



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCAR

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

**CLONAGEM E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS ESTRUTURAIS (C, prM, E) DE ZIKA
VIRUS (ZIKV)**

**Dissertação de Mestrado
JÉSSICA HILÁRIO BONOMO
São Carlos, Agosto de 2018**

Jéssica Hilário Bonomo

**CLONAGEM E EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS ESTRUTURAIS (C, prM, E) DE ZIKA
VIRUS (ZIKV)**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos como parte do requisito para a obtenção do Título de Mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular – Área de concentração Bioquímica e Biologia Molecular

Orientador: Otavio Henrique Thiemann

Co-Orientadora: Tatiana Faria Watanabe

São Carlos, 2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Jéssica Hilário Bonomo, realizada em 31/08/2018:

Prof. Dr. Otávio Henrique Thiemann
USP

Profa. Dra. Sandra Regina Costa Maruyama
UFSCar

Profa. Dra. Andrea Prado Carnizello Souza
USP

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a minha família, que sempre me assiste e apoia. Minha mãe, Giselle, que me mostra como ter ambição para cumprir objetivos. Meu pai, Elço, que me mostra como aproveitar as coisas pequenas da vida e dedicar-se com paixão a projetos pessoais. Meu irmão, Rafael, que me lembra de que nada é tão sério e uma risada é sempre bem-vinda. E, não menos importante, meu namorado Leonardo, compaheiro de todos os momentos, que celebra comigo os momentos bons e me incentiva e guia nos momentos difíceis. Amo todos vocês incondicionalmente. Vocês foram e são essenciais no meu caminho.

Ao Prof. Dr. Otavio Henrique Thiemann (ou apenas Otavio, como me pediu certa vez), pela oportunidade de fazer esse projeto, pela orientação e pela compreensão.

À Dra. Tatiana Faria Watanabe, querida Taty, pela orientação na teoria e na prática, e pelas incontáveis lições acadêmicas, experimentais e pessoais.

Aos colegas do LBEst: Renata, a amiga mais oposta e ao mesmo tempo similar a mim que já tive! Ana, parceira de catarses e desabafos e frustrações, e também das vitórias! Camila e Nath, sempre dispostas a ajudar com um protocolo, a entender um resultado, discutir sobre a vida, ou simplesmente jogar conversa fora. Evandro, Diego, Tulio, Thomas, Gabi, e todos os outros que passaram por lá e me influenciaram de alguma forma ao longo desses anos.

Aos maravilhosos técnicos Susana Andrea Sculaccio Beozzo, Humberto Pereira e Norma Bianca Saes, do Grupo de Pesquisa de Biologia Estrutural e Cristalografia de Proteínas, por todo o suporte que possibilitou o desenvolvimento desse trabalho, e também ao técnico do Grupo de Biofísica Molecular "Sérgio Mascarenhas", Rafael Spadaccia Panhota. Em especial à Su, que é uma das pessoas sem as quais esse trabalho não existiria.

A meus amigos pessoais de outras fontes:

Pascotto, Lázaro, Guiga, Alô, Hindi. Os caras com quem divido as frustrações e emoções da vida acadêmica, e também muitas referências nerds e piada ruins, vocês deixam São Carlos mais divertida.

Bela, Nath, Amanda, Luara. A melhor Tropa Guia de todos os tempos anda sempre na mente, no coração e junto de mim!

Isa Mastrangelli, como não agradecer sempre a minha melhor e mais antiga amiga, sempre próxima, mesmo que distante. Pode sempre contar comigo, maluquinha!

Fabinho, Julia, André, Amanda, Alessandra, Camila, Gothu, todos os chefes do Grupo Escoteiro São Carlos, Tropas Escoteiras e Sênior, e Clã. Foram vocês quem transformaram São Carlos em casa pra mim. Foi um breve “até logo”, e já estou com o coração apertado, animada pra mais muito tempo de escotismo.

A meus avôs e avós, tios e tias, primos e primas, de primeiro ou segundo grau, de todos os lados! Todos vocês fizeram um pedacinho ou um pedaço do que sou hoje, e espero que minha família seja sempre grande e feliz.

Não posso deixar de agradecer a Fernanda Pallone, grande suporte para minha saúde e equilíbrio.

À Universidade Federal de São Carlos, que deu oportunidade, espaço e estrutura para a minha formação acadêmica.

À Universidade de São Paulo, em particular ao Instituto de Física de São Carlos, pela estrutura onde foi realizado este trabalho.

A CNPq, FAPESP e CAPES, pela concessão de bolsas e apoio financeiro de outras formas. Que a ciência brasileira possa continuar a dispor de apoio tão fundamental para o desenvolvimento do país e sociedade como um todo.

Em conclusão, agradeço a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para que esse trabalho tomasse forma, dos meus pais e orientadores até os funcionários que zelaram pelos meus locais de trabalho e estudo.

RESUMO

Vírus são organismos que dependem da maquinaria celular de hospedeiro para sua replicação, e são relevantes para a saúde humana, de animais e plantas. A ameaça moderna de pandemias emergentes é urgente e, nesse cenário, o *Zika virus* (ZIKV) é um novo exemplo importante, devido a epidemias recentes e a confirmação de seu envolvimento no desenvolvimento congênito e manifestações neurológicas. A capacidade de produzir partículas tipo vírus (VLP, do inglês virus-like particles) e proteínas virais recombinantes pode levar ao melhor entendimento de sua estrutura e ao desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, assim como o entendimento de mecanismos de interação entre vírion e célula hospedeira. Esse estudo tem como objetivo obter a expressão heteróloga de VLPs de ZIKV, assim como proteína do Capsídeo (C) de ZIKV para futuras análises estruturais e para viabilizá-las para a comunidade científica. Uma construção recombinante contendo as três proteínas estruturais de ZIKV (C, prM e E) clonada em vetor pPICZ α foi integrada ao genoma de *Pichia pastoris* para a expressão induzida sob o promotor AOX1. A região codificante da proteína C foi clonada em vetor de expressão de *Escherichia coli* para expressão da proteína isolada e purificação por cromatografia de afinidade utilizando uma sequência de histidinas (6xHis). A integração da região codificante das proteínas C, prM e E foi confirmada por PCR e sequenciamento de nucleotídeos. Resultados mostraram a possibilidade da obtenção de proteínas recombinantes solúveis. A produção da proteína C isolada em *E. coli* foi confirmada e sua purificação realizada através de cromatografia de afinidade. Estes resultados abrem caminho para a produção recombinante de ZIKV que poderão contribuir para o futuro desenvolvimento de terapias eficazes contra a infecção.

Palavras-chave: ZIKV, VLP, Capsídeo, Proteína recombinante

ABSTRACT

Viruses are organisms which depend on the host cellular machinery to replicate, and are relevant to human, livestock and plant health. The modern threat of emerging pandemics is pressing and, in this scenario, *Zika Virus* (ZIKV) is an important recent example, due to recent epidemics and confirmation of its involvement in congenital development and neurological manifestations. The ability to produce recombinant virus like particles (VLPs) and recombinant proteins can lead to the understanding of its structure and the development of new therapeutic approaches, as well as the understanding of interaction mechanisms between the virion and host cell. This study aims to achieve heterologous production of ZIKV VLPs as well as ZIKV Capsid protein for future structural analysis and to make them available to the research community. A recombinant construct containing the three structural proteins of ZIKV (C, prM and E) cloned into pPICZ α vector was integrated in *Pichia pastoris* genome for *AOX1* promoter induced expression. C protein coding region was cloned into *Escherichia coli* expression vector for separate expression and purification by affinity chromatography using a 6xHis tag construct. Integration of the coding region for the proteins C, prM and E in the *P. pastoris* genome was confirmed via PCR and sequencing. Results showed the possibility of obtaining soluble secreted recombinant product. Production of isolated C protein was achieved in *E. coli* and its purification was performed through affinity chromatography.

Keywords: ZIKV, VLP, Capsid, Recombinant protein

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Estimativa da população potencialmente exposta ao vírus Zika por país. (Fonte: Alanis *et al.* 2017, adaptada)27
- Figura 2 – Casos prováveis de doença aguda pelo vírus Zika, por semana epidemiológica, no Brasil, nos anos de 2016, 2017 e 2018 (Fonte: Ministério da saúde)28
- Figura 3 – Casos prováveis de doença aguda por Dengue e Zika, no Brasil, em número absoluto, de 2001 a 2017 (Fonte: DATASUS, autoria própria)28
- Figura 4 - Esquema do genoma e poliproteína de flavivírus, bem como os pontos de clivagem e proteases envolvidas. (Fonte: Blazevic, 2016, adaptada)30
- Figura 5 – Esquema da localização da poliproteína expressa na superfície do retículo endoplasmático do hospedeiro (A) e do processo da captura de membrana lipídica por invaginação para formação do envelope viral (B) (Fonte: Blasevic, 2016).....31
- Figura 6 – Estrutura de um homodímero da proteína de Capsídeo de Dengue (DENV-C) com as hélices-alfa e cavidade hidrofóbica indicadas (a), e modelo da interação entre homodímero de DENV-C com a bicamada lipídica e RNA viral na formação do capsídeo (b). (Fonte: Byk e Garmanik, 2016, adaptada) 32
- Figura 7 – A: Diagrama esquemático da organização dos domínios na sequência de ZIKV-E, representando Domínio I (vermelho), Domínio II (amarelo) e Domínio III (azul médio). Azul claro e azul escuro representam região de ligação entre os domínios e a âncora transmembrana C-terminal, respectivamente. B: Estrutura de um homodímero de ZIKV-E, com indicações dos domínios e estruturas secundárias. Fonte: (Dai *et al.* 2016, adaptada)33
- Figura 8 – Estruturas publicadas de ZIKV: A) ZIKV maduro e corte transversal, resolução de 3,8 Å, publicada por Sirohi *et al.*; B) ZIKV maduro, resolução 4,1 Å, publicada por Kostyuchenko *et al.*; C: ZIKV imaturo e corte transversal, resolução 9 Å, publicada por Prasad *et al.*; as setas grossas indicam regiões de densidade entre o capsídeo e o envelope viral; as setas finas numeradas indicam eixos de simetria icosaédrica. Os triângulos representam a unidade assimétrica. As estruturas são coloridas radialmente de acordo com as barras abaixo de cada conjunto. (Fontes: A: Sirohi *et al.* 2016 B: Kostyuchenko *et al.* 2016 C: Prasad *et al.* 2017)36
- Figura 9 – Mapa do vetor pPICZ α _ZIKV-CprME. BleoR confere resistência ao antimicrobiano zeocina, e está sob ação de promotores ativos em *E. coli* (EM7) e *P. pastoris* (TEF1). As setas internas indicam os genes que expressam as proteínas de interesse. (Autoria própria)43

Figura 10 – Mapa do vetor pET-28a_ZIKV-C. KanR confere resistência ao antibiótico kanamicina. As setas internas indicam proteínas expressas. (Autoria própria)	45
Figura 11 – Mapa do vetor pET-TRX_ZIKV-C. KanR confere resistência ao antibiótico kanamicina. As setas internas indicam proteínas expressas. (Autoria própria)	46
Figura 12 - Esquema da inserção do fragmento CprME no genoma de <i>P. pastoris</i> . As regiões promotora e terminadora de AOX1, presentes no vetor, promovem pareamento do plasmídeo e a região de AOX1 no cromossomo 4 da levedura. A presença de uma extremidade coesiva, produzida na linearização do plasmídeo, inicia o mecanismo de recombinação homóloga da levedura, levando à substituição do gene no cromossomo pelo fragmento CprME. O plasmídeo não é compatível com a replicação em <i>P. pastoris</i> e é degradado ou perdido na geração seguinte. (Autoria própria).	49
Figura 13 – Esquema do colchão de sacarose 20% - 60% para purificação de VLPs. (Autoria própria)	54
Figura 14 – Esquema dos fragmentos amplificados esperados após reação de PCR utilizando diferentes combinações de oligonucleotídeos iniciadores da sequência CprME inserida no genoma de <i>P. pastoris</i> . As caixas mostram o tamanho de cada sequência em pares de base, incluindo tamanho dos fragmentos esperados nas reações controle. (Autoria própria)	56
Figura 15 - PCR de confirmação da inserção do fragmento CprME em <i>P. pastoris</i> X-33. Selvagem se refere a célula não transformada com o vetor, Controle (Ø) se refere a célula transformada com vetor vazio, ou seja, não tendo fragmento inserido no sítio de clonagem. Todas as condições apresentaram fragmentos de acordo com o tamanho esperado (Fig. 1). (Autoria própria)	57
Figura 16 – SDS-PAGE 12% das amostras das culturas de <i>P. pastoris</i> CprME após a indução e de extrato de ZIKV, mostrando banda característica esperada. CprME#1 e #2 são duplicatas biológicas, Ø#1 e #2 são controles transformados com vetor vazio. (Autoria própria)	57
Figura 17 – SDS-PAGE das frações coletadas após ultracentrifugação em gradiente de sacarose (20%-60%) dos lisados celulares e meios extracelulares concentrados de culturas de <i>P. pastoris</i> pPICZα_ZIKV-CprME e pPICZα_Ø. (autoria própria)	58
Figura 18 – SDS-PAGE e Western Blot das frações solúvel e insolúvel de <i>P. pastoris</i> CprME após indução em meio MM por 72 h. M: marcador molecular, NI: Não induzido (controle negativo). (autoria própria)	59
Figura 19 – PCR para amplificação de ZIKV-C a partir de pPICZα_ZIKV-CprME	60

Figura 20 – PCR confirmando a inserção de ZIKV-C em pET-TRX e pET-28a. (Autoria própria) 61

Figura 21 – SDS-PAGE das frações solúvel e insolúvel de 3 clones de *E. coli* Rosetta Gami 2 pET-TRX_ZIKV-C após 16 h de indução. A seta aponta para a banda correspondente à proteína TRX_ZIKV-C. (Autoria própria)

.....62

Figura 22 - SDS-PAGE das frações solúvel e insolúvel de *E. coli* Rosetta Gami 2 pET-TRX_ZIKV-C após 16 h de indução e lisado total no momento da indução (t₀), sob diferentes formas de indução, sendo IPTG: 0,5 mM de IPTG adicionado à cultura; TB: autoindução em meio de cultivo TB modificado, e diferentes temperaturas. A seta aponta para a banda correspondente à proteína TRX_ZIKV-C. (Autoria própria)

.....62

Figura 23 - SDS-PAGE de amostras de *E. coli* C43 pET-28a_ZIKV-C no momento da indução (t₀), após 4 horas de indução (t₄), e frações solúvel e insolúvel após 16 horas de expressão (t_f e insol, respectivamente). A indução foi feita com a adição de 0,5 mM IPTG. A seta aponta para a banda correspondente à proteína ZIKV-C. (Autoria própria)

.....63

Figura 24 - SDS-PAGE do ensaio de purificação de TRX_ZIKV-C em Ni-NTA. 1: Lisado total; 2: Fração não ligada; 3: Eluído com imidazol 300 mM; 4: Eluído com tampão de amostra. #1, #2 e #3 se referem a 3 clones diferentes de *E. coli* pET-TRX_ZIKV-C. (Autoria própria)

.....64

Figura 25 - SDS-PAGE do ensaio de purificação de TRX_ZIKV-C em TALON®. 1: Lisado total; 2: Fração não ligada; 3: Eluído com Imidazol 100 mM. (Autoria própria)

.....65

Figura 26 - SDS-PAGE e Western Blot do ensaio de purificação de TRX_ZIKV-C e TRX_GFP em TALON®.+: Controle positivo, 32 kDa; 1: Lisado total; 2: Fração não ligada; 3: Eluído com imidazol 100 mM. (Autoria própria)

.....66

Figura 27 - SDS-PAGE e Western Blot do ensaio de purificação de ZIKV-C em TALON®. +: Controle positivo, 15 kDa; 1: Lisado no momento da indução; 2: Fração solúvel após indução; 3: Fração insolúvel após indução; 4: Eluído. (Autoria própria)

.....66

Figura 28 - SDS-PAGE e Western Blot do ensaio de purificação de ZIKV-C, expressa em diferentes temperaturas, em TALON®. +: Controle positivo, 15 kDa; 1: Fração insolúvel; 2: Fração solúvel; 3: Purificação de cultura induzida por 3 horas; 4: Purificação de cultura induzida por 16 horas. (Autoria própria)

