synthetic genes were optimized to the human codon usage and designed to contain the restriction sites *PstI* and *BglII* at the N' and C' terminus, respectively. The sequences were cloned into a pUMVC3 vector (Aldevron, ND, USA), as previously described (47). For the pgDNS1-ZIKV construction the sequence of full-length ZIKV NS1 was flanked by *ApaI* restriction sites (Supplementary Figure 1). The *Escherichia coli* DH5 α strain was transformed with the recombinant plasmids separately and the plasmid DNA was purified using the EndoFree Plasmid Mega kit (Cat.: 12183, QIAGEN), according to the manufacturer's instructions. The constructions were confirmed by restriction analyses and gene sequencing.

The ZIKV NS1 protein was expressed on the recombinant *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL cells and purified by affinity chromatography after *in vitro* refolding of the protein under high pressure conditions, as previously described (50).

Virus and Cells Lines

The Brazilian clinical ZIKV isolate (ZIKV^{BR}) (GenBank: KU729217.2) was obtained from Evandro Chagas Institute in Belém (Pará, Brazil). ZIKV^{BR} propagation was carried out in *Aedes albopictus* clone C6/36 cells cultured in Leibovitz L-15 medium (Vitrocell, Brazil) supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS) (Life Technologies, USA), followed by a concentration protocol as previously described (5, 51). Vero CCL-81 cells were cultured in Minimum Essential Medium Eagle (MEM, Vitrocell) with 10% FBS. Human embryonic kidney cells (HEK-293 cells, ATCC No. CRL-11268) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Life Technologies) supplemented with 10% FBS.

Detection of ZIKV NS1

Expression of ZIKV NS1 protein was detected either through immunofluorescence or flow cytometry. In both cases, HEK-293 cells were equally transfected with the plasmids according

to a previously described protocol (52). Briefly, HEK-293 cells were seeded (10^5 cell/well) in 24-wells plates (Corning, USA) and cultured at 37°C (5% CO_2) until reaching 70–80% confluence. One hour before the transfection, the cell culture supernatant was removed and 200 μl /well of DMEM (supplemented with 2% FBS) was added to the cells. For transfection, MIX solutions containing 1 μg of the plasmids to 3 μg of polyethylenimine (PEI) (Cat.: 408727, Sigma Aldrich, USA) were prepared in 150 mM NaCl solution. After incubation for 5 min at room temperature (RT), the mixtures were distributed evenly over the plates and the cells were incubated for up to 24 h (37°C , 5% CO_2).

For detection of ZIKV NS1, transfected cell monolayers were washed ($2\times$) with PBS and fixed with 4% formaldehyde diluted in PBS for 15 min (RT). After incubation, cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS (15 min at RT) and blocked with a blocking solution (BS) (2% BSA diluted in PBS) for 30 min at RT. After a new washing cycle ($3\times$), the cells were stained with anti-ZIKV NS1 4H2 mAb (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) diluted in BS and kept for 1 h at room temperature (RT) under agitation. After washing ($3\times$) with 0.05% Tween 20 in PBS (PBS-T), cells were incubated (45 min, at RT) with anti-mouse IgG antibody conjugated to AlexaFluor 488 (Cat.: A11001, Invitrogen, USA). Finally, cells were washed with PBS-T and observed under an immunofluorescence microscope (EvoS FL Thermo Scientific, USA) with images captured at 100x magnification.

For flow cytometry assays, cell monolayers were washed $2\times$ with PBS, trypsinized, and fixed/permeabilized with a Cytotfix/Cytoperm kit (BD Bioscience, USA), according to the manufacturer's instructions. Cells were, then, stained with the primary antibody 4H2 mAb (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) on ice for 30 min. After washing ($2\times$), cells were incubated (30 min on ice) with the anti-mouse conjugated to Alexa Fluor 488 (Cat.: A11001, Thermo Fisher Scientific) diluted 1:800. Finally, after washings ($2\times$), the cells were suspended in 200 μl of PBS-2% FBS solution and analyzed by an LSR Fortessa™ analyzer (BD, Franklin Lakes, NJ, USA). The data obtained were analyzed using FlowJo software (version 10, Tree Star, San Carlo, CA) to determine the percentage of stained cells.

Mice and Immunization Regimen

C57BL/6 (5–7 animals/group) or AB6 (4–6 animals/group) mice were immunized with 2 doses of 50 μg of pUMVC3, pNS1-ZIKV, or pgDNS1-ZIKV formulated in apyrogenic saline (0.9%). For immunization, the animals were previously anesthetized with a mixture of Ketamine and Xylazine (100 and 10 mg/kg, respectively) administered intraperitoneally (i.p.). Then, the animals received intramuscular (i.m.) injections with the formulations followed by electroporation (two 130 V pulses with 1 ms duration and four 70 V pulses with 50 ms duration, with an interval of 450 ms between each pulse), which was carried out with the CUY560-5-0.5 electrode using the NEPA21 Super Electroporator (Nepa Gene Co, Japan.), at an interval of 2 weeks. Blood samples were obtained by submandibular plexus puncture 14 days after the administration of each dose and centrifuged at 3,000 g for 30 min to separate the sera. The obtained serum samples were stored at -20°C for future analysis.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

High-binding ELISA plates (Corning) were coated with purified ZIKV NS1 protein (200 ng/well) diluted in coating buffer (32.5 mM NaHCO_3 , 14.9 mM Na_2CO_3 , pH 9.6) for 18 h at 4°C . The plates were washed three times with PBS containing 0.05% Tween-20 (PBS-T) and added with 200 μl /well of a blocking buffer (BB) containing 5% non-fat milk solution with 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS-T. After incubation (2 h at 37°C), plates were washed ($3\times$) and 100 μl of the individual serum samples, previously diluted (starting 1:25) in BB, were added to the wells and incubated for 1 h at 37°C . After a new wash cycle ($3\times$), anti-mouse IgG antibody conjugated to horseradish peroxidase (HRP) (Sigma Aldrich) was added to the wells at 1:4,000 dilution in BB. For the determination of IgG subclasses, anti-mouse IgG1 or IgG2c HRP-conjugated antibodies (Southern Biotech, USA) were used. After incubation (1 h, 37°C), plates were washed ($3\times$) and 100 μl of developing solution containing o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) (Sigma Aldrich) and H_2O_2 were added to each well and incubated for 15 min at RT in the dark. The reaction was stopped with 50 μl /well of 1 M sulfuric acid and the absorbance was measured at 492 nm ($\text{Ab}_{492\text{nm}}$) with a plate reader (BioTek, Winooski, VT, USA). Antibody titers were determined as the reciprocal end dilution value of the serum sample at which the absorbance obtained was at least 0.1 units above of the cut-off value (mean + 2 SD of $\text{Ab}_{492\text{nm}}$ obtained on wells containing no serum).

Antibody Binding to Native NS1 Protein

Vero cells were seeded (5×10^4 cell/well) in flat 96-well plates (Corning) and incubated for 24 h at 37°C (5% CO_2). Established cell monolayers were infected with ZIKV^{BR} at multiplicity of infection (MOI) 1.0 for 24 h (37°C , 5% CO_2). After infection, the monolayers were washed with PBS ($2\times$), trypsinized (Virocell) and fixed/permeabilized with a Cytotfix/Cytoperm kit (BD Bioscience) according to the manufacturer's instructions. The cells were labeled with pooled serum samples from immunized mice diluted 1:1,000 or 4H2 mAb (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 30 min on ice. After washing ($2\times$), cells were stained for 30 min (on ice) with a goat anti-mouse IgG antibody conjugated to Alexa Fluor 488, diluted 1:800 (Cat.: A11001, Thermo Fisher Scientific). After new wash cycles ($2\times$), the cells were suspended and analyzed in the LSR Fortessa™ analyzer (BD, Franklin Lakes, NJ, USA). The data were analyzed using FlowJo software (version 10, Tree Star, San Carlo, CA) to determine the percentage of stained Vero cells.

Peptide Synthesis

The peptides used in this work were synthesized at GenScript USA Inc. The prediction of immunogenic regions was carried out with algorithm (53, 54) hosted at the Immune Epitope Database (IEDB) Tools (<http://tools.iedb.org/mhci/>), using the amino acid sequence corresponding to the C-terminal portion of the native ZIKV NS1 protein (GenBank–ALU33341). Binding affinities were obtained for all 8–14 mer peptides for the H2-Kb and H2-Db alleles. The selected alleles had the classification of the consensus percentage restricted to 1.7% with a score ≤ 1 . Two high-score-predicted peptides were selected, custom-made

by GenScript (Piscataway, NJ, USA), suspended in DMSO and stored at -80°C before use.

Analysis of Cellular Immune Response

Measurement of induced cellular immune responses was carried out according to a previously described adapted protocol (16). Briefly, 2 weeks after the last vaccine dose, the immunized mice were intravenously (i.v.) infected with 10^6 plaque-forming units (PFU) of ZIKV^{BR}. Three days after infection (d.p.i) the animals were euthanized, the spleens were harvested surgically under aseptic conditions and the splenocytes were isolated, as previously described (52). Then, the isolated spleen cells were stimulated *in vitro* with peptides derived from ZIKV NS1 and the number of IFN γ -producing cells was determined by enzyme-linked immune absorbent spot (ELISpot).

ELISpot was carried out according to a previously described protocol (55). Briefly, splenocytes from immunized and infected mice were seeded (2×10^5 cells/well) in 96-well plates (Millipore, USA), previously coated with capture antibody to IFN γ (BD Biosciences, USA). Then, the cells were cultured for 48 h (37°C , 5% CO_2) in the presence or absence of NS1-derived peptides (100 ng of each peptide/well). After stimulation, the plates were washed ($3 \times$ with PBS and $5 \times$ with PBS-T) and stained (2 h at RT) with a biotinylated mouse anti-IFN γ mAb (BD Biosciences, USA) at $2 \mu\text{g}/\text{ml}$. After washing, the plates were incubated with peroxidase-labeled streptavidin (Sigma, USA) for 2 h at RT. Plates were washed again and developed with TrueBlueTM Substrate (KPL, Milford, MA, USA) for 20 min at RT. The spots were counted and expressed as IFN γ -producing cells/ 10^6 splenocytes.

Lethal Challenge With the ZIKV^{BR}

Two weeks after administration of the second vaccine dose, immunized AB6 mice were i.v. infected with 10^6 PFU of ZIKV^{BR}. The animals were monitored for up to 15 days for the appearance of clinical signs according to an arbitrary score scale (Healthy, score 0; ruffled fur, score 1; paralysis, score 2; deformed spinal column, score 3; moribund, score 4), measurement of body weight and mortality. Serum samples were collected on alternate days and stored at -80°C for analysis of viremia.

Virus Titration

The number of infectious ZIKV particles was determined by plaque assay. Briefly, 10-fold serial dilutions of virus samples were prepared in MEM medium, which were added to the Vero cells monolayers previously established in 24-wells plates (Corning) and incubated for 1 h at 37°C . After incubation, the cell supernatants were removed by aspiration, an overlay solution containing MEM plus carboxymethylcellulose (1%) and SFB (2%) was added to the cells and incubated (37°C , 5% CO_2) for 4 days. The cells monolayers were fixed with formaldehyde (4%) diluted in PBS for 15 min (RT). After washing with water, cells were stained with 1% violet crystal solution (Laborclin) for 10 min (RT). Viral lysis plates were counted and expressed as plaque form units per mL (PFU/mL).

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using the Prism 6 software (GraphPad Software Inc, LA Jolla, CA). *T*-test was used to compare only two groups. One-way ANOVA was applied with Bonferroni's *post-hoc* test to compare results involving several (≥ 3) groups. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's correction was used when the data involved several groups and more than one variable (time points). Log-rank test (Mantel-Cox) was used to analyze the survival and morbidity data. Differences were considered significant when the *p*-value (*p*) was ≤ 0.05 .

RESULTS

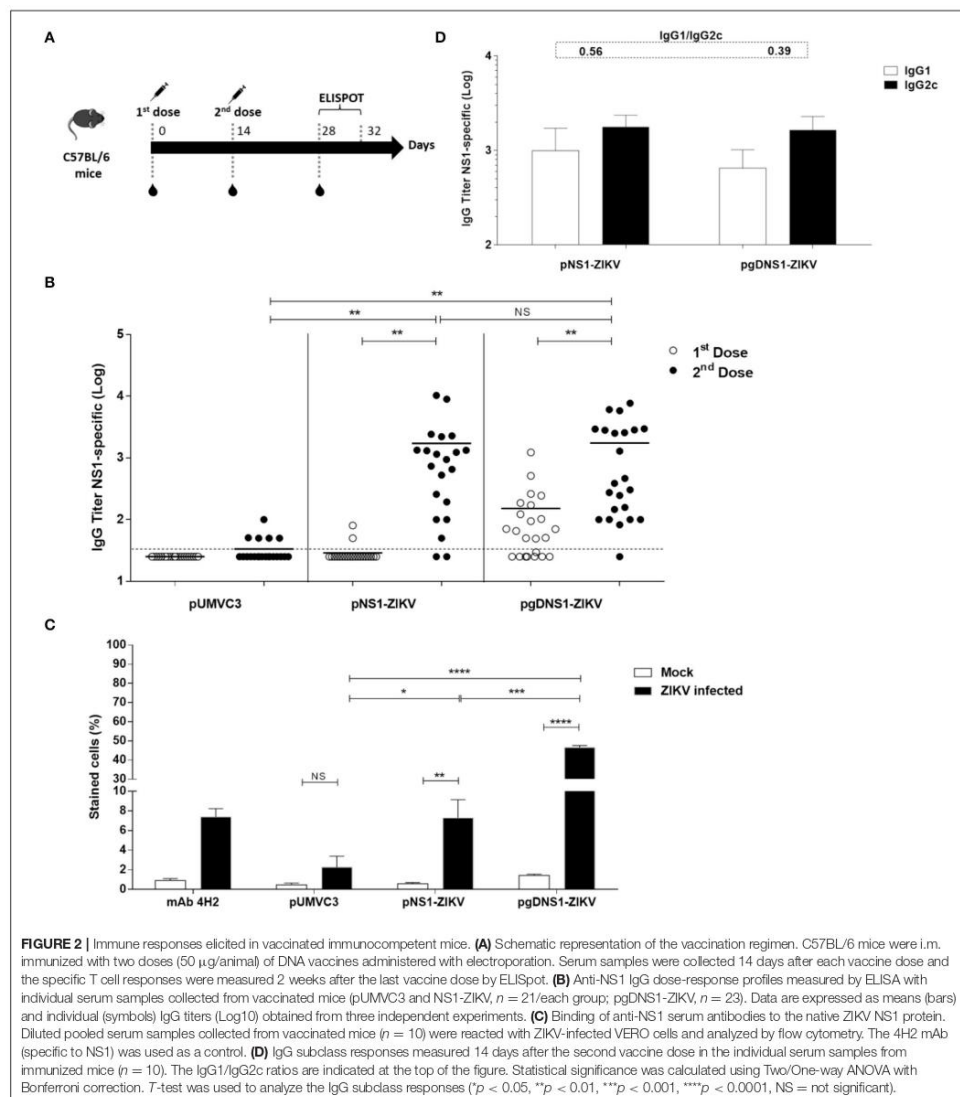
The DNA Vectors Encoding the ZIKV NS1 Protein

Two plasmids encoding the full-length ZIKV NS1 protein, either isolated (pNS1-ZIKV) (Figure 1A) or genetically fused to HSV-1 gD protein (pgDNS1-ZIKV) (Figure 1B), were constructed. Plasmids were submitted to restriction analyses with *Bgl*III and *Pst*I and the released fragments had the expected electrophoretic mobilities (NS1-1,056 pb; gDNS1-2,262 pb) (Supplementary Figure 1). The expression of the encoded proteins in HEK 293 cells transfected with pNS1-ZIKV or pgDNS1-ZIKV was confirmed with NS1-specific antibodies by flow cytometry and immunofluorescence (Figures 1C,E). Interestingly, cells transfected with pgDNS1-ZIKV showed enhanced expression of ZIKV NS1 with regard to cells transfected with pNS1-ZIKV (Figure 1D). The expression of the HSV-1 gD in pgDNS1-ZIKV-transfected cells was also confirmed by immune blots (Supplementary Figure 2). Taken together, these results demonstrate that the recombinant proteins encoded by the DNA vaccines were properly expressed in mammalian cells.

