

RENATA GOIS DE MELLO

Produção e caracterização de *virus-like particles* (VLPs) do vírus Zika produzidas em células de inseto

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo

2021

RENATA GOIS DE MELLO

Produção e caracterização de *virus-like particles* (VLPs) do vírus Zika produzidas em células de inseto

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador (a): Dra. Soraia Attie Calil Jorge

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca no 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)

Gois de Mello, Renata
Produção e caracterização de virus-like particles
(VLPs) do vírus Zika produzidas em células de inseto
/ Renata Gois de Mello; orientadora Soraia Attie
Calil Jorge. -- São Paulo, 2021.
76 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Vírus Zika. 2. Virus-like particles (VLPs). 3.
Baculovírus recombinante. 4. Células Sf9. I. Attie
Calil Jorge, Soraia, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): **Renata Gois de Mello**

Título da Dissertação: **Produção e caracterização de *virus-like particles* (VLPs) do vírus Zika produzidas em células de inseto**

Orientador: **Dr^a Soraia Attie Calil Jorge**

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, 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:

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Soraia Attie Calil Jorge
Área: 0
Soraia A C Jorge (orientador)

Título do projeto: "Produção e caracterização de virus-like particles (VLPs) do vírus Zika produzidos de células de inseto".

Parecer Consubstanciado da CEUA IB

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan, na reunião de 21/02/2018, **ANALISOU** e **APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.



Maria Leonor Sarno de Oliveira
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan



Nancy Oguiura
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo amor, suporte, cuidado e incentivo ao longo da minha vida;

À Dr^a Soraia Attie Calil Jorge pela oportunidade e orientação durante o desenvolvimento do projeto;

Ao Dr. Renato Mancini Astray pelos aconselhamentos e sugestões;

Ao Laboratório de Biologia Estrutural do Instituto Butantan pela ajuda e suporte na realização de experimentos fundamentais para o projeto;

Aos amigos e colaboradores do Laboratório de Biotecnologia Viral por toda a ajuda, conselhos, aprendizagem, acolhimento e por proporcionarem momentos muito agradáveis durante toda essa jornada;

Ao Instituto Butantan e ao Programa de Pós Graduação Interunidades em Biotecnologia-USP;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2017/15715-6.

RESUMO

MELLO, R. G. **Produção e caracterização de virus-like particles (VLPs) do vírus Zika produzidas em células de inseto.** 2021. 79p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

As arboviroses se tornaram um grande problema de saúde pública nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. O vírus Zika (ZIKV) é uma doença causada por arbovírus, prevalente nas Américas, África e Ásia e tem aumentado sua área de endemicidade em todo o mundo. O diagnóstico da infecção é feito por meio de técnicas moleculares e testes sorológicos. Devido aos avanços das infecções causadas pelo ZIKV, é de extrema importância o desenvolvimento de ferramentas que permitam seu combate adequado. As vacinas de partículas semelhantes a vírus (VLPs) apresentam-se com enorme potencial de uso como vacinas antivirais extremamente eficazes, pois mimetizam a partícula viral, induzindo resposta imune e, por não possuírem o material genético do vírus, não se replicam no organismo, tornando-as seguras como vacinas. Neste trabalho, nós estabelecemos uma metodologia para produção e caracterização de VLPs contendo as proteínas estruturais, C, prM e E, do ZIKV produzidas em células de inseto utilizando o sistema de expressão gênica derivado de baculovírus. Para isso, foi construído o vetor pFast-E-ZIKV contendo as sequências gênicas das proteínas de interesse do ZIKV e este foi utilizado para gerar os bacmídeos recombinantes (Bac-E-ZIKV) através da transformação em células DH10Bac™. O Bac-E-ZIKV gerado foi transfectado em células de inseto *Spodoptera frugiperda* (Sf9) e lotes de baculovírus recombinantes (BV-E-ZIKV) foram obtidos para ensaios de infecção. Os ensaios de infecção foram realizados com uma multiplicidade de infecção viral (MOI) de 2 do BV-E-ZIKV. As células Sf9 foram infectadas e o sobrenadante foi coletado 96h pós-infecção. A expressão da proteína E-ZIKV na superfície das células pode ser observada por ensaios de imunofluorescência indireta e *western blot*. Para concentrar e purificar as VLPs produzidas do BV-E-ZIKV testamos os gradientes de sacarose e iodixanol e pudemos avaliar a expressão das proteínas E-ZIKV pelo ensaios de *dot blot* e *western blot*. As VLPs foram analisadas e caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão e pudemos observar estruturas esféricas semelhantes ao ZIKV nativo de 50 a 65 nm contendo as proteínas E-ZIKV em sua superfície. Os resultados obtidos neste projeto podem gerar ferramentas importantes no desenvolvimento de um método de vacina contra o ZIKV.

Palavras-chave: VLPs. Vírus Zika. Baculovírus recombinante. Células Sf9.

ABSTRACT

MELLO, R. G. **Production and characterization of virus-like particles (VLPs) of Zika virus produced in insect cells.** 2021. 79p. Dissertation (Master's thesis in Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Arboviruses have become a public health problem in the tropical and subtropical regions of the world. The Zika virus (ZIKV) is an arboviral disease prevalent in the Americas, Africa and Asia and has increased its area of endemicity around the world. The diagnosis of the infection is made through molecular techniques and serological tests. Due to the advances of the infections caused by the ZIKV it is of extreme importance the development of tools that allow the adequate combat of the ZIKV. Virus-like particles (VLPs) vaccines appear as an enormous potential for use as extremely effective antiviral vaccines, since they mimic the viral particle, inducing immune response and, as they don't have the genetic material of the virus they won't replicate in the organism, making them safe as viral particles. In this work, we established a methodology for production and characterization of VLPs containing the structural proteins, C, prM and E, of ZIKV produced in insect cells using the gene expression system derived from baculovirus. For this, the vector pFast-E-ZIKV was constructed containing the gene sequences of the proteins of interest of the ZIKV and it was used to generate the recombinant bacmids (Bac-E-ZIKV) through transformation into DH10Bac™ cells. The generated Bac-E-ZIKV was transfected in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) insect cells and batches of recombinant baculovirus (BV-E-ZIKV) were obtained for the infection assays. Infection assays were performed with a multiplicity of infection (MOI) of 2 from BV-E-ZIKV. The Sf9 cells were infected and the supernatant was collected 96h post-infection. The expression of the E-ZIKV protein on the cell surface could be observed by indirect immunofluorescence and western blot assays. To concentrate and purify the VLPs produced from BV-E-ZIKV we tested the sucrose and iodixanol gradients and we were able to evaluate the expression of E-ZIKV protein by dot blot and western blot assay. The VLPs were analyzed and characterized by transmission electron microscopy and we were able to observe spherical structures similar to the native ZIKV from 50 to 65 nm containing the E-ZIKV proteins on their surface. The results obtained in this project can generate important tools in the development of a vaccine method against ZIKV.

Key words: VLPs. Zika virus. Recombinant baculovirus. Sf9 cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Figura representativa do ZIKV e seu genoma	20
Figura 2: Esquema representativo da replicação viral do ZIKV	21
Figura 3: Plataformas vacinais contra o ZIKV.....	27
Figura 4: Vacinas de plataformas de VLP.	28
Figura 5: Esquema de trabalho para a produção das VLPs.....	34
Figura 6: Geração do baculovírus recombinante (BV-E-ZIKV) e obtenção das VLPs.....	35
Figura 7: Sequência do fragmento E-ZIKV.....	36
Figura 8: Mapa do vetor pFast-E-ZIKV.....	37
Figura 9: Confirmação da obtenção do vetor pFast-E-ZIKV a partir da digestão com enzimas de restrição e análise em gel de agarose 0,8%.	48
Figura 10: Análise da transposição do vetor pFast-E-ZIKV nos clones de DH10Bac.	49
Figura 11: Confirmação da obtenção do Bac-E-ZIKV através de PCR e análise em gel de agarose 0,8%.....	49
Figura 12: Imagens de microscopia óptica de células Sf9 transfectadas com Bac-E-ZIKV.....	50
Figura 13: Imagens de microscopia óptica do efeito citopático de células Sf9 infectadas com BV-E-ZIKV em diferentes tempos de infecção.	52
Figura 14: Imagem de Imunofluorescência indireta de células Sf9 infectadas com diferentes MOIs de BV-E-ZIKV.....	54
Figura 15: <i>Dot blot</i> do sobrenadante de células Sf9 infectadas com MOI 2 do BV-E-ZIKV em diferentes tempos de coleta pós-infecção.	55
Figura 16: <i>Western blot</i> do sobrenadante de células Sf9 infectadas com MOI 2 do BV-E-ZIKV em diferentes tempos de coleta pós-infecção.	56
Figura 17: Análise do processo de purificação das VLPs com gradiente de sacarose em amostras de sobrenadante de células Sf9 infectadas com BV-E-ZIKV.....	57
Figura 18: Análise do processo de purificação das VLPs com gradiente de iodixanol em amostras de sobrenadante de células Sf9 infectadas com BV-E-ZIKV.	59
Figura 19: Microscopia Eletrônica de Transmissão das VLPs-ZIKV purificadas com gradiente de sacarose e iodixanol.	61
Figura 20 : Microscopia Imunoelétrica das VLPs-ZIKV purificadas com gradiente de sacarose e iodixanol.	62
Figura 21: Microscopia Eletrônica de Transmissão da técnica de citoquímica ultraestrutural das células Sf9 infectadas com BV-E-ZIKV no tempo de 72h pós-infecção.	63

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Candidatos vacinais para o ZIKV em ensaios clínicos em humanos.....	26
Tabela 2 - Oligonucleotídeos utilizados na técnica de PCR para amplificação do bacmídeo recombinante.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcMNPV	<i>Autographa californica multinuclear polyhedrosis</i>
Bac-E-ZIKV	Bacmídeo recombinante expressando proteínas estruturais do ZIKV
BEVS	<i>Baculovirus expression vectors system</i>
BV	<i>Budded virus</i>
BV-E-ZIKV	Baculovírus recombinante expressando proteínas estruturais do ZIKV
C	Proteína do capsídeo
CHIKV	Vírus Chikungunya
DENV	Vírus Dengue
E	Proteína do envelope
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ESPII	Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional
Gp64	Anticorpo monoclonal anti-gp64-baculovírus
Hi-5	Células <i>Trichoplusia ni</i>
IgM	Imunoglobulina M
IFI	Imunofluorescência indireta
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
ODV	<i>Occlusion derived virus</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pFast-E-ZIKV	Vetor pFastBac1 com genes das proteínas estruturais do ZIKV
pfu	<i>Plaque-forming unit</i>
prM	Proteína pré-membrana
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>
SCZ	Síndrome Congênita do Zika vírus
Sf9	Células de <i>Spodoptera frugiperda</i>
Sf9-ET	Células Sf9- <i>Easy titration</i>
SVS	Secretaria de vigilância sanitária
TCID50	<i>Tissue culture infective dose</i>
TOH	<i>Time of harvest</i>

VERO	Células de rim de macaco verde africano
VLP	<i>Virus-like particles</i>
ZIKV	Vírus Zika

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1.	Epidemiologia	18
2.2.	O vírus ZIKA	19
2.3.	Transmissão.....	22
2.4.	Aspectos Clínicos.....	22
2.5.	Diagnóstico	23
2.6.	Tratamento e prevenção	24
2.7.	Candidatos Vacinais contra o ZIKV	25
2.8.	<i>Virus Like-Particles</i> (VLPs).....	26
2.9.	Sistema de expressão de Baculovírus.....	29
3.	OBJETIVOS	32
3.1.	Objetivo Geral	32
3.2.	Objetivos Específicos.....	32
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1.	Linhagem celular e Vírus	33
4.2.	Geração do baculovírus recombinante (BV-E-ZIKV)	33
4.2.1.	Obtenção do pFast-E-ZIKV	34
4.2.2.	Obtenção do Bacmideo recombinante (Bac-E-ZIKV)	38
4.2.3.	Transfecção em células Sf9.....	39
4.2.4.	Titulação viral em células Sf9-ET.....	39
4.2.5.	Ensaio de amplificação do lote viral BV-E-ZIKV	40
4.3.	Obtenção das VLPs-ZIKV	40
4.3.1.	Ensaio de infecção com BV-E-ZIKV em placa	40
4.3.2.	Análise da expressão das proteínas E-ZIKV.....	41
4.3.2.1.	Ensaio de Imunofluorescência Indireta (IFI).....	41
4.3.2.2.	Ensaio de <i>Dot Blot</i>	42
4.3.2.3.	Ensaio de <i>Western Blot</i>	42
4.3.3.	Ensaio de infecção com BV-E-ZIKV em frascos agitados.....	39
4.3.4.	Concentração e purificação das VLPs-ZIKV.....	39
4.3.4.1.	Gradiente de Sacarose.....	44
4.3.4.2.	Gradiente de Iodixanol (OptiPrep™).....	45
4.3.5.	Caracterização das VLPs-ZIKV por Microscopia Eletrônica de Transmissão	45
5.	RESULTADOS.....	47

5.1.	Obtenção do baculovírus recombinante (BV-E-ZIKV)	47
5.1.1.	Obtenção do pFast-E-ZIKV	47
5.1.2.	Obtenção do Bacmídeo recombinante (Bac-E-ZIKV)	48
5.1.3.	Transfecção em células Sf9.....	50
5.1.4.	Titulação viral	50
5.2.	Ensaio de infecção BV-E-ZIKV em placa	51
5.3.	Análise da expressão das proteínas E-ZIKV	53
5.3.1.	Ensaio de Imunofluorescência Indireta (IFI).....	53
5.3.2.	<i>Dot blot</i>	55
5.3.3.	<i>Western blot</i>	55
5.4.	Análise da obtenção das VLPs	56
5.4.1.	Gradiente Sacarose.....	56
5.4.2.	Gradiente Iodixanol (OptiPrep™).....	58
5.4.3.	Caracterização das VLPs-ZIKV por Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	56
6.	DISCUSSÃO	64
7.	CONCLUSÕES	72

1. INTRODUÇÃO

As arboviroses se tornaram um grande problema de saúde pública nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. O vírus Zika (ZIKV) juntamente com os vírus da Dengue (DENV) e o Chikungunya (CHIKV) são os arbovírus mais prevalentes das Américas e são responsáveis por problemas de saúde, com consequências econômicas e sociais para as populações que vivem em áreas endêmicas (RODRÍGUEZ-MORALES, 2015). O ZIKV é um arbovírus (vírus transmitido por artrópodes) e é transmitido para os humanos através da picada do mosquito do gênero *Aedes* (*A. aegypti* e *A. albopictus*). Foi primeiramente isolado em 1947 em primatas, macacos rhesus, na floresta Zika, em Uganda, África (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952; MACNAMARA, 1954). O ZIKV é hoje considerado um problema de saúde pública devido a sua rápida propagação geográfica que ocorreu nos últimos 14 anos, primeiro na região Ásia-Pacífico, seguido por sua rápida entrada no hemisfério ocidental (LANCIOTTI et al., 2008; HEANG et al., 2012; BUATHONG et al., 2015; MCCARTHY, 2016; SIKKA et al., 2016).

Em 2015, o ZIKV foi identificado pela primeira vez no continente Americano, especificamente no Brasil, na região nordeste (ZANLUCA et al., 2015). Nesse mesmo ano, um aumento da incidência de casos de malformação congênita em 20 vezes em relação aos anos anteriores foi relatado concomitante ao surto do ZIKV no nordeste brasileiro (VICTORA et al., 2016). Isto levou a Organização Mundial de Saúde (OMS) a declarar a propagação do ZIKV e a sua associação com defeitos de nascimento como uma Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (ESPII) em 1º de fevereiro de 2016 (WHO, 2016). Em 2016, no Brasil, foram confirmados 126.395 casos de infecção pelo ZIKV, dos quais seis evoluíram para óbito, além do aumento da incidência dos casos de malformação congênita. O ZIKV está atualmente difundido no país com transmissão autóctone e incidência notificada nos 27 estados administrativos da Federação Brasileira.

A infecção causada pelo ZIKV pode causar uma variedade de sintomas como febre, dor de cabeça, dor muscular, conjuntivite, erupções cutâneas e artralgias. Porém, ainda não há um tratamento específico para a infecção e nem drogas antivirais disponíveis no mercado. O diagnóstico das infecções causadas pelo ZIKV é realizado através de testes sorológicos ou moleculares. Entretanto, os testes moleculares podem resultar em falso-negativos se forem

realizados fora do período virêmico da doença e, nos testes sorológicos, podem ocorrer reações cruzadas de anticorpos de vírus pertencentes ao mesmo gênero como o DENV e o vírus da Febre amarela (CDC, 2016).

Assim, o avanço das infecções causadas pelo vírus Zika, os casos de microcefalia em recém-nascidos e os problemas relacionadas ao diagnóstico, leva a necessidade do desenvolvimento de ferramentas tanto para a detecção do vírus (testes rápidos, eficazes e baratos para diagnóstico correto da infecção) quanto para o combate à infecção, como o desenvolvimento de uma vacina que seja segura e efetiva.

A vacinação é considerada o método mais eficiente para a prevenção contra infecções virais. No entanto, o desenvolvimento de vacinas contra infecções virais emergentes, como no caso do ZIKV, pode enfrentar diversos desafios, no que se diz respeito à segurança, rapidez e eficiência da vacina. Dessa forma, a estratégia de vacinação utilizando partículas semelhantes a vírus ou *virus-like particles* (VLPs) surge como uma excelente plataforma para o desenvolvimento de vacinas eficientes, uma vez que elas têm a habilidade de induzir uma resposta imune forte, permitir o teste de múltiplos antígenos como candidatos em sua superfície e estão associadas a um processo de produção mais seguro (LIU et al., 2016). As VLPs são formadas a partir de proteínas estruturais virais que tem a capacidade de automontagem formando estruturas semelhantes ao vírus nativo. Elas já têm sido estudadas como candidatos vacinais há décadas e já existem diversas vacinas aprovadas para comercialização além daquelas que estão em diferentes estágios de estudos clínicos (MOHSEN et al., 2017).

Várias plataformas para a produção de VLPs já são amplamente utilizadas, como bactérias, leveduras, plantas transgênicas, células de mamífero e células de inseto (FUENMAYOR et al., 2017). Dentre eles, o sistema de expressão de baculovírus produzidos em células de inseto tem se mostrado um sistema promissor devido à sua capacidade de proporcionar modificações pós-traducionais, como a glicosilação das proteínas de interesse e por sua capacidade de gerar VLPs mais complexas quando comparado a outros sistemas, além da capacidade de expressar altos níveis de proteínas heterólogas (ROLDÃO et al., 2010; RODRÍGUEZ-LIMAS; SEKAR; TYO, 2013).

Dessa forma, nossa proposta nesse trabalho foi produzir e caracterizar uma partícula semelhante ao vírus Zika (VLP-ZIKV), expressando as suas proteínas estruturais utilizando o sistema de expressão gênica derivado de baculovírus produzidos em cultura de células de inseto de

Spodoptera frugiperda (Sf9). É nossa expectativa que os resultados obtidos possam constituir uma importante ferramenta biotecnológica para o desenvolvimento de métodos vacinais para o ZIKV.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Epidemiologia

O ZIKV foi primeiramente isolado em 1947 em primatas (macacos rhesus) na floresta Zika, em Uganda, África, durante um estudo de vigilância sobre febre-amarela (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). Um ano depois, o vírus foi novamente isolado, desta vez do mosquito *Aedes africanus*, na mesma floresta (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). Estudos sorológicos realizados posteriormente mostraram que o vírus também poderia infectar seres humanos, porém não se sabia sobre as manifestações clínicas da infecção (DICK, 1952). Após isso, o vírus foi reportado por vários países do continente africano: Senegal (MONLUN et al., 1993), Serra Leoa (ROBIN; MOUCHET, 1975), Nigéria (FAGBAMI, 1977; MACNAMARA, 1954; FAGBAMI, 1977; ADEKOLU-JOHN; FAGBAMI, 1983), Gabão (JAN et al., 1978; SALUZZO et al., 1982), República Centro-Africana (SALUZZO et al., 1981), Egito (SMITHBURN et al., 1954), Uganda (SMITHBURN, 1952), Tanzânia (SMITHBURN, 1952) e Quênia (GESER; HENDERSON; CHRISTENSEN, 1970), mostrando que o vírus possui uma ampla distribuição geográfica.

Após 6 anos, em 1954, foi relatado os três primeiros casos de infecção pelo ZIKV em seres humanos com manifestações clínicas na Nigéria (MACNAMARA, 1954). Até o início dos anos 2000 apenas alguns casos esporádicos da infecção causada pelo ZIKV foram documentados em alguns países da Ásia e África (HAYES, 2009). Alguns anos depois, em 2007, ocorreu o primeiro grande surto de ZIKV nas ilhas Yap, na Micronésia, localizada no Oceano Pacífico, onde cerca de 73% da população foi infectada pelo vírus e cerca de 18% das pessoas infectadas desenvolveram a doença com sintomas (DUFFY et al., 2009; LANCIOTTI et al., 2008).

Já o segundo grande surto epidêmico foi reportado em 2013 na Polinésia Francesa com cerca de 11% da população infectada associada a complicações neurológicas, como a síndrome de Guillain-Barré, meningite, mielite e meningoencefalite (CAO-LORMEAU et al., 2014). Entre 2013 e 2014 subsequentes surtos foram relatados nas ilhas do Pacífico, incluindo Nova Caledônia (DUPONT-ROUZEYROL et al., 2015), Ilha de Páscoa (TOGNARELLI et al., 2016), Ilhas Cook (ROTH et al., 2014) e Taiti (WÆHRE et al., 2014). O vírus se espalhou também para outros países mais distantes como Austrália (PYKE et al., 2014), Itália (ZAMMARCHI et al., 2015), Japão (KUTSUNA et al., 2014) e Noruega (WÆHRE et al., 2014).

Pouco depois, em 2015, o ZIKV foi identificado pela primeira vez no continente Americano, através de transmissão autóctone no Brasil, na região nordeste, em associação com um surto de uma doença exantemática aguda (ZANLUCA et al., 2015). Até o fim deste mesmo ano, o vírus tinha se espalhado em pelo menos 14 estados brasileiros (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017) com cerca de 440.000-1.300.000 casos suspeitos de pessoas infectadas (HENNESSEY; FISCHER; STAPLES, 2016). Um aumento da incidência de casos de malformação congênita em neonatos em 20 vezes em relação aos anos anteriores foi relatado juntamente com o surto do ZIKV no nordeste brasileiro (VICTORA et al., 2016). Em novembro de 2015 o Ministério da Saúde Brasileiro declarou uma emergência de saúde pública devido ao grande aumento da incidência de microcefalia no estado de Pernambuco. Isto levou a Organização Mundial de Saúde (OMS) a declarar a propagação do ZIKV e a sua associação com defeitos de nascimento como uma Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (ESPII) em 1º de fevereiro de 2016 (WHO, 2016).