.....67

Figura 29 – A: Cromatograma da purificação por afinidade na resina TALON® de ZIKV-C. A concentração de tampão de eluição (250mM de imidazol) variou de 0% a 100% em 3 volumes de coluna. B: SDS-PAGE e Western Blot da fração solúvel (1), fração não ligada (2) e amostra referente ao pico eluído (3). (Autoria própria)

.....68

Figura 30 – A: Cromatograma de Exclusão molecular de ZIKV-C purificada em TALON. B: Gel de poliacrilamida dos picos coletados e western blot mostrando a presença de ZIKV-C na fração 10. L: Marcador molecular; +: Controle positivo. (Autoria própria)70

Figura 31 - A: Cromatograma de purificação em TALON de ZIKV-C. B: Gel de poliacrilamida e western blot dos picos coletados. FS: Fração Solúvel. NE: Não Ligado. L: Lavagem. As amostras 1-13 estão concentradas 100x. (Autoria própria)72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Meios de cultura utilizados no presente estudo e seções em que são mencionados	41
Tabela 2 - Tampões utilizados no presente estudo e seções em que são mencionados	42
Tabela 3 – Primers utilizados para a amplificação do fragmento ZIKV-C para clonagem em pET-28a e pET-TRX.....	44

ABREVIATURAS E SIGLAS

AOX1	Promotor de Álcool Oxidase 1
C	Proteína do Capsídeo
Cryo-EM	Crio-microscopia eletrônica
DATASUS	Departamento de Informática do SUS
dATPs	Desoxiadenosina Trifosfatada
DENV	Dengue virus (Vírus da Dengue)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês Deoxynucleic Acid)
DOXnm	Densidade óptica a X nanômetros
DTT	Ditiotreitol
dTTPs	Desoxitirosina Trifosfatada
E	Proteína do Envelope
EC	Tampão de lise EC
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês Ethylenediamine tetraacetic acid)
GFP	Proteína Fluorescente Verde (do inglês Green Fluorescent Protein)

ICB	Instituto de Ciências Biológicas
ILHV	Ilheus Virus
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactoside
JEV	Japanese encephalitis virus (vírus da encefalite japonesa)
LB	Meio de Cultura Lisogênico (do inglês, Lysogeny broth)
LIC	Clonagem Independente de Ligase (do inglês Ligase Independent Cloning)
MOPS	Ácido morfolino-propanosulfônico (do nome oficial 3-[N-Morpholino] Propanesulfonic Acid)
NCBI	National Center for Biotechnological Information (Centro Nacional de Informação Biotecnológica dos Estados Unidos da América)
NLP	Partícula tipo nucleocapsídeo (do inglês Nucleocapsid-Like Particle)
NS	Proteína Não-estrutural (do inglês Non-Structural)
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	Pares de base
PBS	Tampão
PBST	Tampão PBS adicionado de Tween 20 a 0,05%

PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês Polymerase Chain Reaction)
PEG	Polietilenoglicol
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil (do inglês Phenylmethylsulfonyl Fluoride)
PP	Tampão de lise PP
prM/M	Proteína pré-membrana/Membrana
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês Ribonucleic Acid)
SDS	Dodecil sulfato de sódio (do inglês Sodium Dodecyl Sulfate)
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (do inglês SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
SUS	Sistema Único de Saúde
TB	Meio de cultivo TB modificado
TCA	Ácido Tricloroacético (do inglês Trichloroacetic acid)
TEV	Tobacco etch virus
TRX	Proteína Tiorredoxina
VC	Volume de Coluna
VLP	Partícula tipo virus (do inglês Virus-Like Particle)

WNV	West Nile virus (virus do Nilo ocidental)
YFV	Yellow Fever virus (virus da Febre Amarela)
YPD	Extrato de Levedura + Peptona + Dextrose) (do inglês Yeast extract + Peptone + Dextrose)
YPDS	Meio YPD adicionado de sorbitol
ZIKV	Zika virus (vírus Zika)

SUMÁRIO

1	Introdução	26
1.1	Contextualização	26
1.2	Flavivírus e o Zika vírus	29
1.3	Genoma e proteínas de flavivírus	30
1.4	Estruturas publicadas de Zika vírus	34
1.5	Vírus Like Proteins e Nucleocapsid Like Proteins	34
2	Objetivos	39
2.1	Objetivo geral	39
2.2	Objetivos específicos	39
3	Material e Métodos	41
3.1	Composição dos meios de cultura e tampões utilizados	41
3.2	Obtenção e clonagem dos genes ZIKV-CprME e ZIKV-C	43
3.2.1	ZIKV-CprME	43
3.2.2	ZIKV-C	44
3.2.2.1	Clonagem da sequência ZIKV-C em pET-28a	44

3.2.2.2	Clonagem de ZIKV-C em pET-TRX	44
3.3	Integração de ZIKV-CprME em <i>Pichia pastoris</i>	47
3.3.1	Preparo de <i>Pichia pastoris</i> X-33.....	47
3.3.2	Transformação de pPICZ α _ZIKV-CprME em <i>P. pastoris</i>	47
3.4	Construção de <i>Escherichia coli</i> recombinante	49
3.4.1	<i>E. coli</i> TOP10 pET-28a_ZIKV-C e <i>E. coli</i> TOP10 pET-TRX_ZIKV-C.....	50
3.4.1.1	Preparação de <i>E. coli</i> TOP 10 competente	50
3.4.1.2	Transformação dos vetores em <i>E. coli</i> TOP 10	50
3.4.2	<i>E. coli</i> Rosetta Gami 2 pET-TRX_ZIKV-C e <i>E. coli</i> C43 pET-28a_ZIKV-C ..	50
3.4.2.1	Preparação de <i>E. coli</i> Rosetta Gami 2 e <i>E. coli</i> C43 eletrocompetentes	50
3.4.2.2	Transformação dos vetores em <i>E. coli</i> Rosetta Gami 2 e <i>E. coli</i> C43.....	51
3.5	Expressão de ZIKV-CprME em <i>Pichia pastoris</i>	51
3.6	Expressão de ZIKV-C em <i>Escherichia coli</i>	52
3.6.1	Indução por adição de IPTG	52
3.6.2	Expressão por meio de autoindução	52
3.6.3	Lise celular e análise da expressão	52
3.6.4	Western Blot	53

3.7	Lise de <i>P. pastoris</i> e purificação de ZIKV-CprME	54
3.7.1	Precipitação de proteínas com Ácido Tricloroacético (TCA)	54
3.8	Purificação de ZIKV-C	55
4	Resultados e Discussão	56
4.1	ZIKV-CprME	56
4.1.1	Clonagem do gene em <i>Pichia pastoris</i> e integração no genoma	56
4.1.2	Expressão de ZIKV-CprME e purificação de VLPs	57
4.2	Expressão e purificação de ZIKV-C	60
4.2.1	Clonagem de ZIKV-C a partir de ZIKV-CprME em vetores de expressão e transformação em <i>E. coli</i> 60	
4.2.2	Expressão de ZIKV-C em <i>E. coli</i>	61
4.2.3	Purificação de ZIKV-C	63
5	Conclusão	75
6	Perspectivas	77
7	Referências	79

1 Introdução

1.1 Contextualização

A doença causada pelo *Zika Virus* (ZIKV, gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*) é uma doença febril aguda, que apresenta quadro clínico semelhante ao causado por outros arbovírus, como o Dengue vírus (DENV) e Chikungunya, apresentando febre, vermelhidão e erupções cutâneas, conjuntivite, dores musculares e nas articulações, dor de cabeça e mal-estar. Devido à semelhança dos sintomas com os de outras doenças, o diagnóstico pode ser difícil, podendo ser confirmado apenas com exames laboratoriais sorológicos ou de PCR. Além disso, estima-se que até 80% dos infectados não apresentam sintomas, dificultando as ações de prevenção de transmissão. O período de incubação deste vírus é desconhecido, provavelmente durando alguns dias, e o período sintomático, quando presente dura de dois a sete dias (Ministério da Saúde (Brasil), 2015).

A “Zika”, como é conhecida popularmente, ganhou repercussão mundial em 2015, quando no nordeste brasileiro foi correlacionado o aumento de casos de microcefalia em recém-nascidos com a infecção pelo vírus (Brasil *et al.*, 2016; Oliveira Melo *et al.*, 2016) além de outras manifestações neurológicas, incluindo encefalites e síndrome de Guillain-Barré (Cao-Lormeau *et al.*, 2016; Krauer *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2016). O avanço de estudos dos efeitos do vírus durante a gravidez (Aragao *et al.*, 2017; Franca *et al.*, 2016; Krauer *et al.*, 2017; Ventura *et al.*, 2018) sugere que a microcefalia compõe apenas uma parte de uma síndrome maior, nomeada Síndrome Congênita do Vírus Zika. Essa síndrome inclui malformações neurológicas e oculares com deficiência visual, perda auditiva, hidrocefalia, deformidades articulares e alterações de tônus muscular e postura. O acompanhamento das crianças identificadas com a Síndrome Congênita do Vírus Zika é essencial e deve revelar novos efeitos e mecanismos que levam a essa síndrome.

A doença é transmitida principalmente através da inoculação do vírus na corrente sanguínea por mosquitos do gênero *Aedes*, sendo que outros meios de transmissão foram também documentados e incluem a transmissão vertical (de mãe para filho), transfusão sanguínea e pelo ato sexual (Besnard, Lastere e Teissier, 2014; Foy *et al.*, 2011; Musso *et al.*, 2014; Oliveira Melo *et al.*, 2016). A determinação da população

vulnerável ao vírus é feita principalmente a partir da presença de possíveis vetores, e estima-se que aproximadamente 3,3 milhões de pessoas estão em regiões onde há exposição ao ZIKV (Figura 1) (Alaniz, Bacigalupo e Cattan, 2017).

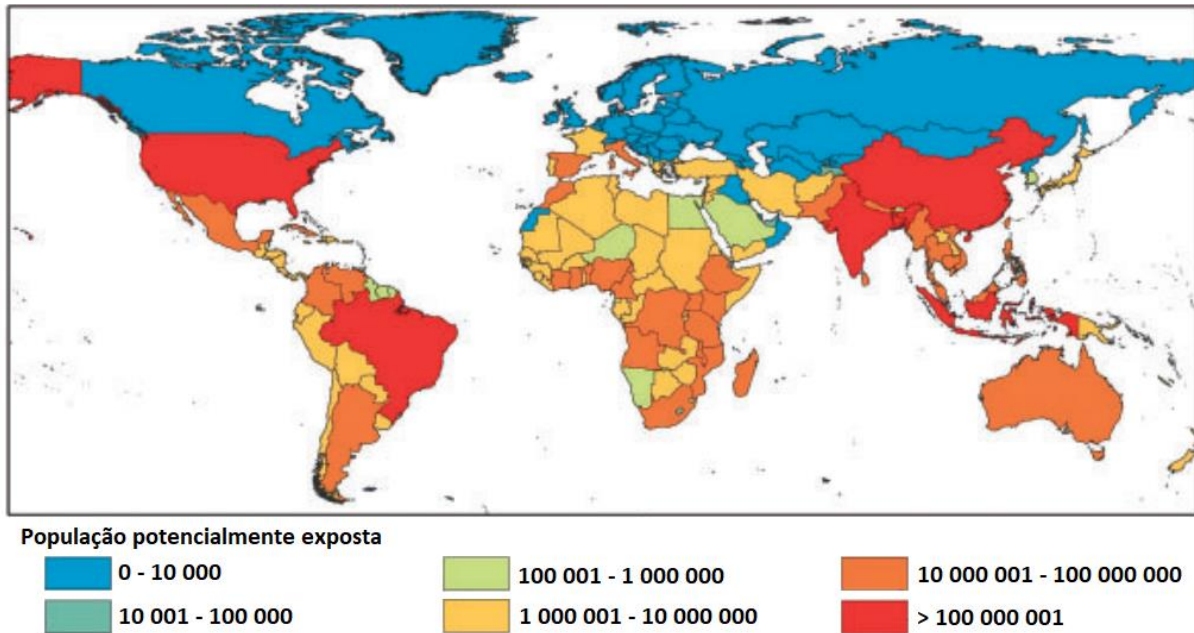


Figura 1 – Estimativa da população potencialmente exposta ao vírus Zika por país. (Fonte: Alaniz *et al.* 2017, adaptada)

No Brasil, a partir de 17/02/2016, a doença aguda pelo vírus Zika é de notificação compulsória determinada pelo Ministério da Saúde em todo o território nacional (Ministério da Saúde (Brasil), 2016). O último boletim epidemiológico publicado pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde relata tais notificações até 23/06/2018. Foram registrados nesse período, 239 202 casos prováveis de infecção por Zika, sendo 216 207 em 2016, 17 594 em 2017 e 5 401 em 2018 (Figura 2). No período de 08/11/2015 a 14/04/2018 foram registrados 6 705 casos de alterações no crescimento e desenvolvimento possivelmente relacionadas à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas, sendo 3 149 confirmados, 2 795 ainda em investigação e os demais prováveis ou inconclusivos (Secretaria de Vigilância em Saúde (Brasil), 2018).

Apesar de os dados mostrarem clara queda nas taxas de incidência das infecções por ZIKV, não se pode assumir que a doença está controlada e deve permanecer com baixos índices de infecção. A Dengue, assim como a Zika, é uma doença febril aguda causada por vírus da família *Flaviviridae* e transmitida principalmente através de picada de *Aedes* spp. No Brasil, o número de casos prováveis de infecção por Dengue entre 2001 e 2017, retirado do Sistema DATASUS e boletins epidemiológicos publicados pelo

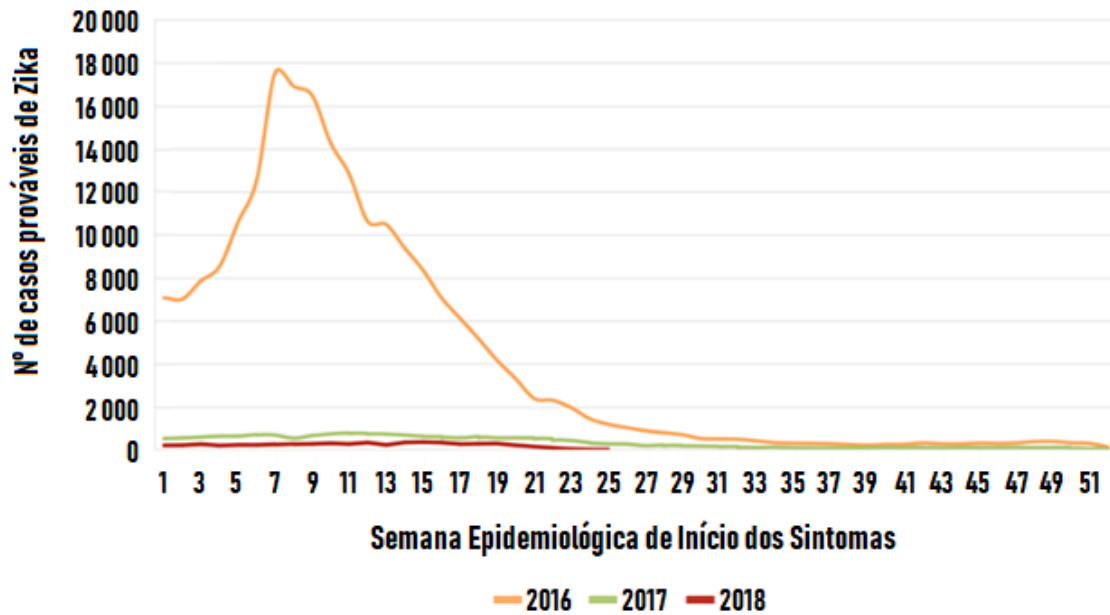


Figura 2 – Casos prováveis de doença aguda pelo vírus Zika, por semana epidemiológica, no Brasil, nos anos de 2016, 2017 e 2018 (Fonte: Ministério da saúde)

Ministério da Saúde, é apresentado na Figura 3. É possível observar a existência de flutuações, com tendência ao aumento da média.