Fusion of ZIKV NS1 to HSV-1 gD Enhances the Induced Humoral and Cellular Immune Responses

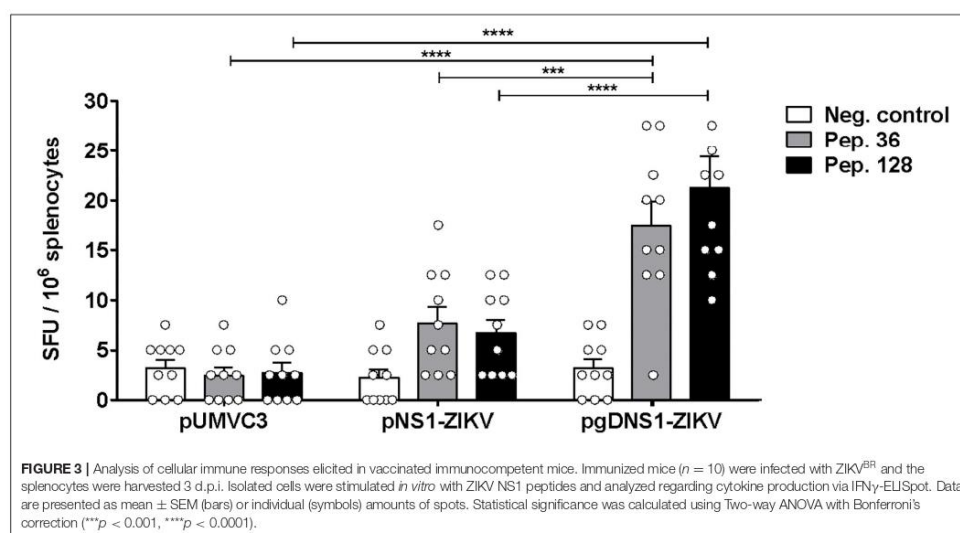
Next, we accessed the immunogenicity of the DNA vaccines in wild-type (WT) C57BL/6 mice. The animals were immunized with two i.m. doses by electroporation (Figure 2A). As observed in Figure 2B, similar serum NS1-specific IgG titers were detected 14 days after the second vaccine dose in mice immunized with pNS1-ZIKV or pgDNS1-ZIKV. Analyses of the NS1-specific serum IgG subclass responses indicated that vaccinated mice elicited similar IgG1 and IgG2c subclass responses (Figure 2D). We also investigated the binding of pooled anti-NS1 serum samples to native NS1 expressed in the ZIKV-infected Vero cells. As shown in Figure 2C and Supplementary Figure 3, anti-NS1 antibodies raised in the mice immunized with pgDNS1-ZIKV showed higher cell binding activity with regard to serum samples collected from mice immunized with pNS1-ZIKV. As expected, mice immunized with the pUMVC3 vector did not elicit anti-NS1 antibody responses (Figures 2B,C).

Fusion of antigens to HSV-1 gD has been shown to increase cellular immune responses to passenger antigens in vaccinated mice (40, 46–48). Thus, we also evaluated the antigen-specific cellular responses induced in mice immunized with the vaccine



formulations. For that purpose, *in silico* predicted MHC-I restrict peptides of ZIKV NS1 were validated with splenocytes of ZIKV-infected mice (Supplementary Figure 4). The peptide prediction was performed using the C-terminal region of NS1 protein based

on a recent report describing the presence of immunodominant CD8+ T cell epitopes in mice (23). Moreover, in order to maximize the detection of NS1-specific T cells, immunized mice were infected with ZIKV and, 3 days later, the numbers



of IFN γ -producing cells were determined. This rationale was based on previous evidences demonstrating that expansion of antigen-specific CD8⁺ T cells may be accessed at this time-point after virus infection (16). Thus, the selected peptides (Supplementary Table 1) were applied in IFN γ -ELISPOT assays carried out with splenocytes harvested at 3 d.p.i from immunized mice (Figure 2A). As shown in Figure 3, only mice immunized with pgDNS1-ZIKV elicited statistically significant enhancement in the number of IFN γ secreting spleen cells after *in vitro* stimulation with two different MHC-I restricted peptides. Taken together, these results indicate that immunization with pgDNS1-ZIKV simultaneously improves NS1-specific IgG response and T cell responses.

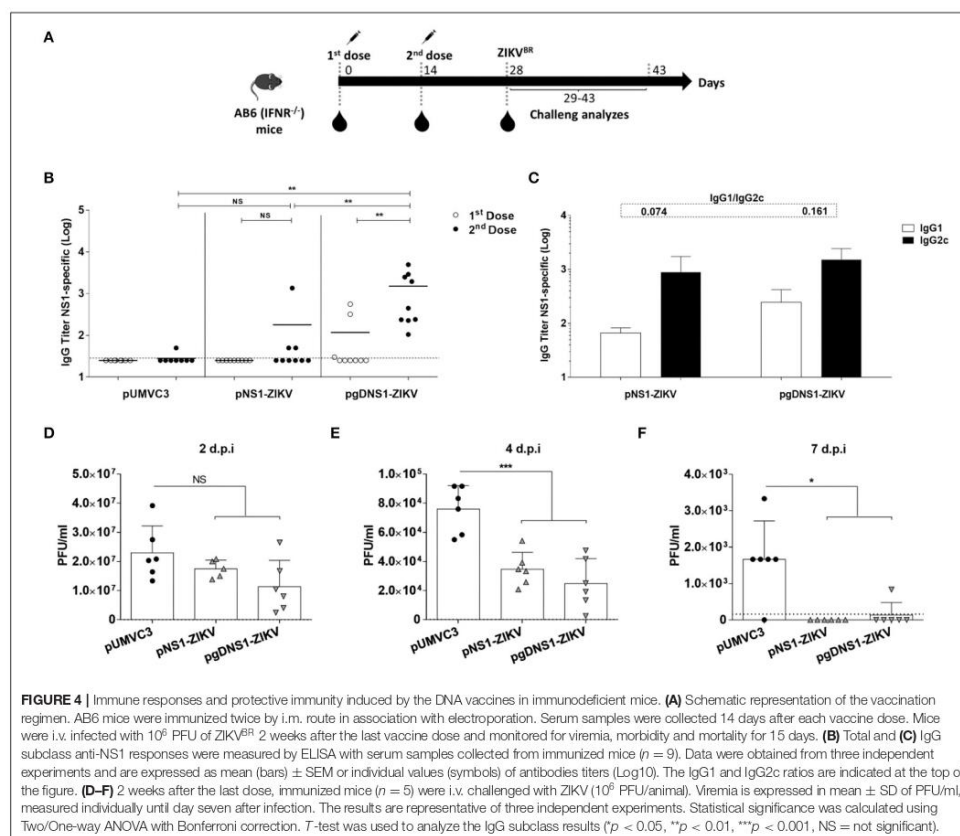
ZIKV-Infected Immunodeficient Mice Showed Reduced Viremia After Immunization With NS1-Encoding DNA Vaccines

Since wild type mice are not susceptible to ZIKV, we tested the protective immunity induced by the NS1-encoding DNA vaccines in the AB6 mouse strain, deficient in the expression of type I IFN receptor (IFNAR1^{-/-}) (56, 57). AB6 mice were immunized following the same regimen with 2 i.m. doses 2 weeks apart, and, 2 weeks after the last dose, animals were challenged with i.v. inoculation of 10⁶ PFU of ZIKV^{BR} (Figure 4A). Before the virus challenge, higher anti-NS1 serum IgG antibodies were detected in mice immunized with pgDNS1-ZIKV when compared to mice immunized with pNS1-ZIKV (Figure 4B). Notably, mice immunized with pNS1-ZIKV or pgDNS1-ZIKV showed prevailing IgG2c subclass responses (IgG1/IgG2c ratios

of 0.074 and 0.161, respectively) (Figure 4C). Viremia was followed in vaccinated and challenged mice up to 7 days. As shown in the Figures 4D–F, mice immunized with the NS1-encoding DNA vaccines presented reduction of viremia with regard to mice immunized with pUMVC3 group. Similarly, mice immunized with either pNS1-ZIKV or pgDNS1-ZIKV showed a shorter viremia period (Figures 4D–F). These results clearly demonstrate that immunization with DNA vaccines encoding ZIKV NS1 has a direct impact on the length of the period and intensity of the viremic state, as measured in vaccinated AB6 mice.

Immunization With pgDNS1-ZIKV Increased Anti-ZIKV Protective Immunity in AB6 Mice

Immunized AB6 mice were monitored for vaccine-induced protection to ZIKV-induced morbidity and mortality. Using a symptom scale classification, mice immunized with pgDNS1-ZIKV showed reduced morbidity compared to non-vaccinated mice than animals immunized with pNS1-ZIKV (Figures 5A–D). pgDNS1-ZIKV vaccinated mice recovered body weight in ~ 10 days post infection, while those immunized with pNS1-ZIKV recovered their body weight 2 weeks after the challenge (Figure 5E). We also measured the vaccine induced anti-ZIKV protection in AB6 mice challenged with a lethal i.v. virus dose. As indicated in the Figure 5F, immunization with pgDNS1-ZIKV conferred higher survival (46%) to lethal ZIKV infection compared to mice immunized with pNS1-ZIKV (27%). No protection was observed in mice immunized with the control vector. Taken together, these results indicated that DNA vaccines

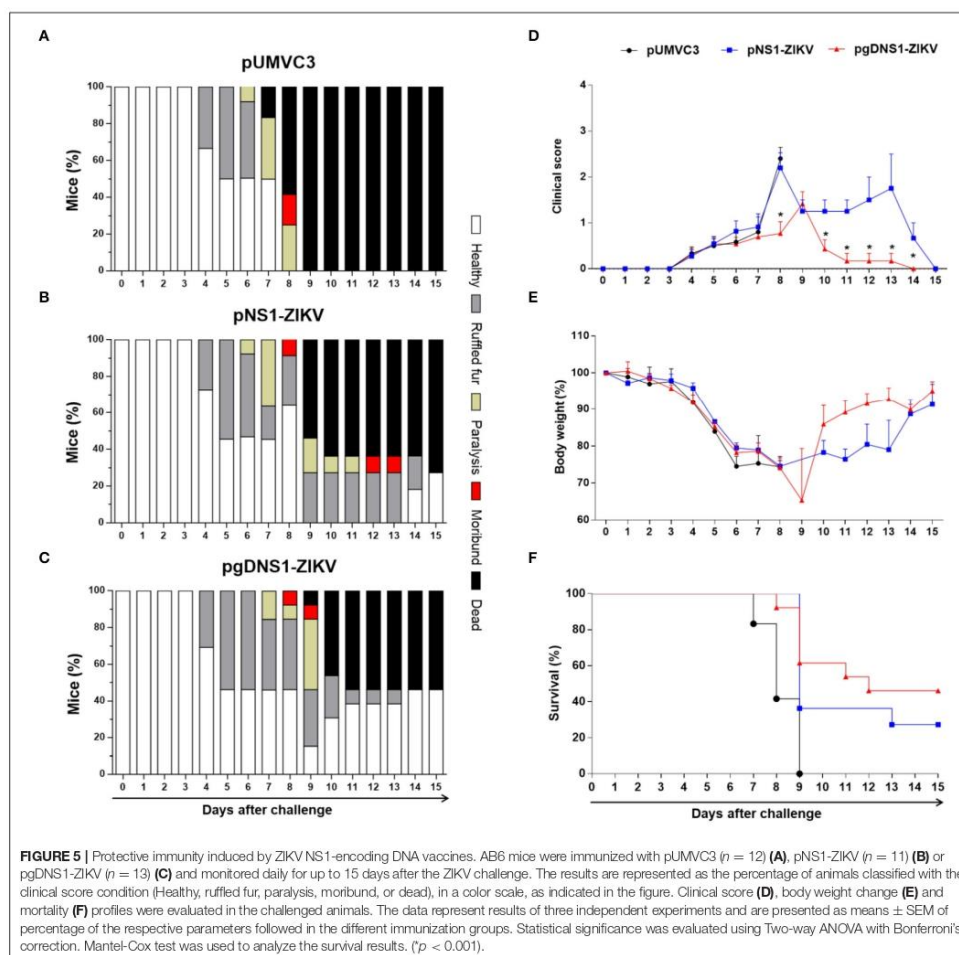


encoding ZIKV NS1 confer partial protection to ZIKV infection in immunodeficient AB6 mice. In addition, the present results demonstrated that genetic fusion of NS1 to gD protein improves the induction of antigen-specific immune responses and the protective immunity to ZIKV.

DISCUSSION

Recent advances demonstrate that both cellular and humoral immune responses play important roles in the development of protective immunity to flavivirus under experimental and clinical conditions. Therefore, ideal vaccines for diseases associated with DENV and ZIKV infections shall preferentially activate both arms of the immune system (19, 58, 59). Here, we describe the use of a novel DNA vaccine strategy based on the expression of ZIKV NS1, either alone or genetically fused to the HSV-1 gD

protein, as an approach to evaluate the protective role of anti-NS1 specific immune responses under experimental conditions. The results clearly demonstrated that immunization with NS1-encoding DNA vaccines induce NS1-specific immune responses in immunocompetent and immunodeficient mice leading to partial protection against lethal systemic ZIKV challenge in immunodeficient AB6 mice. The use of electroporation as a mean to deliver the DNA vaccines resulted in similar serum anti-NS1 IgG titers in mice immunized with pgDNS1-ZIKV or pNS1-ZIKV. Nonetheless, fusion of ZIKV NS1 to gD enhanced the binding of antibodies to the native NS1 antigen expressed in infected mammalian cells. Moreover, using splenocytes from pgDNS1-ZIKV-vaccinated mice we detected higher numbers of IFN- γ -secreting cells after *in vitro* stimulation with MHC-I-restricted NS1-derived peptides. More relevantly, immunization of immune deficient mice with the gD-NS1-encoding DNA vaccine reduced with more efficiency the morbidity and mortality



rates detected after challenge with ZIKV. Collectively, these results support the use of genetic fusion of antigens to HSV-1 gD as promising platform for the development of ZIKV vaccine strategies and validate the adjuvant effects of the gD protein on the immune responses induced by ZIKV NS1-based DNA vaccines.

The potential of NS1 as a target antigen has been investigated regarding induction of both humoral and cellular immune responses (23, 35, 37, 60). This protein is targeted to circulating anti-NS1 antibodies either in plasma, as hexamers, or at cytoplasmic membrane of infected cells, as dimers, which may

lead to cell lysis (38). Since NS1 protein is not present on the virus particle, anti-NS1 antibodies are not capable to induce the ADE phenomenon (36, 38, 39, 61). Although anti-DENV-NS1 antibodies have been implicated to side effects associated with cross-reactivity with host proteins (62–64), such effects seems to be virus specific, since no similar effects have been reported with Japanese encephalitis virus (JEV) anti-NS1 antibodies (64). Moreover, there are conflicting evidences regarding the protective and deleterious effects associated with NS1-specific antibodies both in DENV and ZIKV infections (65, 66). On the other hand, passive immunization of mice with polyclonal

or monoclonal anti-NS1 antibodies promoted a clear protective effect to virus infection (36, 38, 39). Recently, a vaccinia ankara virus (MVA) modified to express the ZIKV NS1 induced protection after an intracranial challenge by inducing NS1-specific IgG2a and polyfunctional NS1-specific CD8⁺ T cells (35, 37). Human-derived anti-NS1 mAbs were also found to confer partial protection to immunodeficient ZIKV-challenged mice through passive immunity (38, 39). Furthermore, T cell-mediated immunity plays an important role in the protection induced by NS1-based DNA vaccines against ZIKV infection (23). Thus, robust induction of anti-NS1 antibodies associated with activation of T cell responses represent key features of a NS1-based vaccine capable to generate protective immunity to ZIKV.