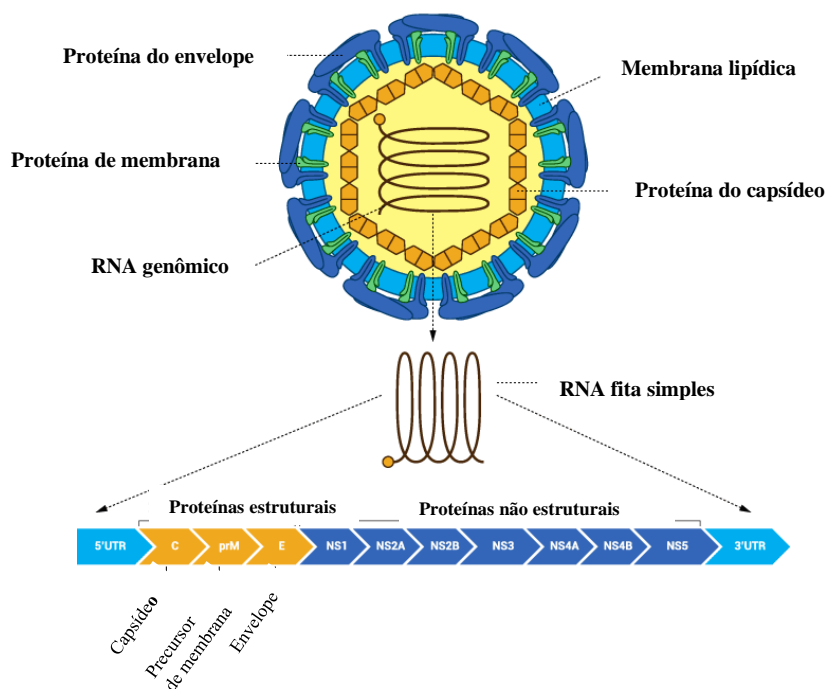
Até abril de 2016, o vírus tinha se espalhado por 33 países e territórios do continente americano (CDC, 2016). Até julho de 2019, 87 países e territórios reportaram casos de transmissão autóctone do vírus (WHO, 2019), sendo 3.473 casos confirmados (WHO, 2019). Até a semana epidemiológica 51 de 2020, foram notificados 7.387 casos prováveis de infecções causadas pelo ZIKV no país com taxa de incidência de 3,5 casos/100 mil habitantes. (SVS, 2021). De acordo com a taxa de incidência de casos prováveis de infecção por ZIKV por regiões geográficas, a região Nordeste apresentou a maior incidência, 9,2 casos/100 mil hab., seguida das regiões Centro-Oeste (3,6 casos/100 mil hab.) e Norte (2,8 casos/100 mil hab.) (SVS, 2021).

2.2. O vírus ZIKA

O ZIKV é um vírus de RNA fita simples de senso positivo pertencente à família *Flaviviridae*, do gênero *Flavivirus* (LINDENBACH; RICE, 2007). Como outros flavivírus, o ZIKV é composto por duas regiões não codificantes, a 5' e 3', que flanqueiam uma região de leitura aberta (ORF). A ORF codifica uma poliproteína dividida em três proteínas estruturais: capsídeo (C), precursor de membrana (prM) e envelope (E) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B,

NS3, NS4A, NS4B e NS5) (KUNO; CHANG, 2007). O vírus apresenta uma proteína de envelope viral (E) na sua membrana lipídica, junto a proteína de membrana (M) (LINDENBACH; RICE, 2007; PIERSON; DIAMOND, 2012; HAMEL et al., 2015). O vírus contém um nucleocapsídeo icosaédrico de aproximadamente 50-60 nm (HAMEL et al., 2015; KUHN et al., 2002; LINDENBACH; RICE, 2007), composto pelas proteínas da cápside (C) e o genoma viral de RNA de fita simples positiva contendo cerca de 10.794 nucleotídeos que codificam 3.419 aa (KUNO; CHANG, 2007) (Figura 1).

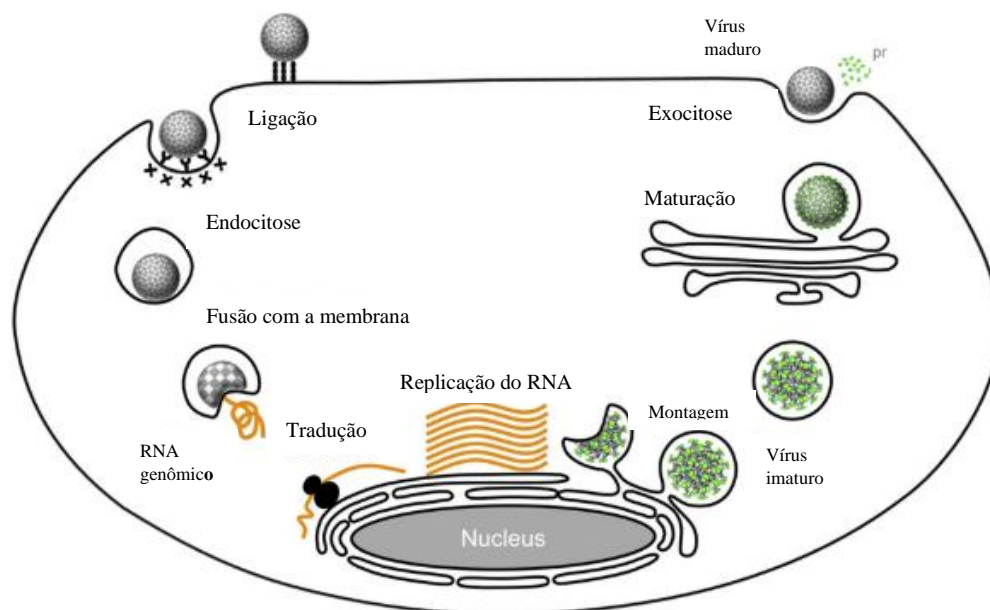
Figura 1: Figura representativa do ZIKV e seu genoma



Fonte: <https://www.promega.com.br/resources/pubhub/inspiration/zika-perspectives-responses>

Após sua inoculação no ser humano pelo mosquito, o vírus entra nas células da pele através de receptores celulares, permitindo a migração para os linfonodos e corrente sanguínea (PLOURDE; BLOCH, 2016). A infecção acontece através da interação da proteína E do vírus com o receptor da célula do hospedeiro por endocitose mediada por clatrina, assim, o envelope é desfeito juntamente com o nucleocapsídeo, liberando o genoma viral no citoplasma da célula (CARNEC et al., 2016; CHU; NG, 2004). O genoma é então traduzido em uma poliproteína que é posteriormente clivada por proteases em: C, prM e E e as proteínas não estruturais (NS) 1 a 5 (LINDENBACH; RICE, 2007). As proteínas estruturais são responsáveis pela montagem, brotamento e entrada na célula hospedeira e as proteínas não estruturais são responsáveis pela replicação do RNA viral, produzindo cópias do genoma viral através de uma fita molde de RNA (PIERSON; DIAMOND, 2012; SONG et al., 2017). O genoma é então inserido no nucleocapsídeo através da interação com a proteína C e os nucleocapsídeos são então envelopados durante o processo de brotamento (LINDENBACH; RICE, 2007; PIERSON, DIAMOND, 2013; RAMAMURTHY et al., 2013) (Figura 2).

Figura 2: Esquema representativo da replicação viral do ZIKV



O ciclo replicativo do ZIKV. Os oito principais passos do ciclo viral são: ligação ao receptor da célula; endocitose; fusão com a membrana; tradução; replicação do RNA; montagem; maturação e exocitose (adaptado de Song et al., 2017).

2.3. Transmissão

O ZIKV é tipicamente transmitido via picada de mosquito, sendo o *A. aegypti* o principal vetor atualmente, seguido do gênero *A. albopictus*. O mosquito *A. aegypti* é uma espécie originária da África, pertence à família *Culicidae*, subfamília *Culicinae*, gênero *Aedes*, e subgênero *Stegomyia*. Mosquitos do gênero *Aedes* estão amplamente distribuídos pelo mundo sendo regiões tropicais e subtropicais o habitat nativo da maioria das espécies (KRAEMER et al., 2015).

A aquisição do vírus pelo mosquito ocorre durante a alimentação do sangue do hospedeiro infectado. Após a captura, o vírus se replica e pode ser encontrado nas glândulas salivares do mosquito. Uma vez infectado, a fêmea transmite o vírus junto com sua saliva para um animal reservatório ao realizar sua próxima refeição (IOOS et al., 2014). O *A. aegypti* é um mosquito de hábito diurno e tem preferência por ambientes urbanos e intradomiciliares (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). A sua proliferação é dada pela postura de ovos pelas fêmeas em locais onde se encontra água parada, onde, posteriormente, os ovos irão eclodir dando origem às larvas. O ovo do mosquito consegue sobreviver até um ano fora da água aguardando condições ambientais favoráveis para se desenvolver (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

O ZIKV além de ser transmitido pela picada do mosquito pode ser transmitido também via sexual (FOY, 2011; MUSSO, 2015), por transfusão sanguínea (MUSSO, 2014) e via placentária, de mãe para filho (PAHO, 2016).

2.4. Aspectos Clínicos

O período de incubação do vírus em humanos a partir da picada do mosquito até o aparecimento dos sintomas é de aproximadamente 3 a 14 dias. A maioria das infecções causadas pelo ZIKV é assintomática (cerca de 80%) e, quando ocorrem eles são geralmente febre, erupções cutâneas, artralgia, mialgia, conjuntivite não purulenta, astenia e dor de cabeça (CAO-LORMEAU et al., 2014; DUFFY et al., 2009; MACNAMARA, 1954). Os sintomas geralmente duram 1 a 2 semanas e são similares a outras infecções causadas por arbovírus como dengue e chikungunya (LANCIOTTI et al., 2008; DUFFY et al., 2009; CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015; ZANLUCA et al., 2015).

Além destes sintomas, o ZIKV também está associado com complicações neurológicas como a síndrome de Guillain-Barré, meningite, mielite e meningoencefalite em adultos (ECDC, 2014; MUSSO et al., 2014). Essa associação foi observada durante o surto na Polinésia Francesa em 2013-2014 (ECDC, 2014; MUSSO et al., 2014) e durante o surto nas Américas em 2015-2016 (BROUTET et al., 2016; ROZE et al., 2016; THOMAS et al., 2016). No último boletim epidemiológico de doenças neuroinvasivas causadas por arbovírus emitido no de 2019, foram notificados 382 casos de complicações neurológicas sendo 160 casos SGB (SVS, 2020).

Já em mulheres grávidas, a infecção pelo vírus pode levar a abortos e em recém-nascidos pode causar malformação congênita (microcefalia), calcificações cerebrais e degeneração muscular (PAHO, 2016). A associação da infecção do ZIKV com a microcefalia em recém-nascidos foi observada no surto ocorrido no Brasil em 2015 quando os casos de microcefalia começaram a aumentar significativamente (MICROCEPHALY EPIDEMIC RESEARCH GROUP, 2016). Após isso, 8.301 casos de microcefalia foram reportados entre novembro de 2015 e julho de 2016 (MAGALHÃES-BARBOSA et al., 2016). Foi demonstrado que o ZIKV infecta neurônios maduros e preferencialmente células progenitoras neurais humanas causando a apoptose. Isso ocasionaria o processo de microcefalia uma vez que essas células são responsáveis pelo desenvolvimento do córtex no cérebro dos fetos (ONORATI et al., 2016; TANG, 2016). Atualmente a microcefalia é considerada um dos problemas mais graves causado pela infecção pelo ZIKV, uma vez que essa condição influencia severamente a formação e as funções cerebrais o que afetaria a qualidade de vida dessas pessoas. Entre as semanas epidemiológicas 45/2015 e 45/2020 foram confirmados 3.563 casos de Síndrome Congênita do Zika vírus (SCZ) dos quais 27 foram confirmados no ano de 2020 (SVS, 2020). Esses dados reforçam que apesar do período de emergência da doença ter terminado, novos casos de SCZ continuam a ocorrer no país.

2.5. Diagnóstico

Atualmente o diagnóstico laboratorial para detectar o ZIKV pode ser realizado através de testes moleculares e testes sorológicos. Os testes moleculares detectam a presença do vírus no material. Isso ocorre por meio da amplificação do material genético, no caso o RNA viral. Essa metodologia é denominada de RT-PCR (Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa)

e é o método de diagnóstico mais específico para detecção do ZIKV (CDC, 2016). Ele deve ser realizado durante o período virêmico da doença (até 5-8 dias após início dos sintomas). Antes ou após este período, o resultado pode ser falso-negativo, o que não exclui a infecção.

Já os testes sorológicos detectam os anticorpos circulantes contra o vírus na amostra. O exame mais utilizado é o ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) que detecta anticorpos IgM específicos contra o ZIKV (BRASIL, 2005). Ele pode ser realizado a partir do quarto dia da doença, quando esses anticorpos começam a aparecer na circulação sanguínea. A vantagem deste teste é que ele exige apenas uma única amostra de soro para fazer a análise. Porém os testes sorológicos podem causar resultados falso-positivos devido às reações cruzadas com outros vírus da mesma família, como por exemplo, o vírus da dengue e o vírus da febre amarela (CDC, 2016). Nesse caso, caso o resultado de positivo, recomenda-se a confirmação do resultado com o teste de neutralização de redução de placas (PRNT).

2.6. Tratamento e prevenção

Atualmente não há nenhum tratamento específico ou vacina disponível para a prevenção da infecção causada pelo ZIKV. Desse modo, é recomendado para os pacientes o tratamento dos sintomas, com analgésicos, ingestão de líquidos e repouso. Devido a isto, o papel da prevenção da doença e controle do vetor é de extrema importância, principalmente quando se trata da população de mulheres grávidas. As medidas são focadas principalmente na prevenção da picada do mosquito transmissor do vírus com a proteção do corpo, uso de mosquiteiros e telas para proteção da casa e uso de repelentes no caso de proteção individual. Em termos de comunidade, em áreas comuns em cidades, os agentes comunitários de saúde e os agentes de combate a endemias, junto da população, são responsáveis por promover o controle químico e mecânico do vetor, cujas estratégias têm como alvo a reprodução dos mosquitos através da eliminação de possíveis criadouros através do uso de inseticidas e a eliminação dos mosquitos adultos (WHO, 2018).

Outra estratégia necessária é a promoção de ações educativas sobre os vírus e seus riscos durante a visita dos agentes comunitários com o objetivo de garantir a eliminação dos criadouros pelos próprios moradores das residências para tentar romper a cadeia de transmissão das doenças (WHO, 2018).

Segundo o último Levantamento Rápido de Índices para *Aedes aegypti* (LIRAA) do ano de 2019, 994 municípios do país se encontravam em estado de alerta e 2.160 estavam em estado de risco para a infestação do mosquito *A. aegypti* (SVS, 2019), mostrando que o controle do mosquito ainda é ineficaz, o que poderia acarretar o risco de novos surtos epidemiológicos das arboviroses por ele transmitidas. Importante ressaltar que este levantamento foi suspenso no ano de 2020/2021 devido a pandemia do Coronavírus.

Para mulheres grávidas que não moram em países endêmicos é recomendado que evitem viajar para países afetados pelo ZIKV. Para mulheres que viajarem para áreas endêmicas é recomendada a realização de testes para a detecção do vírus. A ultrassonografia para monitorar a anatomia fetal é recomendada para mulheres que apresentarem testes positivo ou inconclusivo para o vírus (PETERSEN et al., 2016).

2.7. Candidatos Vacinais contra o ZIKV

Atualmente não há nenhuma vacina aprovada para uso contra o ZIKV. No surto epidêmico do ZIKV em 2016, a Organização Mundial de Saúde (OMS) e outras instituições definiram o desenvolvimento de vacinas contra o ZIKV como principal prioridade. No entanto, com o declínio dos casos desde então, a imprevisibilidade de futuros surtos e o cenário de uso pouco definido dessas vacinas, fez com que a rapidez para o desenvolvimento e o licenciamento de uma vacina diminuísse consideravelmente (WILDER-SMITH et al., 2018). A OMS tem feito o acompanhamento das vacinas que estão em desenvolvimento e em fase de estudos clínicos (WHO, 2019). No momento, existem algumas propostas vacinais que já estão em fase de estudos clínicos de fase 1 e 2 em humanos. As propostas vacinais utilizam as plataformas de DNA, peptídeo, mRNA, vírus inativado e vetor viral recombinante e estão sendo produzidas por diferentes empresas e instituições como pode ser observado na tabela 1.

Várias vacinas já mostraram proteção robusta contra o ZIKV em ensaios de desafio em modelos animais (WHO, 2019) no entanto ainda há a necessidade de desenvolver uma vacina que seja segura para ser usada por mulheres em fase reprodutiva com o objetivo de prevenir infecções pré-natais devido as possíveis complicações de SCZ e outras complicações geradas para a população de modo geral. Além disso essa vacina precisaria estar disponível e ser acessível em

países onde o ZIKV está em circulação. Para isso, é necessário a junção de esforços globais para priorizar novamente o desenvolvimento de uma vacina para o ZIKV que atenda esses requisitos.

Tabela 1: Candidatos vacinais para o ZIKV em ensaios clínicos em humanos (WHO, 2019).

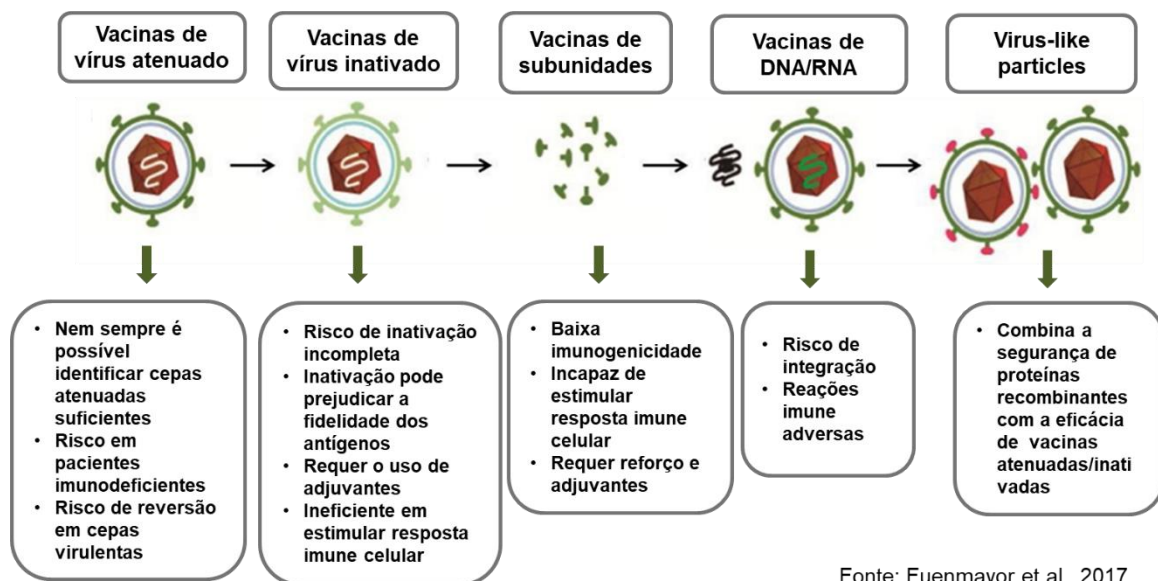
Desenvolvedores	Plataforma	Antígeno	Adjuvante	Fase
GeneOne Life Science	DNA	prME	Não	Fase 1
GeneOne Life Science	DNA	prME	Não	Fase 1
Themis Bioscience	Vetor Viral Recombinante	prME	Não	Fase 1
Moderna Therapeutics	mRNA	prME	Não	Fase 2
NIAID	DNA	prME	Não	Fase 1
NIAID	DNA	prME	Não	Fase 1
NIAID	DNA	prME	Não	Fase 2
NIAID	Vírus Inativado	Vírus inteiro	Sais de metais (alumínio)	Fase 1
NIAID	Vírus Inativado	Vírus inteiro	Sais de metais (alumínio)	Fase 1
BIDMC	Vírus Inativado	Vírus inteiro	Sais de metais (alumínio)	Fase 1
NIAID	Vírus Inativado	Vírus inteiro	Sais de metais (alumínio)	Fase 1
Takeda	Vírus Inativado	Vírus inteiro	Sais de metais (alumínio)	Fase 1
Valneva	Vírus Inativado	Vírus inteiro	Sais de metais (alumínio)	Fase 1
Bharat Biotech	Vírus Inativado	Vírus inteiro	Sais de metais (alumínio)	Fase 1
NIAID	Vetor Viral Recombinante	ZIKV prME no Backbone do DENV	Não	Fase 1
NIH	Peptídeo	Proteínas salivares do mosquito	Não especificado	Fase 1

2.8. *Virus-Like Particles (VLPs)*

Várias estratégias têm sido usadas para o desenvolvimento de vacinas contra arboviroses, sendo as principais até então as vacinas de subunidade (proteína ou DNA plasmidial), vírus quimicamente inativados e vírus atenuados (Figura 3). Mais recentemente, vacinas de RNA mensageiro modificado e vacinas de vetores virais também têm sido estudadas para serem usadas contra a infecção causada pelo ZIKV, sendo que muitas dessas vacinas já estão em fase de estudo pré-clínico em animais e em fase 1 de ensaio clínico em humanos (FERNANDEZ; DIAMOND, 2017). As vacinas de DNA plasmidial ou de vetores de adenovírus tem a proposta de produzir a proteína do envelope do vírus que seja capaz de eleger uma resposta imune neutralizante. As vantagens dessas vacinas são que elas apresentam baixa reatogenicidade e não apresentam o risco de reversão. As vacinas de subunidades são compostas por proteínas recombinantes virais ou proteínas purificadas do vírus selvagem que agem como antígenos. São consideradas seguras,

porém apresentam baixa imunogenicidade quando comparada as outras plataformas. Já as vacinas de vírus atenuado desencadeiam uma resposta imune forte no indivíduo não necessitando geralmente do uso de adjuvante e reforço. Porém por apresentarem risco de reversão e consequente patogenicidade não seria recomendada para ser administrada em populações imunocomprometidas, incluindo mulheres grávidas (FERNANDEZ; DIAMOND, 2017). Já as vacinas de vírus inativados foram criadas para contornar os problemas das vacinas de vírus atenuado. São vacinas onde o vírus selvagem é inativo de forma a perder sua virulência, porém elas apresentam menor eficácia quando comparada as vacinas de vírus atenuado. As vacinas de partículas semelhantes a vírus ou *virus-like particles* (VLPs) têm sido amplamente estudadas, já que combinam a eficácia de uma vacina inativada com a segurança de vacinas de subunidades (PIJLMAN et al., 2015), isso porque as VLPs são estruturas que mimetizam a conformação de uma partícula viral, podendo ser composta por algumas ou todas as proteínas estruturais do vírus, porém sem carregar o genoma viral, formando uma partícula não replicativa, impedindo a possibilidade de reversão e infecção patogênica, o que as tornam seguras como partículas vacinais. Além disso, elas proporcionam uma alta resposta imune celular e humoral, pois estimulam o sistema imune através do reconhecimento repetitivo de subunidades do antígeno em questão (ROLDÃO et al., 2010).