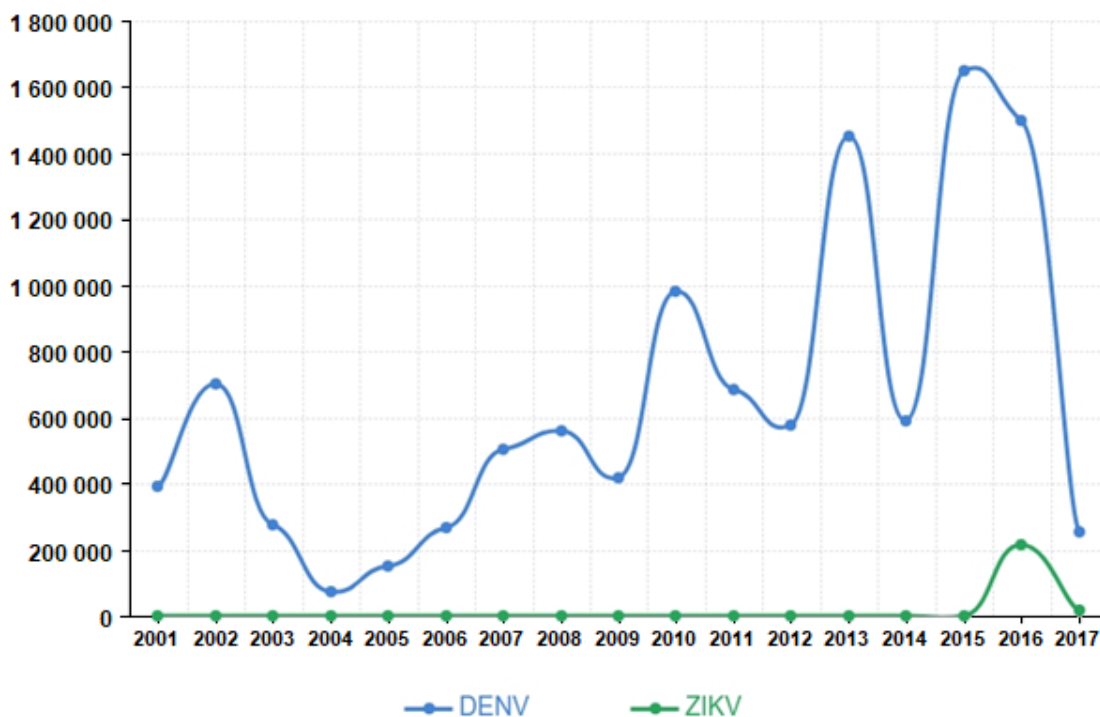


Figura 3 – Casos prováveis de doença aguda por Dengue e Zika, no Brasil, em número absoluto, de 2001 a 2017 (Fonte: DATASUS, autoria própria)

Zika e Dengue possuem 55% de identidade de aminoácidos considerando todas as proteínas expressas, a maior em relação a outros flavivírus de importância para a

saúde humana (YFV, WNV, DENV, JEV) (Chang *et al.*, 2017), e possuem similares quadros clínicos, modo de transmissão e distribuição geográfica.

Se estendermos tal comparação à epidemiologia, podemos ver a possibilidade do retorno dos índices de infecção por ZIKV aos valores de 2016 ou até mesmo ultrapassá-los, sendo importante a continuidade de estudos sobre este agente para traçar estratégias de prevenção, tratamento e controle de epidemias no futuro.

1.2 *Flavivírus e o Zika vírus*

A família *Flaviviridae*, que abriga vírus simétricos, envelopados, de RNA de fita simples e positiva, possui 4 gêneros, incluindo *Flavivirus*, que agrupa 53 espécies conhecidas. Este gênero comporta um grupo vírus de vertebrados, em sua maioria transmissíveis por vetores artrópodes, incluindo o *Zika virus*. O gênero também inclui outros vírus conhecidos popularmente e importantes para a saúde global, como Dengue (DENV), Febre Amarela (YFV), Vírus do Nilo Ocidental (WNV), Vírus da Encefalite Japonesa (JEV), e Ilhéus Vírus (ILHV) (Simmonds *et al.*, 2017).

O vírus Zika foi inicialmente descoberto em 1947, na floresta de Zika (a partir da qual teve seu nome sugerido), localizado em Uganda, isolado a partir do antissoro de macaco rhesus. No ano seguinte, foi isolado de *Aedes africanus*, levantando a hipótese de que este seria um vetor viral (Dick *et al.* 1952). Em 1952, foram identificados casos de infecção em humanos na Uganda e Tanzânia, através de análise sorológica (Smithburn, 1952).

Durante as décadas seguintes, houve o registro de casos da infecção em humanos, apresentando sintomas leves de doença febril aguda, sem o registro de mortes. Através de análises sorológicas em humanos, mapeou-se o avanço do vírus pela África ocidental e Ásia (Faye *et al.*, 2014; Hadow *et al.*, 2012, Olson *et al.*, 1981).

Apenas em 2007, foi registrada a primeira epidemia de Zika em humanos, na ilha de Yap, Micronésia, quando estima-se que 73% da população foi infectada (Duffy *et al.*, 2009). Em 2013 e 2014, ocorreram epidemias em outros grupos de ilhas do pacífico (Cao-Lormeau *et al.*, 2016; Musso *et al.*, 2014; Roth *et al.*, 2014), quando foram observados os primeiros indícios de sintomas neurológicos e complicações congênitas,

assim como foi documentada a transmissão vertical (Besnard, Lastere e Teissier, 2014, Carod-Artal, 2016)

No primeiro semestre de 2015, ocorreu no Brasil uma epidemia de doença febril aguda, na qual de 425 amostras de sangue testadas, apenas 13% se apresentaram positivas para Dengue, a principal suspeita de doenças febris no Brasil na época (Ministério da Saúde (Brasil), 2015). Em maio daquele ano, a Organização Mundial de Saúde (OMS) emitiu um alerta epidemiológico sobre o Zika, informando a possível circulação do vírus no nordeste brasileiro. Em outubro, o número reportado de casos de microcefalia no Brasil aumentou significativamente. Um ano depois, surgiram as primeiras hipóteses de correlação entre esse aumento e a epidemia de Zika, posteriormente confirmada (Araújo, de *et al.*, 2016; Oliveira Melo *et al.*, 2016). Este perfil mostra que a doença encontrou no Brasil uma população sensível a infecção e as condições ideais de disseminação, uma vez que estudos epidemiológicos realizados nas ilhas Yap e Polinésia Francesa revelaram uma alta prevalência do vírus em humanos, sem ocasionar sintomatologia expressiva (Duffy *et al.*, 2009; Musso *et al.*, 2014).

1.3 Genoma e proteínas de flavivírus

O genoma de flavivírus é composto por uma molécula de RNA de fita simples e positiva (ssRNA+), que codifica para 10 diferentes proteínas, sendo 3 proteínas estruturais (Capsídeo, ou C; prM/M, ou pré-Membrana/Membrana; Envelope, ou E) e 7 proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). A molécula de RNA é traduzida em uma única poliproteína na superfície do retículo endoplasmático da célula hospedeira, que sofre ação de proteases virais e do hospedeiro, resultando nas 10 proteínas citadas (Figura 4). A montagem do vírion, então, ocorre no interior do retículo endoplasmático, e sua maturação no complexo golgiense (Blazevic *et al.*, 2016).

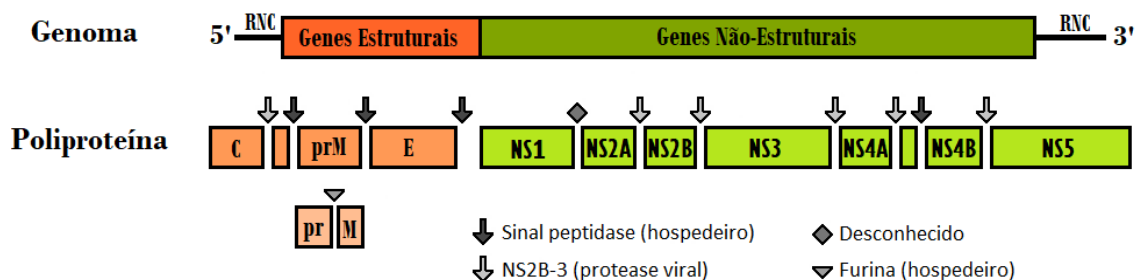


Figura 4 - Esquema do genoma e poliproteína de flavivírus, bem como os pontos de clivagem e proteases envolvidas. (Fonte: Blazevic 2016, adaptada)

A proteína C é a primeira a ser expressa, no citoplasma, e é seguida por prM, a qual se liga através de uma porção transmembrana chamada de âncora, localizada entre as porções C-terminal de C e N-terminal de prM, causando a translocação de prM para o interior do retículo. A âncora é clivada por processos proteolíticos envolvendo uma sinal-peptidase do hospedeiro e uma protease viral (NS2B-3). Estudos sugerem que essas clivagens são importantes para a construção do vírion e sua posterior maturação (Amberg e Rice, 1999; Roby *et al.*, 2015; VanBlargan *et al.*, 2015). A proteína E é também localizada no lúmen do retículo endoplasmático (Figura 5A).

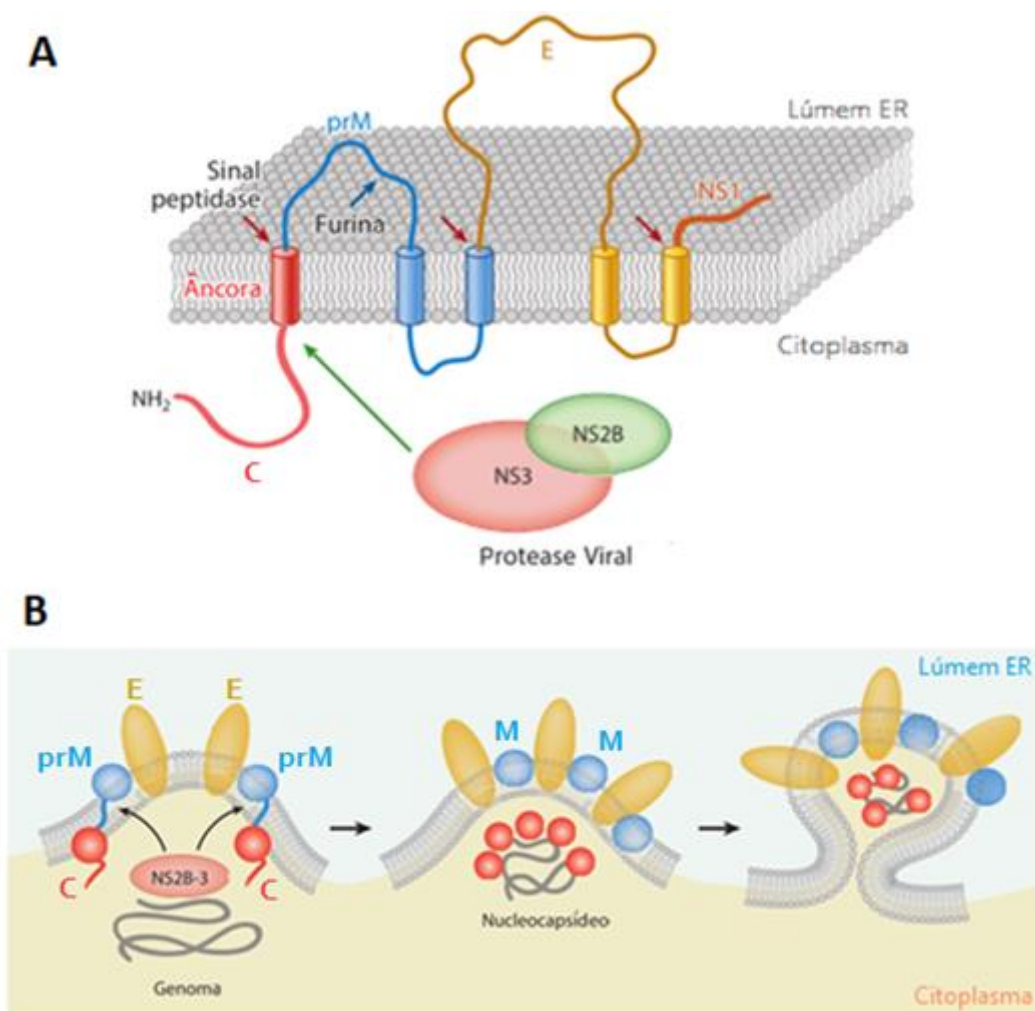


Figura 5 – Esquema da localização da poliproteína expressa na superfície do retículo endoplasmático do hospedeiro (A) e do processo da captura de membrana lipídica por invaginação para formação do envelope viral (B) (Fonte: Blasevic 2016)

A proteína C, juntamente com a fita de RNA genômico, formam o capsídeo viral. Esta é uma proteína pequena (12-14 kDa), que apresenta alta proporção de aminoácidos básicos, apresentando regiões conservadas de hidrofobicidade. Sua estrutura é formada

por 4 alfa-hélices e uma porção N-terminal flexível e altamente positiva. Em solução, apresenta estrutura quaternária de homodímero ligado pela face formada pelas hélices $\alpha 2$ e $\alpha 4$ de cada monômero, e apresenta afinidade por membranas e ácidos nucleicos. A estrutura do homodímero apresenta uma cavidade hidrofóbica formada por $\alpha 2$ e $\alpha 1$, e a face oposta hidrofílica, correspondente a $\alpha 4$ (Figura 6A) (Byk e Gamarnik, 2016; Chambers *et al.*, 1990). Estudos sugerem que a face hidrofílica é responsável pela interação com o RNA genômico, enquanto a cavidade hidrofóbica se liga à membrana do retículo endoplasmático, que será usada na formação do envelope viral (Figura 6B) (Byk e Gamarnik, 2016). Estudos estruturais e de interação da proteína C são dificultados pela tendência a agregação da proteína, principalmente em presença de ácidos nucleicos, sendo que o processo de agregação e formação do capsídeo não é ainda completamente conhecido. O capsídeo é formado por uma molécula do RNA genômico e várias cópias de C, e não possui simetria conhecida.

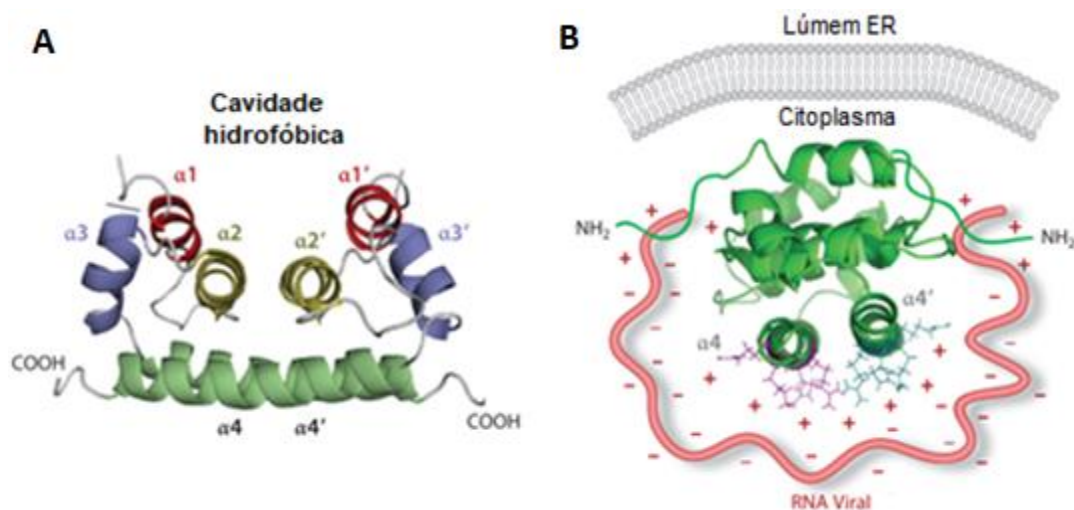


Figura 6 – Estrutura de um homodímero da proteína de Capsídeo de Dengue (DENV-C) com as hélices-alfa e cavidade hidrofóbica indicadas (a), e modelo da interação entre homodímero de DENV-C com a bicamada lipídica e RNA viral na formação do capsídeo (b). (Fonte: Byk & Garmanik, 2016, adaptada)

A proteína prM, precursora de M, é também pequena (18-19kDa). A clivagem do fragmento “pr” está diretamente ligada à maturação do vírion, ocorrendo nos últimos passos que antecedem a saída do mesmo da célula hospedeira e provocando significativa mudança estrutural. Tal clivagem é feita por uma protease furina do hospedeiro e a mudança estrutural é promovida pela diminuição de pH na fase final da via de secreção celular (Byk e Gamarnik, 2016; Heinz e Allison, 2003). A porção “M” possui duas regiões hidrofóbicas, que ancoram a proteína ao envelope.