The protective role of anti-NS1 antibodies has been correlated to the binding activity to surface-associated NS1 in ZIKV-infected cells, which promotes the clearance of the infected cells via ADCC or FcR-mediated complement (FC) cytotoxicity (36–39). Our data indicate that although similar serum anti-NS1 IgG responses were induced with the tested NS1-based DNA vaccines in immunocompetent mice, pgDNS1-ZIKV-vaccinated mice generated anti-NS1 antibodies with higher cell binding activity compared to those immunized with pNS1-ZIKV. Since these antibodies are capable to recognize membrane-associated NS1 dimers in ZIKV-infected cells, we expect that, under *in vivo* conditions, this would favor the clearance of infected cells. The presence of higher IgG2c levels in pgDNS1-ZIKV immunized AB6 mice also supports this hypothesis, since IgG2c antibodies are known to strongly bind to ADCC-mediator FcγRIV (67, 68). Thus, the enhanced immunity observed in this group may be related to the role of gD on the modulation of the induced antigen-specific responses. Moreover, cell transfection with pgDNS1-ZIKV increases the *in vitro* expression of NS1 compared to pNS1-ZIKV-transfected cells, a characteristic that may also impact the immunogenicity of the encoded proteins. These findings highlight the adjuvant effects of gD on the immunogenicity of antigens encoded by DNA vaccines.

The relevance of T cells in the control of ZIKV infection has been highlighted in different studies. This type of immune response was recently linked to protection to ZIKV challenge at experimental conditions, but also in the context of protection to secondary heterologous flavivirus infections (58, 69, 70). Moreover, T cell mediated immune responses induced by NS1-vaccination have been described as a key feature in the control of ZIKV infections under preclinical conditions (23, 37). Similar findings have also been reported in clinical studies demonstrating that NS1 is capable to induce robust IFN-γ production by T cells during ZIKV infection (71, 72). Since gD antigen-fusion platform has been extensively explored to increase T cell mediated protective immune responses (40, 41, 46–48), here we tested whether, under a different vaccine context, such approach would lead to enhancement of NS1-specific IFN-γ producing T cells. Using MHC-I restrict peptides of ZIKV NS1 to activate *in vitro* spleen cells of immunocompetent C57BL/6 immunized mice, we observed that only expression of NS1 fused to gD protein promoted significant enhancement of IFN-γ secreting cell responses. Since we used MHC-I restrict peptides to stimulate

the cells *in vitro*, these results also suggest activation of CD8⁺ T cell responses in vaccinated mice and open perspectives for the use of the identified MHC-I-restricted peptides in future studies dealing with induction of NS1-specific T cell responses under experimental conditions. Taken together, these findings indicated that gD fusion strategy is a promising alternative to enhance NS1-specific cellular response induced by vaccination.

Our data also corroborate with a recent study reporting the use of DNA vaccines encoding the ZIKV NS1 protein (23). Despite the differences in the tested vaccine regimen, including number of doses (total of three), immunization route (intradermal) and mouse genetic background (BALB/c), only expression of a modified form of NS1 (pVAX-tpaNS1) was able to induce high titers of antibodies capable of recognizing NS1 on infected cells and significant activation of T cell responses. Moreover, the authors reported the presence of immunodominant CD4⁺ and CD8⁺ T cell epitopes at the C-terminal region of NS1 (aa 172 to 352) (23). Similarly, the epitopes restricted to MHC-I predicted and validated in our work are mapped in the same region of the protein. In addition, the genetic fusion with HSV-1 gD protein led to enhanced activation of NS1-specific IFN-γ secreting cells in vaccinated mice. The differences in the CD8⁺ T cell epitopes used in the two studies are reflect the distinct genetic backgrounds of the tested vaccinated mouse strains (BALB/c × C57BL/6). On the other hand, since the validation of the peptides described in our study was performed after infection with ZIKV, these findings may reflect part of repertoire of immunodominant epitopes detected in more natural conditions. Nonetheless, since we did not evaluate the induced immune responses with the full length NS1, other epitopes may also be targeted after immunization with pgDNS1-ZIKV. Similarly, further studies shall address the positive impacts of gD antigen fusion with the induction of NS1-specific CD4⁺ T cell responses.

Wild type (WT) mice, such as C57BL/6, have preserved type I IFN responses that provide defense against flaviviruses infections and, consequently, do not permit efficient virus replication, generation of morbidity and lethality effects related to ZIKV infection (73, 74). To access the protective capacity of the formulations tested here we used a type I IFN receptor-deficient (IFNAR1^{-/-}) mouse strain, which is susceptible to ZIKV infection (57). Adopting the same vaccination protocol, we detected higher serum anti-NS1 IgG titers in mice immunized with pgDNS1-ZIKV when compared to mice immunized with pNS1-ZIKV. After challenge, pgDNS1-ZIKV-vaccinated mice showed reduced morbidity and lethality scores compared to animals immunized with pNS1-ZIKV. In addition, both NS1-based DNA vaccines induced predominant serum IgG2c subclass response and reduced viremia after infection. Taken together, these observations confirm the adjuvant effects of the gD-fusion strategy applied to DNA vaccines, leading to enhanced NS1-specific humoral and cellular immune responses in immunocompetent mice and protective immunity in AB6 mice. The observed NS1-mediated protective profiles are aligned with previous studies dealing with ZIKV NS1 based in immunodeficient mice (35), as well as in immunocompetent BALB/c (23, 60) or CD-1/ICR (37) mice. Moreover, in contrast

to the findings described by a study using NS1-based DNA vaccine (23), our formulations was capable to confer protection in IFNAR1^{-/-} mice even after challenge with a high infection dose (10⁶ PFU).

Despite the advantages of DNA vaccines with regard to other vaccine approaches, which includes manufacturing and costs, DNA vaccines usually show reduced immunogenicity when tested at clinical conditions (75). Electroporation represent one of the most effective strategy to enhance the immunogenicity of DNA vaccines both in mice and humans (76). Previous evidences demonstrated that electroporation enhance activation of T-cell mediated protective responses in a murine tumor challenge model (77). In the present study, administration of the DNA vaccines via electroporation contributed to the induction of immune responses with reduction of vaccine doses administered in the animals with regard to other study based on DNA vaccine encoding ZIKV NS1 (23). Altogether, the present evidences further support the relevance of electroporation as a preferred delivery method for administration of DNA vaccines either at experimental or clinical conditions.

Although the adjuvant role of gD is evident in all strategies explored so far, the mechanisms related to the observed adjuvant effects remain not totally elucidated. The gD immunomodulatory effects are mainly based on the binding capacity to specific receptors located on the surface of antigen presenting cells, such as the HVEM receptor in dendritic cells (DC) (48). Binding of gD interferes with interaction of HVEM to its native immunosuppressive ligands leading to final enhancement of B and T cells activation (48). gD binding to HVEM also triggers the activation of NF-kappa B pathway promoting pro-survival signals in T cells (44, 45, 78). Additionally, as previously described, purified chimeric gD-based proteins are capable to activate a DC subset specialized in antigen cross-presentation and leading to enhance generation of activated antigen-specific CD8⁺ T lymphocytes (41). These effects are in line with the results reported here in which generation of a chimeric NS1/gD protein promoted enhanced NS1-specific cellular responses.

Altogether, the findings reported here described for the first time the strategy based on the use of DNA vaccines encoding ZIKV NS1 genetically fused with the HSV-1 gD protein. The adjuvant effects observed with the chimeric NS1/gD, regarding induction of NS1-specific cellular and humoral immune responses, support the use of such approach in further attempts to enhance immunity to ZIKV induced by DNA vaccines and open perspectives for the development of effective anti-ZIKV vaccines as well as other flaviruses.

REFERENCES

1. Faye O, Freire CCM, Iamarino A, Faye O, de Oliveira JVC, Diallo M, et al. Molecular evolution of zika virus during its emergence in the 20th century. *PLoS Negl Trop Dis*. (2014) 8:36. doi: 10.1371/journal.pntd.0002636
2. Hayes EB. Zika virus outside Africa. *Emerg Infect Dis*. (2009) 15:1347–50. doi: 10.3201/eid1509.090442

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**, further inquiries can be directed to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Institutional Animal Care and Use Committee (CEUA) of the University of São Paulo (protocol number 96/2016).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

LP and LF: conceived and designed the experiments. LP, RA, NS, RA-S, AV-C, SP, MC-A, MR-J, MF, and RC-C: performed the experiments. LP and RA: analyzed the data. MR-J and LM: contributed reagents, materials, and analysis tools. LP: prepared the figures. LP, RA, RA-S, MC-A, and LF: wrote the paper. NS, AV-C, SP, MR-J, and MF: revised the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

FUNDING

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). FAPESP grants numbers: 2016/20045-7 (LF), 2016/05570-8 (LP), 2014/17595-0 (RA), 2016/14344-1 (NS), 2016/23560-0 (RA-S), 2017/09661-0 (SP), 2018/14459-9 (MC-A) and 2018/08199-4 (MF). CAPES grant numbers: 88887.473724/2020-00 (AV-C) and 88887.185337/2018-00 (MR-J).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Eduardo Gimenes Martins for the invaluable technical support. We also thanked Dr. Roxane Maria Fontes Piazza (Butantan Institute, Brazil) for donating the 4H2 mAb.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmedt.2020.604160/full#supplementary-material>

3. Hennessey M, Fischer M, Staples JE. Zika virus spreads to new areas - region of the Americas, May 2015-January 2016. *Am J Transplant*. (2016) 16:1031–4. doi: 10.1111/ajt.13743
4. Tognarelli J, Ulloa S, Villagra E, Lagos J, Aguayo C, Fasce R, et al. A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. *Arch Virol*. (2016) 161:665–8. doi: 10.1007/s00705-015-2695-5

5. Cugola FR, Fernandes IR, Russo FB, Freitas BC, Dias JLM, Guimarães KP, et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature*. (2016) 534:267–71. doi: 10.1038/nature18296
6. Driggers RW, Ho C-Y, Korhonen EM, Kuivaneen S, Jääskeläinen AJ, Smura T, et al. Zika virus infection with prolonged maternal viremia and fetal brain abnormalities. *N Engl J Med*. (2016) 374:2142–51. doi: 10.1056/NEJMoa1601824
7. Oliveira DBL, Almeida FJ, Durigon EL, Mendes EA, Braconi CT, Marchetti I, et al. Prolonged shedding of zika virus associated with congenital infection. *N Engl J Med*. (2016) 375:1202–4. doi: 10.1056/NEJMcl607583
8. Scott JM, Lebratti TJ, Richner JM, Jiang X, Fernandez E, Zhao H, et al. Cellular and humoral immunity protect against vaginal zika virus infection in mice. Pfeiffer JK, editor. *J Virol*. (2018) 92:e00038–18. doi: 10.1128/JVI.00038-18
9. Richner JM, Diamond MS. Zika virus vaccines: immune response, current status, and future challenges. *Curr Opin Immunol*. (2018) 53:130–6. doi: 10.1016/j.coi.2018.04.024
10. Elong Ngono A, Shresta S. Cross-reactive t cell immunity to dengue and zika viruses: new insights into vaccine development. *Front Immunol*. (2019) 10:1316. doi: 10.3389/fimmu.2019.01316
11. Tebas P, Roberts CC, Muthumani K, Reuschel EL, Kudchodkar SB, Zaidi FI, et al. Safety and immunogenicity of an anti-zika virus DNA vaccine — preliminary report. *N Engl J Med*. (2017). doi: 10.1056/NEJMoa1708120. [Epub ahead of print].
12. Abbink P, Larocca RA, Visitsunthorn K, Boyd M, De La Barrera RA, Gromowski GD, et al. Durability and correlates of vaccine protection against Zika virus in rhesus monkeys. *Sci Transl Med*. (2017) 9:eaa04163. doi: 10.1126/scitranslmed.aao4163
13. Larocca RA, Abbink P, Peron JPS, Zanotto PM de A, Iampietro MJ, Badamchi-Zadeh A, et al. Vaccine protection against Zika virus from Brazil. *Nature*. (2016) 536:474–8. doi: 10.1038/nature18952
14. Abbink P, Larocca RA, De La Barrera RA, Bricault CA, Moseley ET, Boyd M, et al. Protective efficacy of multiple vaccine platforms against Zika virus challenge in rhesus monkeys. *Science*. (2016) 353:1129–32. doi: 10.1126/science.aah6157
15. Berry N, Kempster S, Ham C, Jenkins A, Hall J, Page M, et al. Passive immunisation of convalescent human anti-Zika plasma protects against challenge with New World Zika virus in cynomolgus macaques. *npj Vaccines*. (2020) 5:86. doi: 10.1038/s41541-020-00234-y
16. Elong Ngono A, Vizcarrá EA, Tang WW, Sheets N, Joo Y, Kim K, et al. Mapping and role of the CD8 + T cell response during primary zika virus infection in mice. *Cell Host Microbe*. (2017) 21:35–46. doi: 10.1016/j.chom.2016.12.010
17. Regla-Nava JA, Elong Ngono A, Viramontes KM, Huynh A-T, Wang Y-T, Nguyen A-VT, et al. Cross-reactive Dengue virus-specific CD8+ T cells protect against Zika virus during pregnancy. *Nat Commun*. (2018) 9:3042. doi: 10.1038/s41467-018-05458-0
18. Huang H, Li S, Zhang Y, Han X, Jia B, Liu H, et al. CD8 + T cell immune response in immunocompetent mice during zika virus infection. Diamond MS, editor. *J Virol*. (2017) 91:e00900-17. doi: 10.1128/JVI.00900-17
19. Wen J, Wang Y-T, Valentine KM, dos Santos Alves RP, Xu Z, Regla-Nava JA, et al. CD4+ T Cells Cross-Reactive with Dengue and Zika Viruses Protect against Zika Virus Infection. *Cell Rep*. (2020) 31:107566. doi: 10.1016/j.celrep.2020.107566
20. Hassert M, Wolf KJ, Schwetye KE, DiPaolo RJ, Brien JD, Pinto AK. CD4+T cells mediate protection against Zika associated severe disease in a mouse model of infection. Fernandez-Sesma A, editor. *PLoS Pathog*. (2018) 14:e1007237. doi: 10.1371/journal.ppat.1007237
21. Lucas CGOO, Kitoko JZ, Ferreira FM, Suzart VG, Papa MP, Coelho SVAA, et al. Critical role of CD4+ T cells and IFN γ signaling in antibody-mediated resistance to Zika virus infection. *Nat Commun*. (2018) 9:3136. doi: 10.1038/s41467-018-05519-4
22. Pardi N, Hogan MJ, Pelc RS, Muramatsu H, Andersen H, DeMaso CR, et al. Zika virus protection by a single low-dose nucleoside-modified mRNA vaccination. *Nature*. (2017) 543:248–51. doi: 10.1038/nature21428
23. Grubor-Bauk B, Wijesundara DK, Masavuli M, Abbink P, Peterson RL, Prow NA, et al. NS1 DNA vaccination protects against Zika infection through T cell-mediated immunity in immunocompetent mice. *Sci Adv*. (2019) 5:eax2388. doi: 10.1126/sciadv.aax2388
24. Zhan Y, Pang Z, Du Y, Wang W, Yang Y, Wang W, et al. NS1-based DNA vaccination confers mouse protective immunity against ZIKV challenge. *Infect Genet Evol*. (2020) 85:104521. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104521
25. McCracken MK, Gromowski GD, Friberg HL, Lin X, Abbink P, De La Barrera R, et al. Impact of prior flavivirus immunity on Zika virus infection in rhesus macaques. Heise MT, editor. *PLoS Pathog*. (2017) 13:e1006487. doi: 10.1371/journal.ppat.1006487
26. Zellweger RM, Prestwood TR, Shresta S. Enhanced infection of liver sinusoidal endothelial cells in a mouse model of antibody-induced severe dengue disease. *Cell Host Microbe*. (2010) 7:128–39. doi: 10.1016/j.chom.2010.01.004
27. Dejinrattisai W, Supasa P, Wongwiwat W, Rouvinski A, Barba-Spaeth G, Duangchinda T, et al. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. *Nat Immunol*. (2016) 17:1102–8. doi: 10.1038/ni.3515
28. Katzelnick LC, Narvaez C, Arguello S, Lopez Mercado B, Collado D, Ampie O, et al. Zika virus infection enhances future risk of severe dengue disease. *Science*. (2020) 369:1123–8. doi: 10.1126/science.abb6143
29. Richner JM, Himansu S, Dowd KA, Butler SL, Salazar V, Fox JM, et al. Modified mRNA vaccines protect against zika virus infection. *Cell*. (2017) 168:1114–25. doi: 10.1016/j.cell.2017.02.017
30. Dowd KA, Ko S-Y, Morabito KM, Yang ES, Pelc RS, DeMaso CR, et al. Rapid development of a DNA vaccine for Zika virus. *Science*. (2016) 354:237–40. doi: 10.1126/science.aai9137
31. Han J-F, Qiu Y, Yu J-Y, Wang H-J, Deng Y-Q, Li X-F, et al. Immunization with truncated envelope protein of Zika virus induces protective immune response in mice. *Sci Rep*. (2017) 7:10047. doi: 10.1038/s41598-017-10595-5
32. Araujo SC, Pereira LR, Alves RPS, Andreata-Santos R, Kanno AI, Ferreira LCS, et al. Anti-Flavivirus vaccines: review of the present situation and perspectives of subunit vaccines produced in *Escherichia coli*. *Vaccines*. (2020) 8:492. doi: 10.3390/vaccines8030492
33. Poland GA, Ovsyannikova IG, Kennedy RB. Zika vaccine development: current status. *Mayo Clin Proc*. (2019) 94:2572–86. doi: 10.1016/j.mayocp.2019.05.016
34. Muller D, Young PR. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Res*. (2013) 98:192–208. doi: 10.1016/j.antiviral.2013.03.008
35. Li A, Yu J, Lu M, Ma Y, Attia Z, Shan C, et al. A Zika virus vaccine expressing pre-membrane-envelope-NS1 polyprotein. *Nat Commun*. (2018) 9:3067. doi: 10.1038/s41467-018-05276-4
36. Bailey MJ, Broecker F, Duehr J, Arumemi F, Krammer F, Palese P, et al. Antibodies elicited by an NS1-based vaccine protect mice against Zika virus. Griffin DE, editor. *MBio*. (2019) 10:e02861-18. doi: 10.1128/mBio.02861-18
37. Brault AC, Domi A, McDonald EM, Talmi-Frank D, McCurley N, Basu R, et al. A Zika vaccine targeting NS1 protein protects immunocompetent adult mice in a lethal challenge model. *Sci Rep*. (2017) 7:14769. doi: 10.1038/s41598-017-15039-8
38. Bailey MJ, Duehr J, Dulin H, Broecker F, Brown JA, Arumemi FO, et al. Human antibodies targeting Zika virus NS1 provide protection against disease in a mouse model. *Nat Commun*. (2018) 9:4560. doi: 10.1038/s41467-018-07008-0
39. Wessel AW, Kose N, Bombardi RG, Roy V, Chantima W, Mongkolsapaya J, et al. Antibodies targeting epitopes on the cell-surface form of NS1 protect against Zika virus infection during pregnancy. *Nat Commun*. (2020) 11:5278. doi: 10.1038/s41467-020-19096-y
40. Lasaro MO, Diniz MO, Reyes-Sandoval A, Ertl HC, Ferreira LCS. Anti-tumor DNA vaccines based on the expression of human papillomavirus-16 E6/E7 oncoproteins genetically fused with the glycoprotein D from herpes simplex virus-1. *Microbes Infect*. (2005) 7:1541–50. doi: 10.1016/j.micinf.2005.05.024