Figura 3: Plataformas vacinais contra o ZIKV.



Assim, o estudo de VLPs surgiu com um enorme potencial para o uso como vacinas antivirais extremamente eficazes, uma vez que mimetizam a partícula viral, induzindo resposta imunológica. Diversas vacinas baseadas em VLPs já estão disponíveis comercialmente, como por exemplo, a Cervarix®, Gardasil® e Gardasil9® que são vacinas contra o HPV (Papilomavírus Humano), as vacinas Sci-B-Vac™ e GenHevac B®, para Hepatite B, a vacina Flublock® contra a influenza e mais recentemente, a primeira vacina licenciada para malária, a Mosquirix™ (MOHSEN et al., 2017). Além dessas vacinas, existem diversas vacinas de VLPs que estão sendo estudadas e estão em fase de ensaios clínicos (MOHSEN et al., 2017) (Figura 4).

Figura 4: Vacinas de plataformas de VLP.

Vacina	Empresa	Vírus	Sistema	Ano de aprovação	Referência
Recombivax HB®	Merck & Co.	Hepatite B	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1983	(Merck & Co., INC., 1983)
Engerix®	GlaxoSmithKline (GSK)	Hepatite B	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1998	(GSK, 2016)
Hecolin®	Xiamen Inovax Biotech	Hepatite E	<i>Escherichia coli</i>	2012	(Proffitti, 2012)
Gardasil®	Merck & Co	HPV	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2006	(Merck & Co., INC., 2006)
Cervarix®	GlaxoSmithKline (GSK)	HPV	Baculovirus recombinante	2007	(Alves,2011)
Gardasil9®	Merck & Co	HPV	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2014	(Merck & Co., INC., 2017)
FluBlock®	Protein Science Corporation	Influenza	Baculovirus recombinante	2014	(Protein Science Corporation, 2018)
Mosquirix™	GlaxoSmithKline (GSK)	Malária	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Piloto, 2019	(WHO, 2019)

As vacinas de VLPs têm sido produzidas em diferentes sistemas de expressão como, por exemplo, em bactérias, leveduras, plantas transgênicas, células de mamífero e células de inseto. O principal requisito para a formação de VLPs que efetivamente mimetizam o vírus selvagem é a montagem correta dos componentes virais na partícula para que esses reproduzam a conformação do envelope viral, no caso de vírus envelopados, e conseqüentemente a conformação correta das proteínas que estão sendo expostas. Para isso, é necessário que o sistema de expressão seja capaz de produzir estruturas complexas e que tenha a capacidade de gerar modificações pós-traducionais necessárias para o funcionamento correto das proteínas recombinantes. Além disso, é importante

que o sistema de expressão utilizado para produzir as partículas seja ao mesmo tempo seguro e capaz de produzir múltiplas proteínas, tanto em pequena escala, para efetuar testes laboratoriais, quanto em maior escala, para a produção de vacinas.

Dessa forma, houve um interesse considerável na utilização do sistema de expressão de baculovírus para a produção de vacinas de VLP pois ele é considerado uma tecnologia bem estabelecida para a produção de proteínas heterólogas pois abrange as necessidades mencionadas acima (METZ, PIJLMAN, 2011) (Figura 3). O licenciamento para comercialização pela FDA da vacina Cervarix® produzida pela GlaxoSmithKline contra o HPV e da vacina FluoBlock® produzida pela Protein Sciences contra a influenza, que são vacinas de VLPs produzida a partir do sistema de expressão de baculovírus para uso em seres humanos, ampliou o interesse no estudo deste sistema de expressão para a produção de VLPs de diferentes vírus, incluindo os arbovírus. A produção de uma vacina de VLPs utilizando o sistema de expressão de baculovírus requer um sistema que produza baculovírus recombinantes. Para isso, células eucarióticas infectadas com estes baculovírus recombinantes são capazes de produzir as VLPs contendo as proteínas de interesse do vírus em estudo.

2.9. Sistema de expressão de Baculovírus

Os baculovírus são vírus de DNA dupla fita, pertencentes a família *Baculoviridae*. Eles formam virions envelopados com um genoma de cerca de 80-180 kpb de DNA. Possuem formato de bastão com tamanho de 200-350 nm de comprimento. São vírus patogênicos aos artrópodes, especialmente a ordem dos lepidópteros (BONNING et al., 2005).

Os baculovírus apresentam duas distintas morfologias, o *budded virus* (BV) ou vírus brotados e o *occlusion derived virus* ou vírus derivados de oclusão (ODV) (ROHRMANN, 1992). Ambos contêm o mesmo genoma, mas diferem na morfogênese, composição dos envelopes e função dentro do ciclo de infecção viral. Os ODVs são estruturas revestidas por poliedrina, produzida pelo próprio vírus, formadas dentro do núcleo das células de inseto infectadas, sendo altamente resistentes. Quando estão no meio ambiente e são ingeridos por lagartas, o revestimento de poliedrina dos ODVs é degradado e o vírus é capaz de infectar as células do hospedeiro. Os nucleocapsídeos são direcionados ao núcleo celular, onde o DNA liberado inicia o processo de replicação. Após essa etapa, os DNAs gerados são então envoltos por novos nucleocapsídeos e são liberados da célula por

brotamento, levando parte da membrana plasmática celular como envelope viral. Esses baculovírus liberados por brotamento são os chamados BVs, que fazem novas infecções em outras células e produzem novos BVs e ODVs (ROHRMANN, 2013).

A necessidade do desenvolvimento de novos sistemas de expressão de proteínas heterólogas em células eucarióticas que fossem simples, rápidos e produzisse grandes quantidades de proteínas recombinantes levou ao desenvolvimento do sistema baseado em baculovírus recombinantes, o BEVS- *Baculovirus expression vector system*. Para isso foi desenvolvido um sistema rápido e eficiente baseado nos baculovírus *Autographa californica multinuclear polyhedrosis* (AcMNPV), utilizando as partículas de BVs sendo capaz de gerar baculovírus recombinantes (CICCARONE; POLAYES; LUCKOW, 1998). Este sistema é baseado no método desenvolvido por Luckow et al. (1993) e comercializado pela empresa Thermo Fisher Scientific, denominado de sistema Bac-to-Bac®. Neste sistema, inicialmente é realizada a inserção do gene de interesse em um plasmídeo “doador”, o pFastBac1™, flanqueado por um sítio de transposição-Tn7, que facilita a transposição do gene de interesse do pFastBac1 para o genoma do baculovírus AcMNPV (bacmídeo), além disso, há o gene de resistência à gentamicina e o sinal de poliadenilação do vírus SV40. O gene de interesse está sob a ação do promotor da poliedrina (pPolh) do baculovírus que é considerado um promotor forte para expressão de altos níveis da proteína heteróloga. Essa transferência do gene de interesse para o genoma do baculovírus é realizada utilizando a cepa de *Escherichia coli* DH10Bac™, a qual contém um genoma do baculovírus (bacmídeo) com um sítio alvo para o transposon Tn7 e também um plasmídeo auxiliar (*helper*), que proporciona as proteínas necessárias para que a transposição ocorra. Uma vez obtido o bacmídeo recombinante, é possível transfectá-lo em células de inseto para a produção dos baculovírus recombinantes e obtenção de um lote desses baculovírus para experimentos de infecção e expressão da proteína de interesse.

Atualmente, o sistema de expressão utilizando baculovírus tem sido um dos mais atrativos métodos de expressão de proteínas recombinantes, devido a sua capacidade de promover altos níveis de expressão quando comparados com outros sistemas. Isso se deve ao fato do vírus conseguir desligar a transcrição de genes precoces da célula hospedeira e alocar a transcrição celular para a expressão dos genes heterólogos (ROLDÃO et al., 2010). Esse sistema também traz como característica atrativa a sua facilidade de produção em larga escala (METZ; PIJLMAN, 2011) Outro ponto relevante é o fato da expressão ser em células eucarióticas, tendo assim, a capacidade

de expressar proteínas complexas, realizando modificações pós-traducionais como acetilação, glicosilação, fosforilação, entre outras (MILLER, 1993; ALTMANN et al., 1999; CHESHENKO et al., 2001), que resultam em um índice maior de similaridade com proteínas expressas em células de mamíferos, quando comparado com outros sistemas.

O laboratório de Biotecnologia Viral do Instituto Butantan possui expertise em expressão de proteínas heterólogas em cultivos de células de insetos e produção de VLPs de arbovírus. Devido a isso, o sistema de expressão de baculovírus recombinante foi escolhido em nosso laboratório, como o sistema para expressar as proteínas estruturais do ZIKV e produção das VLPs em células de inseto.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Este trabalho visa expressar as proteínas estruturais do ZIKV (C/prM/E) utilizando o sistema de expressão gênica derivado de baculovírus (BEVS), com a perspectiva de estabelecimento de produção de partículas semelhantes ao vírus Zika (VLPs-ZIKV).

3.2. Objetivos Específicos

- Construção do vetor pFast-E-ZIKV para obtenção dos bacmídeos recombinantes (Bac-E-ZIKV);
- Obtenção dos baculovírus recombinantes (BV-E-ZIKV) portando os genes estruturais do ZIKV através da transfecção dos Bac-E-ZIKV em células de inseto Sf9;
- Determinar as melhores condições de cultivo celular e infecção viral (tempo de coleta; MOI) para a produção das VLPs;
- Analisar a expressão das proteínas estruturais do ZIKV nas células de inseto infectadas com os BVs-E-ZIKV e a obtenção das VLPs;
- Caracterização das VLPs por Microscopia eletrônica de transmissão.

4. MATERIAL E MÉTODOS

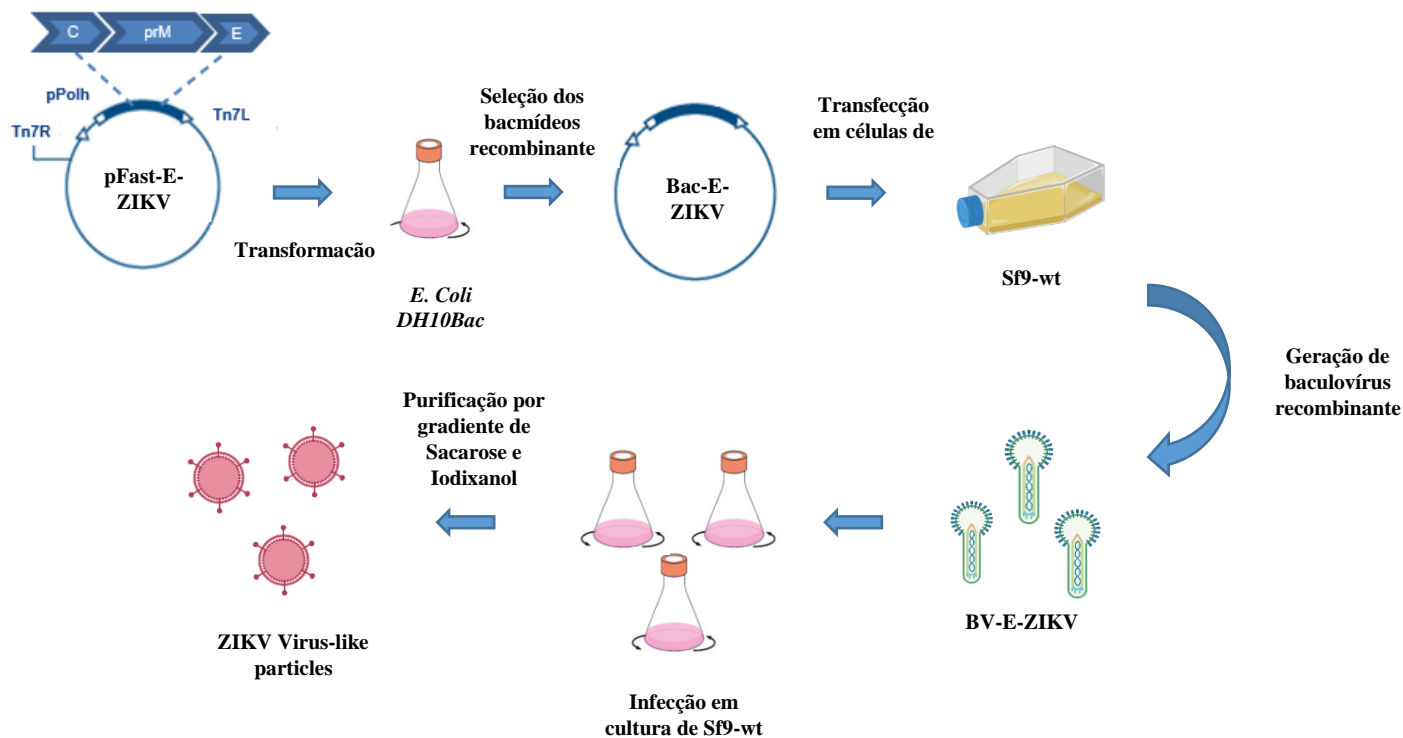
4.1. Linhagem celular, vírus e anticorpos

As células de inseto Sf9, um clone isolado da linhagem Sf21, derivada do tecido ovariano da lagarta *Spodoptera frugiperda*, foram utilizadas para a produção de baculovírus recombinantes através da transfecção do genoma bacmídeo recombinante gerado na cepa de bactérias DH10Bac™ (Invitrogen). A mesma linhagem foi utilizada nos ensaios de infecção com os baculovírus recombinantes, e avaliadas quanto à expressão das proteínas estruturais do ZIKV e geração das VLPs. Células Sf9-ET (*Easy Titration*) (HOPKINS; ESPOSITO, 2009) foram utilizadas para ensaios de titulação dos lotes virais de baculovírus recombinantes. As duas linhagens foram cultivadas em meio Sf-900 III™ (Gibco), em estufa a 28 °C. A cepa IEC do ZIKV foi obtida do Instituto Evandro Chagas (número de acesso do GenBank: KU365780.1) e foi usada para a extração do RNA genômico e como controle positivo na análise de expressão de proteína E do ZIKV. O ZIKV inativado (ZIKV-IN) usado como controle positivo foi preparado através da amplificação em células Vero (ATCC) com MOI: 0,1 e coletado 96 h pós-infecção. Após a purificação, o vírus foi inativado com o agente β-propiolactona que inativa o material genético viral e incubado em nitrogênio líquido até o uso. Os anticorpos utilizados nesse trabalho para detectar as VLPs e os baculovírus foram o anticorpo primário monoclonal 4G2 que reconhece um epítipo do loop de fusão da proteína E de flavivírus e anticorpo primário monoclonal gp64 que reconhece a proteína gp64 dos baculovírus, respectivamente.

4.2. Geração do Baculovírus recombinante (BV-E-ZIKV)

O processo de obtenção do baculovírus recombinante contendo as proteínas estruturais do ZIKV foi desenvolvido com base no esquema apresentado na Figura 5, utilizando o kit comercial Bac-to-Bac (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. Um esquema do plano de trabalho realizado encontra-se na figura abaixo:

Figura 5: Esquema de trabalho para produção das VLPs.



4.2.1. Obtenção do pFast-E-ZIKV

O vetor pFast-E-ZIKV foi construído a partir de um vetor comercial pFastBac1TM, (Invitrogen), e dos genes das proteínas estruturais do ZIKV, sequênciando essa sob o controle do promotor da poliedrina (pPolh) do baculovírus (Fig. 6).

Figura 6: Geração do baculovírus recombinante (BV-E-ZIKV) e obtenção das VLPs.

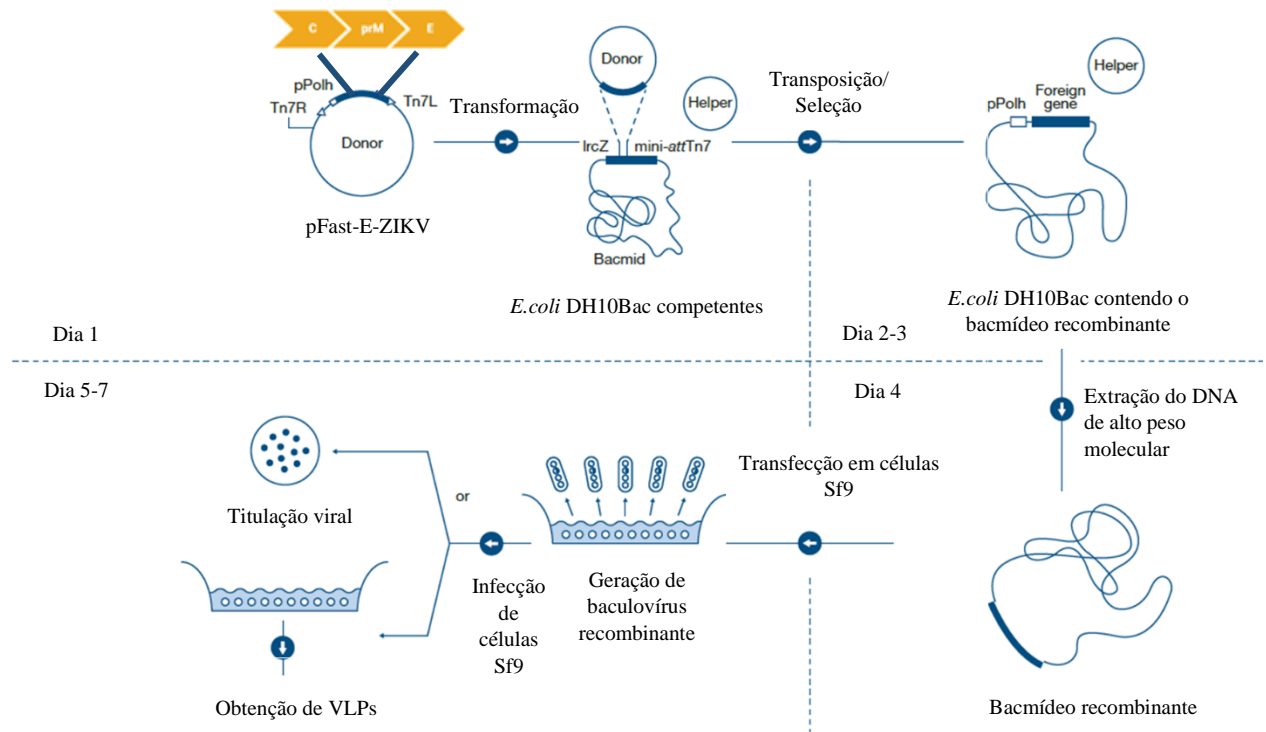


Imagem adaptada do sistema “Bac-to-Bac Baculovirus Expression System”, Invitrogen.

A sequência dos genes que codificam as proteínas estruturais do ZIKV (C/prM/E) foi obtida através da extração do material genético da cepa IEC do ZIKV (GenBank: KU365780.1) através do kit QIAmp Viral RNA (Qiagen) conforme instruções do fabricante e posterior RT-PCR do material para amplificar os genes de interesse (Fig. 7). Os oligonucleotídeos utilizados para amplificar o fragmento de interesse continham uma região específica tanto para a região flanqueadora do fragmento a ser obtido quanto para a região flanqueadora do local onde o mesmo foi inserido (Tabela 2). Foi realizada uma reação de PCR com o fragmento E-ZIKV e os oligonucleotídeos obtidos, utilizando 1 μ L do fragmento E-ZIKV, 0,6 μ L de cada primer (5 μ M), 6,25 μ L de “Phusion mix” (contido no kit), e H₂O para um volume final de 20 μ L. A reação foi realizada no termociclador PTC-200 (MJ Research) com o seguinte ciclo de amplificação: 98°C/30s, (98°C/10s, 55°C/30s, 72°C/4 min) x 5, 98°C/30s, (98°C/10s, 58°C/30s, 72°C/1 min) x 30, 72°C /10 min.