A proteína E é a mais importante do envelope viral, sendo responsável pela interação com receptores e fusão à membrana de células hospedeiras, além de ser alvo de anticorpos, pois cobre toda a superfície do vírion maduro. Tendo 53-54 kDa, é a maior das proteínas estruturais de flavivírus, e se liga à membrana do envelope por uma região hidrofóbica no C-terminal. A separação de suas vizinhas na poliproteína, prM e NS1, ocorre através de sinal-peptidases do hospedeiro. Estruturalmente, é dividida em três domínios (DI, DII e DIII), além da âncora hidrofóbica no C-terminal, já citada (Figura 7). DI apresenta estrutura de barril- β com oito fitas antiparalelas, DII tem estrutura alongada, contendo fitas- β , loops e duas pequenas α -hélices, e DIII tem estrutura tipo-imunoglobulina (Dai *et al.*, 2016).

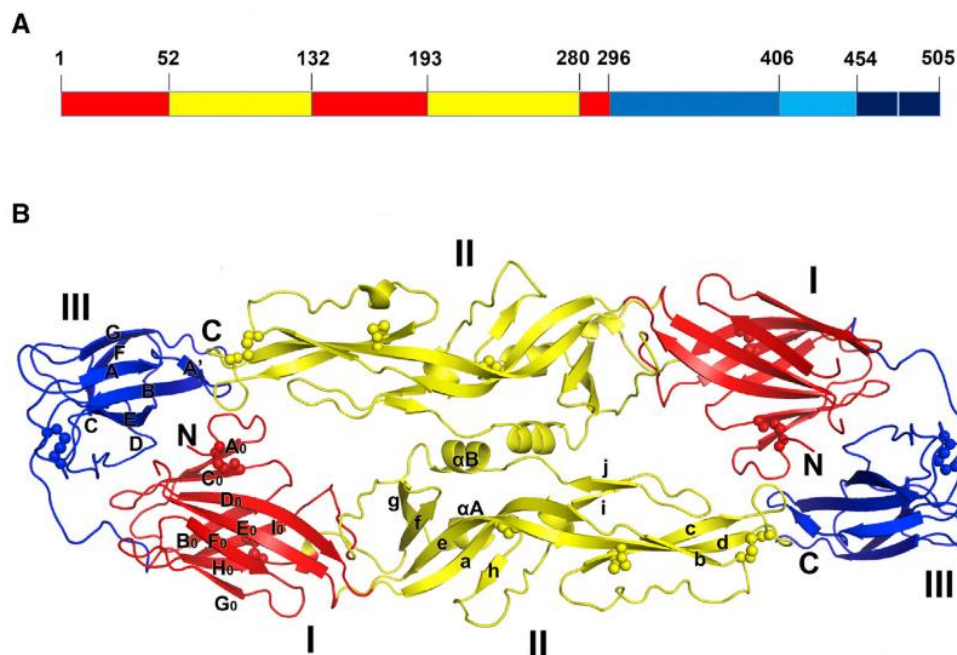


Figura 7 – A: Diagrama esquemático da organização dos domínios na sequência de ZIKV-E, representando Domínio I (vermelho), Domínio II (amarelo) e Domínio III (azul médio). Azul claro e azul escuro representam região de ligação entre os domínios e a âncora transmembrana C-terminal, respectivamente. B: Estrutura de um homodímero de ZIKV-E, com indicações dos domínios e estruturas secundárias. A₀, B₀, C₀, D₀, E₀, F₀, G₀, H₀, I₀ são fitas do Domínio I; a, b, c, d, e, f, g, h, i, j são fitas do Domínio II; A', A, B, C, D, E, F, G são fitas do Domínio III; α A e α B são hélices do Domínio II. Fonte: (Dai *et al.* 2016, adaptada)

As proteínas C, M/prM e E compõem o vírion, e suas características, portanto, são essenciais a sua estrutura. Um vírion de flavivírus contém uma cópia do RNA genômico envolta por diversas cópias de C, formando o nucleocapsídeo, que interage com uma bicamada lipídica, pela qual é envolto, onde se ancoram 180 cópias de prM/M e 180 cópias de E.

Na forma imatura, E e prM formam heterotrímeros, resultando em 60 estruturas proeminentes na superfície do vírion, que tem diâmetro aproximado de 600 Å. A forma madura do vírion tem diâmetro pouco menor, próximo de 500 Å. Nesta configuração, a proteína E forma 90 homodímeros com interface entre DII e DII' e entre DI e DIII'. Tendo a porção "pr" clivada, "M" acomoda-se abaixo de E e acima da bicamada lipídica, que não tem porções expostas na superfície do vírion. O vírion tem estrutura icosaédrica, sendo que 3 homodímeros paralelos de E formam um *raft* tetraédrico e a unidade assimétrica se trata de unidades da proteína E paralelas (Simmonds *et al.*, 2017).

1.4 Estruturas publicadas de Zika vírus

Até julho de 2018, foram publicadas três estruturas de ZIKV resolvidas por criomicroscopia eletrônica (Cryo-EM) (Figura 8), sendo uma do vírion imaturo (9Å) e duas do vírion maduro (3,7 Å e 3,8Å) (Kostyuchenko *et al.*, 2016; Prasad *et al.*, 2017; Sirohi *et al.*, 2016). As estruturas mostram que o ZIKV apresenta a estrutura esperada para flavivírus, apresentando 180 cópias de E e prM/M na superfície de simetria icosaédrica.

Apesar de não ser possível construir um modelo do capsídeo a partir das densidades observadas, a estrutura imatura do ZIKV apresenta, abaixo das proeminências superficiais, densidade que conecta o capsídeo à bicamada lipídica, sugerindo a interação entre elas, o que pode indicar a existência de simetria do capsídeo, nessa forma. No entanto, são necessárias investigações mais profundas para a resolução da estrutura do capsídeo viral no interior do envelope, já que esta pode fornecer informações sobre a construção do vírion e oferecer a oportunidade de guiar o desenvolvimento de medicamentos.

1.5 Vírus Like Proteins e Nucleocapsid Like Proteins

A expressão heteróloga de proteínas estruturais de vírus pode levar à formação de Vírus Like Particles (VLP, Partículas Tipo Vírus), que são estruturas semelhantes a vírions, porém desprovidos do genoma viral. Tais VLPs são importantes para o estudo de vírus em relação a sua estrutura e invasão celular já que não são infecciosas e tem

produção mais simples e rápida comparado ao isolamento de partículas virais a partir de culturas de células infectadas.

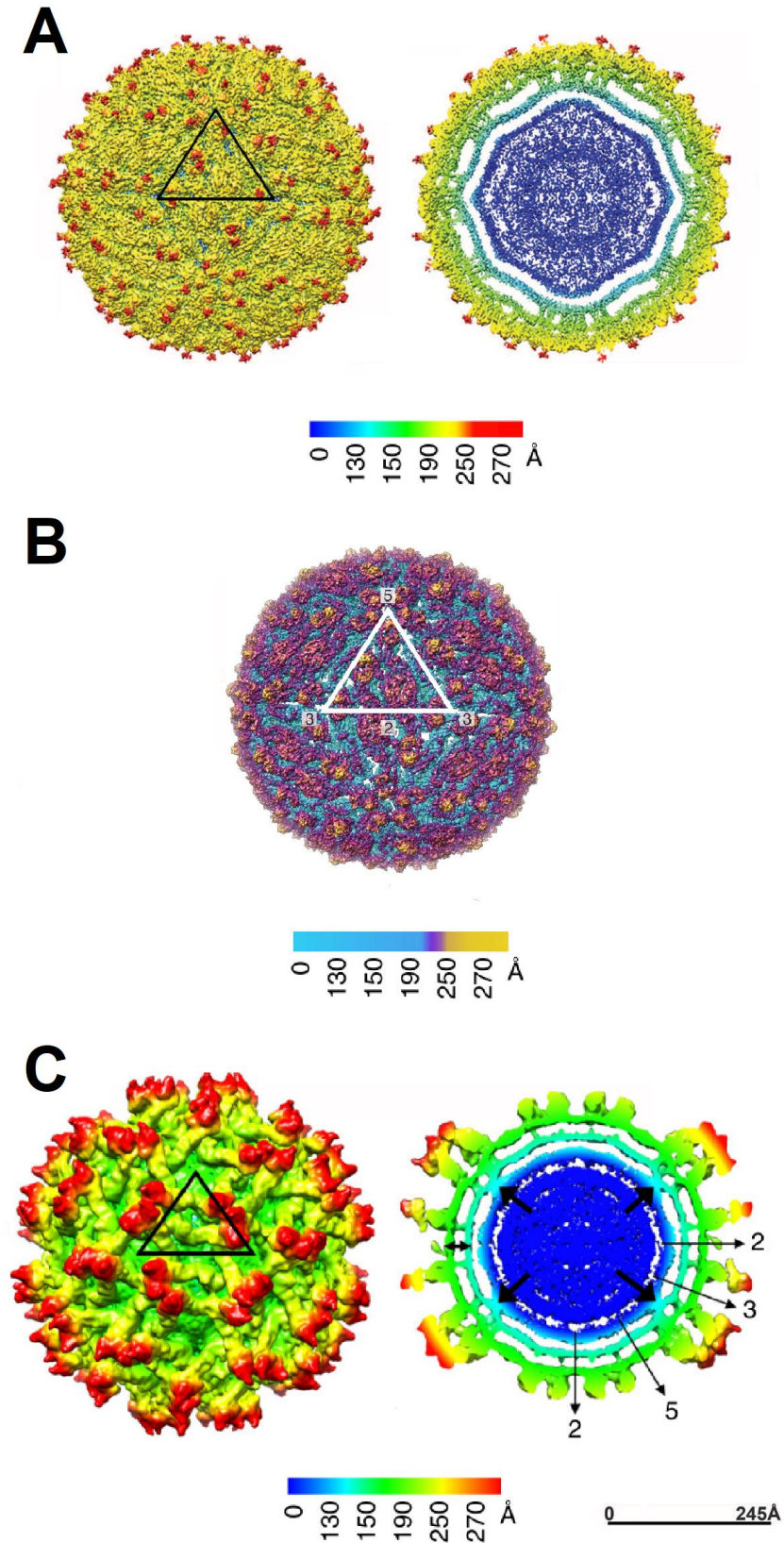


Figura 8 – Estruturas publicadas de ZIKV: A) ZIKV maduro e corte transversal, resolução de 3,8 Å, publicada por Sirohi *et al.*; B) ZIKV maduro, resolução 4,1 Å, publicada por Kostyuchenko *et al.*; C: ZIKV imaturo e corte transversal, resolução 9 Å, publicada por Prasad *et al.*; as setas grossas indicam regiões de densidade entre o capsídeo e o envelope viral; as setas finas numeradas indicam eixos de simetria icosaédrica. Os triângulos representam a unidade assimétrica. As estruturas são coloridas radialmente de acordo com as barras abaixo de cada conjunto. (Fontes: A: Sirohi *et al.* 2016 B: Kostyuchenko *et al.* 2016 C: Prasad. *et al.* 2017)

Dada a dificuldade de tratamento de infecções virais e os possíveis danos por elas causados, como por exemplo sintomas neurológicos e graves efeitos teratogênicos em infecções por ZIKV, a melhor ação para o seu combate é a prevenção por campanhas de controle do vetor e imunização da população suscetível.

Também nesse aspecto vemos a importância de VLPs: sua antigenicidade possibilita seu uso para estudos imunológicos, produção de vacinas e métodos de diagnóstico (Liu, Jiang e Zhou, 2010; Mani *et al.*, 2013; Murrell, 2010; Nguyen *et al.*, 2016; Shustov, Mason e Frolov, 2007; To *et al.*, 2018).

Seguindo a mesma lógica da produção de VLPs, há esforços para a produção de Partículas Tipo Nucleocapsídeo (NLPs, Nucleocapsid Like Particles), expressando-se não todas as proteínas estruturais do vírus, mas apenas aquela constituinte do nucleocapsídeo (C). A estrutura de capsídeos de flavivírus e seu mecanismo de formação ainda são desconhecidos, e o estudo de NLPs é uma possível via para esses avanços.

Dessa forma, este projeto teve como foco a produção de VLP e NLP para contribuir no esforço da comunidade científica que se dedica ao tratamento e diagnóstico rápido do ZIKV.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

O desenvolvimento de protocolo para a produção e purificação de VLPs de *Zika virus*, assim como de sua proteína do Capsídeo (C), para caracterização estrutural do vírus.

2.2 Objetivos específicos

- I. Produção recombinante das proteínas C, prM e E de ZIKV em *Pichia pastoris*.
- II. Produção recombinante da proteína de capsídeo de ZIKV (ZIKV-C) em *Escherichia coli*.
- III. Purificação dos VLPs expressos por ultracentrifugação e cromatografia.
- IV. Purificação de ZIKV-C recombinante por cromatografia
- V. Caracterização estrutural dos VLPs e ZIKV-C

3 Material e Métodos

3.1 Composição dos meios de cultura e tampões utilizados

Todos os meios de cultura e tampões utilizados estão descritos nas Tabelas 1 e 2, com indicação das seções em que são mencionados.

Tabela 1 - Meios de cultura utilizados no presente estudo e seções em que são mencionados

Seção	Meio	Composição
3.3.1; 3.5	YPD	1% m/v Extrato de levedura 2% m/v Peptona 2% m/v Glicose
3.3.2	YPDS	1% m/v Extrato de levedura 2% m/v Peptona 2% m/v Glicose 1 M Sorbitol
3.6.2	AutoLac	1% m/v Triptona 0,5% m/v Glicerol 0,5% m/v Extrato de Levedura 0,05% m/V Glicose 0,2% m/v Lactose 3,3 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄ 6,8 g/L KH ₂ PO ₄ 7,1 g/L Na ₂ HPO ₄
3.4.1.2; 3.4.2.1; 3.4.2.2; 3.6.1; 3.6.2	LB	1% m/v Triptona 0,5% m/v Extrato de levedura 5g/L NaCl
3.4.1.1	TYM	2% m/v Triptona 0,5% m/v Extrato de Levedura NaCl 5,8g/L Mg.SO ₄ .7H ₂ O 2,5 g/L
3.6.2	TB modificado	1,2% m/v Triptona 2,4% m/v Extrato de Levedura 1% m/v NaCl 0,4% m/v glicerol 2 µM CoCl ₂ 10 µM MgCl ₂ 10 µM ZnSO ₄ 50 µM FeCl ₃ 2 µM NaCl

Tabela 2 - Tampões utilizados no presente estudo e seções em que são mencionados

Seção	Tampão	Composição
3.4.1.1	TBF1	30 mM KOAc 50 mM MnCl ₂ 100 M KCl 10 mM CaCl ₂ 15% m/v Glicerol
3.4.1.1	TBF2	10 mM MOPS (pH 7,0) 75 mM CaCl ₂ .2H ₂ O 10 mM KCl 15% m/v Glicerol
3.4.1.2	Tampão de transformação	100 mM KCl 30 mM CaCl ₂ 50 mM MgCl ₂ 1,5% m/v PEG 4000 ou 6000
3.6.3; 3.6.4; 3.7.1	Tampão de amostra (4X)	200 mM Tris (pH 6,8) 8% m/v SDS 0,4% Azul de bromofenol 40% m/v Glicerol 200 mM DTT
3.6.3	Tampão de lise EC	100 mM Fosfato de potássio (pH 7,4) 300 mM KCl
3.6.4	Tampão de transferência (Western Blot)	25 mM Tris 192 mM Glicina 20% Metanol
3.6.4	PBST	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄ 0,1% v/v Tween-20
3.6.4	Tampão de Revelação	1,1% v/v luminol 0,48% v/v ácido P-cumárico 11,1% v/v Tris 1M pH 8,5 3,33% v/v H ₂ O ₂
3.7	Tampão de lise PP	50 mM NaH ₂ PO ₄ 1,25 mM EDTA 5% m/v Glicerol

3.2 Obtenção e clonagem dos genes ZIKV-CprME e ZIKV-C

3.2.1 ZIKV-CprME

A sequência codificante para o polipeptídeo CprME foi obtida a partir do genoma completo de ZIKV MR766 isolado de macaco em 1947 na Uganda (acesso NCBI: NC_012532.1). A sequência contínua codificante para as proteínas C, prM e E foi otimizada para expressão em *Pichia pastoris* e adicionada de códon de parada e sítio de clivagem para as enzimas *EcoRI* e *XhoI*, nas extremidades 5' e 3' respectivamente; e sintetizado pela empresa Epoch Life Science em vetor pPICZ α (Figura 9). O vetor pPICZ α contém o promotor AOX1, induzido por metanol, e marcador de resistência ao agente antimicrobiano zeocina sob ação de promotores ativos em *E. coli* e *P. pastoris*.