41. Porchia BFMM, Moreno ACR, Ramos RN, Diniz MO, de Andrade LHTM, Rosa DS, et al. Herpes simplex virus glycoprotein D targets a specific dendritic cell subset and improves the performance of vaccines to human papillomavirus-associated tumors. *Mol Cancer Ther.* (2017) 16:1922–33. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-17-0071
42. Connolly SA, Jackson JO, Jardetzky TS, Longnecker R. Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery. *Nat Rev Microbiol.* (2011) 9:369–81. doi: 10.1038/nrmicro2548
43. Murphy TL, Murphy KM. Slow down and survive: enigmatic immunoregulation by BTLA and HVEM. *Annu Rev Immunol.* (2010) 28:389–411. doi: 10.1146/annurev-immunol-030409-101202
44. Steinberg MW, Cheung TC, Ware CF. The signaling networks of the herpesvirus entry mediator (TNFRSF14) in immune regulation. *Immunol Rev.* (2011) 244:169–87. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01064.x
45. Cheung TC, Steinberg MW, Osborne LM, Macauley MG, Fukuyama S, Sanjo H, et al. Unconventional ligand activation of herpesvirus entry mediator signals cell survival. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2009) 106:6244–9. doi: 10.1073/pnas.0902115106
46. Porchia BFMM, Diniz MO, Cariri FAMO, Santana VC, Amorim JH, Balan A, et al. Purified herpes simplex type 1 glycoprotein D (gD) genetically fused with the type 16 human papillomavirus E7 oncoprotein enhances antigen-specific CD8+ T cell responses and confers protective antitumor immunity. *Mol Pharm.* (2011) 8:2320–30. doi: 10.1021/mp200194s
47. Diniz MO, Cariri FAMO, Aps LRMM, Ferreira LCS. Enhanced therapeutic effects conferred by an experimental DNA vaccine targeting human papillomavirus-induced tumors. *Hum Gene Ther.* (2013) 24:861–70. doi: 10.1089/hum.2013.102
48. Lasaro MO, Tatsis N, Hensley SE, Whitbeck JC, Lin S-W, Rux JJ, et al. Targeting of antigen to the herpesvirus entry mediator augments primary adaptive immune responses. *Nat Med.* (2008) 14:205–12. doi: 10.1038/nm1704
49. Lásaro MO, Alves AM, Botosso VE, Durigon EL, Ferreira LC. Antibody-inducing properties of a prototype bivalent herpes simplex virus/enterotoxigenic *Escherichia coli* DNA vaccine. *FEMS Immunol Med Microbiol.* (2003) 35:25–31. doi: 10.1111/j.1574-695X.2003.tb00645.x
50. Rosa da Silva CM, Chura-Chambi RM, Ramos Pereira L, Cordeiro Y, de Souza Ferreira LC, Morganti L. Association of high pressure and alkaline condition for solubilization of inclusion bodies and refolding of the NS1 protein from zika virus. *BMC Biotechnol.* (2018) 18:78. doi: 10.1186/s12896-018-0486-2
51. Andreatta-Santos R, Alves RP dos S, Pereira SA, Pereira LR, Freitas CL de, Pereira SS, et al. Transcutaneous administration of dengue vaccines. *Viruses.* (2020) 12:514. doi: 10.3390/v12050514
52. Henriques HR, Rampazo EV, Gonçalves AJS, Vicentin ECM, Amorim JH, Panatieri RH, et al. Targeting the non-structural protein 1 from dengue virus to a dendritic cell population confers protective immunity to lethal virus challenge. *PLoS Negl Trop Dis.* (2013) 7:233008648–903079. doi: 10.1371/journal.pntd.0002330
53. Lundegaard C, Lamberth K, Harndahl M, Buus S, Lund O, Nielsen M. NetMHC-3.0: accurate web accessible predictions of human, mouse and monkey MHC class I affinities for peptides of length 8–11. *Nucleic Acids Res.* (2008) 36:W509–12. doi: 10.1093/nar/gkn202
54. Moutafisi M, Peters B, Pasquetto V, Tschärke DC, Sidney J, Bui H-H, et al. A consensus epitope prediction approach identifies the breadth of murine T(CD8+)-cell responses to vaccinia virus. *Nat Biotechnol.* (2006) 24:817–9. doi: 10.1038/nbt1215
55. Alves RP dos S, Pereira L, Fabris DLN, Salvador FS, Santos RA, Zanotto PM de A, et al. Production of a recombinant Dengue virus 2 NS5 protein and the potential use as a vaccine antigen. *Clin Vaccine Immunol.* (2016) 23:460–9. doi: 10.1128/CVI.00081-16
56. Caine E, Jagger B, Diamond M. Animal models of zika virus infection during pregnancy. *Viruses.* (2018) 10:598. doi: 10.3390/v10110598
57. Miner JJ, Cao B, Govero J, Smith AM, Fernandez E, Cabrera OH, et al. Zika virus infection during pregnancy in mice causes placental damage and fetal demise. *Cell.* (2016) 165:1081–91. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.008
58. Subramaniam KS, Lant S, Goodwin L, Grifoni A, Weiskopf D, Turtle L. Two is better than one: evidence for T-cell cross-protection between dengue and zika and implications on vaccine design. *Front Immunol.* (2020) 11:517. doi: 10.3389/fimmu.2020.00517
59. Pinheiro-Michelsen JR, Souza R da SO, Santana IVR, da Silva P de S, Mendez EC, Luiz WB, et al. Anti-dengue vaccines from development to clinical trials. *Front Immunol.* (2020) 11:1252. doi: 10.3389/fimmu.2020.01252
60. Liu X, Qu L, Ye X, Yi C, Zheng X, Hao M, et al. Incorporation of NS1 and prM/M are important to confer effective protection of adenovirus-vectored Zika virus vaccine carrying E protein. *npj Vaccines.* (2018) 3:29. doi: 10.1038/s41541-018-0072-6
61. Stettler K, Beltranello M, Espinosa DA, Graham V, Cassotta A, Bianchi S, et al. Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. *Science.* (2016) 353:823–6. doi: 10.1126/science.1248505
62. Wan S-W, Lin C-F, Chen M-C, Lei H-Y, Liu H-S, Yeh T-M, et al. C-terminal region of dengue virus nonstructural protein 1 is involved in endothelial cell cross-reactivity via molecular mimicry. *Am J Infect Dis.* (2008) 4:85–91. doi: 10.3844/ajidsp.2008.85.91
63. Lin C-F, Lei H-Y, Shiau A-L, Liu H-S, Yeh T-M, Chen S-H, et al. Endothelial cell apoptosis induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 via production of nitric oxide. *J Immunol.* (2002) 169:657–64. doi: 10.4049/jimmunol.169.2.657
64. Chen M-C, Lin C-F, Lei H-Y, Lin S-C, Liu H-S, Yeh T-M, et al. Deletion of the C-terminal region of dengue virus nonstructural protein 1 (NS1) abolishes anti-NS1-mediated platelet dysfunction and bleeding tendency. *J Immunol.* (2009) 183:1797–803. doi: 10.4049/jimmunol.0800672
65. Reyes-Sandoval A, Ludert JE. The dual role of the antibody response against the flavivirus non-structural protein 1 (NS1) in protection and immunopathogenesis. *Front Immunol.* (2019) 10:1651. doi: 10.3389/fimmu.2019.01651
66. Amorim JH, Alves RPDS, Boscardin SB, Ferreira LCDS. The dengue virus non-structural 1 protein: risks and benefits. *Virus Res.* (2014) 181:53–60. doi: 10.1016/j.virusres.2014.01.001
67. Nimmerjahn F, Bruhns P, Horiuchi K, Ravetch JV. FcγRIV: a novel FcR with distinct IgG subclass specificity. *Immunity.* (2005) 23:41–51. doi: 10.1016/j.immuni.2005.05.010
68. Falconer DJ, Barb AW. Mouse IgG2c Fc loop residues promote greater receptor-binding affinity than mouse IgG2b or human IgG1. Perymakov EA, editor. *PLoS ONE* (2018) 13:e0192123. doi: 10.1371/journal.pone.0192123
69. Saron WAA, Rathore APS, Ting L, Ooi EE, Low J, Abraham SN, et al. Flavivirus serocomplex cross-reactive immunity is protective by activating heterologous memory CD4 T cells. *Sci Adv.* (2018) 4:eaar4297. doi: 10.1126/sciadv.aar4297
70. Singh R, Rothman AL, Potts J, Guirakhoo F, Ennis FA, Green S. Sequential immunization with heterologous chimeric flaviviruses induces broad-spectrum cross-reactive CD8 + T cell responses. *J Infect Dis.* (2010) 202:223–33. doi: 10.1086/653486
71. El Sahly HM, Gorchakov R, Lai L, Natrajan MS, Patel SM, Atmar RL, et al. Clinical, virologic, and immunologic characteristics of zika virus infection in a cohort of US patients: prolonged RNA detection in whole blood. *Open Forum Infect Dis.* (2019) 6:ofy352. doi: 10.1093/ofid/ofy352
72. Waggoner JJ, Roupael N, Xu Y, Natrajan M, Lai L, Patel SM, et al. Pericarditis associated with acute zika virus infection in a returning traveler. *Open Forum Infect Dis.* (2017) 4:ofx103. doi: 10.1093/ofid/ofx103
73. Alves dos Santos E, Fink K. Animal models for dengue and zika vaccine development. *Adv Exp Med Biol.* (2018) 1062:215–39. doi: 10.1007/978-981-10-8727-1_16
74. Lazear HM, Govero J, Smith AM, Platt DJ, Fernandez E, Miner JJ, et al. A mouse model of zika virus pathogenesis. *Cell Host Microbe.* (2016) 19:720–30. doi: 10.1016/j.chom.2016.03.010
75. MacGregor RR, Boyer JD, Ugen KE, Lacy KE, Gluckman SJ, Bagarazzi ML, et al. First human trial of a DNA-based vaccine for treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection: safety and host response. *J Infect Dis.* (1998) 178:92–100. doi: 10.1086/515613
76. Low L, Mander A, McCann K, Dearnaley D, Tjelle T, Mathiesen I, et al. DNA vaccination with electroporation induces increased antibody responses in patients with prostate cancer. *Hum Gene Ther.* (2009) 20:1269–78. doi: 10.1089/hum.2009.067
77. Sales NS, Silva JR, Aps LRMM, Silva MO, Porchia BFMM, Ferreira LCS, et al. *In vivo* electroporation enhances vaccine-mediated therapeutic control of human papilloma virus-associated tumors by the activation of multifunctional and effector memory CD8+ T cells. *Vaccine.* (2017) 35:7240–9. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.11.011

78. Reske A, Pollara G, Krummenacher C, Chain BM, Katz DR. Understanding HSV-1 entry glycoproteins. *Rev Med Virol.* (2007) 17:205–15. doi: 10.1002/rmv.531

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Pereira, Alves, Sales, Andreato-Santos, Venceslau-Carvalho, Pereira, Castro-Amarante, Rodrigues-Jesus, Favaro, Chuna-Chambi, Morganti and Ferreira. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

ANEXOS A – Aprovação do kit ELISA ZIKV pela ANVISA

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Detalhes do Produto	
Nome da Empresa	ADVAGEN BIOTECH LTDA
CNPJ	22.565.307/0001-72
Autorização	8.14.720-6
Produto	Adva Femme Zika-v IgG.

Modelo Produto Médico
COD: ZVE/192
COD: ZVE/480
COD: ZVE/96
COD: ZVE/960

Tipo de Arquivo	Arquivos	Expediente, data e hora de inclusão
INSTRUÇÕES DE USO OU MANUAL DO USUÁRIO DO PRODUTO	Instruções de Uso Adva Femme Zika -v IgG Versão 06.pdf	3931649211 - 05/10/2021 15:36:46

Nome Técnico	ZIKA
Registro	81472060013
Processo	25351706085201811
Fabricante Legal	ADVAGEN BIOTECH LTDA
Classificação de Risco	III - Classe III: produtos de alto risco ao indivíduo e ou médio risco à saúde pública
Vencimento do Registro	03/06/2029

ANEXO B – Artigo de primeira autoria publicado durante o doutoramento.