Figura 7: Sequência do fragmento E-ZIKV.

```
5' ATGAAAAACCCCAAAAAAGAAATCCGGAGGATTCCGGATTGTCAATATGCTAAAACGCGGAGTAGCCCGT
GTGAGCCCCTTTGGGGGCTTGAAGAGGCTGCCAGCCGGACTTCTGCTGGGTCATGGGCCCATCAGGATGGTCTTGGCA
ATTCTAGCCTTTTGGAGATTCACGGCAATCAAGCCATCACTGGGTCTCATCAATAGATGGGGTTCAGTGGGGAAAAA
GAGGCTATGGAAATAATAAAGAAGTTCAAGAAAGATCTGGCTGCCATGCTGAGAATAATCAATGCTAGGAAGGAGAAG
AAGAGACGGGGCGCAGATACTAGTGTCTGGAATTGTTGGCCTCCTGCTGACCACAGCTATGGCAGCGGAGGTCCTAGA
CGTGGGAGTGCATACTATATGTACTTGGACAGAAACGATGCTGGGGAGGCCATATCTTTTCCAACCACATTGGGGATG
AATAAGTGTATATACAGATCATGGATCTTGGACACATGTGTGATGCCACCATGAGCTATGAATGCCCTATGCTGGAT
GAGGGGGTGAACCAGATGACGTGCGATTGTTGGTGAACACGACGTCAACTTGGGTGTGTACGGAAACCTGCCATCAC
AAAAAGGTGAAGCACGGAGATCTAGAAGAGCTGTGACGCTCCCCTCCATTCCACTAGGAAGCTGCAAACGCGGTG
CAAACCTGGTTGGAATCAAGAGAATACACAAAGCACTTGATTAGAGTCGAAAATTGGATATTCAGGAACCCTGGCTTC
GCGTTAGCAGCAGCTGCCATCGCTTGGCTTTTGGGAAGCTCAACGAGCCAAAAAGTCATATACTTGGTCATGATACTG
CTGATTGCCCCGGCATAACAGCATCAGGTGCATAGGAGTCAGCAATAGGGACTTTGTGGAAGGTATGTCAGGTGGGACT
TGGGTTGATATTGTCTTGGAACATGGAGGTTGTGTCACCGTAATGGCACAGGACAAACCGACTGTGCGACATAGAGCTG
GTTACAACAACAGTCAGCAACATGGCGGAGGTAAGATCCTACTGCTATGAGGCATCAATATCAGACATGGCTTCGGAC
AGCCGCTGCCAACACAAGGTGAAGCCTACCTTGACAAGCAATCAGACACTCAATATGTCTGCAAAAAGAACGTTAGTG
GACAGAGGCTGGGGAAATGGATGTGGACTTTTTGGCAAAGGGAGTCTGGTGACATGCGCTAAGTTTTGCATGCTCCAAG
AAAATGACCGGGAAGAGCATCCAGCCAGAGAATCTGGAGTACCGGATAATGCTGTGAGTTCATGGCTCCCAGCACAGT
GGGATGATCGTTAATGACACAGGACATGAAACTGATGAGAATAGAGCGAAGGTTGAGATAACGCCCAATTCACCAAGA
GCCGAAGCCACCCTGGGGGGTTTTGGAAGCCTAGGACTTGATTGTGAACCGAGGACAGGCCTTGACTTTTCAGATTTG
TATTACTTGACTATGAATAACAAGCACTGGTTGGTTCACAAGGAGTGGTTCACGACATTCCATTACCTTGGCACGCT
GGGCAGACACCGGAACACTCCACACTGGAACAACAAGAAGCACTGGTAGAGTTCAAGGACGCACATGCCAAAAGGCAA
ACTGTGCTGGTTCTAGGGAGTCAAGAAGGAGCAGTTCACACGGCCCTTGCTGGAGCTCTGGAGGCTGAGATGGATGGT
GCAAAGGGAAGGCTGTCTCTGGCCACTTGAAATGTGCGCTGAAAATGGATAAACTTAGATTGAAGGGCGTGTGATAC
TCCTTGTGTACCGCAGCGTTCACATTCACCAAGATCCCGGCTGAAACACTGCACGGGACAGTCACAGTGGAGGTACAG
TACGCAGGGACAGATGGACCTTGAAGGTTCCAGCTCAGATGGCGGTGGACATGCAAACCTTGACCCCAAGTTGGGAGG
TTGATAACCGCTAACCCCGTAATCACTGAAAGCACTGAGAACTTAAGATGATGCTGGAACCTTGATCCACCATTTGGG
GACTCTTACATTGTGATAGGAGTCGGGGAGAAGAAGATCACCCACCCTGGCACAGGAGTGGCAGCACCATTGGAAAA
GCATTTGAAGCCACTGTGAGAGGTGCCAAGAGAATGGCAGTCTTGGGAGACACAGCCTGGGACTTTGGATCAGTTGGA
GGCGCTCTCAACTCATTGGGCAAGGGCATCCATCAAATTTTTGGAGCAGCTTTCAAATCATTGTTTGGAGGAATGTCC
TGTTTCTCACAATTTCTCATTGGAACGTTGCTGATGTGGTTGGGTCTGAACACAAAGAATGGATCTATTTCCCTTATG
TGCTTGGCCTTAGGGGGAGTGTGATCTTCTTATCCACAGCCGCTCTGCT3'
```

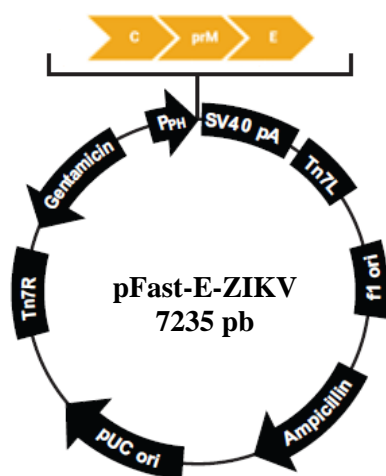
A sequência corresponde aos genes que codificam as proteínas estruturais do ZIKV: proteína C (azul claro); proteína prM (azul escuro) e proteína E (cinza) e possui um códon de iniciação (ATG, em vermelho).

O vetor pFastBac1 foi digerido com a enzima de restrição *SpeI*, presente no sítio de clonagem, para sua linearização, sendo incubado a 37°C por 2h. Foi feito um gel de agarose 0,8% para confirmar a obtenção do vetor digerido e do fragmento E-ZIKV obtido pela PCR. Tanto o fragmento de interesse E-ZIKV quanto o vetor pFastBac1 foram purificados do gel de agarose utilizando o kit Wizard SV gel and PCR clean-up system (Promega). A sequência E-ZIKV foi clonada no vetor pFastBac1 utilizando o kit In-Fusion® (Takara) conforme instruções do fabricante, onde ocorre uma recombinação homóloga entre a sequência do fragmento de interesse com a sequência homóloga no vetor. A clonagem foi realizada seguindo o protocolo do kit In-

Fusion®, onde um procedimento de ligação foi realizado na proporção 1:3 (vetor: inserto), utilizando 2 µL do tampão *In fusion* 5x (contido no kit), 2,5 µL do vetor, 2,2 µL do inserto, e água para um volume final de 20 µL, sendo incubados a 50°C por 15 minutos. Após esse período, a reação foi colocada em gelo por 5 minutos e transformada em bactéria Stellar™ (Takara) na proporção 3:30 (ligação:bactéria) através de choque térmico (gelo/30 min, 42°C/1 min, gelo/2 min). Após a transformação, foram adicionados 100 µL de meio S.O.C. (2% triptona, 0,5% extrato de levedura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10mM MgSO₄ e 20 mM glicose) e a reação foi incubada a 37°C por 1 hora, sendo posteriormente adicionada em placas LB contendo ampicilina (10 mg/mL) e incubada a 37°C por 24 h.

As colônias crescidas em placa após a ligação foram cultivadas em meio líquido (LB) e então submetidas a um procedimento de Maxiprep (Qiagen), conforme instruções do fabricante. Os plasmídeos obtidos foram então digeridos com as seguintes enzimas de restrição: *ScaI*, *SalI*, *DraI* e *BglI* para confirmar a inserção do inserto E-ZIKV e obtenção do vetor pFast-E-ZIKV, com base nos padrões de digestão que foram avaliados em eletroforese em gel de agarose 0,8%. Os plasmídeos foram sequenciados para confirmar a inserção da sequência E-ZIKV (Fig. 8).

Figura 8: Mapa do vetor pFast-E-ZIKV



E-ZIKV: Genes das proteínas estruturais do ZIKV
Ampicilina: Gene de resistência a ampicilina
Gentamicina: Gene de resistência a gentamicina
Tn7R/Tn7L: Sequências para transposição
SV40: Sinal de poliadenilação
PpH: Promotor da poliedrina
pUC ori: Origem de replicação
f1 ori: Origem de replicação

4.2.2. Obtenção do Bacmideo recombinante (Bac-E-ZIKV)

Uma vez obtido o vetor pFast-E-ZIKV, este foi transformado na cepa de *E. coli* DH10Bac™ do sistema comercial Bac-to-Bac (Invitrogen), através de choque térmico, conforme instruções do fabricante, sendo as bactérias transformadas semeadas em placa de LB ágar contendo os antibióticos tetraciclina (10 µg/mL), gentamicina (7 µg/mL) e canamicina (50 µg/mL), mais os reagentes Bluo-Gal (100µg/mL) e IPTG (40 µg/mL) e incubadas a 37°C por 48 h. Após esse período, foram visualizadas colônias brancas e colônias azuis, das quais as brancas correspondem aquelas em que ocorreu a transposição, onde o fragmento de interesse foi inserido na região correspondente ao gene LacZ, que codifica a enzima b-galactosidase no bacmídeo. Algumas colônias brancas foram então escolhidas para ser feito um pré-inoculo em meio LB líquido para multiplicação das colônias, posterior extração do Bac-E-ZIKV e confirmação da transposição. O bacmídeo foi extraído utilizando o kit Maxiprep (QIAGEN), conforme instruções do fabricante.

Um protocolo de PCR convencional foi realizado para confirmar a inserção do fragmento de interesse no bacmídeo conforme descrito nas instruções do kit. Para tanto, existem oligonucleotídeos já estabelecidos (Tabela 2) pelo kit Bac-to-Bac que flanqueiam a região de transposição para que seja feita a confirmação, com base na diferença de tamanho do fragmento amplificado. Foram adicionados 5 µL de amostra, para 1,25 µL de cada oligonucleotídeo (pUCM13 F / pUCM13 R, 10 µM), 1 µL de MgCl₂ (50 mM), 1 µL dNTP (10 mM), 5 µL de Buffer 10X, 0,5 µL de enzima Taq Polimerase (1 U) e água para um volume final de 50 µL. A reação foi realizada no termociclador PTC-200 (MJ Research) com o seguinte ciclo de amplificação: 93°C/ 3 min, (94°C/ 45s, 55°C/ 45s, 72°C/ 5:30 min) x 35 e 72°C/10 min. Os fragmentos amplificados foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 0,8 %, contendo 0,5 µg/mL de Gel Red (Biotium), com revelação no fotodocumentador Uvitec Cambridge sob luz ultravioleta e análise com aplicativo Alliance (Uvitec Cambridge).

Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados no experimento de obtenção do Bac-E-ZIKV.

Nome	Sequência	T _m (°C)	% GC
pUC/M13F	CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG	52	52
pUC/M13R	AGCGGATAACAATTCACACAGG	48	43
E-ZIKV F	ACGTCGACGAGCTCAAGTATCAACAGGTTTTATTTGG	68.8	55.2
E-ZIKV R	AGCGGCCGCGACTAGTCTTTGAGAAGTCCACCGAG	76.9	59.2

4.2.3. Transfecção em células Sf9

O procedimento de transfecção do bacmídeo recombinante foi realizado em células Sf9 em placas de cultivo celular de seis poços, com 1×10^6 células/poço em um volume de 2 mL de meio Sf-900IIITM (Gibco). Simultaneamente foi feita uma mistura com o agente de transfecção Cellfectin II (Thermo Fisher Scientific) onde foram adicionados 9 μ L do agente em 100 μ L do meio Sf-900III. Também foi feita uma diluição de 2 μ g do bacmídeo em 100 μ L do meio Sf-900III. As duas soluções foram misturadas e incubadas durante 30 min a temperatura ambiente. Após a adesão das células ao poço foi adicionada a solução de transfecção sobre as células e as mesmas foram incubadas por 4h a 28°C. Após esse tempo, foi realizada a troca do meio, adicionando-se 2 mL de Sf-900III novo, e a placa foi incubada a 28 °C. As células foram coletadas 96 h pós-transfecção, foram centrifugadas a 500 g por 5 min e o sobrenadante foi coletado e filtrado em filtro 0,45 μ m e passado para um novo tubo para obtenção do lote 1 (L1) dos baculovírus recombinantes (BV-E-ZIKV).

4.2.4. Titulação viral em células Sf9-ET

Para determinar o título viral e, conseqüentemente, a quantidade de vírus a ser utilizada nos ensaios de infecção, utilizamos células Sf9-ET (*Easy titration*) (HOPKINS; ESPOSITO, 2009), que apresentam fluorescência somente quando infectadas com baculovírus uma vez que as mesmas

possuem o gene da proteína verde fluorescente (GFP) sob a ação do promotor da poliedrina do baculovírus.

A titulação foi realizada em placas de 96 poços, com 8×10^4 células por poço, em um volume de trabalho de 180 μ L. Foi feita uma diluição seriada da suspensão viral de 10^{-1} a 10^{-8} sendo utilizadas as diluições de 10^{-1} a 10^{-8} em octoplicatas. A placa foi incubada a 28°C e analisada após 72h em microscópio de fluorescência para verificar a formação de “focis”, que consiste em um grupo de células que apresentam fluorescência. O cálculo para estabelecer o título viral foi feito com base na TCID₅₀, calculado baseado em Reed & Muench, 1938, que foi utilizado para estimar a quantidade de unidades formadoras de placa por mL (pfu/mL).

4.2.5. Ensaio de amplificação do lote viral BV-E-ZIKV

Os ensaios de infecções para amplificação dos lotes de BV-E-ZIKV foram realizados nas linhagens Sf9, sendo utilizadas 1×10^6 células/mL em garrafas de cultura celular T75 com volume total de 10 mL. As células foram inoculadas com uma multiplicidade de infecção (MOI) 0,1 do L1 e foram mantidas sob agitação durante uma hora e incubadas na estufa a 28°C. A coleta dos BVs-E-ZIKV foi realizada 96 h.p.i., após a observação dos efeitos citopáticos. Após a coleta, as células foram centrifugadas a 500 g por 5 min, o sobrenadante foi coletado e filtrado em filtro 0,45 μ m e passado para um tubo novo. O lote 2 (L2) obtido foi titulado para determinar o volume necessário para infectar as células com MOI 0,1 para a obtenção do L3. O mesmo procedimento de infecção foi feito com o L2 para obtenção do lote 3 (L3) do BV-E-ZIKV que foram utilizados nos ensaios de infecção para obtenção das VLPs.

4.3. Obtenção das VLPs-ZIKV

4.3.1. Ensaio de infecção com BV-E-ZIKV em placa

Primeiramente foram realizados ensaios de infecção em menor escala, em placas de 6 poços para avaliar a expressão das proteínas E-ZIKV utilizando o L3 do BV-E-ZIKV produzido e assim

determinar as melhores condições de infecção para a obtenção das VLPs. Os ensaios de infecção em placa foram realizados nas linhagens Sf9, sendo utilizadas 1×10^6 células / poço em placas de 6 poços com volume total de 2 mL de meio Sf-900IIITM. Inicialmente, ensaios de infecção foram realizados variando o MOI (0,5; 1; 2 e 5) do lote L3. As placas foram mantidas sob agitação durante uma hora e incubadas na estufa a 28°C. As células foram coletadas 72 h.p.i. para posterior análise. Após este ensaio foi avaliado diferentes tempos de coleta (TOH - *time of harvest*) de 24h, 48h, 72h, 96h, 120h e 144h para análise de expressão das proteínas no sobrenadante. Para isso, o mesmo experimento em placa foi realizado com o melhor MOI escolhido no experimento anterior. As células foram coletadas nos diferentes tempos de coleta, foram centrifugadas a 1.008 g por 3 min e o sobrenadante foi coletado para posterior análise. As análises do MOI foram feitas por imunofluorescência indireta (IFI) e a análise do melhor tempo de coleta foi feita por *dot blot*. A confirmação da expressão da proteína E-ZIKV foi feita por *western blot*.

4.3.2. Análise da expressão das proteínas E-ZIKV

4.3.2.1. Ensaio de Imunofluorescência Indireta (IFI)

O ensaio de imunofluorescência indireta foi feito com as células Sf9 infectadas com o L3 do BV-E-ZIKV coletadas do ensaio de infecção em placa, sendo avaliado o tempo de 72h pós-infecção. O procedimento foi feito através da adesão das células (5×10^4 cel/poço) à lâmina a temperatura ambiente por 30 min, retirada do sobrenadante, fixação da amostra na lâmina com 10 µL de metanol-acetona (1:1) e incubação a 4°C por 10 min. Após esta incubação foi feita a lavagem da lâmina com PBS 1X (0,1M NaCl, 0,002M KCl, 0,01M NaHPO e 0,001M KH₂PO₄) e uma nova incubação (1h/4°C) com 10 µL do anticorpo primário monoclonal 4G2 (anti-E-flavivírus) na diluição 1:100. Após novo procedimento de lavagem com PBS 1X, foi adicionado o anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com fluoresceína (FITC), diluído 1:500 em solução de azul de Evans 0,02% e PBS 1X e incubadas por 1h a 4°C. Um novo ciclo de lavagem foi realizado e as amostras foram observadas e fotografadas em imagem digital em microscópio de fluorescência (BX51, Olympus).

4.3.2.2. Ensaio de *Dot Blot*

Para o ensaio de *dot blot* as amostras do sobrenadante do ensaio de infecção em placa foram submetidas a um processo de lise utilizando a proporção 1:10 (tampão:amostra) do tampão RIPA não redutor (NaCl 150 mM, IGEPAL1 %, deoxicolato de sódio 0,5%, Tris 50 mM, pH 8.0) e foram incubadas durante 30 min a 4°C. Após esse processo, 50 µL das amostras foram aplicados na membrana de nitrocelulose Amersham Hybond – ECL de 0,45 µm (GE Healthcare, Piscataway, NJ, U.S.A.) contida no aparato Bio-dot (Biorad).

Após a aplicação das amostras e utilização do vácuo no aparelho Bio-dot, a membrana foi retirada do aparato e foi então incubada em solução de bloqueio (leite em pó desnatado 3% em PBS 1X) por 1 hora. A membrana foi então lavada 3x por 10 min com PBS 1X, e posteriormente foi adicionado o anticorpo primário monoclonal 4G2 (anti-E-flavivírus) (1:100), sendo incubado por 1h30min sob agitação. Após esse período, outro procedimento de lavagem 3x por 10 min com PBS 1x foi realizado e em seguida, adicionou-se o anticorpo secundário anti-camundongo, diluído 1:2000, sendo novamente incubado por 1h sob agitação. O mesmo procedimento de lavagem já descrito foi realizado novamente. A membrana foi revelada com o reagente ECL Select, da empresa GE HealthCare, no fotodocumentador Uvitec Cambridge, com análise no aplicativo Alliance (Uvitec Cambridge).

4.3.2.3. Ensaio de *Western Blot*

Para o ensaio de *western blot* foi montado um gel de poliacrilamida 12,5%. As amostras do sobrenadante do ensaio de infecção em placa foram submetidas a um processo de lise utilizando a proporção 1:10 (tampão:amostra) do tampão RIPA não redutor (NaCl 150 mM, IGEPAL1 %, deoxicolato de sódio 0,5%, Tris 50 mM, pH 8.0) e foram incubadas durante 30 min a 4°C. Após esse processo, foram utilizados 30 µL do sobrenadante juntamente com 5 µL de Loading buffer 6X sendo posteriormente aplicadas em seus respectivos géis. A corrida do gel foi realizada a 100V, por 2,5 h. Após a corrida, o gel foi colocado em um aparato específico para realizar a transferência úmida para membrana de nitrocelulose Amersham Hybond – ECL de 0,45 µm (GE Healthcare), a 100 V por 1 hora. Após a transferência, a membrana foi transferida para a solução de bloqueio

(leite em pó desnatado 3% em PBS 1x), e incubada por 1 hora com agitação. A membrana foi lavada 3x por 10 minutos com PBS 1X. Logo após, foi adicionado o anticorpo primário monoclonal 4G2, diluído 1:100 sendo incubado *overnight* a 4°C. Após esse período, três novos procedimentos de lavagem com PBS 1X foram realizados, e em seguida adicionou-se o anticorpo secundário anti-camundongo diluído 1:2000, sendo novamente incubado por 1h sob agitação. O mesmo procedimento de lavagem já descrito foi realizado novamente. A membrana foi revelada com o reagente ECL Select, da empresa GE HealthCare, no fotodocumentador Uvitec Cambridge, com análise no aplicativo Alliance (Uvitec Cambridge).

4.3.3. Ensaio de infecção com BV-E-ZIKV em frascos agitados

A partir dos resultados obtidos pelo ensaio de infecção em placa, foram realizados os ensaios de infecção em frascos agitado para a obtenção das VLPs. Estes foram realizados nas linhagens Sf9, sendo utilizadas 1×10^6 células/mL com volume total de 20 mL em frascos agitados de cultura celular de 100 mL. Foram utilizados 3 frascos no total para padronizar os protocolos de purificação e caracterização das VLPs. As células foram infectadas com o lote L3 do BV-E-ZIKV com o melhor MOI estabelecido no ensaio de infecção em placa. Os frascos foram incubados em agitador orbital a 28°C com agitação de 80 rpm durante uma hora e após esse período foi mantido a 100 rpm até o período da coleta. A coleta foi realizada no tempo de 96h pós-infecção com base nos resultados obtidos dos ensaios anteriores. O sobrenadante do cultivo celular infectado foi utilizado para os procedimentos de concentração, purificação e detecção das VLPs produzidas. Os mesmos processos foram realizados com as células Sf9 não infectadas para serem utilizadas como controle negativo nos experimentos.

4.3.4. Concentração e purificação das VLPs-ZIKV

As células do ensaio de infecção em suspensão foram coletadas 96 h.p.i. e centrifugadas a $1.300 \times g$ por 15 min para a clarificação da amostra e o sobrenadante foi recuperado e filtrado em filtro 0,45 μm . Um procedimento de ultracentrifugação foi realizado para concentrar as VLPs geradas. Para isso, todo o volume do clarificado foi ultracentrifugado a $150.000 g$ por 1:30h a 4°C,

utilizando o rotor MLA-50 da ultracentrífuga Optima MAX-XP (Beckman Coulter). Após a ultracentrifugação o sobrenadante foi descartado e o pellet gerado foi ressuspensionado em um volume de 500 µL de PBS 1X e mantido *overnight* até o pellet ser totalmente dissolvido. O pellet gerado foi submetido aos procedimentos de purificação das VLPs.

4.3.4.1. Gradiente de Sacarose

Para purificar as VLPs produzidas no ensaio de infecção em suspensão dos BVs-E-ZIKV foi utilizada uma técnica de purificação de colchão e gradiente de sacarose. Para isso, utilizamos inicialmente um colchão de sacarose, com solução de sacarose de 20%, onde para cada tubo de ultracentrífuga de 5 mL utilizamos 4,5 mL da solução de sacarose 20%, e adicionamos os 500 µL da amostra ressuspensionada em PBS sobre o colchão. Foi feita uma ultracentrifugação a 150.000 g por 3 horas no rotor MLS-50 da ultracentrífuga Optima MAX-XP (Beckman Coulter). O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em um volume de 500 µL de PBS 1X e mantido *overnight* até o pellet ser totalmente dissolvido.

O gradiente de sacarose foi montado nos tubos de ultracentrifugação de 5 mL contendo 1,5 mL de cada concentração das soluções de sacarose sendo elas 20%, 30% e 40%. Aplicou-se cada solução gota a gota, da mais para a menos concentrada para a formação do gradiente e os 500 µL da amostra ressuspensionada em PBS foi adicionado também gota a gota sobre a última concentração de solução de sacarose adicionada. Foi feita uma ultracentrifugação de 150.000 g por 3 horas no rotor MLS-50 para formar o gradiente de sacarose. Após isso foram coletadas 9 frações de 500 µL do gradiente formado dos tubos para posterior análise da produção das VLPs e dos BVs-E-ZIKV pelas técnicas de *dot blot* e *western blot* (seguindo mesmo protocolo conforme já descrito nos itens 4.3.2.2 e 4.3.2.3) e para a análise da caracterização das VLPs-ZIKV pelas técnicas de Microscopia Eletrônica de Transmissão.