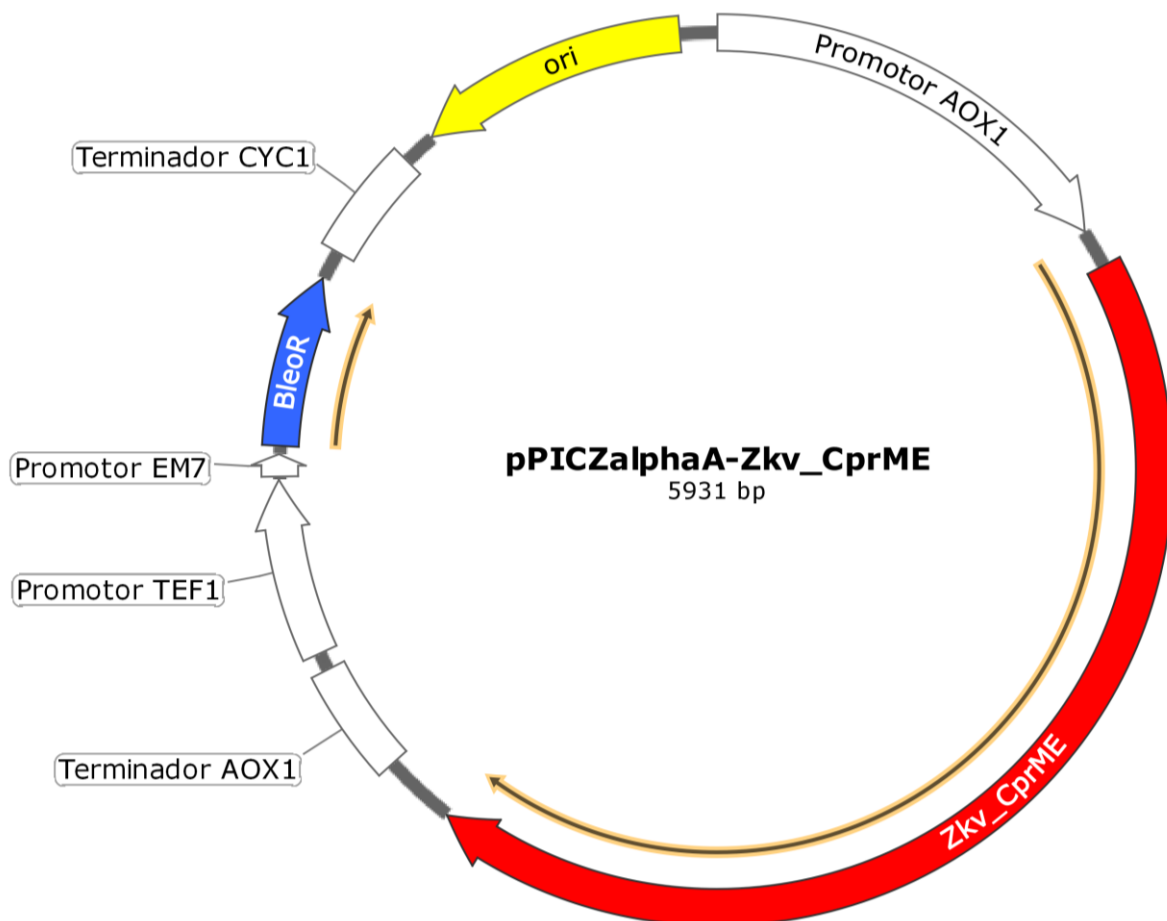


Figura 9 – Mapa do vetor pPICZ α _ZIKV-CprME. BleoR confere resistência ao antimicrobiano zeocina, e está sob ação de promotores ativos em *E. coli* (EM7) e *P. pastoris* (TEF1). As setas internas indicam os genes que expressam as proteínas de interesse. (Autoria própria)

3.2.2 ZIKV-C

A partir do vetor pPICZ α _ZIKV-CprME, a região codificante para a proteína C foi amplificada por PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos, descritos na Tabela 3, para a clonagem em pET-28a e pET-TRX, e o produto das reações foi purificado utilizando o PCR Purification Kit (Jena Bioscience), seguindo o protocolo do fabricante.

Tabela 3 – Primers utilizados para a amplificação do fragmento ZIKV-C para clonagem em pET-28a e pET-TRX

Primers	5' – 3'
Zk_CpET28 F	ACGTACGTCATATGAAAAACCCAAAGGAGGAAATACGTCG
Zk_CpET28 R	CCGCTCGAGTTAAGCGTTTATAATCCTCAGC
Zk_CpETLIC F	CAGGGCGCCATGAAAAACCCAAAGGAGG
Zk_CpETLIC R	GACCCGACGCGGTTACGTTTATAATCCTCAGC

3.2.2.1 Clonagem da sequência ZIKV-C em pET-28a

A sequência ZIKV-C, amplificada por PCR, e o vetor pET-28a foram digeridos pelas enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI*. O produto de cada digestão foi analisado em gel de agarose 0,8% (TAE, pH 8,0) e as bandas correspondentes ao vetor e inserto digeridos foram purificadas com kit de Extração de gel de agarose da Jena Biosciences. A reação de ligação foi realizada incubando vetor e inserto digeridos, com excesso 3X picomoles de inserto, com enzima T4 DNA Ligase (ThermoFischer Scientific) de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. A construção inclui no N-terminal da proteína ZIKV-C uma cauda de 6 Histidinas, com objetivo de permitir a purificação através de cromatografia de afinidade por metal quelado e também o uso de anticorpos anti-His para identificação da proteína. A Figura 10 mostra o mapa do vetor pET-28a_ZIKV-C.

3.2.2.2 Clonagem de ZIKV-C em pET-TRX

A sequência ZIKV-C foi ligada ao vetor pET-TRX através de clonagem independente de ligase (LIC, do inglês *Ligase Independent Cloning*).

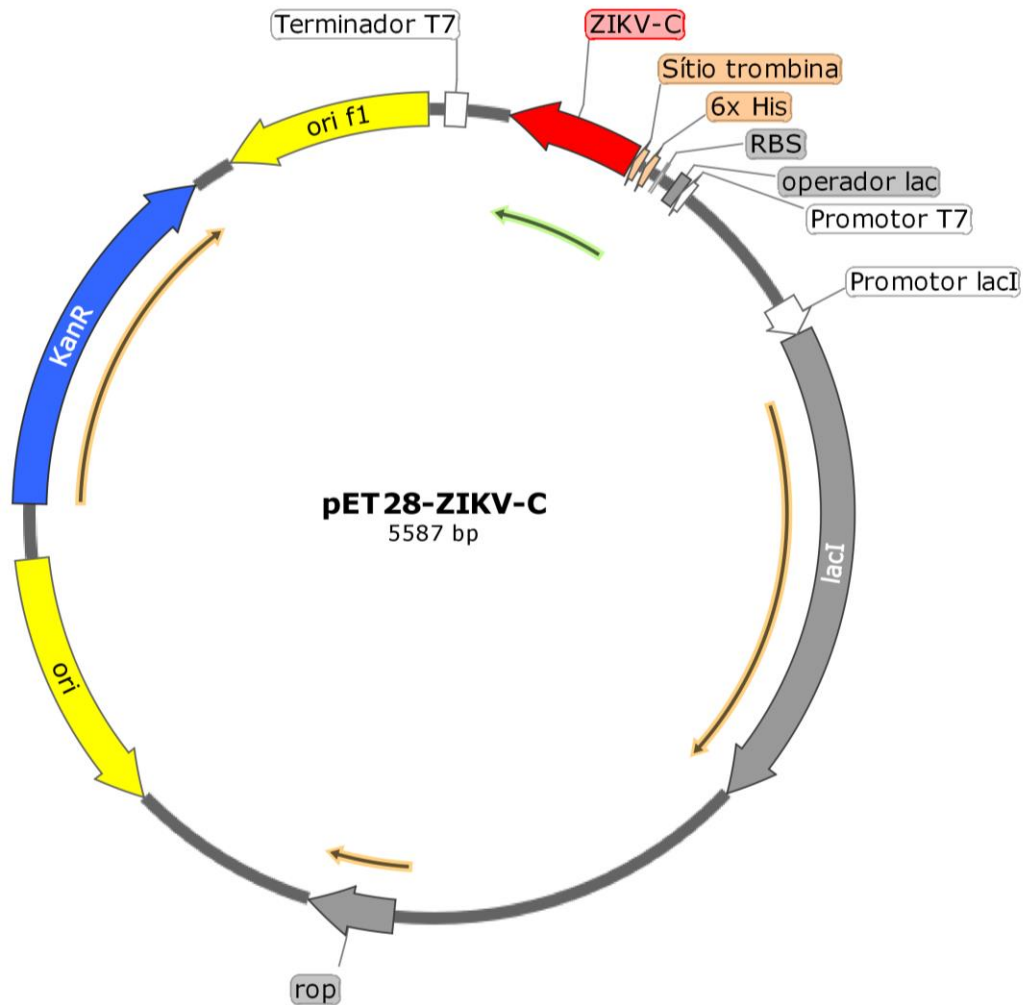


Figura 10 – Mapa do vetor pET-28a_ZIKV-C. KanR confere resistência ao antibiótico kanamicina. As setas internas indicam proteínas expressas. (Autoria própria)

Para isso, foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores para amplificação de ZIKV-C contendo sequências adicionais específicas presentes no vetor. Após a amplificação, o produto de PCR foi purificado utilizando o PCR Purification Kit Jena Bioscience, seguindo o protocolo do fabricante, e incubado com 2U T4 DNA-polimerase na presença de 2,5 mM de dATP, para que a atividade 3'->5' da enzima produzisse no produto amplificado extremidades coesivas de 10 a 12 bases. O vetor foi linearizado utilizando a enzima de restrição *Bsa*I, em seguida aplicado em gel de agarose 0,8% e submetido a eletroforese. A banda correspondente ao vetor digerido foi purificada com kit de Extração de gel de agarose da Jena Biosciences. O DNA purificado foi então incubado com T4 DNA-polimerase na presença de dTTP, resultando na obtenção de extremidades coesivas complementares às produzidas na sequência de interesse. Então, a ligação foi realizada através da mistura das soluções contendo o vetor e o

inserto preparados e incubação a temperatura ambiente por 15 min. A Figura 11 mostra o mapa do vetor pET-TRX_ZIKV-C.

Esta construção contém cauda de histidinas e a proteína tiorredoxina ligada ao N-terminal de ZIKV-C, separada por um sítio de clivagem de TEV protease. Tiorredoxina é uma proteína extremamente solúvel em *E. coli*, e sua fusão a ZIKV-C tem como objetivo reduzir a formação de corpos de inclusão.

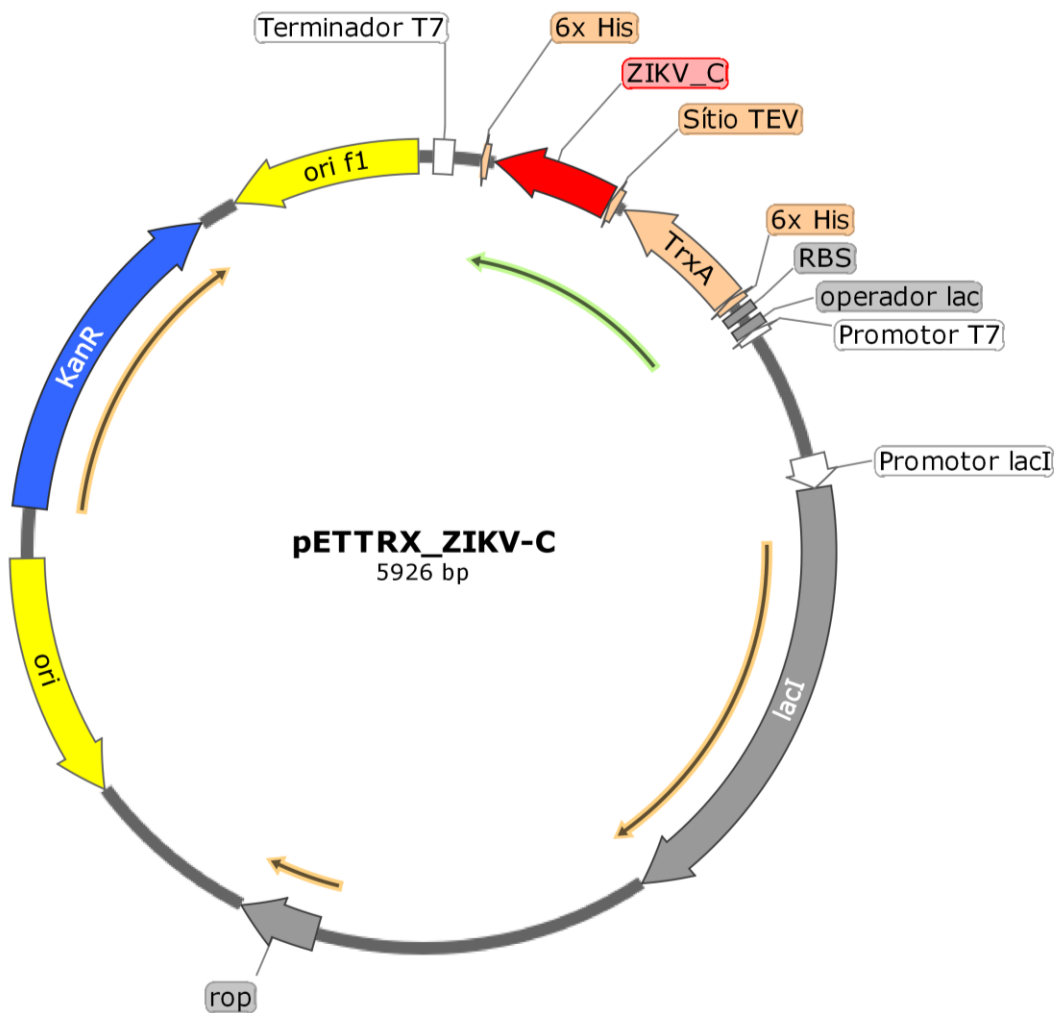


Figura 11 – Mapa do vetor pET-TRX_ZIKV-C. KanR confere resistência ao antibiótico kanamicina. As setas internas indicam proteínas expressas. (Autoria própria)

3.3 Integração de ZIKV-CprME em *Pichia pastoris*

O vetor pPICZ α _ZIKV-CprME foi linearizado utilizando a enzima de restrição *SacI* e transformado em *Pichia pastoris* X-33 por eletroporação, como descrito nas seções a seguir.

3.3.1 Preparo de *Pichia pastoris* X-33

Uma colônia de *Pichia pastoris* X-33 foi inoculada em 10 mL de meio YPD e mantida sob agitação a 30 °C por 16 horas. Foi então diluída em 50 mL de meio YPD e crescida nas mesmas condições. Após a concentração celular atingir OD_{600nm}=1,3-1,5, a cultura foi centrifugada por 5 min a 1500 xg e ressuspensa em 50 mL de água estéril gelada. A solução foi novamente centrifugada como descrito e ressuspensa em 25 mL de água estéril gelada, e então em 2 mL solução de sorbitol 1 M estéril e gelada e, finalmente, em 100 μ L da solução de sorbitol.