Article

Intradermal Delivery of Dendritic Cell-Targeting Chimeric mAbs Genetically Fused to Type 2 Dengue Virus Nonstructural Protein 1

Lennon Ramos Pereira ¹, Elaine Cristina Matos Vicentin ², Sara Araujo Pereira ¹,
Denicar Lina Nascimento Fabris Maeda ¹, Rúbens Prince dos Santos Alves ¹,
Robert Andreato-Santos ¹, Francielle Tramontini Gomes de Sousa ³,
Marcio Massao Yamamoto ², Maria Fernanda Castro-Amarante ¹,
Marianna Teixeira de Pinho Favaro ¹, Camila Malta Romano ³, Ester Cerdeira Sabino ³,
Sílvia Beatriz Boscardin ² and Luís Carlos de Souza Ferreira ^{1,*}

- ¹ Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo 05508-000, Brazil; lennon_rp@hotmail.com (L.R.P.); araujopereirasara@gmail.com (S.A.P.); denicarlina@usp.br (D.L.N.F.M.); rubens.bme@gmail.com (R.P.d.S.A.); robert_andreato@hotmail.com (R.A.-S.); mfamarante@usp.br (M.F.C.-A.); favaro.mtp@gmail.com (M.T.d.P.F.)
² Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo 05508-000, Brazil; elaine.vicentin@gmail.com (E.C.M.V.); masayama@usp.br (M.M.Y.); sbboscardin@usp.br (S.B.B.)
³ Clinical Hospital HCFMUSEP, Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, Sao Paulo 05403-000, Brazil; francielte@gmail.com (F.T.G.d.S.); camismalta@gmail.com (C.M.R.); sabinoec@gmail.com (E.C.S.)
 * Correspondence: lcsf@usp.br; Tel.: +55-11-3091-7356

Received: 19 August 2020; Accepted: 22 September 2020; Published: 1 October 2020



Abstract: Targeting dendritic cells (DCs) by means of monoclonal antibodies (mAbs) capable of binding their surface receptors (DEC205 and DCIR2) has previously been shown to enhance the immunogenicity of genetically fused antigens. This approach has been repeatedly demonstrated to enhance the induced immune responses to passenger antigens and thus represents a promising therapeutic and/or prophylactic strategy against different infectious diseases. Additionally, under experimental conditions, chimeric α DEC205 or α DCIR2 mAbs are usually administered via an intraperitoneal (i.p.) route, which is not reproducible in clinical settings. In this study, we characterized the delivery of chimeric α DEC205 or α DCIR2 mAbs via an intradermal (i.d.) route, compared the elicited humoral immune responses, and evaluated the safety of this potential immunization strategy under preclinical conditions. As a model antigen, we used type 2 dengue virus (DENV2) nonstructural protein 1 (NS1). The results show that the administration of chimeric DC-targeting mAbs via the i.d. route induced humoral immune responses to the passenger antigen equivalent or superior to those elicited by i.p. immunization with no toxic effects to the animals. Collectively, these results clearly indicate that i.d. administration of DC-targeting chimeric mAbs presents promising approaches for the development of subunit vaccines, particularly against DENV and other flaviviruses.

Keywords: intradermal; DEC205; DCIR2; dendritic cell; NS1 protein; Dengue virus

1. Introduction

Targeting antigens to dendritic cells (DCs) has been repeatedly demonstrated to improve the immunogenicity of subunit vaccines. DCs are specialized in antigen presentation with functions that include the initiation and regulation of host immune responses. An efficient DC-targeting delivery method relies on the genetic fusion of antigens to monoclonal antibodies (mAbs) that specifically bind to endocytic receptors expressed on the surface of DCs [1–3]. Among various DC types, CD8 α + and

ANEXO C – Artigos de co-autoria publicados durante o doutoramento.



Short Communication

NS1-based ELISA test efficiently detects dengue infections without cross-reactivity with Zika virus

Samuel Santos Pereira^a, Robert Andreato-Santos^a, Lennon Ramos Pereira^a, Camila Pereira Soares^b, Alvina Clara Félix^c, Patrícia de Mello Jungmann Cardoso de Andrade^d, Edison Luís Durigon^b, Camila Malta Romano^{c,e}, Luís Carlos de Souza Ferreira^{a,*}

^aVaccine Development Laboratory, Microbiology Department, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^bLaboratory of Clinical and Molecular Virology, Microbiology Department, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^cInstituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

^dUniversidade de Pernambuco UPE - General Pathology, Recife, Pernambuco, Brazil

^eHospital das Clínicas HCFMUSP (LIM 52), Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 May 2021

Revised 1 September 2021

Accepted 6 September 2021

KEYWORDS:

Dengue virus
Serological diagnosis
NS1
ELISA

ABSTRACT

Objectives: The aim of this study was to achieve greater specificity of dengue virus (DENV) serological tests based on a recombinant antigen derived from non-structural protein 1 (Δ NS1) with regard to cross-reactive Zika virus (ZIKV) anti-NS1 antibody responses. This is of relevance in endemic regions for the serological discrimination of both DENV and ZIKV, such as Brazil and other tropical countries.

Methods: The Δ NS1 proteins were obtained as recombinant antigens and were evaluated as solid-phase-bound antigens in the ELISA test to detect anti-NS1 IgG antibodies. The performance of the Δ NS1-based DENV IgG ELISA was assessed with both mouse and human serum samples previously exposed to DENV or ZIKV.

Results: The Δ NS1-based DENV IgG ELISA detected anti-DENV NS1 IgG without cross-reactivity with ZIKV-positive serum samples. The sensitivity and specificity of the assay determined using samples previously characterized by real-time PCR (qRT-PCR) or plaque reduction neutralization assay (PRNT) were 82% and 93%, respectively.

Conclusion: The Δ NS1-based DENV IgG ELISA conferred enhanced diagnostic specificity for anti-DENV serological tests and may be particularly useful for serological analyses in endemic regions for both DENV and ZIKV transmission.

© 2021 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of International Society for Infectious Diseases. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

1. Introduction

Dengue virus (DENV) and Zika virus (ZIKV) share genetic and antigenic determinants (Breitbach et al., 2019). This feature leads to difficulties in laboratory diagnosis based on serological assays, particularly in regions where the two diseases are endemic. Indeed, the misdiagnosis of DENV infection caused by cross-reactivity with anti-ZIKV antibodies is found among commercially available immunoassays (Felix et al., 2017). Presently available ELISAs for DENV are based on whole cross-reactive antigens, such as the envelope protein and DENV particles (Premkumar et al., 2017;

Tyson et al., 2019). Nonetheless, enhanced specificity of ZIKV serological tests has been achieved using C-terminal fragments of ZIKV non-structural protein 1 (ZIKV Δ NS1) (Cabral-Miranda et al., 2018; Kanno et al., 2020).

The aim of the present study was to evaluate the performance of DENV serological tests performed using recombinant NS1 C-terminal fragments (DENVs Δ NS1) for the detection of IgG responses using ELISA. The results indicated that recombinant DENVs Δ NS1 allows the specific detection of IgG responses in DENV-infected patients, even in the presence of ZIKV anti-NS1 antibodies.

* Corresponding author: Luís Carlos de Souza Ferreira, Vaccine Development Laboratory, Microbiology Department, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.
E-mail address: lcsf@usp.br (L.C.S. Ferreira).

<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.09.009>

1201-9712/© 2021 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of International Society for Infectious Diseases. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)



BASIC SCIENCE

Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine
37 (2021) 102445



Original Article

nanomedjournal.com

Nano-multilamellar lipid vesicles loaded with a recombinant form of the chikungunya virus E2 protein improve the induction of virus-neutralizing antibodies

Aléxia Adrienne Venceslau-Carvalho, MSc^a, Marianna Teixeira de Pinho Favaro, PhD^a, Lennon Ramos Pereira, MSc^a, Mônica Josiane Rodrigues-Jesus, PhD^a, Samuel Santos Pereira, MSc^a, Robert Andreatta-Santos, PhD^a, Rúbens Prince dos Santos Alves, PhD^a, Maria Fernanda Castro-Amarante, PhD^a, Karine Bitencourt Rodrigues, MSc^a, Jamile Ramos da Silva, MSc^a, Rafael Rahal Guaragna Machado, BSc^b, Marielton dos Passos Cunha, PhD^c, Paolo Marinho de Andrade Zanotto, PhD^c, Wesley Luzetti Fotoran, PhD^d, Gerhard Wunderlich, PhD^d, Edison Luiz Durigon, PhD^b, Luís Carlos de Souza Ferreira, PhD^{a,*}

^aVaccine Development Laboratory, Microbiology Department and Parasitology Department, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^bLaboratory of Clinical and Molecular Virology, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^cLaboratory of Molecular Evolution and Bioinformatics, Department of Microbiology, Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^dUnit for Drug Development and Plasmodium Molecular Biology, Parasitology Department, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Brazil

Revised 1 July 2021

Abstract

Chikungunya virus (CHIKV) is responsible for a self-limited illness that can evolve into long-lasting painful joint inflammation. In this study, we report a novel experimental CHIKV vaccine formulation of lipid nanoparticles loaded with a recombinant protein derived from the E2 structural protein. This antigen fragment, designated ΔE2.1, maintained the antigenicity of the native viral protein and was specifically recognized by antibodies induced in CHIKV-infected patients. The antigen has been formulated into nanoparticles consisting of nano-multilamellar vesicles (NMVs) combined with the adjuvant monophosphoryl lipid A (MPLA). The vaccine formulation demonstrated a depot effect, leading to controlled antigen release, and induced strong antibody responses significantly higher than in mice immunized with the purified protein combined with the adjuvant. More relevantly, E2-specific antibodies raised in mice immunized with ΔE2.1-loaded NMV-MPLA neutralized CHIKV under *in vitro* conditions. Taken together, the results demonstrated that the new nanoparticle-based vaccine formulation represents a promising approach for the development of effective anti-CHIKV vaccines.

© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.

Key words: Chikungunya; Nanovaccine; CHIKV; NMVs; MPLA

Acknowledgments: We would like to acknowledge the financial support of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico [CNPq grant number: 168284/2017-0], Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo [FAPESP grant number RAS: 2016/23560-0; RRGM: 2017/24769-2; ELD: 2016/20045-7; MPC: 2016/08204-2; PMAZ: 2017/23281-6; WLF: 2016/19145-7] and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CAPES. We appreciate the support of the Supramolecular Chemistry Laboratory and CEFAP. We generously acknowledge the valuable support and contributions of Eduardo Gimenes and Eric Lin. The protein purification steps were performed with the assistance of DeltaLys Biotechnology.

* Corresponding author.

E-mail addresses: alexiabiotec@usp.br, (A.A. Venceslau-Carvalho), favaro.mfp@gmail.com, (M. Teixeira de Pinho Favaro), lennon_rp@hotmail.com, (L. Ramos Pereira), modrigues4@gmail.com, (M.J. Rodrigues-Jesus), samuelbiomedicina@usp.br, (S. Santos Pereira), robert_andreatta@hotmail.com, (R. Andreatta-Santos), rubens.bmc@gmail.com, (R.P. dos Santos Alves), mcfamante@gmail.com, (M.F. Castro-Amarante), karinebitencourt@usp.br, (K. Bitencourt Rodrigues), jamile@usp.br, (J. Ramos da Silva), rafadmachado@usp.br, (R. Rahal Guaragna Machado), marieltondospassos@gmail.com, (M. dos Passos Cunha), pzanotto@usp.br, (P. Marinho de Andrade Zanotto), wesleylfw@hotmail.com, (W. Luzetti Fotoran), gwunder@usp.br, (G. Wunderlich), edurigo@usp.br, (E.L. Durigon), lcsf@usp.br, alexiabiotec@usp.br, (L.C. de Souza Ferreira).

<https://doi.org/10.1016/j.nano.2021.102445>

1549-9634/© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.



Nanovaccine based on self-assembling nonstructural protein 1 boosts antibody responses to Zika virus

Marianna Teixeira Pinho Favaro, PhD*, Monica Josiane Rodrigues-Jesus, MSc, Alexia Adrienne Venceslau-Carvalho, MSc, Rúbens Prince Dos Santos Alves, PhD, Lennon Ramos Pereira, MSc, Samuel Santos Pereira, MSc, Robert Andreata-Santos, MSc, Luís Carlos de Souza Ferreira, PhD*

Vaccine Development Laboratory, Microbiology Department, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Revised 29 October 2020

Abstract

Self-assembling proteins may be generated after the addition of short specific amino acid sequences at both the N- and C-terminal ends. To date, this approach has not been evaluated regarding the impact of self-assembled proteins on the induction of immune responses. In the present study, we report the application of this experimental approach to the immunogenicity of protein antigens by measuring the antibody responses in mice immunized with nanoparticles made with a recombinant form of Zika virus nonstructural protein 1 (Δ NS1). The results clearly indicated that Δ NS1-derived nanoparticles (NP- Δ NS1) are assembled into a 3-dimensional structure with a high degree of multimerization. While Δ NS1 proved to be a weak immunogen, immunization with NP- Δ NS1 enhanced subunit vaccines' immunogenicity with improved longevity in vaccinated mice. Thus, immunization with self-assembled antigens (nanovaccines) represents a new and promising strategy to enhance NS1-specific antibodies' induction based on purified recombinant proteins.
© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

Key words: Nanovaccines; Zika virus; Self-assembling protein nanoparticles; Vaccines; Nanoparticles; Nonstructural protein 1

The emerging class of nanovaccines comprises several nanoparticle-based vaccines formed by different materials that can be assembled in the nanometric size range. For instance, polymers, lipids and inorganic components are being evaluated in several preclinical and clinical trials and enact different interactions with the immune system depending on their composition, size, and net surface charge.¹ Overall, nanovaccine-generating platforms usually work with different antigens and are flexible tools,² with virus-like particles standing, by far, as the most frequent choice.

Here, we propose the use of a new approach to generate nanovaccines: self-assembling protein nanoparticles (SAPNs), a *de novo* protein design based on the addition of short peptide sequences to both the C- and N-termini of proteins to promote self-assembly under adequate physicochemical conditions. This strategy has been deeply characterized as a targeted drug delivery

platform in different cancer models,^{3–12} as well as for gene delivery therapies.^{13,14} Nonetheless, no previous attempts have been reported on the impact of SAPN generation on the immune system's activation. *This multimerization with side-by-side antigen presentation may overcome the low immunogenicity of protein subunit vaccines that usually fail to interact with pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and other innate immune system receptors.³ Besides, repetitive surface patterns may promote cross-link B cell receptors and lead to cell activation.^{4,5}*

The SAPNs were reported to self-assemble into nanodisks, mainly due to electrostatic interactions between monomers.³ A plus of this strategy is that, unlike in other alternatives, this nanoparticle is composed by a structurally ordered antigenic array, presenting a high density of epitopes that can potentially mimic the repetitiveness, geometry, size, and shape of the natural host-pathogen surface interactions.¹⁵ This multimerization with side-by-side antigen presentation may overcome the low immunogenicity of protein subunit vaccines that usually fail to interact with pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and other innate immune system receptors.¹⁶ Besides, repetitive surface patterns may promote cross-link B cell receptors and lead

* Corresponding authors.

E-mail addresses: favaro.mtp@gmail.com (M.T.P. Favaro), lcsf@usp.br (L.C. de Souza Ferreira).