4.3.4.2. Gradiente de Iodixanol (OptiPrep™)

Alternativamente, foi utilizado o gradiente de Iodixanol-OptiPrep™ (Sigma-Aldrich) para a purificação das VLPs produzidas dos BVs-E-ZIKV. Primeiramente, foi feito um colchão de sacarose 20%, repetindo o mesmo procedimento de ultracentrifugação descrito anteriormente. Após a ultracentrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuscitado em um volume de 500 µL de PBS 1x *overnight* até o pellet ser totalmente dissolvido. O gradiente foi feito em tubos de 5 mL com soluções de 10% e 30% da solução de iodixanol, sendo utilizado 2,25 mL de cada concentração. As concentrações foram aplicadas gota a gota, dá mais para a menos concentrada para a formação do gradiente e os 500 µL da amostra ressuscitada em PBS foi aplicada sobre a última solução adicionada também gota a gota. Foi feita uma ultracentrifugação a 150.000 g por 3 horas a 4°C no rotor MLS-50 para a formação do gradiente. Após isso foram coletadas 9 frações de 500µL do gradiente para posterior análise da produção das VLPs e dos BVs-E-ZIKV por pelas técnicas de *dot blot* e *western blot* (seguindo mesmo protocolo conforme já descrito nos itens 4.3.2.2 e 4.3.2.3) e análise da caracterização das VLPs-ZIKV pela técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão.

4.3.5. Caracterização das VLPs-ZIKV por Microscopia Eletrônica de Transmissão

As frações referentes ao halo formado nos dois gradientes foram analisadas através de microscopia eletrônica de transmissão (MET) para evidenciar a obtenção das VLPs. Para o ensaio de contrastação negativa, 10 µL das amostras foram aplicados em grades de cobre de 300 mesh revestidas com carbono e deixadas a adsorver por 10 min e o excesso removido com papel filtro. Esse processo foi repetido 3 vezes. Em seguida, 5 µL de solução de acetato de uranila 2% foram aplicados sobre a amostra por 1 min e o excesso removido. As grades foram analisadas em um microscópio eletrônico do tipo Leo 906 E (Zeiss).

Para a técnica de microscopia imunoelétrica (MIE), 10 µL das amostras foram aplicados em grades de níquel de 400 mesh pré-revestidas com carbono e parlódio 2% e incubadas por 10 min em temperatura ambiente. Esse procedimento foi repetido 3x. As grades foram incubadas com o anticorpo 4G2 diluído em PBS 1X contendo 0,01% de Tween 20 e 0,5% de BSA por 2h em

câmara úmida a temperatura ambiente. As grades foram então lavadas 4x com PBS 1X contendo 1% BSA e incubadas com o anticorpo secundário conjugado com partículas de ouro coloidal de 10 nm (Alexa Fluor 488, Invitrogen) diluído em PBS 1X contendo 0,01% de Tween 20 e 1,5% de BSA por 1h em câmara úmida a temperatura ambiente. As grades foram lavadas 1x com PBS 1X e 3x em solução salina a 0,85% por 10 min cada. As amostras foram então contrastadas negativamente com solução de acetato de uranila a 2% por 1 min e foram examinadas no microscópio eletrônico de transmissão como descrito acima.

Para analisar a produção de VLPs dentro das células Sf9 infectadas com os BVs-E-ZIKV, foi realizada a técnica de citoquímica ultraestrutural. Para isso, as células infectadas foram coletadas com 72 h.p.i do ensaio em suspensão, foram centrifugadas a 500 g por 5 min e o pellet resultante foi fixado com glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2% em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2 sendo incubados a 4°C por 24h. Os pellets foram lavados 3x com cacodilato de sódio 0,1M por 15 min cada e pós-fixados com tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,1 M por 1h a temperatura ambiente. Os pellets foram novamente lavados por 3x com solução cacodilato de sódio 1M por 15 min cada. As células foram desidratadas em uma série graduada de etanol seguindo o ciclo: 2x álcool etílico 70%/10min; 2x álcool etílico 95%/15 min; 3x álcool etílico absoluto/20 min; 1x óxido de propileno + álcool etílico absoluto (1:1) /15 min; 2x óxido de propileno/15 min; 1x óxido de propileno + resina /2h. A amostra foi pré-embebida em resina pura do tipo Embed 812 (EMS, Hatfield, PA) e incubadas *overnight* a temperatura ambiente. Todas as etapas foram feitas sob agitação. O material foi processado na câmara de vácuo e foi incubado a 60°C por 48h. Foram realizados cortes ultrafinos nos blocos e os mesmos foram montados em grades metálicas de cobre de 300 mesh pré-revestidas com parlódio 2% e carbono. As amostras foram contrastadas com acetato de uranila a 2% e citrato de chumbo alcalino. As grades foram examinadas no microscópio eletrônico de transmissão. Esses processos foram feitos em colaboração com a Dra. Marta Maria Antoniazzi, no Laboratório de Biologia Celular, do Instituto Butantan.

5. RESULTADOS

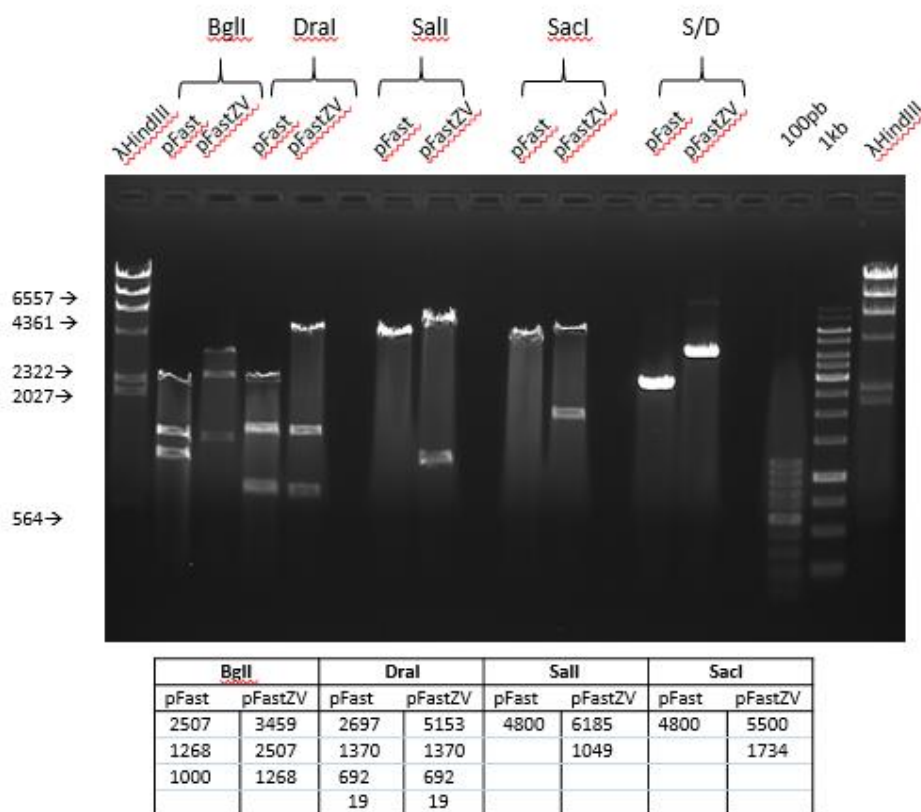
5.1. Obtenção do baculovírus recombinante (BV-E-ZIKV)

A construção do vetor pFast-E-ZIKV necessário para obtenção dos BVs-E-ZIKV foi realizada conforme instruções do kit Bac-to-Bac (Invitrogen). O plasmídeo foi obtido a partir da clonagem da sequência dos genes das proteínas estruturais do ZIKV (E-ZIKV) no vetor comercial pFastBac1™, o qual foi utilizado para obter o bacmídeo e os baculovírus recombinantes.

5.1.1. Obtenção do pFast-E-ZIKV

Após a clonagem do fragmento da sequência de interesse E-ZIKV no plasmídeo pFast-Bac1™ e sua extração das cepas de bactéria Stellar™, foi feita a confirmação da obtenção do vetor pFast-E-ZIKV através da análise do padrão de digestão a partir do uso de enzimas de restrição. A figura 5 mostra um gel de agarose 0,8% após a digestão do pFast-E-ZIKV, com as enzimas de restrição *BglI*, *DraI*, *Sall* e *SacI* com seus respectivos padrões de banda esperados. Os padrões de banda apresentados entre os vetores com e sem o fragmento de interesse evidenciam a incorporação do fragmento E-ZIKV no vetor pFastBac™ gerando o vetor pFast-E-ZIKV. Também foi possível confirmar a inserção da sequência E-ZIKV no vetor através do sequenciamento.

Figura 9: Confirmação da obtenção do vetor pFast-E-ZIKV a partir da digestão com enzimas de restrição e análise em gel de agarose 0,8%.

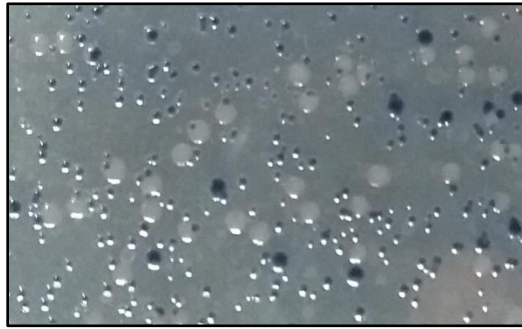


Marcador λ HindIII - valores em pares de bases (pb); pFast- vetor pFastBac sem inserção do inserto usado como controle; pFastZV- vetor pFast-E-ZIKV; S/D- sem digerir; 100 pb marcador de 100 pb; 1kb- marcador de 1kb.

5.1.2. Obtenção do Bacmídeo recombinante (Bac-E-ZIKV)

Após a transformação do pFast-E-ZIKV em bactérias *Escherichia coli* DH10Bac™, as mesmas foram plaqueadas em meio LB ágar contendo os antibióticos tetraciclina (10 µg/mL), gentamicina (7 µg/mL) e canamicina (50 µg/mL) e incubadas a 37°C por 48h. A Figura 6 mostra como ficam as colônias após esse período, sendo que as colônias de coloração branca correspondem àquelas em que ocorreu a transposição do fragmento de interesse no bacmídeo. Sendo assim, as colônias brancas foram escolhidas para ser feito um pré-inoculo em meio LB líquido contendo os mesmos antibióticos mencionados acima para multiplicação e extração do Bac-E-ZIKV e confirmação da transposição.

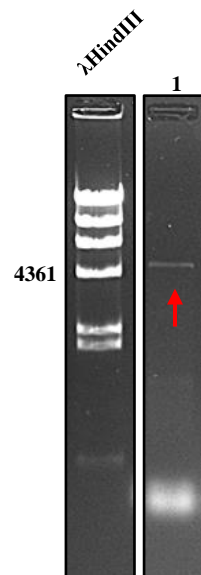
Figura 10: Análise da transposição do vetor pFast-E-ZIKV nos clones de DH10Bac.



DH10Bac transformada com pFast-E-ZIKV em placa de LB ágar com tetraciclina (10 µg / mL), gentamicina (7 µg / mL), canamicina (50 µg / mL), Blu-Gal (100 µg / mL) e IPTG (40 µg / mL), incubadas a 37° C por 48h.

A confirmação do Bac-E-ZIKV foi feita através de uma PCR convencional, utilizando os pares de oligonucleotídeos indicados no kit Bac-to-Bac (Tabela 2), que são específicos para regiões do bacmídeo que flanqueiam a região que foi transposta. O fragmento esperado no tamanho de 4760 pb, que corresponde ao tamanho do fragmento E-ZIKV (2460 pb) juntamente com uma parte do bacmídeo transposta com o vetor pFastBac1 amplificada (2300 pb), pode ser observado através de eletroforese no gel de agarose 0,8% (Figura 6).

Figura 11: Confirmação da obtenção do Bac-E-ZIKV através de PCR e análise em gel de agarose 0,8%.

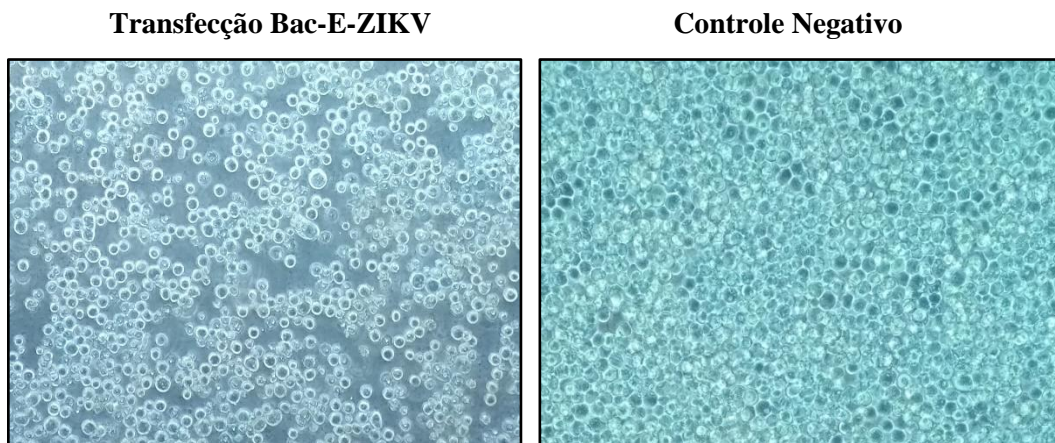


Marcador λ HindIII - valores em pares de base (pb); 1: colônia DH10Bac branca transformada com pFast-E-ZIKV. Seta em vermelho indica o fragmento amplificado.

5.1.3. Transfecção em células Sf9

Uma vez obtido o bacmídeo recombinante, o mesmo foi utilizado para a transfecção em células de inseto Sf9 para a obtenção dos BVs-E-ZIKV. O procedimento de transfecção do Bac-E-ZIKV foi realizado em células Sf9 com coleta dos BVs-E-ZIKV 96 h pós-transfecção. Os baculovírus coletados nessa primeira etapa foram denominados de lote viral L1. Após a titulação do L1, o mesmo foi utilizado para a obtenção do L2 e L3 conforme descrito no Material e Métodos. As imagens de microscopia óptica foram obtidas para analisar os efeitos citopáticos típicos do processo de infecção no período de 96h (Figura 7).

Figura 12: Imagens de microscopia óptica de células Sf9 transfectadas com Bac-E-ZIKV.



Células Sf9 transfectadas com o Bac-E-ZIKV com o agente de transfecção Cellfectin II analisadas no tempo de 96 h pós-transfecção em microscópio óptico, com objetivas de 10X.; Controle negativo: células Sf9 não transfectadas analisadas no mesmo tempo.

5.1.4. Titulação viral

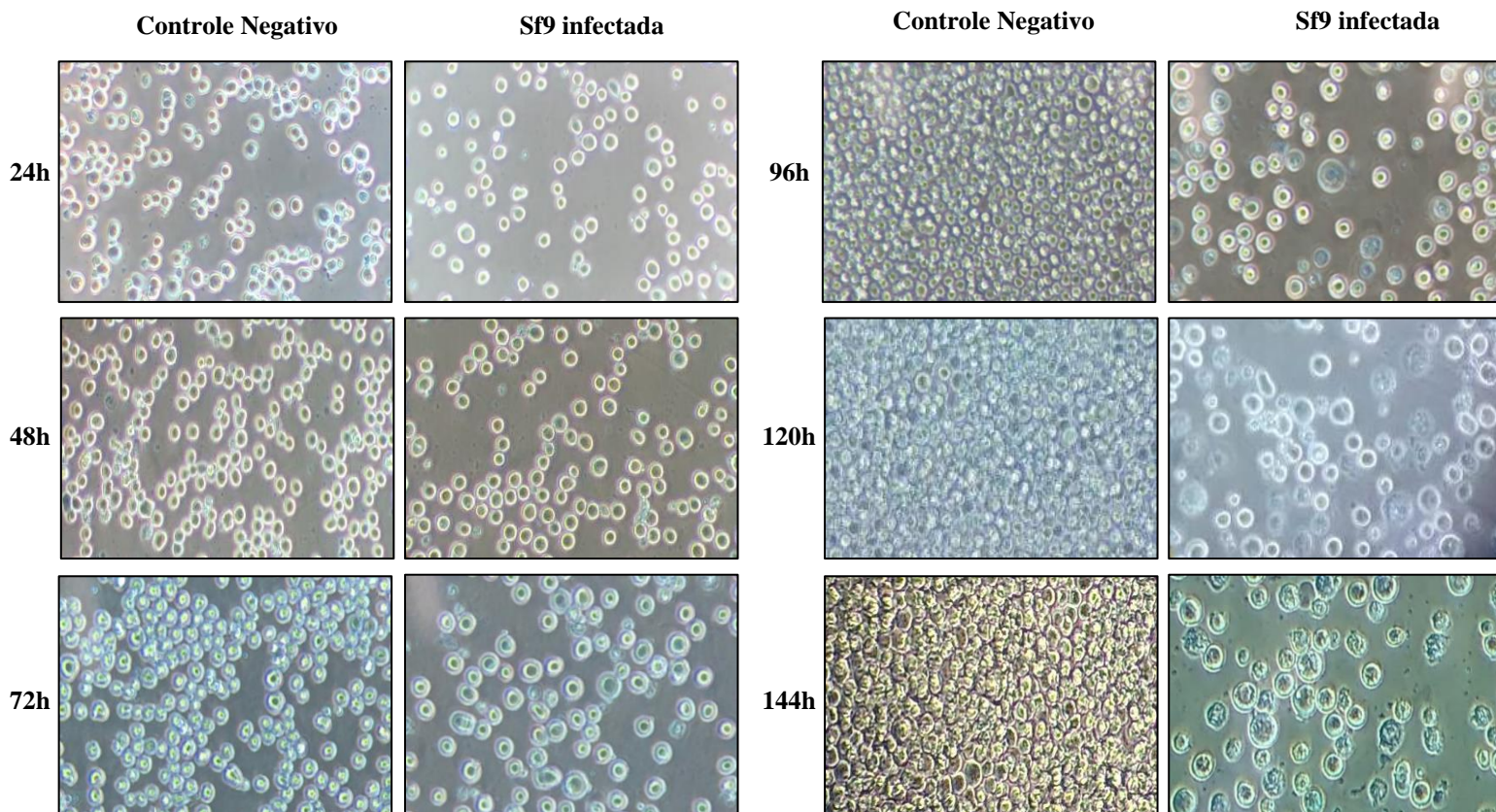
O procedimento de titulação do lote L1 dos BVs-E-ZIKV obtidos foi feito em células Sf9-ET em placas de 96 poços, com diferentes diluições da suspensão viral. Para isso foram contados

os focos de fluorescência em todos os poços infectados. O cálculo para estabelecer o título viral foi feito com base na TCID₅₀, (*tissue culture infective dose*) (REED; MUENCH, 1938), que consiste na quantidade de vírus suficiente para infectar 50% das células, e com isso estimar a quantidade de unidades formadoras de placa por mL (pfu/mL), multiplicando o resultado obtido de TCID₅₀ por 0,96, fator derivado da distribuição de Poisson, seguindo a fórmula: PFU= 0,69 x TCID₅₀ (O' REILLY, 1994). Com base nos dados resultantes deste experimento e a conversão em pfu/mL, obtivemos os títulos de 1×10^6 pfu/mL para o lote 1 (L1). Após a obtenção do título do L1, o mesmo foi utilizado para produção do lote L2 e posteriormente o L3 que obtiveram os seguintes títulos: $1,64 \times 10^7$ pfu/mL para o lote 2 (L2) e $8,13 \times 10^7$ pfu/mL para o lote 3 (L3), sendo o L3 o lote de BV-E-ZIKV usado nos ensaios de infecção e para produção de VLPs-ZIKV.

5.2. Ensaio de infecção BV-E-ZIKV em placa

Uma vez obtido e titulado o lote L3 de BVs-E-ZIKV, deu-se prosseguimento aos ensaios de produção das VLPs-ZIKV. Para isso, primeiramente foram realizados ensaios de infecção em placa de 6 poços nas linhagens celulares Sf9, sendo utilizadas 1×10^6 células / poço. Esses experimentos foram realizados para avaliar a expressão da proteína E-ZIKV e verificar o melhor MOI a ser utilizado para a produção das VLPs. A partir do resultado obtido foram avaliados diferentes tempos de coleta para análise de expressão das proteínas no sobrenadante. Imagens de microscopia óptica foram obtidas a partir do tempo de 24h até 144 h.p.i. com o melhor MOI escolhido para monitorar os efeitos citopáticos causados pelo processo de infecção, quando comparados com as células controle não infectadas e podem ser observadas na Figura 8. As análises de expressão das proteínas foram feitas por *dot blot*, *western blot* e imunofluorescência indireta (IFI).

Figura 13: Imagens de microscopia óptica do efeito citopático de células Sf9 infectadas com BV-E-ZIKV em diferentes tempos de infecção.



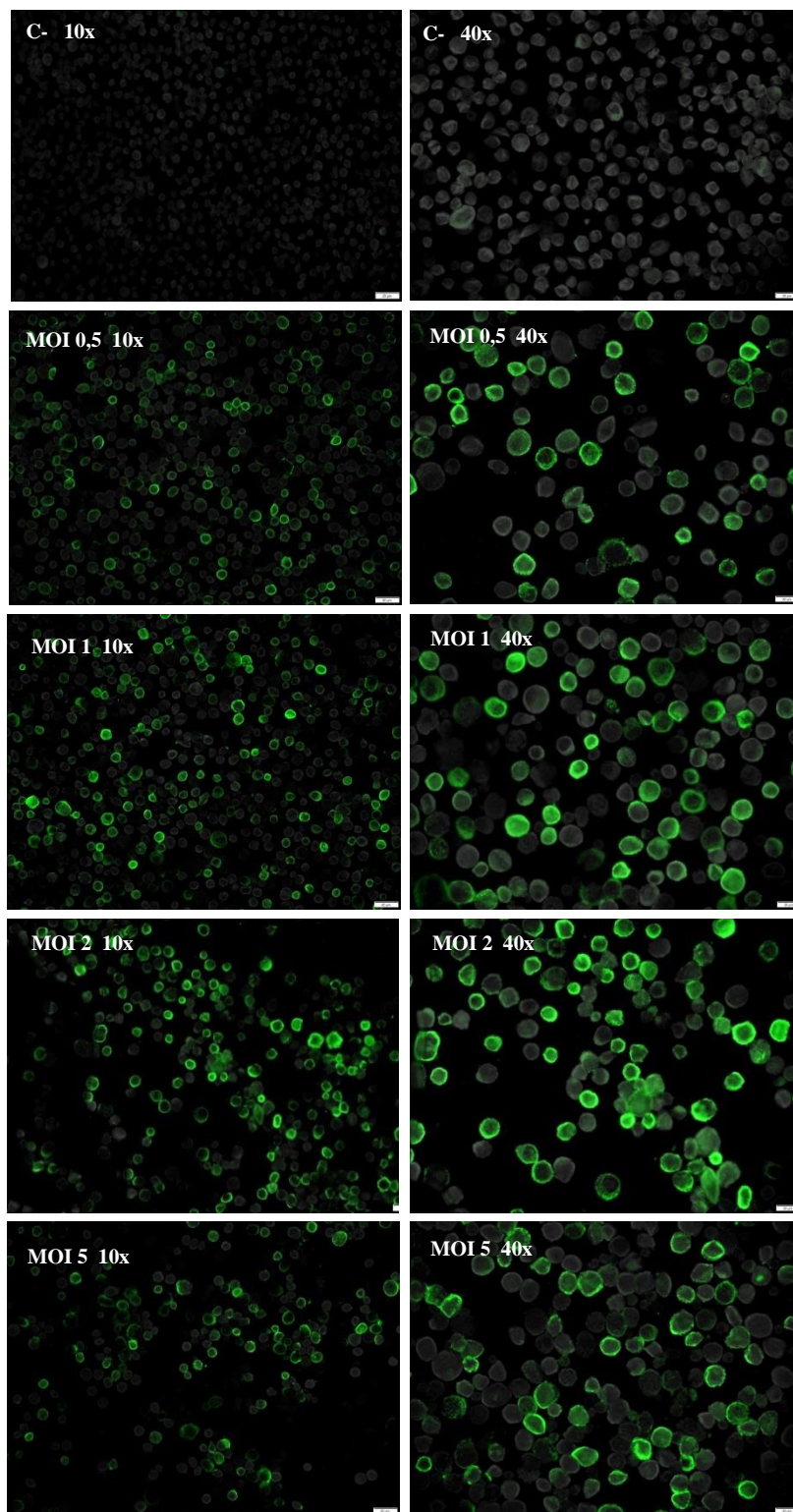
Células Sf9 infectadas com BV-E-ZIKV nos tempos 24h, 48h, 72h, 96h, 120h e 144h pós-infecção, visualizadas em microscópio óptico com objetiva de 40x. Controle Negativo: células Sf9 não infectadas usadas como controle negativo.