3.3.2 Transformação de pPICZ α _ZIKV-CprME em *P. pastoris*

O vetor pPICZ α _ZIKV-CprME previamente linearizado pela enzima *SacI* e purificado, foi adicionado à suspensão de *Pichia pastoris* preparada (seção 3.3.1) na proporção de 5-10 μ g de vetor para 80 μ L de solução de células e a mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação com abertura de 0,2 cm. Após 5 min de incubação em gelo, as células foram submetidas a eletroporação em eletroporador utilizando 1,5 kV, 25 μ F, 186 Ω . Imediatamente após o pulso, 1 mL de sorbitol 1 M estéril gelado foi adicionado à cubeta e todo o conteúdo foi então transferido para um tubo estéril de 15 mL e incubado a 30 °C por 1h sem agitação antes de ser plaqueado em meio YPDS sólido contendo 100 μ g/mL de zeocina para seleção. A placa foi incubada a 30 °C por 2 dias até o surgimento de colônias.

O plasmídeo pPICZ α possui a região promotora e terminadora do gene de álcool-oxidase 1 (*AOX1*), desta maneira a entrada do plasmídeo linearizado na célula provoca a recombinação homóloga entre o gene *AOX1* e a sequência de interesse no vetor,

assim integrando a sequência ao genoma da levedura sob ação do promotor *AOX1* conforme esquematizado na Figura 12.

O mesmo procedimento foi utilizado para transformar pPICZ α vazio, ou seja, não contendo sequência codificante sob ação do promotor *AOX1*, para a obtenção do clone *P. pastoris* pPICZ α _Ø, utilizado posteriormente como controle.

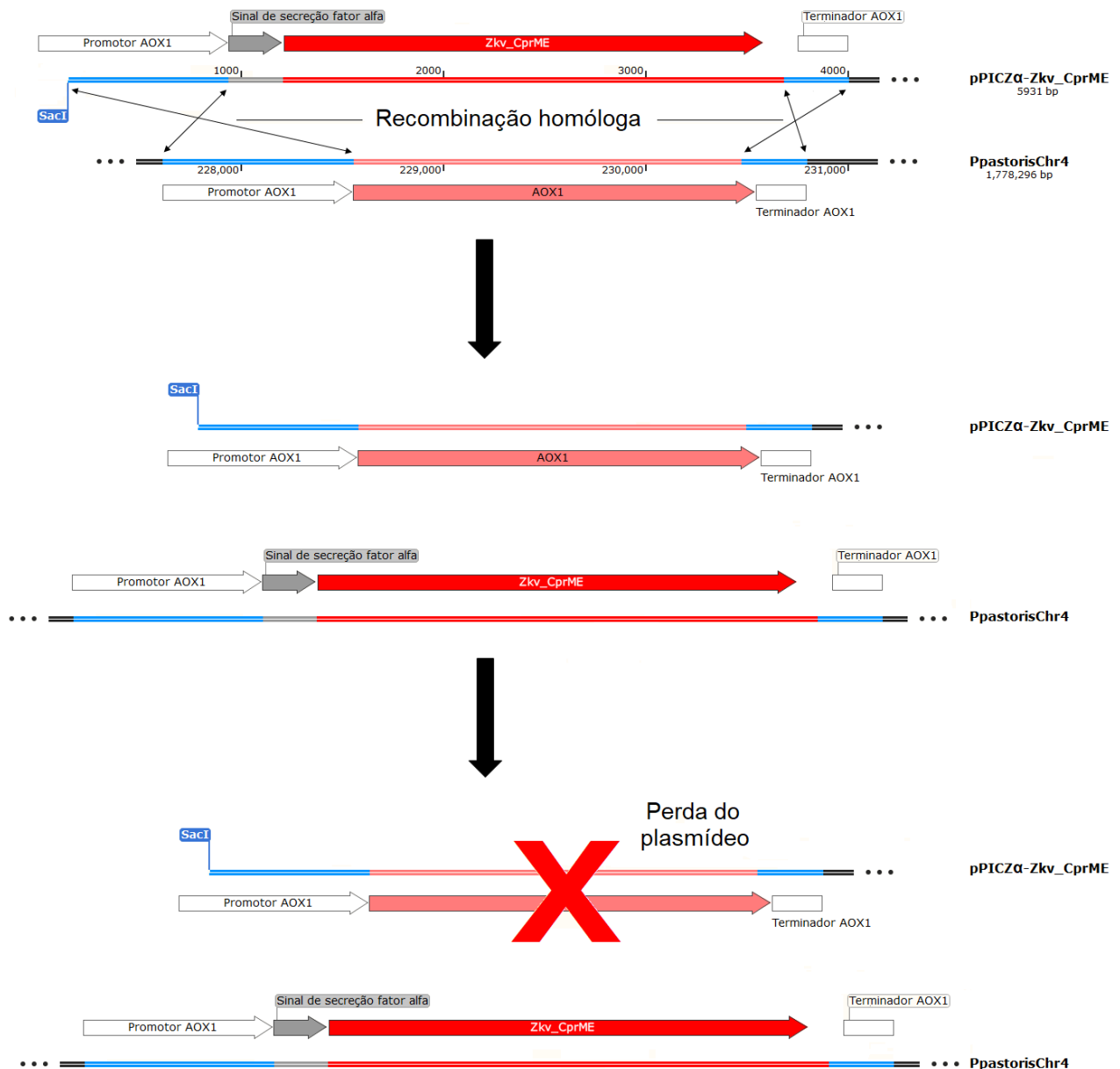


Figura 12 - Esquema da inserção do fragmento CprME no genoma de *P. pastoris*. As regiões promotora e terminadora de AOX1, presentes no vetor, promovem pareamento do plasmídeo e a região de AOX1 no cromossomo 4 da levedura. A presença de uma extremidade coesiva, produzida na linearização do plasmídeo, inicia o mecanismo de recombinação homóloga da levedura, levando à substituição do gene no cromossomo pelo fragmento CprME. O plasmídeo não é compatível com a replicação em *P. pastoris* e é degradado ou perdido na geração seguinte. (Autoria própria).

3.4 Construção de Escherichia coli recombinante

Os vetores pET-28a_ZIKV-C e pET-TRX_ZIKV-C foram transformados em *E. coli* TOP10 para manutenção por transformação química e em seguida nas cepas de expressão *E. coli* C43 e *E. coli* Rosetta Gami 2, respectivamente, através de eletroporação. Os procedimentos são descritos nas seções a seguir.

3.4.1 *E. coli* TOP10 pET-28a_ZIKV-C e *E. coli* TOP10 pET-TRX_ZIKV-C

3.4.1.1 Preparação de *E. coli* TOP 10 competente

Uma colônia isolada de *E. coli* TOP 10 foi inoculada em 5 mL de meio TYM e cultivada sob agitação a 37 °C por 16 horas. A cultura foi então diluída em 10 mL de meio fresco mantida nas mesmas condições de crescimento até atingir a $DO_{600nm}=0,4$, quando foi diluída em 40 mL de meio fresco, novamente cultivada até $DO_{600nm}=0,7$, e finalmente diluída em 200 mL de meio fresco e cultivada até $DO_{600nm}=0,6$. Durante todo o processo, a cultura foi mantida sob agitação a 37 °C. Ao atingir a concentração celular desejada, a cultura foi resfriada em banho de gelo e centrifugada a 4 °C por 15 min a 4000 xg. O sobrenadante foi descartado, e as células ressuspensas em 100 mL de TBF1 gelado. A solução foi então centrifugada a 4 °C por 8 min a 4000 xg, o sobrenadante foi descartado e as células foram finalmente ressuspensas em 10 mL de TBF2 gelado e alíquotas foram congeladas e armazenadas a -80 °C.

3.4.1.2 Transformação dos vetores em *E. coli* TOP 10

Uma alíquota de 40 µL de células competentes foi descongelada em gelo e a ela foram adicionados 20 µL de solução contendo o plasmídeo e 80 µL de tampão de transformação. Cada mistura foi mantida em gelo por 30 min e em seguida incubada a 42 °C por 2 min. Após a incubação, a cada mistura foi adicionado 1 mL de meio LB e foram incubadas a 37 °C por 50 min até finalmente serem plaqueadas em meio sólido seletivo (LB contendo kanamicina).

3.4.2 *E. coli* Rosetta Gami 2 pET-TRX_ZIKV-C e *E. coli* C43 pET-28a_ZIKV-C

3.4.2.1 Preparação de *E. coli* Rosetta Gami 2 e *E. coli* C43 eletrocompetentes

As células de *E. coli* Rosetta Gami 2 e *E. coli* C43 foram preparadas para eletroporação através do mesmo procedimento, descrito a seguir.

Uma colônia isolada foi incubada em 5 mL de meio LB e incubada a 37 °C sob agitação durante uma noite. Volume apropriado da cultura foi diluído em 200 mL de meio fresco para obter $DO_{600nm}=0,1$ e incubada a 37 °C sob agitação até que $DO_{600nm}=1,0$ a 2,0. A cultura foi então centrifugada a 4000 xg por 20 minutos a 4 °C, a partir de quando as células foram mantidas em gelo. As células foram lavadas através de ressuspensão e centrifugação (3500 xg, 7 min, 4 °C) com 100 mL de água gelada, em seguida com 50 mL de água gelada e finalmente com 6 mL de glicerol 20% gelado. As células foram centrifugadas uma última vez por 15 min a 3500 xg, 4 °C, e ressuspensas em 600 µl de glicerol 20% gelado e o volume final foi dividido em alíquotas, que foram congeladas e mantidas a -80 °C.

3.4.2.2 Transformação dos vetores em *E. coli* Rosetta Gami 2 e *E. coli* C43

Os clones *E. coli* Rosetta Gami 2 pET-TRX_ZIKV-C e *E. coli* C43 pET-28a_ZIKV-C foram transformados por eletroporação, segundo o seguinte procedimento:

Uma alíquota de 40 µl foi descongelada em gelo e a ela de 1 a 2 µl do vetor purificado e ressuspendido em água foi adicionado e a mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação de abertura de 0,1 cm. A mistura foi submetida a pulso elétrico de 1,7 kV, 200 Ω, 25 µF. Imediatamente após o pulso, foi adicionado à cubeta 1 mL de meio LB e o volume total foi transferido para um tubo estéril e incubado a 37 °C por 1 hora, sob agitação. Após a incubação, as células foram plaqueadas em meio LB sólido contendo os antibióticos apropriados e as placas foram incubadas a 37 °C por uma noite até o crescimento de colônias.

3.5 Expressão de ZIKV-CprME em *Pichia pastoris*

Cultura de células de *P. pastoris* pPICZα_ZIKV-CprME foram inoculadas em 25 mL de meio de cultura YPD em um frasco de 250 mL, a 30 °C, sob agitação, até atingir $DO_{600nm}=5,0$ (aproximadamente 30 h). A cultura foi então diluída para $DO_{600nm}=1,0$ e adicionado metanol para obter concentração no meio de 0,5%. A indução foi mantida por

aproximadamente 72 h para a expressão de VLPs de ZIKV, sendo que a cada 24 h foi adicionado metanol para compensar o volume evaporado. Após a indução, as células foram separadas por centrifugação e mantidas congeladas até posterior lise. O mesmo procedimento foi realizado com cultura de *P. pastoris* pPICZ α _Ø, como controle negativo de indução. Cada condição foi feita em duplicata.

3.6 Expressão de ZIKV-C em *Escherichia coli*

3.6.1 Indução por adição de IPTG

O clone foi inoculado em de meio LB contendo os antibióticos apropriados e incubado sob agitação a 37 °C por 16 horas. A cultura então foi diluída para que $DO_{600nm}=0,1$ e novamente incubada até $DO_{600nm}=0,6$. IPTG foi adicionado para concentração final de 1 mM. Posteriormente, testes mostraram o mesmo nível de expressão utilizando 0,5 mM e essa concentração passou a ser utilizada. O tempo de indução foi de 16 h.

O volume do inóculo variou de acordo com o volume final desejado de cultura a ser induzida, sendo de 5mL para indução de 10 mL a 100 mL, 10 mL para indução de 250 mL e de 100 mL para indução de 1 L.

3.6.2 Expressão por meio de autoindução

O clone foi inoculado em meio LB contendo os antibióticos apropriados e incubado sob agitação a 37 °C por 16h. As células foram então centrifugadas por 1min a 4000 xg e ressuspensas em meio autoindutor (AutoLac, TB modificado) para concentração $DO_{600nm}=0,1$. O crescimento celular foi acompanhado até que $DO_{600nm}=0,6$ e o tempo de indução era de 16 h a partir desse momento.

Assim como feito para a expressão com IPTG, o volume do inóculo variou de acordo com o volume final desejado.

3.6.3 Lise celular e análise da expressão

As culturas foram centrifugadas a 3000 xg, 4 °C, por tempo variável de acordo com o volume (10 min para até 50 mL, 30 min para até 500 mL, 40 min para 1 L). O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspense em tampão de lise EC contendo lisozima, PMSF, pepstatina e leupeptina, e lisado através de sonicação (8 s ON / 18 s OFF, 40%, 3 min). O lisado foi então centrifugado por 40 min a 4 °C, 14 000 xg. O sobrenadante, fração solúvel do lisado, foi reservado, e o *pellet* ressuspense em tampão de amostra.

Alíquotas retiradas durante o cultivo foram centrifugadas a 3000 xg, 4 °C, por 2 min, e o *pellet* foi ressuspense em tampão de amostra.

3.6.4 Western Blot

Amostras proteicas foram desnaturadas por fervura durante 10 minutos em tampão de amostra e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) em tampão de corrida. A eletroforese foi realizada a 140-160 V, 400 mA por 90 min. O sistema Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (Bio Rad) foi utilizado para a transferência das proteínas separadas no gel para membrana de nitrocelulose utilizando o tampão de transferência durante 30 min, a 100 V e 350 mA. A eficiência da transferência foi avaliada corando-se a membrana com 0,2 % Ponceau, que foi retirado através de lavagens subsequentes com água. A membrana foi bloqueada com 5 % de leite em pó diluído em PBST por 1 hora. Em seguida a membrana foi incubada por 2 horas, com o anticorpo primário diluído apropriadamente em PBST. Foram então realizadas três lavagens de 5 min com PBST, e a membrana foi incubada com o anticorpo secundário, em diluição apropriada, por 45 minutos. A membrana foi novamente lavada três vezes com PBST por 5 minutos e revelada. O bloqueio, lavagens e incubações com anticorpo foram feitos a temperatura ambiente e sob agitação. A revelação foi feita por quimioluminescência: a membrana é rapidamente submergida em tampão de revelação. As membranas foram analisadas com o *scanner* C-digit Blot e as imagens adquiridas pelo *software* Image Studio™ (*scanner* e *software* de LI-COR Biosciences UK Ltd).

Tanto o extrato proteico de ZIKV quanto o antissoro policlonal anti-ZIKV, produzido em coelho, utilizados nos western blots, foram fornecidos gentilmente pelo

Prof. Luis Carlos de Souza Ferreira (Lab. De Desenvolvimento de Vacinas; ICB-USP). Foram utilizados como anticorpos primários o antissoro policlonar anti-ZIKV feito em coelho e anticorpo monoclonal anti-His feito em ratos, e como anticorpos secundários anticorpos monoclonais anti igG de coelho e de rato, de acordo com o anticorpo primário utilizado.

3.7 Lise de *P. pastoris* e purificação de ZIKV-CprME

O pellet congelado, obtido de 200 ml de volume de cultura de células induzidas, foi ressuspenso em 1 mL de Tampão de lise PP adicionado de PMSF, leupeptina e pepstatina. A cada 500 μ L de pellet foram adicionados aproximadamente 200 μ L de esferas de vidro (425-600 μ m) e a lise foi feita mecanicamente através de agitação em vórtex em 3 ciclos de 1 min intercalados com 1 min no gelo. O lisado foi clarificado por centrifugação a 3300 xg por 40 min a 4 °C.