Protective Immunity to Dengue Virus Induced by DNA Vaccines Encoding Nonstructural Proteins in a Lethal Challenge Immunocompetent Mouse Model

OPEN ACCESS

Edited by:

Maria A. Deli,
Biological Research Centre, Hungary

Reviewed by:

Appavu K. Sundaram,
Henry M Jackson Foundation for the
Advancement of Military Medicine
(HAF), United States
Mohammad Monirul Islam,
University of Chittagong, Bangladesh

*Correspondence:

Luís Carlos de Souza Ferreira
lcsf@usp.br

Specialty section:

This article was submitted to
Pharmaceutical Innovation,
a section of the journal
Frontiers in Medical Technology

Received: 04 May 2020

Accepted: 30 September 2020

Published: 30 October 2020

Citation:

Alves RPaS, Andreata-Santos R, de
Freitas CL, Pereira LR,
Fabris-Macedo DLN,
Rodrigues-Jesus MJ, Pereira SS,
Carvalho AA/B, Sales NS, Peron JPS,
Amorim JH and Ferreira LCdS (2020)
Protective Immunity to Dengue Virus
Induced by DNA Vaccines Encoding
Nonstructural Proteins in a Lethal
Challenge Immunocompetent Mouse
Model
Front. Med. Technol. 2:558984.
doi: 10.3389/fmed.2020.558984

Rúbens Prince dos Santos Alves¹, Robert Andreata-Santos¹, Carla Longo de Freitas²,
Lennon Ramos Pereira¹, Denicar Lina Nascimento Fabris-Macedo¹,
Mônica Josiane Rodrigues-Jesus¹, Samuel Santos Pereira¹,
Alexia Adrienne Venceslau Brito Carvalho¹, Natily Silva Sales¹,
Jean Pierre Schatzmann Peron², Jaime Henrique Amorim³ and
Luís Carlos de Souza Ferreira^{1*}





¹Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, ²Laboratório de Interações Neuroimunes, Departamento de Imunologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, ³Laboratório de Microbiologia, Centro das Ciências Biológicas e de Saúde, Universidade Federal Do Oeste da Bahia, Barreiras, Brazil

Dengue virus represents the main arbovirus affecting humans, but there are no effective drugs or available worldwide licensed vaccine formulations capable of conferring full protection against the infection. Experimental studies and results generated after the release of the licensed anti-DENV vaccine demonstrated that induction of high-titer neutralizing antibodies does not represent the sole protection correlate and that, indeed, T cell-based immune responses plays a relevant role in the establishment of an immune protective state. In this context, this study aimed to further demonstrate protective features of immune responses elicited in immunocompetent C57BL/6 mice immunized with three plasmids encoding DENV2 nonstructural proteins (NS1, NS3, and NS5), which were subsequently challenged with a DENV2 strain naturally capable of inducing lethal encephalitis in immunocompetent mouse strains. The animals were immunized intramuscularly with the DNA vaccine mix and complete protection was observed among vaccinated mice. Vaccine induced protection correlated with the cytokine profiles expressed by spleen cells and brain-infiltrating mononuclear cells. The results confirm the pivotal role of cellular immune responses targeting nonstructural DENV proteins and validate the experimental model based on a DENV2 strain capable of infecting and killing immunocompetent mice as a tool for the evaluation of protective immunity induced by anti-DENV vaccines.

Keywords: mouse model, dengue, nonstructural proteins, DNA vaccines, IFN- γ

Review

Anti-Flavivirus Vaccines: Review of the Present Situation and Perspectives of Subunit Vaccines Produced in *Escherichia coli*

Sergio C. Araujo ¹, Lennon R. Pereira ², Rubens P. S. Alves ², Robert Andreato-Santos ², Alex I. Kanno ¹, Luis Carlos S. Ferreira ^{2,*} and Viviane M. Gonçalves ^{1,*}

¹ Laboratory of Vaccine Development, Instituto Butantan, São Paulo–SP 05503-900, Brazil; sergio.araujo@butantan.gov.br (S.C.A.); alex.kanno@butantan.gov.br (A.I.K.)

² Laboratory of Vaccine Development, Institute of Biomedical Sciences, Universidade de São Paulo, São Paulo–SP 05508-000, Brazil; lennon_rp@usp.br (L.R.P.); rpsa7@usp.br (R.P.S.A.); randreato@usp.br (R.A.-S.)

* Correspondence: lcsf@usp.br (L.C.S.F.); viviane.goncalves@butantan.gov.br (V.M.G.)

Received: 23 July 2020; Accepted: 23 August 2020; Published: 31 August 2020



Abstract: This article aims to review the present status of anti-flavivirus subunit vaccines, both those at the experimental stage and those already available for clinical use. Aspects regarding development of vaccines to Yellow Fever virus (YFV), Dengue virus (DENV), West Nile virus (WNV), Zika virus (ZIKV), and Japanese encephalitis virus (JEV) are highlighted, with particular emphasis on purified recombinant proteins generated in bacterial cells. Currently licensed anti-flavivirus vaccines are based on inactivated, attenuated, or virus-vector vaccines. However, technological advances in the generation of recombinant antigens with preserved structural and immunological determinants reveal new possibilities for the development of recombinant protein-based vaccine formulations for clinical testing. Furthermore, novel proposals for multi-epitope vaccines and the discovery of new adjuvants and delivery systems that enhance and/or modulate immune responses can pave the way for the development of successful subunit vaccines. Nonetheless, advances in this field require high investments that will probably not raise interest from private pharmaceutical companies and, therefore, will require support by international philanthropic organizations and governments of the countries more severely stricken by these viruses.

Keywords: flavivirus; mosquito-borne diseases; subunit vaccines

1. Introduction

Flaviviruses are enveloped and positive-sense single-stranded RNA viruses of the *Flavivirus* genus and *Flaviviridae* family. Most of them are transmitted to their hosts by hematophagous mosquitoes or ticks. However, alternative transmission routes in humans, such as sexual and transplacental transmission, have been described. The distinguishing characteristic of the *Flavivirus* genus is the type I cap (m⁷ GpppAmp) at the 5'-end of the genome, which is not seen in viruses of the other genera [1]. The yellow fever virus (YFV) is the prototype of the family, which encompasses other species of viruses that cause important human diseases, such as Dengue virus (DENV), West Nile virus (WNV), Zika virus (ZIKV), and Japanese encephalitis virus (JEV).

Diseases caused by flaviviruses have great health and socioeconomic burden to countries mainly located at tropical and subtropical regions. More than 3 billion people are at risk of JEV infection. DENV infects approximately 390 million people annually. WNV is the most geographically widespread flavivirus since it also affects countries in the Northern hemisphere. The last ZIKV outbreak alarmed the world due to the congenital Zika syndrome, which includes microcephaly. Despite the existence of



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Infectious Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijid

Short communication

Specificity of NS1-based immunochromatographic tests for dengue virus with regard to the Zika virus protein



Robert Andreato-Santos^{a,1}, Samuel Santos Pereira^{a,1}, Lennon Ramos Pereira^a,
Alvina Clara Félix^b, Camila Malta Romano^{b,c}, Luís Carlos de Souza Ferreira^{a,*}

^aVaccine Development Laboratory Microbiology Department, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^bInstituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

^cHospital das Clínicas HCFMUSP (LIMS2), Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 February 2020

Received in revised form 2 April 2020

Accepted 4 April 2020

Keywords:

Immunochromatographic tests

NS1 protein

Dengue

Zika

Cross-reactivity

ABSTRACT

Objectives: This study was performed to determine whether Dengue virus (DENV) immunochromatographic tests can detect and differentiate nonstructural protein 1 (NS1) from each of the four DENV serotypes and do not cross-react with the Zika virus (ZIKV) NS1 protein.

Methods: We compared the specificity of six NS1-based DENV immunochromatographic tests (point of care) in the detection of NS1 proteins from each of the four DENV serotypes and ZIKV. The tests were performed with NS1 proteins produced in mammalian cells. Cross-reactivity was confirmed with a purified recombinant ZIKV NS1 protein and DENV⁺ or ZIKV⁺ human serum samples.

Results: Cross-reaction was observed in 2 out of the 6 evaluated tests using cell culture supernatants containing NS1 protein of each tested virus. Cross-reactivity with ZIKV was confirmed with purified recombinant ZIKV NS1 produced in *Escherichia coli*. Further analyses with serum samples collected from DENV⁺ or ZIKV⁺ patients confirmed the cross-reactivity with ZIKV protein in 2 tests.

Conclusions: The detection of the NS1 protein is the basis for several commercially available serological DENV diagnostic tests. The present results emphasize the relevance of testing specificity of presently available NS1-based DENV serological tests and the need of adjustments of tests that cross-react with the ZIKV protein. Our results are particularly relevant for regions where both viruses are endemically found, as in the case of Brazil.

© 2020 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of International Society for Infectious Diseases. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Dengue virus (DENV) is one of the most epidemiologically relevant arboviruses transmitted to humans. This virus has a wide distribution, with an estimated number of 3.9 billion people at risk of infection in 128 countries and approximately 500,000 cases with more severe forms of the disease (World Health Organization (WHO); Bhatt et al., 2013). The clinical symptoms of this infection are easily confused with symptoms induced by other arboviruses. Thus, the use of specific laboratory tests is essential for the correct diagnosis and patient management, especially in endemic regions for these arboviruses.

The detection of the nonstructural protein 1 (NS1) is the basis of several commercially available DENV serological tests (Cuzubbo et al., 2001). Since the NS1 protein is released by infected cells and accumulates in the blood of DENV-positive patients, it is used as a marker of acute infection and can be detected by immunochromatographic tests. However, with the recent spread of Zika virus (ZIKV) in the world, the specificity of these tests may be compromised by the extensive shared similarities between these viruses, consequently, increasing the risks of false-positive results in areas where both viruses circulate (Muller and Young, 2013; Gyurech et al., 2016; Matheus et al., 2016). Thus, in the present study, we compared the specificities of 6 different commercial DENV immunochromatographic tests (5 are widely available in the Brazilian market, whereas 1 is available in other countries). The tests were performed with NS1 proteins expressed by the 4 DENV serotypes and ZIKV using culture supernatants of infected cells, recombinant proteins

* Corresponding author.

E-mail address: lcsf@usp.br (L.C.d.S. Ferreira).

¹ These authors contributed equally for this paper.

<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.04.032>

1201-9712/© 2020 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of International Society for Infectious Diseases. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Safety, Tumor Reduction, and Clinical Impact of Zika Virus Injection in Dogs with Advanced-Stage Brain Tumors

Carolini Kaid,¹ Raquel Azevedo dos Santos Madi,² Renato Astray,³ Ernesto Goulart,¹ Luiz Carlos Caires-Junior,¹ Thiago Giove Mitsugi,¹ Ana Carolina Ramos Moreno,⁴ Maria Fernanda Castro-Amarante,⁴ Lennon Ramos Pereira,⁴ Bruna Felício Milazzotto Maldonado Porchia,⁵ Thais Oliveira de Andrade,¹ Vivian Landini,¹ Daniel Soares Sanches,⁶ Carolina Gonçalves Pires,⁶ Rubens Koji Oliveira Tanioka,² Marcia C.L. Pereira,¹ Igor Neves Barbosa,¹ Cristina O. Massoco,⁷ Luís Carlos de Souza Ferreira,⁴ Oswaldo Keith Okamoto,^{1,8} and Mayana Zatz¹

¹Human Genome and Stem Cell Research Center (HUG-CEL) Institute of Biosciences, University of São Paulo, Cidade Universitária, São Paulo 05508-090, Brazil;

²Hospital Veterinário Granja Viana, Granja Viana 06345-410, Brazil; ³Butantan Institute, São Paulo 05508-900, Brazil; ⁴Vaccine Development Laboratory, Biomedical Sciences Institute, Department of Microbiology, University of São Paulo, São Paulo 05508-900, Brazil; ⁵Laboratory of Tumor Immunology, Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo 05508-900, Brazil; ⁶Veterinary Pathological Anatomy Center, São Paulo 05376-070, Brazil; ⁷Department of Pathology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, São Paulo 05508-270, Brazil; ⁸Hemotherapy and Cellular Therapy Department, Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo 05652-900, Brazil

Malignant brain tumors are among the most aggressive cancers with poor prognosis and no effective treatment. Recently, we reported the oncolytic potential of Zika virus infecting and destroying the human central nervous system (CNS) tumors *in vitro* and in immunodeficient mice model. However, translating this approach to humans requires pre-clinical trials in another immunocompetent animal model. Here, we analyzed the safety of Brazilian Zika virus (ZIKV^{BR}) intrathecal injections in three dogs bearing spontaneous CNS tumors aiming an anti-tumoral therapy. We further assessed some aspects of the innate immune and inflammatory response that triggers the anti-tumoral response observed during the ZIKV^{BR} administration *in vivo* and *in vitro*. For the first time, we showed that there were no negative clinical side effects following ZIKV^{BR} CNS injections in dogs, confirming the safety of the procedure. Furthermore, the intrathecal ZIKV^{BR} injections reduced tumor size in immunocompetent dogs bearing spontaneous intracranial tumors, improved their neurological clinical symptoms significantly, and extended their survival by inducing the destruction specifically of tumor cells, sparing normal neurons, and activating an immune response. These results open new perspectives for upcoming virotherapy using ZIKV to destroy and induce an anti-tumoral immune response in CNS tumors for which there are currently no effective treatments.

INTRODUCTION

Central nervous system (CNS) tumors are mostly malignant with a world incidence rate of 3.5 million (GLOBOCAN 2018). Despite aggressive current therapies, including surgery, radiation, and chemotherapy, the most common forms of adult and pediatric primary brain tumors remain lethal.¹ The treatment is not effective and sur-

living patients present important side effects that affect their quality of life.² Therefore, novel treatment options are urgently needed.

Since the approval of the first oncolytic virotherapy, T-VEC, in 2015, the search for viruses capable of infecting and destroying cancer cells has been growing. Recently, the Zika virus (ZIKV) has been reported as an oncolytic virus that infects and destroys cancer cells from CNS tumors. In glioblastoma, a study showed that ZIKV can oncolysis murine brain tumors and infect human glioblastoma (GBM) stem-like cell lines but at high concentrations of the virus.³

Our group demonstrated for the first time that the Brazilian ZIKV (ZIKV^{BR}) also has oncolytic activity against human embryonal CNS tumor cell lines, resulting in a massive tumor cell death 3 days after infection.⁴ Furthermore, in a pre-clinical study in BALB/c nude mice bearing orthotopic human embryonal CNS tumor xenografts, we showed that a single intracerebroventricular injection of ZIKV^{BR} significantly increased survival, decreased tumor burden, and reduced metastasis with a complete remission in some animals.⁴ However, before translating this approach to humans, several questions need to be addressed in particular about safety and ZIKV oncolytic potential in a larger immunocompetent animal model for CNS tumors.

In cancer research, canine clinical trials have been performed before or in parallel with human clinical trials to assess safety, novel drug

Received 29 November 2019; accepted 6 March 2020;
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.03.004>

Correspondence: Mayana Zatz, Human Genome and Stem Cell Research Center (HUG-CEL) Institute of Biosciences, University of São Paulo, Cidade Universitária, São Paulo 05508-090, Brazil.

E-mail: mayanzatz@usp.br





Article

Transcutaneous Administration of Dengue Vaccines

Robert Andreato-Santos ¹ , Rúbens Prince dos Santos Alves ¹, Sara Araujo Pereira ¹, Lennon Ramos Pereira ¹, Carla Longo de Freitas ¹, Samuel Santos Pereira ¹, Alexia Adrienne Venceslau-Carvalho ¹, Maria Fernanda Castro-Amarante ¹ , Marianna Teixeira Pinho Favaro ¹, Camila Mathias-Santos ¹, Jaime Henrique Amorim ² and Luís Carlos de Souza Ferreira ^{1,*}

¹ Vaccine Development Laboratory, Microbiology Department, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo 05508-000, Brazil; robert_andreato@hotmail.com (R.A.-S.); rubens.bmc@gmail.com (R.P.d.S.A.); araujopereirasara@gmail.com (S.A.P.); lennon_rp@hotmail.com (L.R.P.); carla.longofreitas@gmail.com (C.L.d.F.); samuelbiomedicina@usp.br (S.S.P.); alexia_myt@hotmail.com (A.A.V.-C.); mfamarante@gmail.com (M.F.C.-A.); favaro.mtp@gmail.com (M.T.P.F.); camilamathias@gmail.com (C.M.-S.)