5.3. Análise da expressão das proteínas E-ZIKV

5.3.1. Ensaio de Imunofluorescência Indireta (IFI)

O procedimento de imunofluorescência indireta foi feito com as células Sf9 infectadas com o lote L3 dos BVs-E-ZIKV marcadas com anticorpo 4G2 (anti-E-flavivírus) e anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com FITC. Foram avaliados os diferentes MOIs: 0,5; 1; 2 e 5 e tempo de 72h pós-infecção, para avaliar em qual MOI ocorre a maior porcentagem de células infectadas. Conforme demonstrado na figura 9, foi possível observar um aumento na quantidade de células infectadas e uma fluorescência mais intensa à medida que o MOI é aumentado. Porém, no maior MOI utilizado, o MOI 5, já é possível observar uma leve diminuição da fluorescência no tapete celular quando comparado ao MOI 2. O MOI 2 foi escolhido para ser utilizado nos experimentos de infecção para a obtenção das VLPs. Células Sf9 não infectadas foram usadas como controle negativo.

Figura 14: Imagem de Imunofluorescência indireta de células Sf9 infectadas com diferentes MOIs de BV-E-ZIKV.

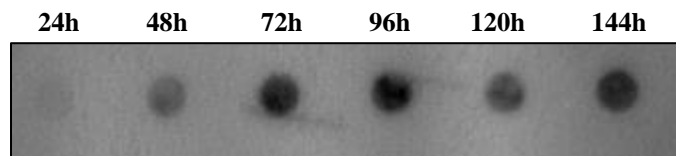


Células Sf9 infectadas com os MOIs 0,5, 1, 2 e 5 do BV-E-ZIKV marcadas com anticorpo 4G2 e anticorpo secundário conjugado com FITC e avaliadas no tempo 72h pós-infecção, visualizadas no microscópio de fluorescência com as objetivas de 10x e 40x.

5.3.2. *Dot blot*

Os experimentos de *dot blot* foram realizados com amostras coletadas dos ensaios de infecção em placa com as células Sf9 e MOI 2 do BV-E-ZIKV, conforme já descrito. Foram avaliados diferentes tempos de coleta: 24h, 48h, 72h, 96h, 120h e 144h para avaliar o melhor tempo para a produção e coleta das VLPs. As análises foram feitas de amostras do sobrenadante, utilizando o anticorpo 4G2 (anti-E-flavivírus). Foi possível observar marcações a partir de tempo de 48 h.p.i., sendo uma marcação mais intensa observada entre 72 e 96 h.p.i. (Figura 10).

Figura 15: *Dot blot* do sobrenadante de células Sf9 infectadas com MOI 2 do BV-E-ZIKV em diferentes tempos de coleta pós-infecção.

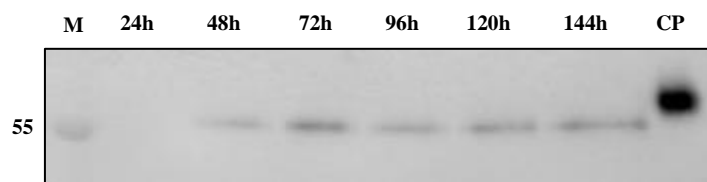


Sobrenadante do ensaio de infecção com MOI 2 do BV-E-ZIKV em células Sf9 coletados em diferentes tempos (24h/48h/72h/96h/120h/144h) para produção das VLPs utilizando o anticorpo 4G2.

5.3.3. *Western blot*

Foram realizados experimentos de *western blot* com as mesmas amostras avaliadas nos experimentos de *dot blot* para confirmar o tamanho da proteína E-ZIKV. Foi possível observar marcações a partir de tempo de 48 horas pós infecção, onde foi confirmado o tamanho da proteína E-ZIKV de aproximadamente 55kDa (Figura 11).

Figura 16: *Western blot* do sobrenadante de células Sf9 infectadas com MOI 2 do BV-E-ZIKV em diferentes tempos de coleta pós-infecção.



Western blot do sobrenadante do ensaio de infecção com MOI 2 do BV-E-ZIKV em células Sf9 coletados em diferentes tempos (24h/48h/72h/96h/120h/144h) para produção das VLPs utilizando o anticorpo 4G2 anti-E. M - Marcador Pageruler Plus; CP: Controle positivo - ZIKV inativado.

5.4. Análise da obtenção das VLPs

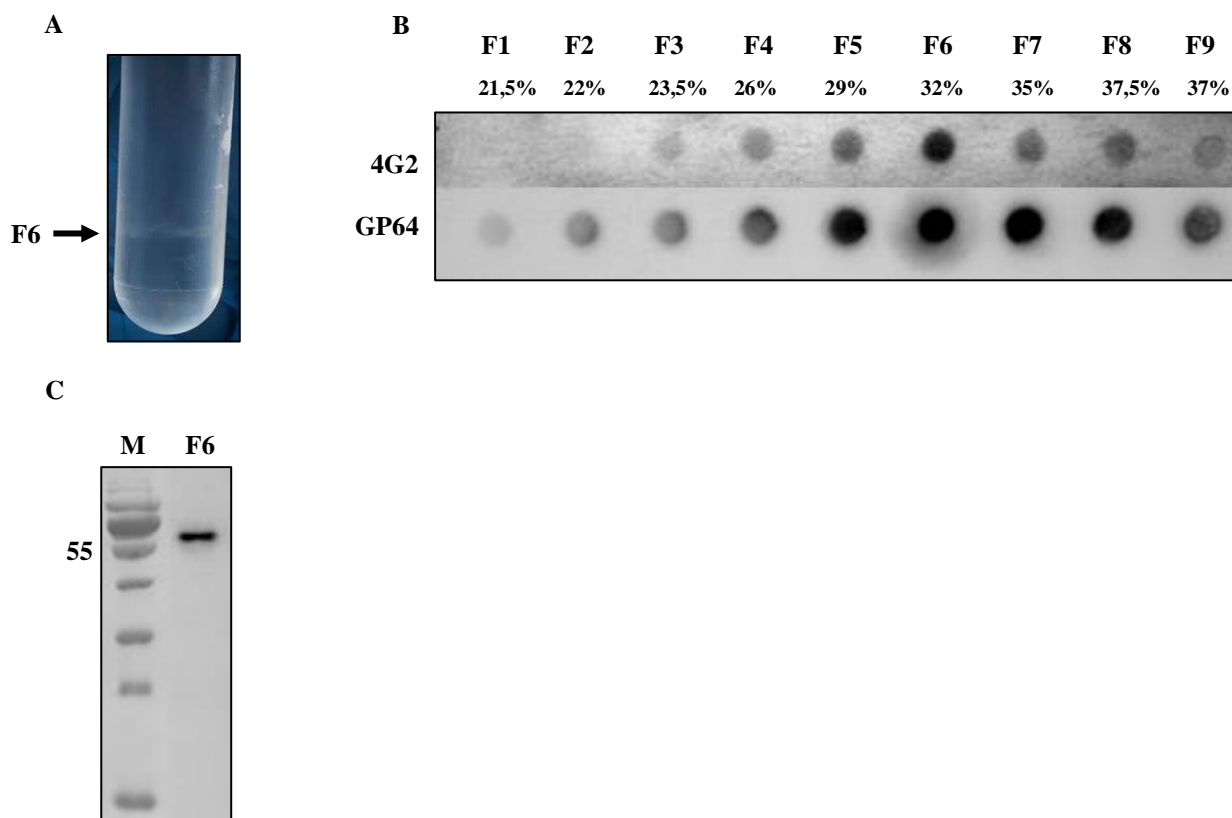
A partir dos resultados obtidos, optamos por realizar os ensaios em frascos agitados com volume de trabalho de 20 mL. Esses volumes nos permitiram padronizar os protocolos de purificação e caracterização das VLPs.

5.4.1. Gradiente Sacarose

As células Sf9 infectadas com os BVs-E-ZIKV no ensaio de frascos agitados foram coletadas 96 horas pós-infecção, clarificadas e o sobrenadante foi recuperado e filtrado, sendo então submetidos a um processo de concentração e purificação das VLPs conforme descrito anteriormente. Primeiramente foi avaliado o método de purificação com gradiente de sacarose. Foram coletadas 9 frações de 500 μ L do gradiente gerado, e as mesmas foram analisadas quanto a produção das VLPs e dos BVs-E-ZIKV. Foi possível observar a formação de um halo na fração 6 do gradiente gerado onde acredita-se estar concentrado a maior porcentagem das VLPs produzidas (Figura 12A). A técnica de *dot blot* foi feita utilizando o anticorpo 4G2 para marcar as VLPs produzidas e o anticorpo gp64 (anti-gp64-baculovírus) para marcar os BVs-E-ZIKV. Pelo ensaio de *dot blot*, referente a marcação com o anticorpo 4G2, foi possível observar uma marcação mais intensa na fração 6 (Figura 12B), mesma fração na qual foi possível observar o halo no gradiente, evidenciando uma maior concentração das VLPs nessa fração. Já na marcação das frações com o anticorpo gp64 foi possível observar uma marcação mais intensa nas frações F6 e F7, evidenciando uma maior concentração de baculovírus nessas frações. O ensaio de *western blot* foi feito com a

fração 6 e marcado com o anticorpo 4G2 evidenciando a proteína E-ZIKV no tamanho correspondente de aproximadamente 55 kDa.

Figura 17: Análise do processo de purificação das VLPs com gradiente de sacarose em amostras de sobrenadante de células Sf9 infectadas com BV-E-ZIKV.

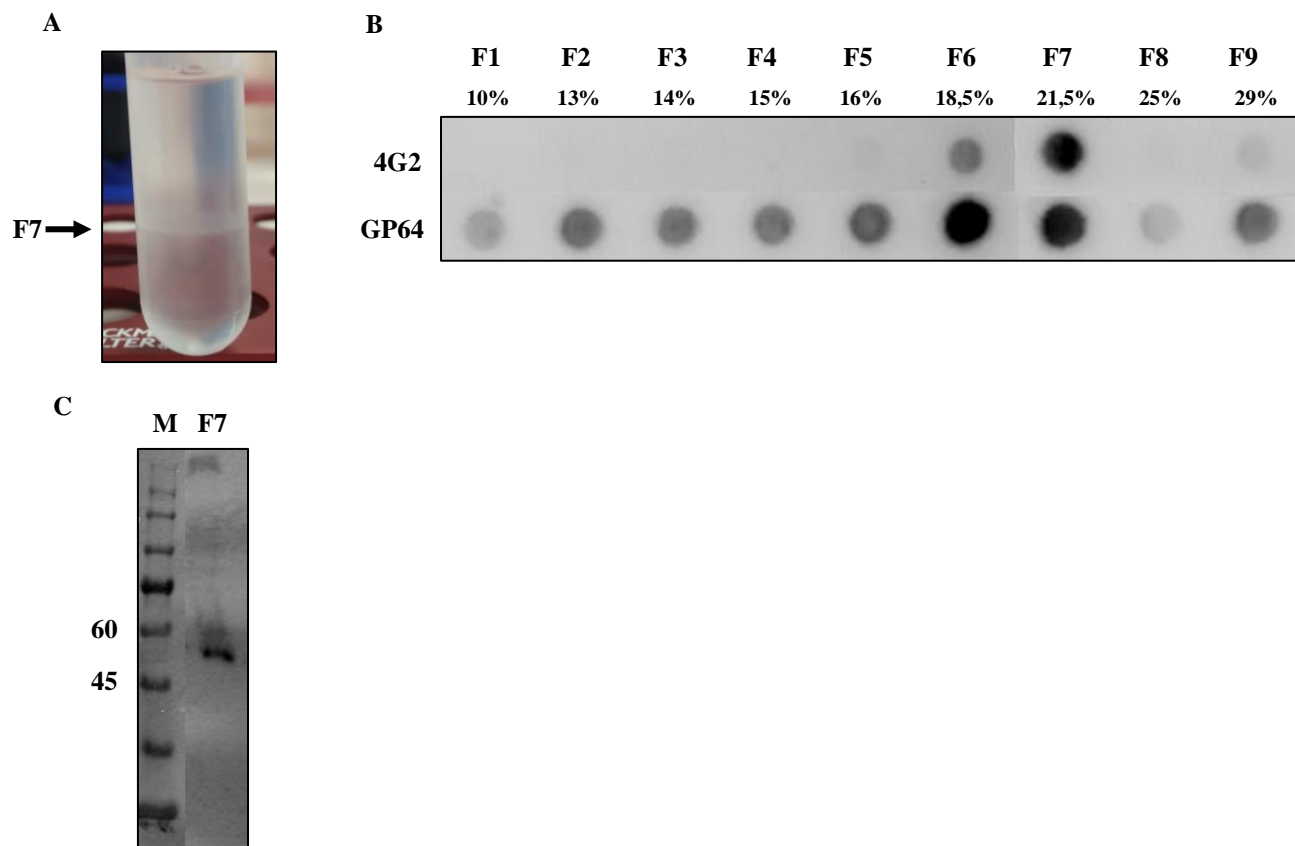


A Purificação das VLPs por ultracentrifugação com gradiente de sacarose mostrando halo formado na fração 6; **B** *Dot blot* das frações coletadas do gradiente (F1-F9) marcadas com anticorpo 4G2 (VLP-ZIKV) e anticorpo gp64 (BV-E-ZIKV); **C** *Western blot* da fração F6 correspondente ao halo marcada com anticorpo 4G2 (VLP-ZIKV); M: Marcador Pageruler™ Plus.

5.4.2. Gradiente Iodixanol (OptiPrep™)

Outro método utilizado para a purificação das VLPs foi o gradiente de iodixanol (OptiPrep™). Foram coletadas 9 frações de 500 µL do gradiente gerado, e as mesmas foram analisadas quanto a produção das VLPs e dos BVs-E-ZIKV. Foi possível observar a formação de um halo na fração 7 do gradiente gerado onde acredita-se estar concentrado a maior porcentagem das VLPs produzidas (Figura 13A). A técnica de *dot blot* foi feita utilizando o anticorpo 4G2 para marcar as VLPs produzidas e anticorpo gp64 para marcar os BVs-E-ZIKV. Pelo ensaio de *dot blot*, referente a marcação com o anticorpo 4G2, foi possível observar uma marcação mais intensa na fração 7 (Figura 13B), mesma fração na qual foi possível observar o halo no gradiente, evidenciando uma maior concentração das VLPs nessa fração. Já na marcação das frações com o anticorpo gp64 foi possível observar uma marcação mais intensa entre as frações F6 e F7, evidenciando uma maior concentração dos baculovírus nessas frações. O ensaio de *western blot* foi feito com a fração 7 e marcado com o anticorpo 4G2, evidenciando a proteína E-ZIKV no tamanho correspondente de aproximadamente 55 kDa.

Figura 18: Análise do processo de purificação das VLPs com gradiente de iodixanol em amostras de sobrenadante de células Sf9 infectadas com BV-E-ZIKV.

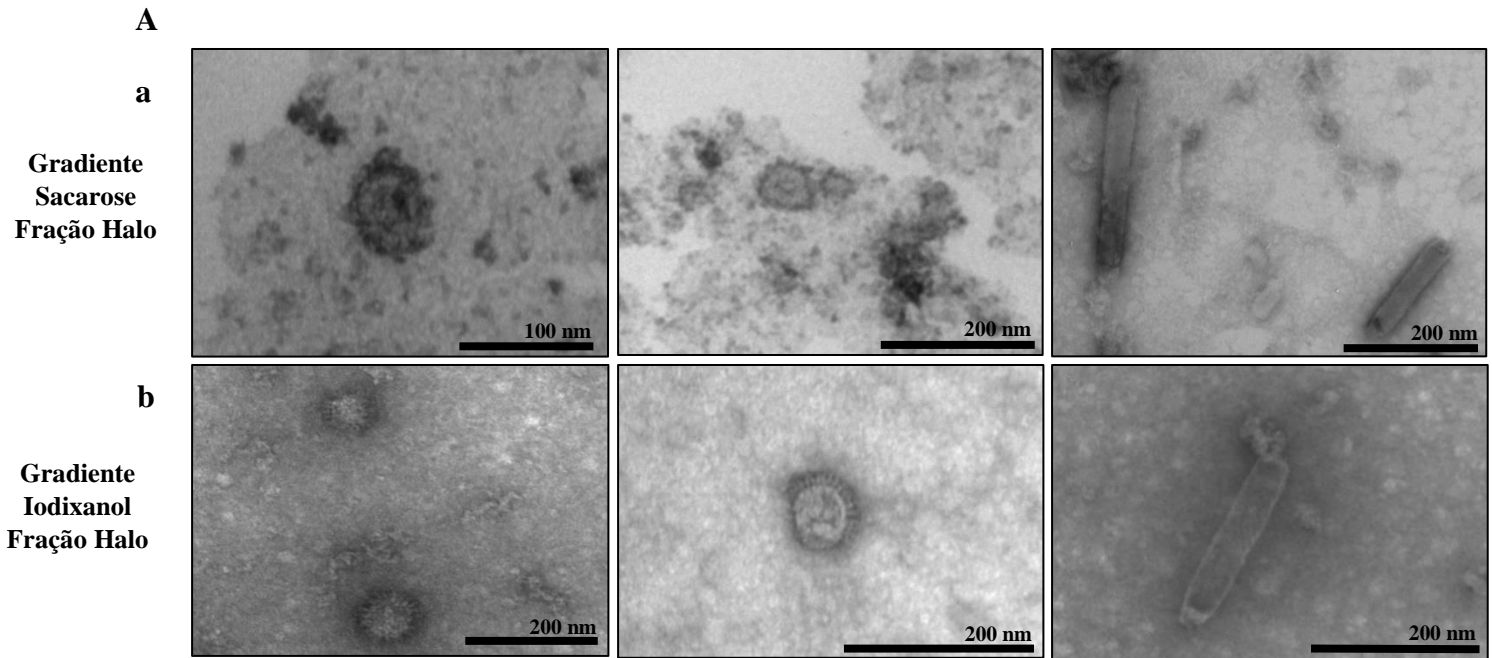


A Purificação das VLPs por ultracentrifugação com gradiente de iodixanol mostrando halo formado na fração 7; **B** *Dot blot* das frações coletadas do gradiente (F1-F9) marcadas com anticorpo 4G2 (VLP-ZIKV) e anticorpo gp64 (BV-E-ZIKV); **C** *Western blot* da fração F7 correspondente ao halo marcada com anticorpo 4G2 (VLP-ZIKV); M: Marcador TrueColor Protein Marker.

5.4.3. Caracterização das VLPs-ZIKV por Microscopia Eletrônica de Transmissão

As amostras correspondentes as frações coletadas nos gradientes de sacarose e iodixanol que apresentaram marcação mais intensa nos ensaios de *dot blot* e nas quais o tamanho da proteína E-ZIKV foi confirmado pelo ensaio de *western blot*, foram submetidas a análise de obtenção das VLPs-ZIKV por microscopia eletrônica de transmissão. Para isso, as técnicas de contrastação negativa, microscopia imunoelétrica e citoquímica ultraestrutural foram utilizadas para caracterizar as VLPs. Pela técnica de contrastação negativa foi possível observar estruturas semelhantes a VLPs, similares em tamanho (50-65 nm) e forma ao ZIKV nas amostras concentradas e purificadas pelo gradiente de sacarose (Figura 14A-a) e pelo gradiente de iodixanol (Figura 14A-b). Também foi possível observar estruturas de baculovírus (~150 a 250 nm) nas frações analisadas dos dois gradientes. Com o ensaio de microscopia imunoelétrica foi possível observar estruturas semelhantes a VLPs imunomarcadas com as partículas de ouro do anticorpo secundário utilizado na técnica, evidenciando a presença da proteína E-ZIKV na superfície das VLPs-ZIKV obtidas dos dois gradientes (Figura 15). Com a técnica de citoquímica ultraestrutural foi possível observar estruturas esféricas semelhantes a VLPs-ZIKV dentro das células Sf9 infectadas com o BV-E-ZIKV no período de 72h pós-infecção (Figura 16A-B) e também estruturas semelhantes a VLPs-ZIKV brotando das células Sf9 infectadas no mesmo período (Figura 16C-D). Foi possível observar também corpos de oclusão de baculovírus sendo produzidos no núcleo celular das células Sf9 (Figura 16E). Nas células Sf9 não infectadas usadas como controle não foram observadas essas estruturas (Figura 16F).