Foi feita quantificação de proteína total pelo método de Bradford para cada amostra, e volume contendo 0,5 g de proteínas foi cuidadosamente aplicado sobre “colchão” de sacarose (sacarose 20 % e 60 % formando duas fases distintas), formando 3 fases, como esquematizado na Figura 12. Os tubos contendo as amostras foram centrifugados a 100 000 xg por 1 hora, a 4 °C, em ultracentrífuga. Após a centrifugação, foram coletadas frações que foram precipitadas com TCA e submetidas a SDS-PAGE para análise.

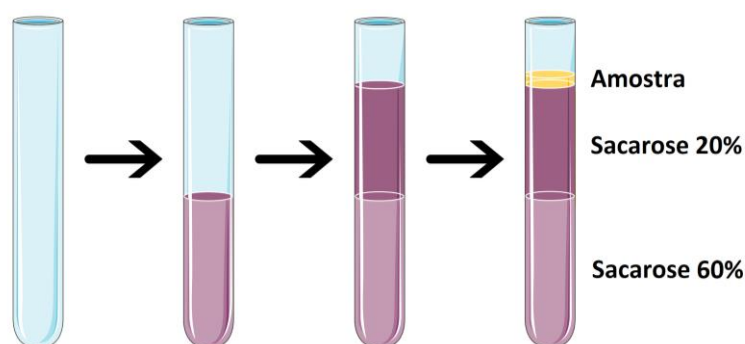


Figura 13 – Esquema do colchão de sacarose 20% - 60% para purificação de VLPs. (Autoria própria)

3.7.1 Precipitação de proteínas com Ácido Tricloroacético (TCA)

Para cada 300 μ l de amostra, foi adicionado 67 μ L de TCA 100%. As amostras foram vortexadas e incubadas a 4 °C por 16 h. Foram então centrifugadas por 30 min, a

14 000 xg, a 4°C, e o sobrenadante foi descartado. Os precipitados proteicos foram lavados com 1 mL de acetona gelada, vortexados e centrifugados por 15 min a 14 000 xg, a 4°C. A lavagem com acetona seguida de vortexação e centrifugação foram repetidas três vezes. Finalmente, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi incubado por alguns minutos a temperatura ambiente até secar completamente. Cada pellet foi suspenso em tampão de amostra 1X e submetido a SDS-PAGE para análise.

3.8 Purificação de ZIKV-C

A purificação de ZIKV-C foi feita através de cromatografia de afinidade utilizando as resinas Ni-NTA e TALON®, resinas com Ni²⁺ e Co²⁺ imobilizados, respectivamente.

As cromatografias em bancada foram feitas em colunas preparadas com 5 mL de resina (1 volume de coluna, ou VC). As colunas foram lavadas com 4 VC de água e equilibradas com 3 VC de tampão de lise EC adicionado de 10 mM de imidazol. As amostras foram então aplicadas à resina e escoadas por gravidade. A resina foi então lavada com 5 – 10 VC do mesmo tampão com que a coluna foi equilibrada, a fim de eluir proteínas ligadas inespecificamente à resina. A eluição foi feita aplicando na coluna 2 VC de tampão contendo concentrações crescentes de imidazol (100 mM, 150 mM, 200 mM, 300 mM, 500 mM). Foram coletadas a fração não eluída, lavagem e frações eluídas para análise por SDS-PAGE e western blot. Após as cromatografias, as resinas foram lavadas com tampão e água e mantidas em etanol 20%.

Para as purificações realizadas no Sistema AKTA Explorer 10 (GE Healthcare) foram utilizadas colunas empacotadas com 10 mL de resina (1 VC). Assim como feito em bancada, as colunas foram lavadas com água e equilibradas com tampão antes da aplicação do lisado contendo a proteína de interesse. Nesse sistema, é possível acompanhar em tempo real a concentração de proteína total deixando a coluna através de leitura de absorbância a 280 nm, portanto a lavagem após aplicação da amostra foi feita até que esta leitura se mantivesse em zero por 0,5 VC. Também é possível programar a mistura de tampão A, aquele em que a amostra se encontra, e tampão B, tampão de eluição contendo maior concentração de imidazol. Dessa forma, a eluição pode ser feita em degraus ou gradiente de concentração de imidazol.

Anteriormente à cromatografia, os lisados celulares clarificados foram filtrados em filtros 0,45 µm.

4 Resultados e Discussão

4.1 ZIKV-CprME

4.1.1 Clonagem do gene em *Pichia pastoris* e integração no genoma

A integração da sequência de interesse foi confirmada através de PCR, utilizando diferentes combinações de oligonucleotídeos iniciadores complementares ao inserto e ao genoma hospedeiro (Figura 14), além de sequenciamento utilizando sequenciador 3130 Genetic Analyzer (Life Technologies), no Laboratório de Biofísica do Instituto de Física da Universidade de São Paulo, em São Carlos.

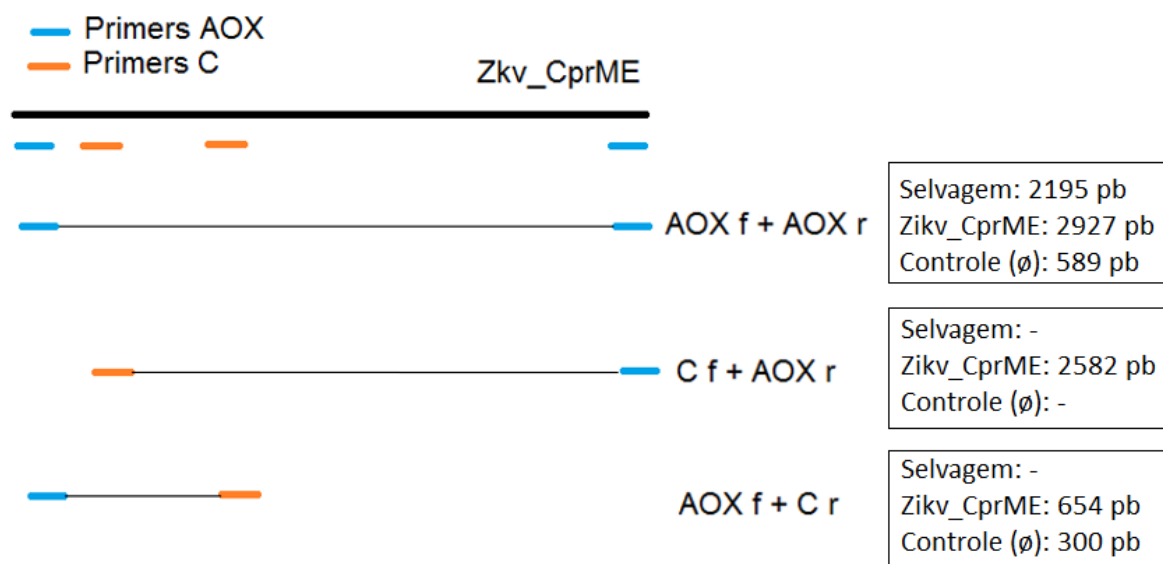


Figura 14 – Esquema dos fragmentos amplificados esperados após reação de PCR utilizando diferentes combinações de oligonucleotídeos iniciadores da sequência CprME inserida no genoma de *P. pastoris*. As caixas mostram o tamanho de cada sequência em pares de base, incluindo tamanho dos fragmentos esperados nas reações controle. (Autoria própria)

Para análise de PCR, foi calculado o tamanho, em pares de bases, do fragmento amplificado na reação utilizando cada tipo de construção como DNA molde, sendo Selvagem a linhagem X-33 sem alteração, Zkv_CprME a sequência resultante da recombinação genômica mostrada na Figura 12, e Controle \emptyset o resultado de recombinação genômica com o vetor pPICZ α original. Análise de eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR revelou fragmentos amplificados correspondentes ao esperado, considerando a presença do gene CprME no clone, do gene *AOX1* na cultura

selvagem e ausência de ambos no controle transformado com plasmídeo vazio (Figura 15). O resultado do sequenciamento confirmou este resultado, assim como a ausência de qualquer mutação ou mudança de fase de leitura que pudesse interferir na expressão do gene heterólogo.

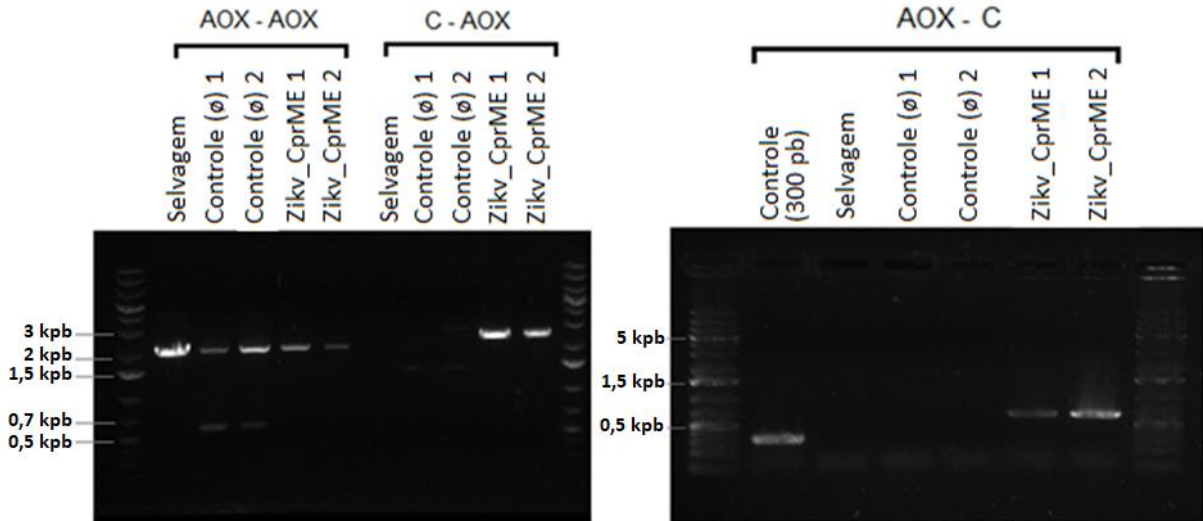


Figura 15 - PCR de confirmação da inserção do fragmento CprME em *P. pastoris* X-33. Selvagem se refere a célula não transformada com o vetor, Controle (\emptyset) se refere a célula transformada com vetor vazio, ou seja, não tendo fragmento inserido no sítio de clonagem. Todas as condições apresentaram fragmentos de acordo com o tamanho esperado (Fig. 1). (Autoria própria)

4.1.2 Expressão de ZIKV-CprME e purificação de VLPs

A Figura 16 mostra a imagem do gel após SDS-PAGE contendo as amostras após a indução em YPM, assim como uma amostra de extrato de ZIKV.

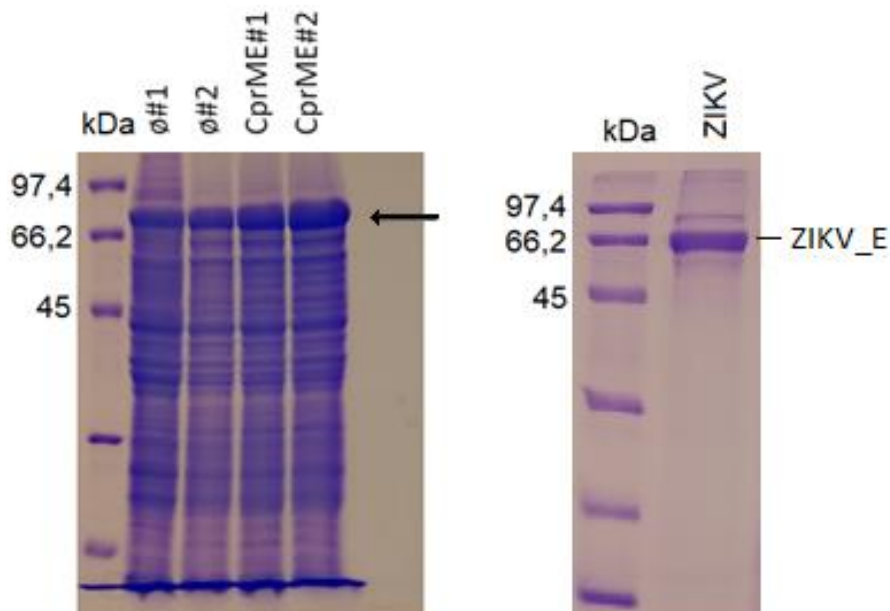


Figura 16 – SDS-PAGE 12% das amostras das culturas de *P. pastoris* CprME após a indução e de extrato de ZIKV, mostrando banda característica esperada. CprME#1 e #2 são duplicatas biológicas, ∅#1 e #2 são controles transformados com vetor vazio. (Autoria própria)

Apesar de o vírion possuir 3 proteínas de diferentes tamanhos (C: 13 kDa; prM: 19 kDa; E: 54 kDa), apenas uma banda é observada com clareza no extrato de ZIKV, referente à proteína E, próxima ao marcador de 66,2 kDa. Isso já foi observado na literatura também para a expressão de proteínas estruturais de DENV, seja na expressão de CprME (Sugrue *et al.*, 1997) ou prME (Liu *et al.*, 2010). Observamos que a comparação do padrão de bandas para confirmar a expressão nesse caso não é confiável, já que *P. pastoris* X-33 (selvagem), submetida às mesmas condições que o clone *P. pastoris* pPICZ α _ZIKV-CprME, induzido para expressão das proteínas estruturais do ZIKV, apresenta em seu padrão de bandas uma banda de mesma altura, podendo ocultar a banda de interesse.

A fração solúvel dos extratos celulares assim como o meio extracelular concentrado foram submetidos a ultracentrifugação em colchão de sacarose (20%-60%) para o isolamento das VLPs, já que a formação de partículas esféricas a partir das proteínas estruturais altera sua densidade e, portanto, permite a separação dessas partículas das proteínas isoladas. Após a ultracentrifugação, foram recolhidas frações do gradiente, precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) e analisadas por SDS-PAGE (Figura 17). Uma das culturas induzidas apresentou no meio extracelular banda distinta das presentes no controle, em tamanho compatível com a proteína E, sugerindo a presença de VLPs secretados pelas células induzidas.

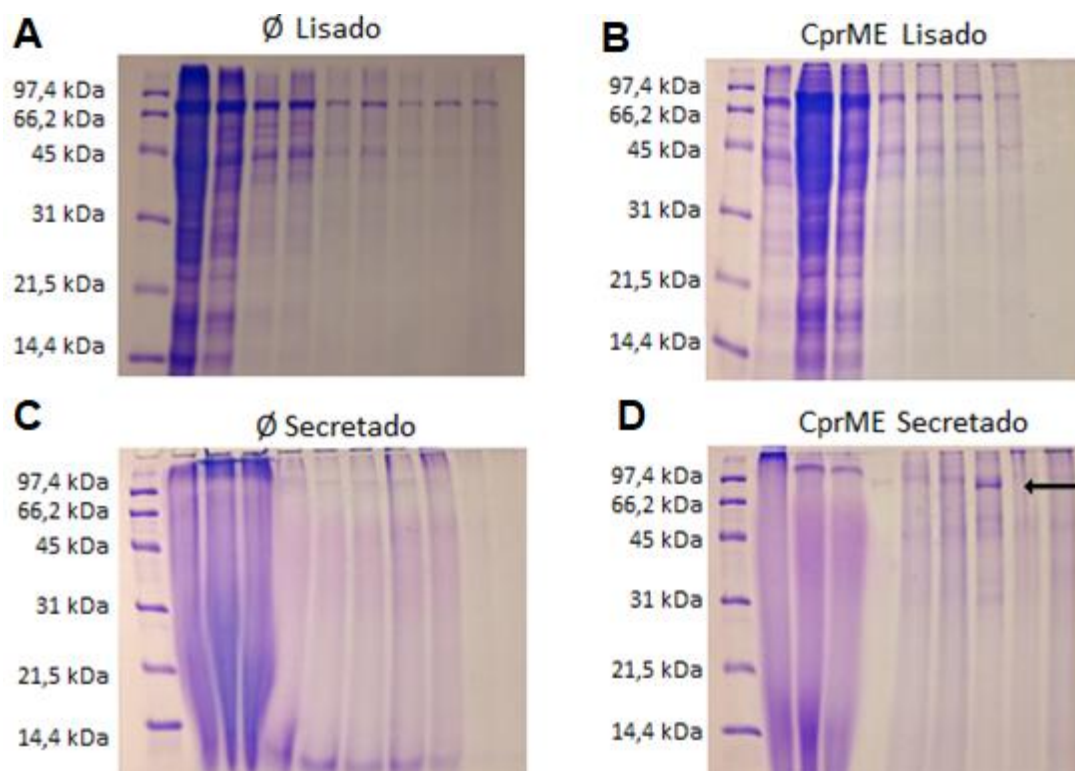


Figura 17 – SDS-PAGE das frações coletadas após ultracentrifugação em gradiente de sacarose (20%-60%) dos lisados celulares de *P. pastoris* pPICZ α _Ø (A) e pPICZ α _ZIKV-CprME (B) e meios extracelulares concentrados de culturas de *P. pastoris* pPICZ α _Ø (C) e pPICZ α _ZIKV-CprME (D). (autoria própria)

Utilizando antissoro anti-ZIKV, foi realizado western blot apresentado na Figura 18. A técnica foi utilizada para comparar amostras das frações solúvel e insolúvel do extrato celular de culturas de *P. pastoris* pPICZ α _ZIKV-CprME induzidas por 3 dias e não induzidas (controle negativo). O extrato de ZIKV foi usado como controle positivo. Apesar da presença de uma banda de tamanho similar à apresentada no extrato de ZIKV nas amostras induzidas e ausência nas amostras não induzidas, tais bandas não foram reativas ao antissoro, revelando que não houve a expressão da poliproteína CprME.