² Center for Biological and Health Sciences, Federal University of Western Bahia, Bahia 47810-047, Brazil; jaime.henrique.amorim@gmail.com

* Correspondence: lcsf@usp.br; Tel.: +55-11-3091-7356

Received: 3 February 2020; Accepted: 3 April 2020; Published: 6 May 2020



Abstract: In the present study, we evaluated the immunological responses induced by dengue vaccines under experimental conditions after delivery via a transcutaneous (TC) route. Vaccines against type 2 Dengue virus particles (DENV2 New Guinea C (NGC) strain) combined with enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) heat-labile toxin (LT) were administered to BALB/c mice in a three-dose immunization regimen via the TC route. As a control for the parenteral administration route, other mouse groups were immunized with the same vaccine formulation via the intradermic (ID) route. Our results showed that mice vaccinated either via the TC or ID routes developed similar protective immunity, as measured after lethal challenges with the DENV2 NGC strain. Notably, the vaccine delivered through the TC route induced lower serum antibody (IgG) responses with regard to ID-immunized mice, particularly after the third dose. The protective immunity elicited in TC-immunized mice was attributed to different antigen-specific antibody properties, such as epitope specificity and IgG subclass responses, and cellular immune responses, as determined by cytokine secretion profiles. Altogether, the results of the present study demonstrate the immunogenicity and protective properties of a dengue vaccine delivered through the TC route and offer perspectives for future clinical applications.

Keywords: transcutaneous immunization; dengue vaccines; heat-labile toxin; adjuvant; intradermic immunization

1. Introduction

Infection with one of the four Dengue virus serotypes (DENV1-4) may cause a spectrum of diseases ranging from an acute, self-limiting febrile illness (DF) characterized mainly by fever, retro-orbital headache, rash, arthralgia, and to more severe, life-threatening, conditions that may include hemorrhagic manifestations, increased vascular permeability, thrombocytopenia, and shock [1–3]. In fact, it is estimated that 3.9 billion people in 128 countries are at risk of infection [2,4]. DENV causes approximately 390 million infections, of which 500,000 cases develop into severe forms, making DENV infection one of the most economically and epidemiologically relevant arthropod-borne diseases

ORIGINAL ARTICLE

Open Access

Optimization and scale-up production of Zika virus Δ NS1 in *Escherichia coli*: application of Response Surface Methodology



Alex Issamu Kanno¹ , Luciana Cezar de Cerqueira Leite¹ , Lennon Ramos Pereira²,
Mônica Josiane Rodrigues de Jesus², Robert Andreata-Santos² , Rúbens Prince dos Santos Alves²,
Edison Luiz Durigon³, Luís Carlos de Souza Ferreira² and Viviane Maimoni Gonçalves^{1*}

Abstract

Diagnosing Zika virus (ZIKV) infections has been challenging due to the cross-reactivity of induced antibodies with other flavivirus. The concomitant occurrence of ZIKV and Dengue virus (DENV) in endemic regions requires diagnostic tools with the ability to distinguish these two viral infections. Recent studies demonstrated that immunoassays using the C-terminal fragment of ZIKV NS1 antigen (Δ NS1) can be used to discriminate ZIKV from DENV infections. In order to be used in serological tests, the expression/solubility of Δ NS1 and growth of recombinant *E. coli* strain were optimized by Response Surface Methodology. Temperature, time and IPTG concentration were evaluated. According to the model, the best condition determined in small scale cultures was 21 °C for 20 h with 0.7 mM of IPTG, which predicted 7.5 g/L of biomass and 962 mg/L of Δ NS1. These conditions were validated and used in a 6-L batch in the bioreactor, which produced 6.4 g/L of biomass and 500 mg/L of Δ NS1 in 12 h of induction. The serological ELISA test performed with purified Δ NS1 showed low cross-reactivity with antibodies from DENV-infected human subjects. Denaturation of Δ NS1 decreased the detection of anti-ZIKV antibodies, thus indicating the contribution of conformational epitopes and confirming the importance of properly folded Δ NS1 for the specificity of the serological analyses. Obtaining high yields of soluble Δ NS1 supports the viability of an effective serologic diagnostic test capable of differentiating ZIKV from other flavivirus infections.

Keywords: Zika NS1, Serological diagnosis, *E. coli*, Heterologous protein production, Soluble expression, Response Surface Methodology

Introduction

Zika virus (ZIKV) is a flavivirus transmitted primarily by *Aedes aegypti* mosquitoes. Many cases of microcephaly and other congenital malformations were reported following ZIKV infections during pregnancy (Franca et al. 2016). Most cases are asymptomatic, however, infection of both children and adults can lead to serious neurologic complications, such as Guillain-Barré syndrome or

neuropathy (WHO 2016). The ZIKV infections are normally diagnosed by molecular tests designed to detect viral RNA in the blood or saliva, but the short blood-stream viral detection window limits its utilization. Furthermore, another concern lies in the molecular tests reliability, since recent reports showed 73% of suboptimal sensitivity or specificity among 15 Brazilian laboratories (Fischer et al. 2018) and similar results among European laboratories, which highlights the challenging aspect of the diagnosis.

On the other hand, serological tests do not have the disadvantage of limited window of detection. IgM and IgG antibodies can be detected for months or even years

* Correspondence: viviane.goncalves@butantan.gov.br

¹ Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas, Instituto Butantan, Av Vital Brasil, 1500, São Paulo, SP 05508-900 Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2019. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

RESEARCH ARTICLE

Protein refolding based on high hydrostatic pressure and alkaline pH: Application on a recombinant dengue virus NS1 protein

Rosa Maria Chura-Chambi¹, Cleide Mara Rosa da Silva¹, Lennon Ramos Pereira², Paolo Bartolini¹, Luis Carlos de Souza Ferreira², Ligia Morganti^{1*}

1 Centro de Biotecnologia, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo, São Paulo, Brazil, **2** Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil

* lmorganti@ipen.br



OPEN ACCESS

Citation: Chura-Chambi RM, da Silva CMR, Pereira LR, Bartolini P, Ferreira LCS, Morganti L (2019) Protein refolding based on high hydrostatic pressure and alkaline pH: Application on a recombinant dengue virus NS1 protein. *PLoS ONE* 14(1): e0211162. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211162>

Editor: Malaya Kumar Sahoo, Stanford University School of Medicine, UNITED STATES

Received: September 6, 2018

Accepted: January 8, 2019

Published: January 25, 2019

Copyright: © 2019 Chura-Chambi et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported from a grant from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, www.fapesp.br), Process number 2015/02574-0 to LM and a Fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, www.cnpq.br), Process number 130256/2015-3 to CMRdS. The

Abstract

In this study we evaluated the association of high hydrostatic pressure (HHP) and alkaline pH as a minimally denaturing condition for the solubilization of inclusion bodies (IBs) generated by recombinant proteins expressed by *Escherichia coli* strains. The method was successfully applied to a recombinant form of the dengue virus (DENV) non-structural protein 1 (NS1). The minimal pH for IBs solubilization at 1 bar was 12 while a pH of 10 was sufficient for solubilization at HHP: 2.4 kbar for 90 min and 0.4 kbar for 14 h 30 min. An optimal refolding condition was achieved by compression of IBs at HHP and pH 10.5 in the presence of arginine, oxidized and reduced glutathiones, providing much higher yields (up to 8-fold) than association of HHP and GdnHCl via an established protocol. The refolded NS1, 109 ± 9.5 mg/L bacterial culture was recovered mainly as monomer and dimer, corresponding up to 90% of the total protein and remaining immunologically active. The proposed conditions represent an alternative for the refolding of immunologically active recombinant proteins expressed as IBs.

Introduction

Escherichia coli strains are the most usual alternative for production of heterologous proteins, particularly for those that do not require post-translational modifications [1]. Depending on the characteristics of the expressed protein, incubation temperature and expression levels, it may be produced in soluble form or as insoluble aggregates: the inclusion bodies (IBs) [2]. In IBs the proteins form amyloid-like structures in which molecules, with a conformation that include the native ones, are trapped [3]. Indeed, proteins in IBs frequently keep secondary and tertiary structures similar to those found in their native conformation [4] and may even show some degree of biological activity [5, 6]. In addition, the expression of recombinant proteins as IBs provides recombinant proteins with very low levels of contaminants.

In contrast, the difficulties faced to obtain a fully active protein from IBs is a frequent drawback. Usually the first step in the refolding processes is the solubilization of the insoluble



Article

Persistence and Intra-Host Genetic Evolution of Zika Virus Infection in Symptomatic Adults: A Special View in the Male Reproductive System

Danielle B. L. Oliveira ^{1,†}, Giuliana S. Durigon ^{2,†}, Érica A. Mendes ^{1,†}, Jason T. Ladner ^{3,4,†}, Robert Andreatta-Santos ^{1,†}, Danielle B. Araujo ¹, Viviane F. Botosso ⁵, Nicholas D. Paola ¹, Daniel F. L. Neto ¹, Marielton P. Cunha ¹, Carla T. Braconi ¹, Rúbens P. S. Alves ¹, Monica R. Jesus ¹, Lennon R. Pereira ¹, Stella R. Melo ¹, Flávio S. Mesquita ¹, Vanessa B. Silveira ¹, Luciano M. Thomazelli ¹, Silvana R. Favoretto ⁶, Franciane B. Almonfrey ², Regina C. R. M. Abdulkader ², Joel M. Gabrili ^{5,7}, Denise V. Tambourgi ⁵, Sérgio F. Oliveira ⁸, Karla Prieto ^{3,9}, Michael R. Wiley ^{3,9}, Luís C. S. Ferreira ¹, Marcos V. Silva ¹⁰, Gustavo F. Palacios ^{3,†}, Paolo M. A. Zanotto ^{1,†} and Edison L. Durigon ^{1,*,‡}

- ¹ Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP 05508-000, Brazil; danibruna@gmail.com (D.B.L.O.); ericaarmendes@gmail.com (É.A.M.); robert_andreatta@hotmail.com (R.A.-S.); daniellebastos@yahoo.com.br (D.B.A.); nicholasdipaola@gmail.com (N.D.P.); danielviro@gmail.com (D.F.L.N.); marieltondospassos@gmail.com (M.P.C.); cabraconi@gmail.com (C.T.B.); rubens.bmc@gmail.com (R.P.S.A.); modrigues4@gmail.com (M.R.J.); lennon_rp@hotmail.com (L.R.P.); stellmelo@gmail.com (S.R.M.); flavio.mesquita@usp.br (F.S.M.); vanessa.silveirabio@gmail.com (V.B.S.); lucmt@usp.br (L.M.T.); lcsf@usp.br (L.C.S.F.); pzanotto@usp.br (P.M.A.Z.)
- ² Medical School Clinic Hospital, University of São Paulo, São Paulo, SP 05403-000, Brazil; giuliana.durigon@gmail.com (G.S.D.); fran_almonfrey@hotmail.com (F.B.A.); kader@usp.br (R.C.R.M.A.)
- ³ Center for Genome Sciences, US Army Medical Research Institute of Infectious Diseases, Frederick, MD 21702, USA; jtladner@gmail.com (J.T.L.); karla.prieto.ctr@mail.mil (K.P.); michael.r.wiley19.ctr@mail.mil (M.R.W.); gustavo.f.palacios.ctr@mail.mil (G.F.P.)
- ⁴ The Pathogen and Microbiome Institute, Northern Arizona University, Flagstaff, AZ 86011-4073, USA
- ⁵ Virology Laboratory, Butantan Institute, São Paulo, SP 05503-900, Brazil; viviane.botosso@butantan.gov.br (V.F.B.); joel.megalegabrili@gmail.com (J.M.G.); denise.tambourgi@butantan.gov.br (D.V.T.)
- ⁶ Pasteur Institute, State Health Department, São Paulo, SP 1103-000, Brazil; srfavoretto@usp.br
- ⁷ Immunochemistry Laboratory, Butantan Institute, São Paulo, SP 05503-900, Brazil
- ⁸ Department of Cellular and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP 05508-000, Brazil; sfolivei@gmail.com
- ⁹ Department of Environmental, Agricultural and Occupational Health, University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE 68198-4388, USA
- ¹⁰ Institute of Infectology Emilio Ribase Pontificia Universidade Católica (PUC-SP), São Paulo, SP 01246-900, Brazil; mvsilva@pucsp.br
- * Correspondence: eldurigo@usp.br
- † These authors contributed equally for the paper.
- ‡ These authors contributed equally for the paper.

Received: 22 August 2018; Accepted: 20 October 2018; Published: 7 November 2018



Abstract: We followed the presence of Zika virus (ZIKV) in four healthy adults (two men and two women), for periods ranging from 78 to 298 days post symptom onset. The patients were evaluated regarding the presence of the virus in different body fluids (blood, saliva, urine and semen), development of immune responses (including antibodies, cytokines and chemokines), and virus genetic variation within samples collected from semen and urine during the infection course. The analysis was focused primarily on the two male patients who shed the virus for up to 158 days after the initial symptoms. ZIKV particles were detected in the spermatozoa cytoplasm and

Impact of Toxin-Specific Antibodies on the Adjuvanticity and Inflammatory Effects Induced by Parenterally Administered *Escherichia coli* heat-Labile Toxin

Mariana de Jesus Cintra¹, Denicar Lina Nascimento Fabris Maeda^{1,2}, Camila Mathias-Santos¹, Lennon Ramos Pereira¹, Wilson Barros Luiz¹, Luís Carlos de Souza Ferreira^{1*} and Juliana Falcão Rodrigues^{1,2}

¹Vaccine Development Laboratory, Department of Microbiology, Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

²Department of Parasitology, Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, São Paulo

Received: 19 April, 2018; Accepted: 24 May, 2018; Published: 29 May, 2018

*Corresponding authors: Dr. Luis C.S. Ferreira, Dra. Juliana F. Rodrigues, Vaccine Development Laboratory, Department of Microbiology, Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, E-mail: lcsf@usp.br, jufalcao@usp.br

Abstract

Introduction: Heat-labile toxins (LT), produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) strains, exert potent adjuvant effects when admixed or linked to antigens delivered via mucosal, transcutaneous or parenteral routes. There is limited information regarding the impact of preexisting immunity on the immunomodulatory properties of LT, which is frequently observed among people infected with ETEC.

Aims: In the present study, we evaluated the effect of anti-LT antibodies on the adjuvant and inflammatory activities triggered by LT admixed with a specific vaccine antigen following subcutaneous administration to mice.

Material and Methods/Results: Animals were immunized with dengue virus nonstructural protein (NS1), as model antigen, in combination with native LT in the presence of LT-specific antibodies. Exposure to anti-LT antibodies did not impair the humoral adjuvanticity of LT regarding to the magnitude of the serum anti-NS1 IgG titers. In addition, anti-toxin antibodies did not reduce neutrophil migration nor edema formation after s.c. administration of LT. Nonetheless, administration of LT admixed with anti-LT antibodies changed the local cytokine production profile and modulated the NS1-specific T cell responses to a Th1-type pattern.

Conclusion: These results indicate that preexisting immunity does not affect the humoral adjuvant activities but may modulate different aspects of both innate and adaptive immune responses induced by parenterally administered LT.

Keywords: Heat-Labile Toxin; Vaccine Adjuvant; Preexisting Immunity; Inflammatory Response; Adaptive Immunity; Vaccine;

colonization factors, which mediate adhesion to gut cells, and enterotoxins, particularly heat-stable and/or heat-labile toxin families, involved specifically with cytotoxic effects. LT toxins are characterized by an enzymatically active A subunit non-covalently linked to a pentameric ring of B polypeptides, which is responsible for binding to cell surface receptors such as GM1 ganglioside [1,2]. Together with cholera toxin (CT), LT shows also remarkable adjuvant activities following mucosal and parenteral administration improving both humoral and cellular immune responses against target antigens [3-6]. However, the inherent toxicity of LT, even after inoculation of low amounts, has precluded its use as a vaccine adjuvant for humans, particularly under mucosal route [3,4,7,8]. On the other hand, detoxified LT mutants and natural variants have demonstrated safety features after parenteral inoculation [8-11]. Thus, parenteral administration of LT-derivatives represents a new and promising alternative for clinical use of this class of vaccine adjuvant.