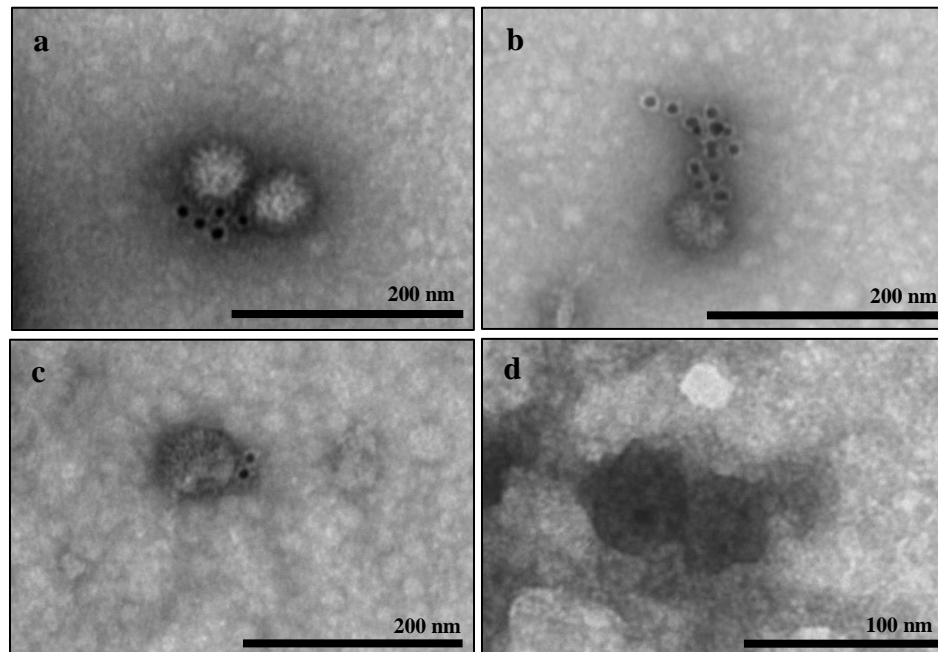
Figura 19: Microscopia Eletrônica de Transmissão das VLPs-ZIKV purificadas com gradiente de sacarose e iodixanol.



A-a Contrastação negativa da fração do halo do gradiente de sacarose mostrando estruturas semelhantes a VLPs (50 a 65 nm) e baculovírus (150-250 nm); **A-b** Contrastação negativa da fração do halo do gradiente de iodixanol mostrando estruturas semelhantes a VLPs (50 a 65 nm) e baculovírus (~250 nm). Barras de escala são mostradas para cada micrografia eletrônica.

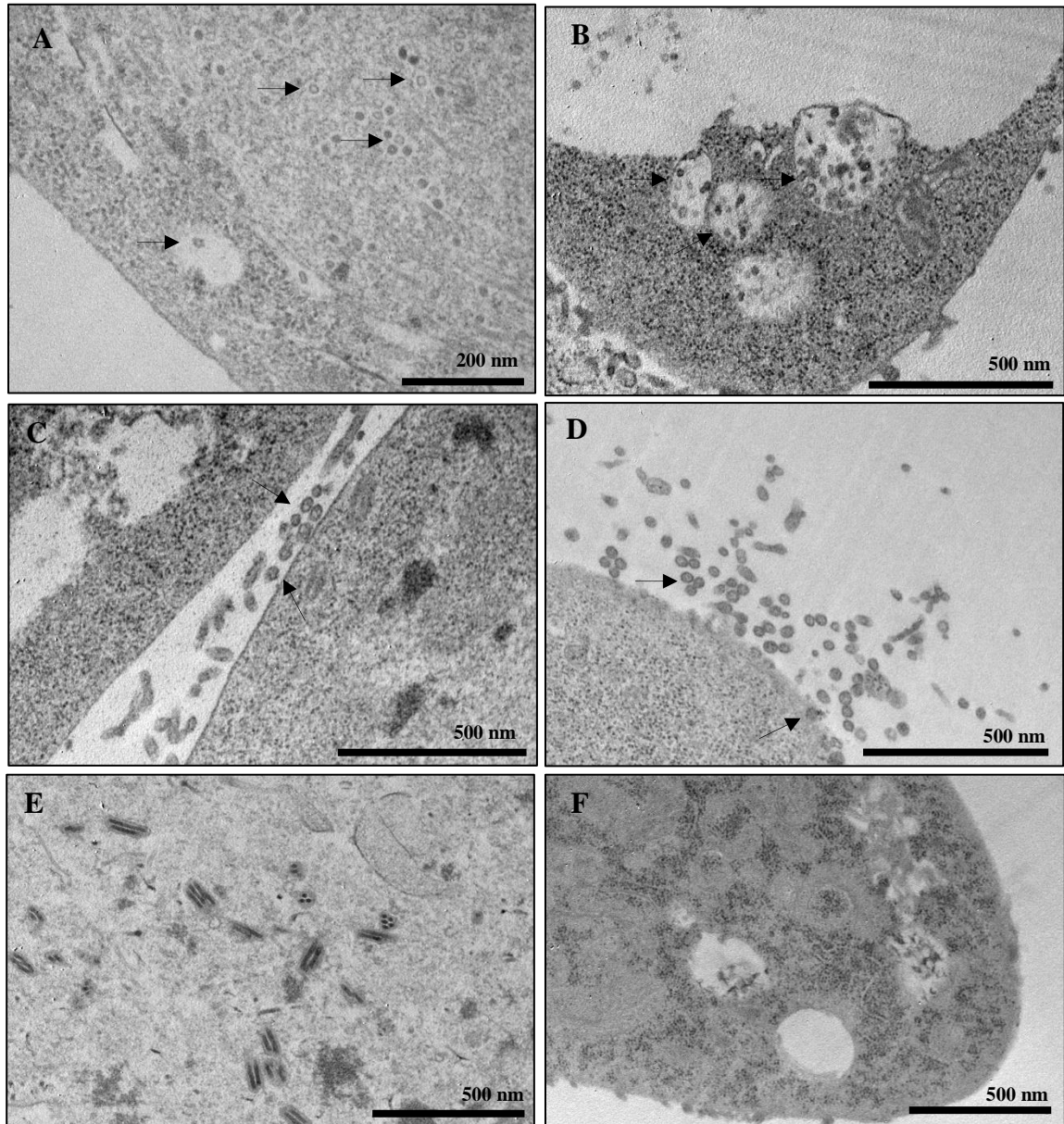
Figura 20 : Microscopia Imunoeletrônica das VLPs-ZIKV purificadas com gradiente de sacarose e iodixanol.

A



A Microscopia Imunoeletrônica das amostras purificadas pelo gradiente de iodixanol (**a-c**) e pelo gradiente de sacarose (**d**) mostrando estruturas semelhantes a VLPs-ZIKV imunomarcadas com partículas de ouro (10 nm). Barras de escala são mostradas para cada micrografia eletrônica.

Figura 21: Microscopia Eletrônica de Transmissão da técnica de citoquímica ultraestrutural das células Sf9 infectadas com BV-E-ZIKV no tempo de 72h pós-infecção.



A Partículas esféricas presumivelmente sendo VLPs-ZIKV no citoplasma celular (setas pretas); **B** Vesículas intracelulares preenchidas com pequenas partículas esféricas (setas pretas); **C-D** Partículas esféricas presumivelmente VLPs-ZIKV fora da membrana celular após brotamento (setas pretas); **E** Corpos de oclusão de baculovírus sendo produzidos no núcleo celular; **F** Células Sf9 não infectada usada como controle negativo apresentando vesículas intracelulares vazias. Barras de escala são mostradas para cada micrografia eletrônica.

6. DISCUSSÃO

Embora o desenvolvimento de uma vacina contra o ZIKV utilizando diferentes plataformas esteja sendo estudado e citado em diversos estudos (LIN et al., 2018; WHO 2019), até o momento ainda não há vacina disponível comercialmente para este fim. A plataforma vacinal de partículas semelhantes a vírus (VLPs) têm se mostrado vantajosa quando comparada a outras plataformas vacinais e apresenta-se com enorme potencial de uso como vacinas antivirais extremamente eficazes, pois mimetizam a conformação de uma partícula viral, sendo compostas por algumas ou todas as proteínas estruturais do vírus, mas sem o genoma viral. Portanto, elas formam uma partícula não replicante, evitando a possibilidade de reversão e infecção patogênica, tornando-as seguras como vacinas. Além disso, proporcionam alta resposta imune celular e humoral, pois estimulam o sistema imune por meio do reconhecimento de subunidades repetitivas do antígeno em questão (ROLDÃO et al., 2010). Várias vacinas baseadas em VLP estão disponíveis comercialmente, porém ainda não há nenhuma para arbovírus (ROLDÃO et al., 2010). As VLPs podem ser produzidas em diferentes sistemas de expressão, sendo eles células de mamíferos, leveduras, bactérias, plantas e células de insetos. Entre eles, o sistema de expressão derivado de baculovírus recombinante já é uma tecnologia bem estabelecida e tem demonstrado bastante interesse principalmente devido a capacidade de produzir VLPs mais complexas, expressando altos níveis das proteínas recombinantes de interesse, além da capacidade em realizar modificações pós-traducionais mais completas das proteínas expressas, necessárias para induzir uma resposta imune protetiva (RODRIGUEZ-LIMAS, et al, 2013).

Dessa forma, a padronização do uso de baculovírus recombinantes produzidos em células de inseto como sistema de expressão para a produção de VLPs como candidatos vacinais seguros e efetivos representa uma estratégia promissora para o desenvolvimento de uma plataforma de produção de vacinas contra arboviroses. Assim, neste trabalho, nós estabelecemos uma metodologia de produção de VLPs do ZIKV contendo suas proteínas estruturais C, prM e E produzidas em células de insetos utilizando o sistema de expressão derivado de baculovírus. O sistema escolhido foi o Bac-to-Bac (Invitrogen) devido ao seu amplo uso, facilidade e rapidez de gerar os produtos recombinantes (LIU et al., 2013).

Como descrito anteriormente, o vetor pFast-E-ZIKV contendo os genes que codificam as proteínas estruturais do ZIKV foi utilizado para a obtenção dos bacmídeos recombinantes (Bac-E-ZIKV). Após a transfecção dos Bac-E-ZIKV nas células Sf9, foi possível observar um aumento do diâmetro celular, um aumento no tamanho do núcleo das células e diminuição da taxa de crescimento celular quando comparadas ao controle negativo. Segundo Anderson et al., (1996), esses são os efeitos citopáticos esperados em um processo de células transfectadas com o bacmídeo recombinante e produzindo baculovírus, evidenciando que a transfecção ocorreu conforme o esperado. Foram gerados lotes de BVs-E-ZIKV com títulos virais mais concentrados para serem utilizados nos ensaios de infecção para a geração das VLPs. O título viral alcançado dos BVs-E-ZIKV produzidos neste trabalho foi de $8,13 \times 10^7$ pfu/mL que condiz com o esperado para um lote 3 produzidos em células Sf9 segundo Anderson et al. (1996). Kwang et al. (2016) obtiveram títulos virais acima de 2×10^8 pfu/mL em um cultivo celular de 10 L, mostrando que os resultados obtidos neste trabalho estão dentro do padrão de título viral para cultura em pequena escala e poderão ser aumentados em ensaios de escalonamento.

Os ensaios de infecção para a expressão das proteínas de interesse e geração das VLPs foram realizados em células Sf9, uma vez que essa linhagem é uma das mais utilizadas para o sistema de expressão derivado de baculovírus (WILDE et al., 2014). Células de *Trichoplusia ni* (Hi-5) também têm sido utilizadas para a produção de VLPs e deverão ser estudadas pelo nosso grupo, uma vez que alguns estudos mostram que estas células apresentam um maior nível de expressão de proteínas quando comparada a célula Sf9 (WILDE et al., 2014). Os efeitos citopáticos oriundos do processo de infecção pelo BV-E-ZIKV em células Sf9 foram monitorados com o passar do tempo (24h a 144h). Foi possível observar um aumento do diâmetro celular e no tamanho do núcleo das células nas primeiras 24h, uma diminuição da taxa de crescimento celular a partir de 48h e o processo de lise celular a partir de 72h. Além disso, foi possível verificar uma intensificação desses efeitos com o passar do tempo conforme observado na figura 8. Essas observações corroboram o que foi observado e relatado por Rohrmann (2013).

Os experimentos de imunofluorescência indireta mostraram a presença da proteína E-ZIKV nas membranas das células infectadas, evidenciando o estágio final de processamento e translocação da proteína E dentro da célula hospedeira antes do brotamento das VLPs, possibilitando a caracterização da proteína na própria célula e assim a comparação da expressão

das proteínas nas células sob os diferentes MOIs testados. A determinação de fatores de infecção celular como o MOI, o tempo de coleta (TOH) e a concentração celular são importantes, pois influenciam na expressão da proteína recombinante e consequentemente no processo de formação das VLPs produzidas (ROLDÃO et al., 2010). Dessa forma, com base em dados da literatura e de outros experimentos já estabelecidos no laboratório utilizando o mesmo sistema de expressão, foram escolhidos os MOIs 0,5; 1; 2; 5 para serem testados. A melhor marcação da expressão das proteínas ocorreu no MOI 2. Já no MOI 5 foi possível observar uma leve diminuição da fluorescência no tapete celular quando comparado ao MOI 2, possivelmente devido a uma menor expressão das proteínas na superfície daquelas células. Essas observações podem ser esperadas, uma vez que ensaios de infecção realizados com mais vírus do que o necessário pode levar ao aumento da carga metabólica celular, levando a uma diminuição da produtividade da proteína de interesse (WILDE et al., 2014). Além disso, utilizar mais vírus do que o necessário também pode levar a um aumento dos efeitos citopáticos, como lise celular e consequentemente a menor expressão da proteína recombinante. Assim, com base nos resultados foi estabelecido o MOI 2 para o desenvolvimento do trabalho.

A expressão da proteína E-ZIKV também foi avaliada em diferentes TOHs no sobrenadante celular através das técnicas de *dot blot* e *western blot*. O início da expressão é esperado após o período de 24 horas de infecção, uma vez que o promotor da poliedrina do baculovírus é considerado tardio. Com a técnica de *dot blot*, foi possível observar uma marcação mais intensa no tempo de 96 h.p.i., quando comparada com os outros tempos, mostrando que nesse tempo grande parte das VLPs teria sido produzida e secretada no sobrenadante. O melhor tempo de coleta das proteínas recombinantes pode variar entre 72 a 96 h.p.i., quando a viabilidade celular está entre 40 a 70% (CRUZ et al., 1998; FERREIRA et al. 2005). Após esse período, pode ocorrer um aumento na degradação das proteínas recombinantes em decorrência do aumento da lise celular (POWER et al. 1994). Dessa forma, foi escolhido o tempo de 96 h pós-infecção para a coleta das VLPs geradas. Pela técnica de *western blot* foi possível caracterizar e confirmar o tamanho da proteína E-ZIKV expressa na altura esperada de 55 kDa, em todos os tempos de coleta a partir de 48 h.p.i., que corresponde ao tamanho da proteína E do ZIKV. Já no controle positivo é possível observar uma banda um pouco acima de 55 kDa, isso pode ser explicado devido ao fato do vírus selvagem inativo usado como controle positivo ter sido produzido em células de mamífero, o que levaria a um padrão de glicosilação diferente da proteína quando comparado a produção de proteínas em células de

insetos (ZITZMANN et al., 2017). Esse mesmo padrão pode ser observado em outros trabalhos (WAGNER et al., 2014) não prejudicando a geração das VLPs. Apesar de observarmos a expressão da proteína E-ZIKV, esses dados ainda não nos permitiriam afirmar que as proteínas estruturais do ZIKV estão associadas no formato de VLPs. Os dados obtidos até então nos permitiram determinar apenas as melhores condições para dar continuidade aos experimentos de infecção e a produção das VLPs-ZIKV.

Após o ensaio de infecção em suspensão para a produção das VLPs-ZIKV, passamos então a realizar as etapas de concentração e purificação das mesmas. O processo de purificação das VLPs pode ser dificultado devido a alguns fatores, como o meio de cultura utilizado no processo de produção, se a VLP é secretada ou não, o processo de produção e a própria estrutura das VLPs (ROLDÃO et al., 2010). O uso de meio de cultura sem soro acaba sendo vantajoso nesse sentido, pois não possui alto teor de proteína e nem suplementos derivados de animais o que acaba facilitando os processos de purificação e reduz problemas relacionados à segurança (MOREIRA et al., 1995). No nosso trabalho, o fato de utilizarmos o meio de cultura Sf-900 III sem a adição de soro animal e das VLPs produzidas nas células de inseto serem secretadas para o meio extracelular facilita o processo de purificação, uma vez que não são necessários processo de extração e clarificação mais complexos dessas partículas (VICENTE et al., 2011).

Em relação ao processo de produção, um dos desafios de utilizar o sistema de expressão de baculovírus é justamente o fato de produzirmos os BVs juntamente com as VLPs nesse processo. Dessa forma é importante a escolha de um método de purificação que seja eficiente em separar essas partículas. Para isso nós testamos dois métodos de purificação por gradiente de densidade por ultracentrifugação: o gradiente de sacarose e o gradiente de iodixanol. Ambos são métodos convencionais utilizados para essa finalidade conforme descrito na literatura, que se baseiam na separação de partículas em uma amostra pela diferença de densidade de cada uma (STROBEL et al., 2015; LIU et al., 2016). No gradiente de sacarose foi possível observar a formação de um halo próximo à sexta fração onde estariam concentradas as VLPs. Pelo ensaio de *dot blot* foi possível observar que a maior porcentagem das VLPs e dos BVs-E-ZIKV produzidos se concentraram na mesma fração do halo. O ensaio de *western blot* nos possibilitou caracterizar a proteína E-ZIKV na fração do halo no tamanho correspondente de aproximadamente 55 kDa. Os resultados mostraram que não conseguimos obter uma purificação total com o gradiente de sacarose uma vez

que tanto as VLPs quanto os BVs se concentraram nas mesmas frações. Dai et al. (2018) produziram VLPs do ZIKV utilizando o sistema de baculovírus em células Sf9 e realizaram a purificação através do gradiente de sacarose (10-60%). Porém também detectaram partículas de VLPs e BVs concentradas nas mesmas frações, corroborando com os resultados mostrados neste trabalho. No entanto, isso não afetou a resposta imunológica gerada pelas VLPs produzidas nos testes de imunogenicidade feito em experimentos *in vivo*. Isso mostra que apesar do gradiente de sacarose não ter sido eficiente para separar totalmente as VLPs produzidas dos BVs, ainda seria possível dar continuidade nas análises de antigenicidade e imunogenicidade das partículas geradas. Importante ressaltar que no trabalho citado foram produzidas VLPs compostas de diferentes proteínas e que diferentes condições de infecção como MOI, TOH e concentração celular foram utilizadas.

O outro método de purificação avaliado foi o gradiente de iodixanol, utilizando o reagente comercial OptiPrep™. O iodixanol já é utilizado como um método que apresenta melhores índices de purificação e rendimento, quando comparado a outros métodos como sacarose e cloreto de cério (CsCl) (STROBEL et al., 2015). Além disso, por possuir propriedades não iônicas e isosmóticas e por ser menos viscoso que a sacarose, o uso do iodixanol facilita posteriores etapas de purificação e de outras análises a serem realizadas na amostra (ZOLOTUKHIN et al., 1999). Foi possível observar a formação de um halo no gradiente um pouco mais concentrado quando comparado ao formado no gradiente de sacarose. O resultado do *dot blot* confirmou a concentração das VLPs no halo. Porém, foi possível evidenciar que uma porcentagem dos BVs-E-ZIKV também foi concentrada na fração do halo, mostrando que também não houve total purificação das VLPs por este gradiente. Pela técnica de *western blot*, foi possível caracterizar a proteína E-ZIKV na fração do halo no tamanho correspondente de aproximadamente 55 kDa. Zolotukhin et al., (1999) demonstraram que o uso do gradiente de iodixanol foi eficiente na purificação das proteínas celulares provenientes do processo de infecção, porém a adição de uma etapa de purificação por cromatografia ainda foi necessária para uma purificação mais completa. Além disso, alguns autores relataram uma similaridade de densidade entre algumas VLPs e os baculovírus provenientes do processo de infecção, o que resultaria na dificuldade em separar com eficiência essas duas partículas por métodos de gradiente de densidade por ultracentrifugação (MARGINE et al, 2012; CHAVES et al, 2018). Nesse caso, eles sugerem a utilização desses diferentes gradientes como uma etapa de polimento e após isso poderiam ser utilizadas diferentes técnicas como cromatografia

(afinidade, exclusão de tamanho, troca iônica) ou técnicas de ultrafiltração tangencial para a purificação final do produto, sendo esta última vista como uma alternativa mais viável pois possui custos mais baixos não inviabilizando o produto final (JOZALA et al., 2016).

Embora os métodos utilizados neste trabalho para purificar as VLPs não tenham sido capazes de eliminar todos os baculovírus presentes nas amostras, eles ainda podem ser usados como uma etapa de polimento em processos onde certa quantidade de baculovírus pode ser tolerada. É importante ressaltar que os baculovírus não são infecciosos para mamíferos, o que não representaria um problema significativo para várias aplicações, como a realização de testes de imunogenicidade (CHAVES et al., 2018). No entanto, a presença de baculovírus na formulação do insumo farmacêutico final pode ser um problema no que diz respeito ao registro e aos requisitos de segurança da vacina recombinante (RUEDA et al., 2000; MAREK et al., 2011). Dessa forma, seria necessário realizar procedimentos de inativação do vírus remanescentes ou outras etapas de purificação, processos que são realizados nas vacinas comerciais que também utilizam este sistema de expressão (RUEDA et al., 2000; HERVAS-STUBBS et al., 2007; MAREK, et al., 2011). Dessa forma, os procedimentos de purificação por gradiente de densidade por ultracentrifugação acabam sendo utilizados para padronizar metodologias que sirvam como referência para o desenvolvimento de outros processos (VICENTE et al., 2011).

A caracterização das VLPs concentradas tanto pelo gradiente de sacarose quanto pelo gradiente de iodixanol foi feita através de técnicas de microscopia eletrônica de transmissão. Foi possível observar VLPs nos tamanhos entre 50-65 nm nos dois gradientes, sendo semelhantes em tamanho e morfologia ao ZIKV nativo. Outros autores também observaram a produção de VLPs do ZIKV em células de mamífero e inseto em tamanhos semelhantes entre 30-65 nm (BOIGARD, 2017; GARG et al., 2017; DAI et al., 2018; SALVO et al., 2018). Também foi possível observar a presença de BVs entre 150-250 nm, porém em menor quantidade no gradiente de iodixanol quando comparado à técnica de purificação pelo gradiente de sacarose, mostrando que a purificação por gradiente de iodixanol foi mais eficaz ao separar as partículas e concentrar as VLPs do ZIKV. Pela técnica de microscopia imunoelétrica foi possível observar partículas de ouro contornando as VLPs, indicando a exposição da proteína E-ZIKV na superfície externa das VLPs purificadas pelos dois gradientes utilizados. A proteína E dos flavivírus é considerada o epítipo imunodominante entre os flavivírus por sua capacidade de induzir a produção de anticorpos neutralizantes

(LINDENBACH; RICE, 2001). Dessa forma, podemos inferir a manutenção da antigenicidade das partículas produzidas e a possibilidade da indução de uma resposta imune, que será testada em trabalhos futuros. Trabalhos relataram a capacidade de VLPs do ZIKV de serem altamente imunogênicas, produzindo uma resposta imune ampla e com capacidade de induzirem resposta de anticorpos neutralizante (BOIGARD, et al., 2017; GARG et al., 2017; BASU et al., 2018; DAI et al., 2018; SALVO et al., 2018). Isso mostra que as VLPs produzidas neste trabalho podem possuir um grande potencial como uma estratégia vacinal altamente eficazes.

Foi realizado também o ensaio de citoquímica ultraestrutural onde foi possível observar as VLPs geradas no citoplasma das células Sf9 infectadas com os BVs-E-ZIKV e dentro de vesículas intracelulares. Também foi possível observar VLPs fora da membrana plasmática das células possivelmente após o processo de brotamento, sendo esse processo similar ao processo de exocitose do próprio ZIKV nativo. Já nas células Sf9 não infectadas pelo BV-E-ZIKV usadas como controle negativo, não foi possível observar essas partículas, sendo possível observar vesículas intracelulares vazias, evidenciando que os BVs-E-ZIKV foram capazes de infectar as células Sf9 e resultar na produção de VLPs e essas foram devidamente secretadas para o meio extracelular. Dai et al. (2018) compararam o processo de produção e brotamento de VLPs de ZIKV em células Sf9 com o ZIKV nativo em células Vero e observaram os mesmos processos de exocitose celular entre as duas partículas. Eles confirmaram que as VLPs possuem a capacidade de se automontarem em células Sf9 infectadas com o baculovírus recombinante, corroborando com os dados observado no nosso trabalho.

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, foi demonstrada a eficácia na produção e concentração das VLPs-ZIKV compostas das proteínas E-ZIKV através de células Sf9 infectadas com o baculovírus recombinante BV-E-ZIKV e posteriormente purificadas por gradiente de sacarose ou de iodixanol. Foi possível demonstrar que as VLPs geradas apresentam morfologia e antigenicidade similares ao vírus nativo. Além disso, ainda será necessário estabelecer um método analítico quantitativo capaz de determinar a concentração dessas partículas virais uma vez que elas deverão ser testadas quanto a sua capacidade imunogênica e assim determinar se essas partículas podem ser utilizadas como futuros candidatos vacinais. Uma das grandes vantagens de utilizar o sistema de expressão de baculovírus é a capacidade desse sistema em expressar altos níveis da proteína recombinante de interesse. Vários autores relataram altas concentrações nas produções de

VLPs de diferentes vírus nesse sistema que variam de 0,2 mg/L a centenas de miligramas por litro (ROLDÃO et al, 2010; VICENTE et al, 2011). Além disso, é esperado um ganho ainda maior a partir do escalonamento do processo para a produção dessas partículas em larga escala (VICENTE, et al, 2011). Apesar de não termos conseguido verificar o rendimento das VLPs produzidas neste trabalho, baseado nos resultados observados na literatura, é esperado que consigamos obter níveis consideráveis de VLPs com o sistema de expressão escolhido.

O desenvolvimento de uma plataforma de vacinas considerada segura especialmente para os grupos de pessoas que são considerados de alto risco de sofrer os efeitos da infecção pelo ZIKV, como imunocomprometidos e gestantes, é de extrema importância e prioridade de saúde pública. Nossa expectativa é que os resultados obtidos possam constituir uma potencial ferramenta biotecnológica para o desenvolvimento de métodos vacinais para o ZIKV e que o estabelecimento dessa tecnologia em nosso laboratório possa contribuir para o desenvolvimento de projetos visando novas estratégias de obtenção de outras vacinas virais.

7. CONCLUSÕES

Com os dados obtidos neste trabalho conseguimos concluir que foi possível produzir e caracterizar as VLPs-ZIKV através do sistema de expressão de baculovírus recombinante utilizando células de inseto Sf9. Geramos lotes de baculovírus recombinantes portando os genes que codificam as proteínas estruturais do ZIKV e essas proteínas foram capazes de se automontar em partículas semelhantes ao vírus nativo gerando VLPs expressando a proteína E-ZIKV em sua superfície, sendo possível assim determinar a antigenicidade dessas partículas. Conseguimos concentrar e purificar parcialmente as VLPs geradas. No entanto ainda seria necessário analisar em trabalhos futuros tanto o rendimento da produção das VLPs pelo sistema de expressão escolhido quanto a capacidade imunogênica das partículas uma vez que com os resultados obtidos conseguimos apresentar uma potencial plataforma para a produção de futuros candidatos vacinais contra o ZIKV e outros vírus.

REFERÊNCIAS

- ADEKOLU-JOHN, E. O.; FAGBAMI, A. H. Arthropod-borne virus antibodies in sera of residents of Kainji Lake Basin, Nigeria 1980. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 2, p. 149–151, 1983.
- AKAHATA, W. A virus-like particle vaccine for epidemic Chikungunya virus protects nonhuman primates against infection. **Nat Med**. v. 16, n. 3, p. 334-338, 2010.
- ALTMANN, F. et al. Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins. **Glycoconjugate Journal**, v. 16, n. 2, p. 109–123, 1999.
- ANDERSON, D. et al. Rapid Generation of Recombinant Baculoviruses and Expression of Foreign Genes Using the Bac-To-Bac® Baculovirus Expression System. **Focus**. v.17, p. 53-58, 1996.
- BASU, R. et al. Immunization with phage virus-like particles displaying Zika virus potential B-cell epitopes neutralizes Zika virus infection of monkey kidney cells. **Vaccine**. v. 36, n. 10, p. 1256-1264, 2018.
- BOIGARD, H., et al. M. Zika virus-like particle (VLP) based vaccine. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 11, n. 5, 2017.
- BONNING, B. C. Baculoviruses: biology, biochemistry and molecular biology. In: Gilbert, L. I.; Iatrou, K.; Gill, S. S. **Comprehensive Molecular Insect Science**. Oxford: Elsevier, p. 233-270, 2005
- BRINTON, M. Flaviviruses. *In: Clinical and Molecular Aspects of Neurotropic Virus Infection*. Heidelberg: **Springer**, p. 69–99, 1989.
- BUATHONG, R. et al. Detection of Zika Virus Infection in Thailand, 2012-2014. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 93, n. 2, p. 380–383, 2015.
- CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. Campos_2015 - Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. v. 21, n. 10, p. 1885–1886, 2015.
- CAO-LORMEAU, V.-M. et al. Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. **Emerging infectious diseases**, v. 20, n. 6, p. 1085–6, 2014.
- CARNEC, X. et al. The Phosphatidylserine and Phosphatidylethanolamine Receptor CD300a Binds Dengue Virus and Enhances Infection. **Journal of virology**, v. 90, n. 1, p. 92–102, 2016.
- CDC. **Revised diagnostic testing for Zika, chikungunya, and dengue viruses in US Public Health Laboratories**. CDC, 2016.
- CHAVEZ, L. C.S., RIBEIRO, B.M., BLISSARD, G.W. Production of GP64-free virus-like particles from baculovirus-infected insect cells. **J Gen Virol**. v. 99, n. 2, p. 265-274, 2018.
- CHESHENKO, N. et al. A novel system for the production of fully deleted adenovirus vectors that does not require helper adenovirus. **Gene Therapy**, v. 8, n. 11, p. 846–854, 2001.
- CHU, J. J. H.; NG, M. L. Infectious Entry of West Nile Virus Occurs through a Clathrin-Mediated

- Endocytic Pathway. **Journal of Virology**, v. 78, n. 19, p. 10543–10555, 2004.
- CICCARONE, V. C.; POLAYES, D. A.; LUCKOW, V. A. Generation of Recombinant Baculovirus DNA in *E. coli* Using a Baculovirus Shuttle Vector. In: **Molecular Diagnosis of Infectious Diseases**. New Jersey: Humana Press. v. 13p. 213–236, 1998.
- CRUZ, P. E. Optimization of the production of virus-like particles in insect cells. **Biotechnol. Bioeng.** v. 60, n. 4, p. 408–418, 1998.
- DAI, S. et al. Zika Virus Baculovirus-Expressed Virus-Like Particles Induce Neutralizing Antibodies in Mice. **Virologica Sinica**, v. 33, n. 3, p. 213–226, 2018.
- DEBELJAK, N. et al. Variability in the immunodetection of His-tagged recombinant proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 359, n. 2, p. 216–223, 2006.
- DICK, G. W. . Zika virus (II). Pathogenicity and physical properties. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 521–534, 1952.
- DICK, G. W. .; KITCHEN, S. .; HADDOW, A. . Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509–520, 1952.
- DUFFY, M. R. et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536–2543, 2009.
- DUPONT-ROUZEYROL, M. et al. Co-infection with Zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014. **Emerging infectious diseases**, v. 21, n. 2, p. 381–2, 2015.
- ECDC, 2014. Rapid Risk Assessment: Zika Virus Infection Outbreak, French Polynesia. **European Centre for Disease Prevention and Control**, Stockholm, Sweden February 14, 2014. Disponível em: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Zika-virus-French-Polynesia-rapid-risk-assessment.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2019.
- FAGBAMI, A. Epidemiological investigations on arbovirus infections at Igbo-Ora, Nigeria. **Tropical and geographical medicine**, v. 29, n. 2, p. 187–91, 1977.
- FERREIRA, T. B. et al. Effect of re-feed strategies and non-ammonogenic medium on adenovirus production at high cell densities. **J. Biotechnol.** v. 119, n. 3, p. 272–280, 2005
- FERNANDEZ, E.; DIAMOND, M. S. Vaccination strategies against Zika virus. **Current Opinion in Virology**, v. 23, p. 59–67, 2017.
- FUENMAYOR, J.; GÒDIA, F.; CERVERA, L. Production of virus-like particles for vaccines. **New Biotechnology**, v. 39, p. 174–180, 2017.
- GARG, H. et al. Development of Virus-Like-Particle Vaccine and Reporter Assay for Zika Virus. **J Virol.** v.91, n. 20, p. 834-17, 2017.
- HAMEL, R. et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. **Journal of virology**, v. 89, n. 17, p. 8880–96, 2015.
- HAYES, E. B. Zika virus outside Africa. **Emerging infectious diseases**, v. 15, n. 9, p. 1347–50, 2009.

- HEANG, V. et al. Zika virus infection, Cambodia, 2010. **Emerging infectious diseases**, v. 18, n. 2, p. 349–51, 2012.
- HENNESSEY, M.; FISCHER, M.; STAPLES, J. E. Zika Virus Spreads to New Areas — Region of the Americas, May 2015–January 2016. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 3, p. 1–4, 2016.
- HERBAS-STUBBS, S., et al. Insect baculoviruses strongly potentiate adaptive immune responses by inducing type I IFN. **J Immunol.** v. 178, n. 4, p. 2361-9, 2007.
- HOPKINS, R. F.; ESPOSITO, D. A rapid method for titrating baculovirus stocks using the Sf-9 Easy Titer cell line. **BioTechniques**, v. 47, n. 3, p. 785–788, 2009.
- IOOS, S. et al. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 44, n. 7, p. 302–307, 2014.
- JAN, C. et al. A serological survey of arboviruses in Gabon. **Bulletin de la Societe de pathologie exotique et de ses filiales**, v. 71, n. 2, p. 140–6, 1978.
- JOZALA, A. F. et al. Biopharmaceuticals from microorganisms: from production to purification. **Braz J Microbiol.** v. 1, p. 51-6, 2016.
- KRAEMER, M. U. G. et al. The global compendium of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* occurrence. **Scientific Data**, v. 2, n. 1, p. 150035, 2015.
- KUHN, R. J. et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. **Cell**, v. 108, n. 5, p. 717–25, 2002.
- KUNO, G.; CHANG, G.-J. J. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. **Archives of Virology**, v. 152, n. 4, p. 687–696, 2007.
- KUTSUNA, S. et al. Two cases of Zika fever imported from French Polynesia to Japan, December 2013 to January 2014. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 4, p. 20683, 2014.
- LANCIOTTI, R. S. et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging infectious diseases**, v. 14, n. 8, p. 1232–9, 2008.
- LIN, H.-H. et al. Zika virus structural biology and progress in vaccine development. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 1, p. 47–53, 2018.
- LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. The Viruses and Their Replication. **Fields Virology**, p. 1101–1113, 2007.
- LIU, F. et al. Use of baculovirus expression system for generation of virus-like particles: Successes and challenges. **Protein Expression and Purification**, v. 90, n. 2, p. 104–116, 2013.
- LIU, J. et al. Virus like particle-based vaccines against emerging infectious disease viruses. **Virologica Sinica**, v. 31, n. 4, p. 279–287, 2016.
- LUCKOW, V. A. et al. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. **Journal of virology**, v. 67, n. 8, p. 4566–79, 1993.

- MACNAMARA, F. . Zika Virus: a Report on Three Cases of Human Infection During an Epidemic of Jaundice in Nigeria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, n. 2, 1954.
- MAGALHÃES-BARBOSA, M. C. DE et al. Trends of the microcephaly and Zika virus outbreak in Brazil, January–July 2016. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 14, n. 5, p. 458–463, 2016.
- MARCONDES, C. B. et al. Zika virus in Brazil and the danger of infestation by Aedes (Stegomyia) mosquitoes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 1, p. 4–10, 2015.
- MAREK, M. et al. Engineering of baculovirus vectors for the manufacture of virion-free biopharmaceuticals. **Biotechnol Bioeng**. v. 108, n. 5, p.1056-67, 2011.
- MARGINE, I. et al. Residual baculovirus in insect cell-derived influenza virus-like particle preparations enhances immunogenicity. **PLoS One**. v. 7, n. 12, 2012.
- MCCARTHY, M. Zika virus outbreak prompts US to issue travel alert to pregnant women. **BMJ**, v. 352, p. i306, 2016.
- METZ, S. W.; PIJLMAN, G. P. Arbovirus vaccines; opportunities for the baculovirus-insect cell expression system. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 107, p. S16–S30, 2011.
- MICROCEPHALY EPIDEMIC RESEARCH GROUP, M. E. R. Microcephaly in Infants, Pernambuco State, Brazil, 2015. **Emerging infectious diseases**, v. 22, n. 6, p. 1090–1093, 2016.
- MILLER, L. K. Baculoviruses: high-level expression in insect cells. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 3, n. 1, p. 97–101, 1993.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Combate ao Aedes Aegypti: prevenção e controle da Dengue, Chikungunya e Zika. 2019. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/aedes-aegypti> Acesso em: 5 set. 2019.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Vírus Zika no Brasil. A resposta do SUS. 2017. Disponível em: http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/virus_zika_brasil_resposta_sus.pdf Acesso em: 5 set. 2019.
- MOHSEN, M. O. et al. Major findings and recent advances in virus–like particle (VLP)-based vaccines. **Seminars in Immunology**, v. 34, p. 123–132, 2017.
- MONLUN, E. et al. Surveillance of the circulation of arbovirus of medical interest in the region of eastern Senegal. **Bulletin de la Societe de pathologie exotique (1990)**, v. 86, n. 1, p. 21–8, 1993.
- MOREIRA, J. L. et al. Serum-free and serum-containing media for growth of suspended BHK aggregates in stirred vessels. **EnzymeMicrob.Technol**. v. 17, n. 5, p. 437–444,1995.
- MUSSO, et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. **Euro Surveill.**; v. 19, p. 20761, 2014.
- ONORATI, M. et al. Zika Virus Disrupts Phospho-TBK1 Localization and Mitosis in Human Neuroepithelial Stem Cells and Radial Glia. **Cell Reports**, v. 16, n. 10, p. 2576–2592, 2016.

- PAHO/WHO. Epidemiological Update: Neurological Syndrome, Congenital Anomalies and Zika virus Infection. 17 January. Washington, DC: **PAHO/WHO**; 2016.
- PETERSEN, E. E. et al. Interim Guidelines for Pregnant Women During a Zika Virus Outbreak - United States, 2016. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, 2016.
- PIERSON, T. C.; DIAMOND, M. S. Degrees of maturity: the complex structure and biology of flaviviruses. **Current Opinion in Virology**, v. 2, n. 2, p. 168–175, 2012.
- PIJLMAN, G. P. Enveloped virus-like particles as vaccines against pathogenic arboviruses. **Biotechnology Journal**, v. 10, n. 5, p. 659–670, maio 2015.
- PLOURDE, A. R.; BLOCH, E. M. A Literature Review of Zika Virus. **Emerg. Infect. Dis.** v. 22, n. 7, p. 1185–1192, 2016.
- POWER, J. F. et al. Modeling and optimization of the baculovirus expression vector system in batch suspension culture. **Biotechnol. Bioeng.** v. 44, n. 6, p. 710–719, 1994.
- PYKE, A. T. et al. Imported Zika Virus Infection from the Cook Islands into Australia, 2014. **PLoS Currents**, v. 6, 2014.
- REED, L. J.; MUENCH, H. A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS¹². **American Journal of Epidemiology**, v. 27, n. 3, p. 493–497, 1938.
- ROBIN, Y.; MOUCHET, J. Serological and entomological study on yellow fever in Sierra Leone. **Bulletin de la Societe de pathologie exotique et de ses filiales**, v. 68, n. 3, p. 249–58, 1975.
- RODRÍGUEZ-LIMAS, W. A.; SEKAR, K.; TYO, K. E. Virus-like particles: the future of microbial factories and cell-free systems as platforms for vaccine development. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, n. 6, p. 1089–1093, 2013.
- RODRÍGUEZ-MORALES, A. J. Zika: The new arbovirus threat for latin america. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 6, p. 684–685, 2015.
- ROHRMANN, G. Baculovirus Molecular Biology. 3rd edition. Bethesda (MD): **National Center for Biotechnology Information (US)**, p. 1–6, 2013.
- ROHRMANN, G. F. Baculovirus structural proteins. **Journal of General Virology**.v. 73, n. 4, p. 749-761, 1992.
- ROLDÃO, A. et al. Virus-like particles in vaccine development. **Expert Ver Vaccines**. v. 9, n. 10, p. 1149–1176, 2010.
- ROTH, A. et al. Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections – an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012–2014. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 41, p. 20929, 2014.
- RUEDA, P. et al. Effect of different baculovirus inactivation procedures on the integrity and immunogenicity of porcine parvovirus-like particles. **Vaccine**. v. 19, n. 7–8, p. 726-734, 2000.
- SALVO, M.A, et al. Zika virus like particles elicit protective antibodies in mice. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 12, n. 2, 2018.

SALUZZO, J. F. et al. Serological survey for arbovirus antibodies in the human and simian populations of the South-East of Gabon. **Bulletin de la Societe de pathologie exotique et de ses filiales**, v. 75, n. 3, p. 262–6, 1982.

SIKKA, V. et al. The emergence of zika virus as a global health security threat: A review and a consensus statement of the INDUSEM Joint working Group (JWG). **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 8, n. 1, p. 3, 2016.

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

STROBEL, B. et al. Comparative Analysis of Cesium Chloride- and Iodixanol-Based Purification of Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors for Preclinical Applications. **Human gene therapy methods**, v. 26, n. 4, p. 147–57, 2015.

SVS. Secretaria de vigilância em saúde. **Boletim Epidemiológico 13**. 2019. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/abril/30/2019-013-Monitoramento-dos-casos-de-arboviroses-urbanas-transmitidas-pelo-Aedes-publicacao.pdf>

SVS. Secretaria de vigilância em saúde. **Boletim Epidemiológico 44**. 2020. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2020/novembro/13/boletim_epidemiologico_svs_44.pdf

SVS. Secretaria de vigilância em saúde. **Boletim Epidemiológico 47**. 2020. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-r/media/pdf/2020/dezembro/11/boletim_epidemiologico_svs_47.pdf

SVS. Secretaria de vigilância em saúde. **Boletim Epidemiológico 03**. 2021. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/fevereiro/01/boletim_epidemiologico_svs_3.pdf

TANG, B. L. Zika virus as a causative agent for primary microencephaly: the evidence so far. **Archives of Microbiology**, v. 198, n. 7, p. 595–601, 2016.

TOGNARELLI, J. et al. A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. **Archives of Virology**, v. 161, n. 3, p. 665–668, 2016.

VAN OERS, M. M.; PIJLMAN, G. P.; VLAK, J. M. Thirty years of baculovirus-insect cell protein expression: from dark horse to mainstream technology. **Journal of General Virology**, v. 96, n. Pt_1, p. 6–23, 2015.

VICENTE, T. et al. Large-scale production and purification of VLP-based vaccines. **J Invertebr Pathol**. 2011.

VICTORA, C. G. et al. Microcephaly in Brazil: how to interpret reported numbers? **The Lancet**, v. 387, n. 10019, p. 621–624, 2016.

WÆHRE, T. et al. Zika virus infection after travel to Tahiti, December 2013. **Emerging infectious diseases**, v. 20, n. 8, p. 1412–4, 2014.

WAGNER, J. M. et al. Enhanced production of Chikungunya virus-like particles using a high-pH adapted Spodoptera frugiperda insect cell line. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. 1–14, 2014.

WILDE, M. et al. Tnao38, high five and Sf9--evaluation of host-virus interactions in three different insect cell lines: baculovirus production and recombinant protein expression. **Biotechnology**

letters, v. 36, n. 4, p. 743–9, 2014.

WILDER-SMITH, A. et al. Zika vaccines and therapeutics: Landscape analysis and challenges ahead. **BMC Medicine**, v. 16, n. 1, p. 1–15, 2018.

WHO. **Statement on the First Meeting of the International Health Regulations (2005) Emergency Committee on Zika Virus and Observed Increase in Neurological Disorders and Neonatal Malformations**. 2016.

WHO. **Who vaccine pipeline tracker**. 2019. Disponível em: https://www.who.int/immunization/research/vaccine_pipeline_tracker_spreadsheet/en/ Acesso em: 5 set. 2019.

WHO. **Zika virus**. 2018. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus>. Acesso em : 05 set. 2019.

ZAMMARCHI, L. et al. Zika virus infections imported to Italy: Clinical, immunological and virological findings, and public health implications. **Journal of Clinical Virology**, v. 63, p. 32–35, 2015.

ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569–572, 2015.

ZITZMANN, J. et al. Process Optimization for Recombinant Protein Expression in Insect Cells. **New Insights into Cell Culture Technology**, 2017.

ZOLOTUKHIN, S., et al. Re-combinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. **Gene Ther**. v. 6, p. 973-985, 1999.