Preexisting immunity may compromise the performance of vaccines, particularly those based on microorganisms as antigen-delivery systems, such as adenovirus and *Salmonella* [12-14]. Such restriction may also apply to protein adjuvant, such as derivatives of LT and CT. Individuals naturally or deliberately challenged with ETEC or *Vibrio cholera* strains mount local and systemic antibody responses to LT [15-18]. Some reports demonstrate that the rate of seroconversion directed towards LT is high, ranging from 75% to 92% at the first infection and reaching about 50-60% under rechallenge [15,18,19]. Additionally, it has been seen that the anti-LT antibodies in serum samples or in lymphocyte supernatants remained at increased levels following rechallenge with wild-type ETEC strain or an inactivated oral *Vibrio cholera* vaccine [18,20]. Collectively, these findings suggest that the natural exposure to LT or CT in endemic countries results in individuals with blood-circulating LT-specific antibodies, which could access mucosal

Introduction

ETEC strains are considered important etiologic agents of the childhood diarrhea and represent the most common cause of the traveler's diarrhea in endemic areas. The pathogenesis induced by ETEC is associated with the production of both

Article

Epitope Sequences in Dengue Virus NS1 Protein Identified by Monoclonal Antibodies

Leticia Barboza Rocha ^{1,†}, Rubens Prince dos Santos Alves ^{2,†}, Bruna Alves Caetano ¹, Lennon Ramos Pereira ², Thais Mitsunari ¹, Jaime Henrique Amorim ^{2,‡}, Juliana Moutinho Polatto ¹, Viviane Fongaro Botosso ³, Neuza Maria Frazatti Gallina ⁴, Ricardo Palacios ⁵, Alexander Roberto Precioso ⁵, Celso Francisco Hernandes Granato ⁶, Danielle Bruna Leal Oliveira ⁷ , Vanessa Barbosa da Silveira ⁷ , Daniela Luz ¹, Luís Carlos de Souza Ferreira ² and Roxane Maria Fontes Piazza ^{1,*}

¹ Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, São Paulo, 05503-900 SP, Brazil; leticia.rocha@butantan.gov.br (L.B.R.); bruna.caetano@butantan.gov.br (B.A.C.); thais.mitsunari@butantan.gov.br (T.M.); juliana.yassuda@butantan.gov.br (J.M.P.); daniedaluz@yahoo.com.br (D.L.)

² Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 05508-000 SP, Brazil; rubens.bmc@gmail.com (R.P.d.S.A.); lennon_rp@usp.br (L.R.P.); jh.biomedico@gmail.com (J.H.A.); lcsf@usp.br (L.C.d.S.F.)

³ Laboratório de Virologia, Instituto Butantan, São Paulo, 05503-900 SP, Brazil; viviane.botosso@butantan.gov.br

⁴ Divisão de Desenvolvimento Tecnológico e Produção, Instituto Butantan, São Paulo, 05503-900 SP, Brazil; neuza.gallina@butantan.gov.br

⁵ Divisão de Ensaios Clínicos e Farmacovigilância, Instituto Butantan, São Paulo, 05503-900 SP, Brazil; ricardo.palacios@butantan.gov.br (R.P.); alexander.precioso@butantan.gov.br (A.R.P.)

⁶ Departamento de Medicina, Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 04023-062 SP, Brazil; celso.granato@grupofleury.com.br

⁷ Laboratório de Virologia Molecular e Clínica, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 05508-000 SP, Brazil; danibruna@gmail.com (D.B.L.O.); vanessa.silveirabio@gmail.com (V.B.d.S.)

* Correspondence: roxane@butantan.gov.br; Tel.: +55-11-2627-9724

† These authors contributed equally to the present work.

‡ Present address: Laboratório de Microbiologia, Centro das Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Oeste da Bahia, Barreiras, 47805-100. Bahia, Brazil.

Received: 8 August 2017; Accepted: 22 September 2017; Published: 15 October 2017

Abstract: Dengue nonstructural protein 1 (NS1) is a multi-functional glycoprotein with essential functions both in viral replication and modulation of host innate immune responses. NS1 has been established as a good surrogate marker for infection. In the present study, we generated four anti-NS1 monoclonal antibodies against recombinant NS1 protein from dengue virus serotype 2 (DENV2), which were used to map three NS1 epitopes. The sequence ¹⁹³AVHADMGYWIESALNDT²⁰⁹ was recognized by monoclonal antibodies 2H5 and 4H1BC, which also cross-reacted with Zika virus (ZIKV) protein. On the other hand, the sequence ²⁵VHTWTEQYKQPES³⁸ was recognized by mAb 4F6 that did not cross react with ZIKV. Lastly, a previously unidentified DENV2 NS1-specific epitope, represented by the sequence ¹²⁷ELHNQTFLLIDGPETAEC¹⁴³, is described in the present study after reaction with mAb 4H2, which also did not cross react with ZIKV. The selection and characterization of the epitope, specificity of anti-NS1 mAbs, may contribute to the development of diagnostic tools able to differentiate DENV and ZIKV infections.

Keywords: dengue virus; NS1; Zika virus; mAbs; antibody recognition; amino acid sequences



Adjuvant-Mediated Epitope Specificity and Enhanced Neutralizing Activity of Antibodies Targeting Dengue Virus Envelope Protein

Denicar Lina Nascimento Fabris Maeda¹, Milene Tavares Batista^{1,2}, Lennon Ramos Pereira¹, Mariana de Jesus Cintra¹, Jaime Henrique Amorim³, Camila Mathias-Santos¹, Sara Araújo Pereira¹, Silvia Beatriz Boscardin⁴, Sandriana dos Ramos Silva⁵, Eliana L. Faquim-Mauro⁶, Vanessa Barbosa Silveira⁷, Danielle Bruna Leal Oliveira⁷, Stephen Albert Johnston⁸, Luis Carlos de Souza Ferreira^{1*} and Juliana Falcão Rodrigues¹

OPEN ACCESS

Edited by:

Laurent Réna, Agency for Science, Technology and Research (A*STAR), Singapore

Reviewed by:

Katja Fink, Singapore Immunology Network (A*STAR), Singapore
Chiou-Feng Lin, Taipei Medical University, Taiwan

*Correspondence:

Luis Carlos de Souza Ferreira
lcsf@usp.br

Specialty section:

This article was submitted to Vaccines and Molecular Therapeutics, a section of the journal Frontiers in Immunology

Received: 20 June 2017

Accepted: 05 September 2017

Published: 25 September 2017

Citation:

Maeda DLNF, Batista MT, Pereira LR, de Jesus Cintra M, Amorim JH, Mathias-Santos C, Pereira SA, Boscardin SB, Silva SR, Faquim-Mauro EL, Silveira VB, Oliveira DBL, Johnston SA, Ferreira LCS and Rodrigues JF (2017) Adjuvant-Mediated Epitope Specificity and Enhanced Neutralizing Activity of Antibodies Targeting Dengue Virus Envelope Protein. *Front. Immunol.* 8:1175. doi: 10.3389/fimmu.2017.01175

¹Vaccine Development Laboratory, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ²Center for Innovation in Medicine, Biodesign Institute, Arizona State University, Tempe, AZ, United States, ³Center of Biological and Health Sciences, Federal University of Western Bahia, Bahia, Brazil, ⁴Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ⁵Pasteur Institute, São Paulo, Brazil, ⁶Laboratory of Immunopathology, Butantan Institute, São Paulo, Brazil, ⁷Clinical and Molecular Virology Laboratory, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

The heat-labile toxins (LT) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* display adjuvant effects to coadministered antigens, leading to enhanced production of serum antibodies. Despite extensive knowledge of the adjuvant properties of LT derivatives, including *in vitro*-generated non-toxic mutant forms, little is known about the capacity of these adjuvants to modulate the epitope specificity of antibodies directed against antigens. This study characterizes the role of LT and its non-toxic B subunit (LTB) in the modulation of antibody responses to a coadministered antigen, the dengue virus (DENV) envelope glycoprotein domain III (EDIII), which binds to surface receptors and mediates virus entry into host cells. In contrast to non-adjuvanted or alum-adjuvanted formulations, antibodies induced in mice immunized with LT or LTB showed enhanced virus-neutralization effects that were not ascribed to a subclass shift or antigen affinity. Nonetheless, immunosignature analyses revealed that purified LT-adjuvanted EDIII-specific antibodies display distinct epitope-binding patterns with regard to antibodies raised in mice immunized with EDIII or the alum-adjuvanted vaccine. Notably, the analyses led to the identification of a specific EDIII epitope located in the EF to FG loop, which is involved in the entry of DENV into eukaryotic cells. The present results demonstrate that LT and LTB modulate the epitope specificity of antibodies generated after immunization with coadministered antigens that, in the case of EDIII, was associated with the induction of neutralizing antibody responses. These results open perspectives for the more rational development of vaccines with enhanced protective effects against DENV infections.

Keywords: heat-labile toxins, labile toxins, adjuvants, dengue virus, envelope protein, vaccines, antibodies, immunosignature

Research Article

Functional Profile Evaluation of *Lactobacillus fermentum* TCUESC01: A New Potential Probiotic Strain Isolated during Cocoa Fermentation

Tauá Alves Melo,¹ Thalís Ferreira dos Santos,² Lennon Ramos Pereira,¹
 Hélic Moreira Passos,¹ Rachel Passos Rezende,¹ and Carla Cristina Romano¹

¹Department of Biological Sciences, State University of Santa Cruz, Ilhéus-Itabuna Road, Km 16 Salobrinha, 45662-900 Ilhéus, BA, Brazil

²Department of Biological Sciences, State University of Feira de Santana, Transnordestina Avenue, S/N, Novo Horizonte, 44036-900 Feira de Santana, BA, Brazil

Correspondence should be addressed to Carla Cristina Romano; romanocc@uol.com.br

Received 27 March 2017; Revised 16 May 2017; Accepted 20 June 2017; Published 20 July 2017

Academic Editor: Filippo Canducci

Copyright © 2017 Tauá Alves Melo et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The use of intestinal probiotic bacteria is very common in the food industry and has been the focus of the majority of research in this field. Yet in recent years, research on extraintestinal microorganisms has greatly increased due to their well-known potential as probiotics. Thus, we studied a strain of *Lactobacillus fermentum* (TCUESC01) extracted from fermenting cocoa. First, we examined the impact of pH on the growth of this strain and studied its survival under conditions similar to those of the human gastrointestinal tract. *L. fermentum* TCUESC01 demonstrated resistance to conditions mimicking the human stomach and intestines and grew well between pH 5 and pH 7. Next, we subjected *L. fermentum* TCUESC01 to storage at 4°C in a milk solution and found that it survived well for 28 days. Lastly, we measured the susceptibility of this strain to numerous antibiotics and its tendency to autoaggregate. *L. fermentum* TCUESC01 showed significant autoaggregation, as well as susceptibility to the majority of antibiotics tested. Overall, our findings support the potential use of this extraintestinal bacterium as a dietary probiotic.

1. Introduction

The search for new probiotics is motivated by the knowledge that each strain of microorganisms possesses different properties and could have unique effects on human health. Historically, it was believed that the lactic bacteria in probiotic products had to be sourced from humans due to the specificity of the host [1]. However, extraintestinal microorganisms isolated from fermented lactose-containing foods or fermented vegetables also exhibit promising probiotic effects [2, 3]. Preliminary evidence from our lab indicates that *Lactobacillus* strains derived from the fermentation of high-quality cocoa exhibit probiotic properties: they reduce histological damage, reduce the systemic concentration of inflammatory cytokines, and increase the serum IgA levels in an in vivo experimental model of colitis [4]. However, the possible use

of these strains in commercial products depends on a series of tests recommended by international organizations. According to the Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO) and the World Health Organization (WHO), potential probiotic strains should be evaluated for their functional and technological characteristics, including their resistance during gastrointestinal transit and their stability during storage [5]. Therefore, we evaluated the functional properties and safety of the *Lactobacillus fermentum* strain TCUESC01 that was isolated during the fermentation of high-quality cacao.

2. Materials and Methods

2.1. Microorganisms and Growth Conditions. *Lactobacillus fermentum* TCUESC01 strain (accession number KU244478,

gain occurs during national holidays. Although this population sample may be wealthier, better educated, and more motivated toward weight loss than average, it still provides insights for practice. Advising a patient to have better self-control over the holidays is one approach.^{3,4} Yet given the weight-loss patterns shown in Figure 1, it might be better to advise patients that although up to half of holiday weight gain is lost shortly after the holidays, half the weight gain appears to remain until the summer months or beyond. Of course, the less one gains, the less one then has to worry about trying to lose it.

Elina E. Helander, Ph.D.
Tampere University of Technology
Tampere, Finland

Brian Wansink, Ph.D.
Cornell University
Ithaca, NY
fb1submissions@cornell.edu
Angela Chieh, M.S.
Withings
Paris, France

Disclosure forms provided by the authors are available with the full text of this letter at NEJM.org.

1. Roberts SB, Mayer J. Holiday weight gain: fact or fiction? *Nutr Rev* 2000;58:378-9.
2. Yanowski JA, Yanowski SZ, Sovik KN, Nguyen TT, O'Neil PM, Sebring NG. A prospective study of holiday weight gain. *N Engl J Med* 2000;342:861-7.
3. Hull HR, Radley D, Dinger MK, Fields DA. The effect of the Thanksgiving holiday on weight gain. *Nutr J* 2006;5:29.
4. Phelan S, Wing RR, Raynor HA, Dibello J, Nedeau K, Peng W. Holiday weight management by successful weight losers and normal weight individuals. *J Consult Clin Psychol* 2008;76:442-8.
DOI: 10.1056/NEJMc1602012

Prolonged Shedding of Zika Virus Associated with Congenital Infection

TO THE EDITOR: The presence of Zika virus (ZIKV) infection has been associated with microcephaly in multiple studies,^{1,2} although little is known about ZIKV shedding in congenitally infected infants. We report a case of a newborn who had continued viremia with ZIKV for at least 67 days after birth.

On January 2, 2016, a male child was born with microcephaly in São Paulo, Brazil, at 40 weeks of gestation to a mother who had reported having symptoms associated with ZIKV infection during the 26th week of pregnancy. At birth, the weight was 3095 g, the length 48 cm, and the head circumference 32.5 cm. The neurologic abnormality was not detected during an initial physical examination.

An analysis of cerebrospinal fluid and ophthalmologic and otoacoustic evaluations were normal. Magnetic resonance imaging (MRI) showed a reduced brain parenchyma, notably in the frontal and parietal lobes, foci of calcification in the subcortical area, and compensatory dilatation of the infratentorial supraventricular system (Fig. 1). At day 54, serum, saliva, and urine were tested for ZIKV on quantitative real-time polymerase-chain-reaction (qRT-PCR) assay. All three assays were positive for ZIKV RNA, with 1.4×10^6 copies per milliliter in the serum, 4.1×10^4 in the

saliva, and 5.4×10^3 in the urine. (Details of all analyses are provided in the Methods section in the Supplementary Appendix, available with the full text of this letter at NEJM.org.)

RNA sequencing of a urine sample obtained from the infant showed a high degree of similarity with samples isolated in the Americas with 98.5% bootstrap support (Fig. S3 in the Supplementary Appendix). ZIKV-specific IgM and IgG were positive as well. On day 67, ZIKV RNA in the serum continued to be detected on qRT-PCR, with 2.8×10^4 copies per milliliter. On day 216, ZIKV RNA was no longer detected in the serum on qRT-PCR; the ZIKV-specific IgG titer was high (>320) in comparison with the first and second samples (average titer, <99).

When the infant was examined on day 54, he had no obvious illness or evidence of any immunocompromising condition. However, by 6 months of age, he showed neuropsychomotor developmental delay, with global hypertonia and spastic hemiplegia, with the right dominant side more severely affected.

During the third trimester of pregnancy, the infant's mother had presented with fever, pruritic maculopapular rash, headache, conjunctival hyperemia, and swelling and pain in the joints of the hands and feet at 26 weeks of gestation;