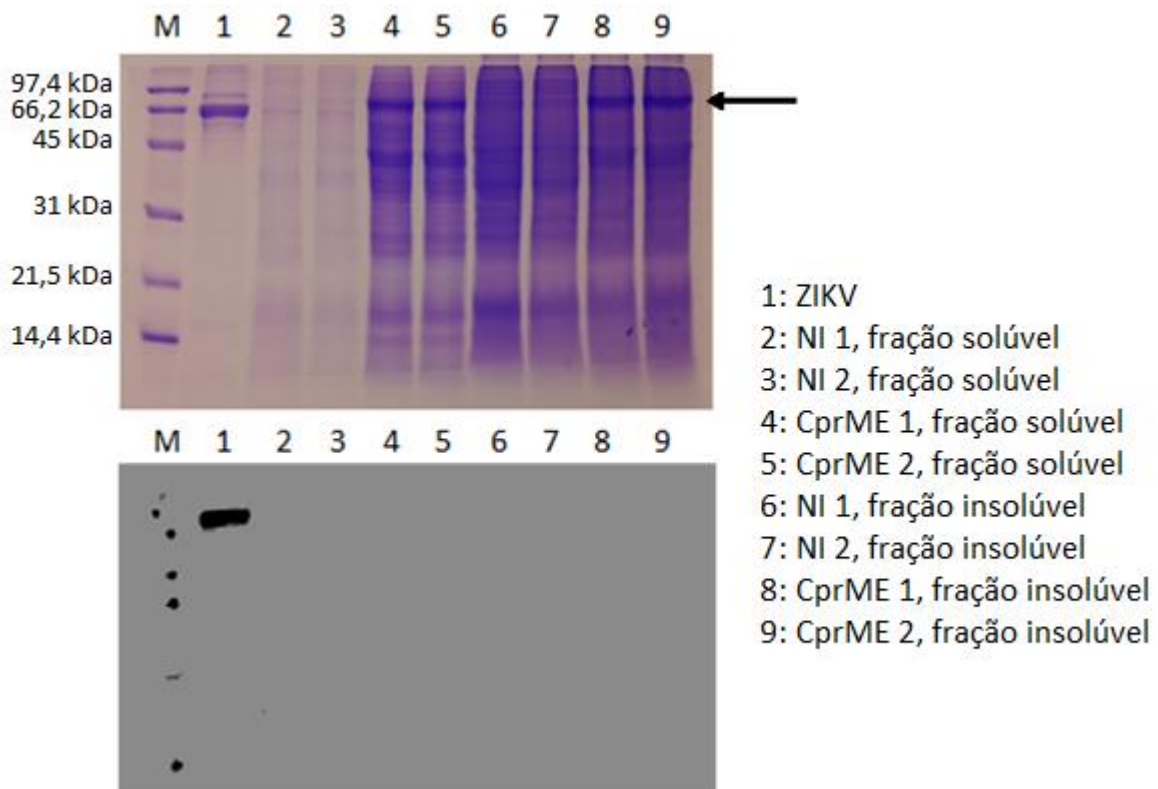


Figura 18 – SDS-PAGE e Western Blot das frações solúvel e insolúvel de *P. pastoris* CprME após indução em meio MM por 72 h. M: marcador molecular, NI: Não induzido (controle negativo). A seta indica o tamanho aproximado de E. Para o Western Blot, foi utilizado como anticorpo primário anti-ZIKV. (autoria própria)

O antissoro utilizado foi obtido a partir de vírions de ZIKV, e seria possível que não fosse capaz de ligar-se às proteínas estruturais na forma desnaturada em que se encontram após eletroforese na presença de SDS e DTT. No entanto, o uso de amostra de ZIKV inativado como controle positivo confirma que o antissoro utilizado é capaz de reconhecer a proteína E desnaturada, como observado na coluna 1 da Figura 18. Também é relevante saber que flavivírus apresentam certa reatividade cruzada, principalmente entre linhagens diferentes de uma mesma espécie de vírus (Heinz e Stiasny, 2017; Shang *et al.*, 2012; Urakami *et al.*, 2017). É certamente possível, porém

improvável que antissoro policlonal anti-ZIKV seria capaz de reconhecer ZIKV-E da amostra de ZIKV inativado e incapaz de reconhecer ZIKV-E expresso por *P. pastoris* pPICZ α _ZIKV-CprME. – GLICOSILAÇÃO?

Considerando tais resultados, o tempo já decorrido de projeto e a existência de uma segunda linha no estudo, com foco na proteína C, que apresentava resultados promissores, decidimos concentrar os esforços apenas no estudo da proteína C.

4.2 Expressão e purificação de ZIKV-C

4.2.1 Clonagem de ZIKV-C a partir de ZIKV-CprME em vetores de expressão e transformação em *E. coli*

A Figura 19 mostra a amplificação da sequência ZIKV-C por PCR utilizando dois pares de oligonucleotídeos, desenhados para clonagem em diferentes vetores (Tabela 3).

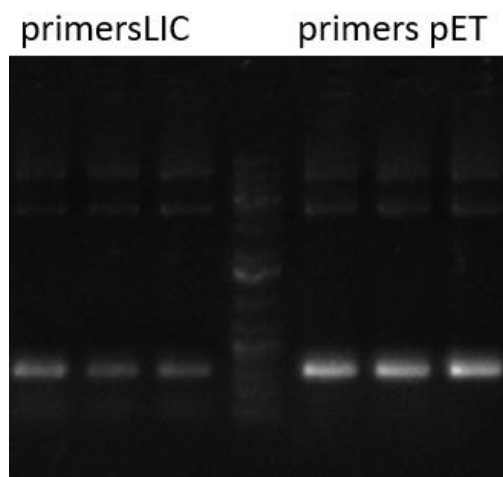


Figura 19 – PCR para amplificação de ZIKV-C a partir de pPICZ α _ZIKV-CprME

ZIKV-C foi ligado aos vetores pET-TRX e pET-28a e as construções foram transformados em *E. coli* Top10 e posteriormente nas cepas de expressão *E. coli* Rosetta Gami 2 e *E. coli* C43, respectivamente. Para a confirmação da transformação nas cepas de expressão, para cada clone foram feitas PCRs utilizando como molde o DNA extraído de cultura de células transformadas. Em ambos os casos foi utilizado um oligonucleotídeo iniciador que se anela ao vetor (T73G) e um oligonucleotídeo que anela

no inserto. Ao final das reações, os fragmentos foram submetidos a eletroforese de DNA em gel de agarose 0,8%, que revelou a amplificação de fragmento de tamanho esperado para pET-TRX_ZIKV-C (787 pb) e para pET-28a_ZIKV-C (450 pb) (Figura 20). A correta orientação da ligação do inserto, foi confirmada pela amplificação dos fragmentos utilizando oligonucleotídeos iniciadores que se ligam ao promotor, presente apenas no vetor, e à extremidade 3' do inserto. Caso o inserto estivesse ligado ao vetor de maneira invertida, na presença desses oligonucleotídeos não haveria amplificação do fragmento desejado.

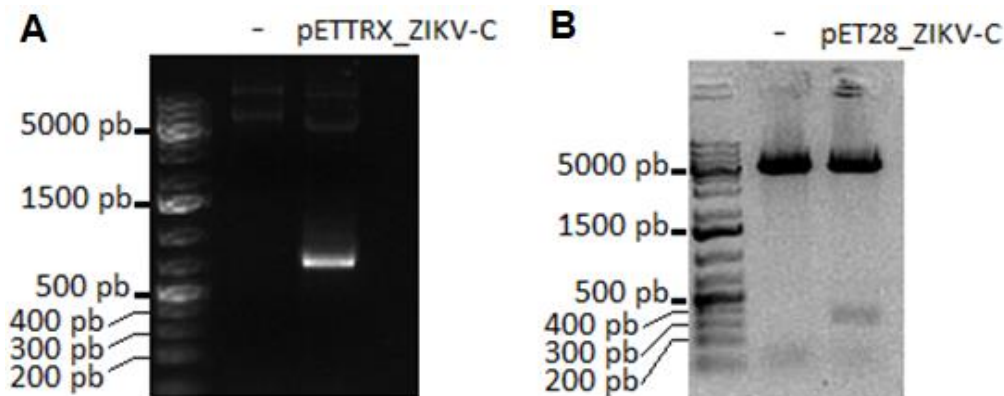


Figura 20 – Gel de agarose confirmando a inserção de ZIKV-C em pET-TRX (A) e pET-28a (B) através de PCR. (Autoria própria)

Todas as construções foram sequenciadas em sequenciador 3130 Genetic Analyzer (Life Technologies), no Laboratório de Biofísica do Instituto de Física de São Carlos (IFSC).

4.2.2 Expressão de ZIKV-C em *E. coli*

A expressão de ZIKV-C foi investigada utilizando SDS-PAGE e Western blot. A Figura 21 mostra o SDS-PAGE das frações solúvel e insolúvel após 16 horas de indução com 0,5 mM IPTG a 37°C de *E. coli* Rosetta Gami 2 pET-TRX_ZIKV-C. A massa molecular da proteína associada a TRX (TRX_ZIKV-C) é de 26 kDa.

Visando o aumento da solubilidade da proteína, também foram testadas a expressão deste clone com meio autoindutor (TB modificado) e a temperatura de 18°C (Figura 22). A adição de IPTG na cultura provoca intensa expressão de genes sob ação

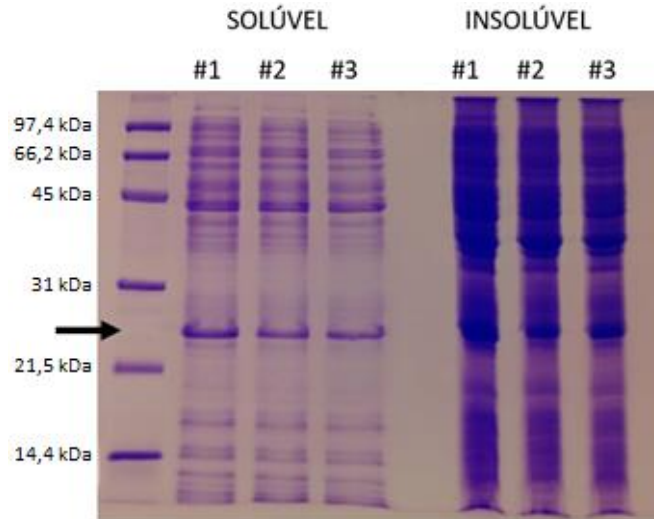


Figura 21 – SDS-PAGE das frações solúvel e insolúvel de 3 clones de *E. coli* Rosetta Gami 2 pET-TRX_ZIKV-C após 16 h de indução. A seta aponta para a banda correspondente à proteína TRX_ZIKV-C. (Autoria própria)

do promotor T7/lac, além de alterações metabólicas nas células, o que pode levar à formação de “corpos de inclusão”, ou seja, agregados proteicos insolúveis, através de mecanismo similar à resposta celular a choque térmico (Kosinski *et al.*, 1991). Meios autoindutores se aproveitam de expressão de “escape” que ocorre no promotor mesmo quando não há presença de lactose ou IPTG, proporcionando expressão mais contida e lenta, podendo evitar a formação de corpos de inclusão em alguns casos e, conseqüentemente, aumentando a proporção de proteína recombinante na fração solúvel. O uso de baixas temperaturas de indução tem o mesmo objetivo de limitar alterações metabólicas que possam afetar a solubilidade da proteína de interesse.

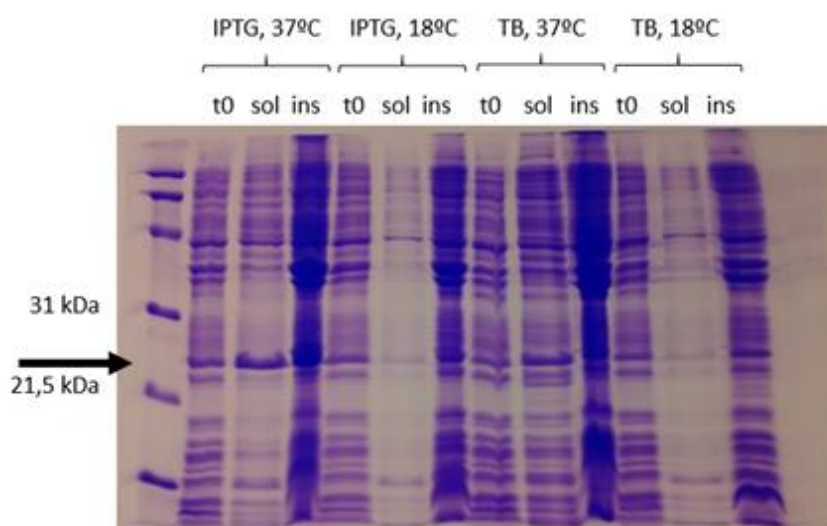


Figura 22 - SDS-PAGE das frações solúvel e insolúvel de *E. coli* Rosetta Gami 2 pET-TRX_ZIKV-C após 16 h de indução e lisado total no momento da indução (t0), sob diferentes formas de indução, sendo IPTG: 0,5 mM de IPTG adicionado à cultura; TB: autoindução em meio de cultivo TB modificado, e diferentes temperaturas. A seta aponta para a banda correspondente à proteína TRX_ZIKV-C. (Autoria própria)

A construção pET-28a_ZIKV-C foi transformada para expressão na linhagem *E. coli* C43. Esta linhagem é apropriada para expressão correta e solúvel de proteínas tóxicas (Dumon-Seignovert *et al.*, 2004), e foi utilizada pensando na tendência de proteínas de capsídeo em formar agregados (Acosta-Rivero *et al.*, 2004; Freire *et al.*, 2013), já que esta construção não conta com proteína de fusão que auxiliaria na solubilidade, como em pET-TRX_ZIKV-C.

A expressão de *E. coli* C43 pET-28a_ZIKV-C foi induzida com 0,5 mM IPTG durante 16 horas a 37°C. A verificação da expressão foi feita comparando-se o padrão de bandas em SDS-PAGE de amostras do momento da indução (t0), após 4h (t4) e 16h (tf). Também foram preparadas amostras da fração insolúvel do extrato celular (Figura 23). A massa molecular de ZIKV-C expressa nesta construção é de 13 kDa. A presença de uma banda de tamanho esperado após 4 horas de indução indica a expressão da proteína de interesse, e a observação da fração insolúvel sugere que parte da proteína expressa se encontra solúvel.

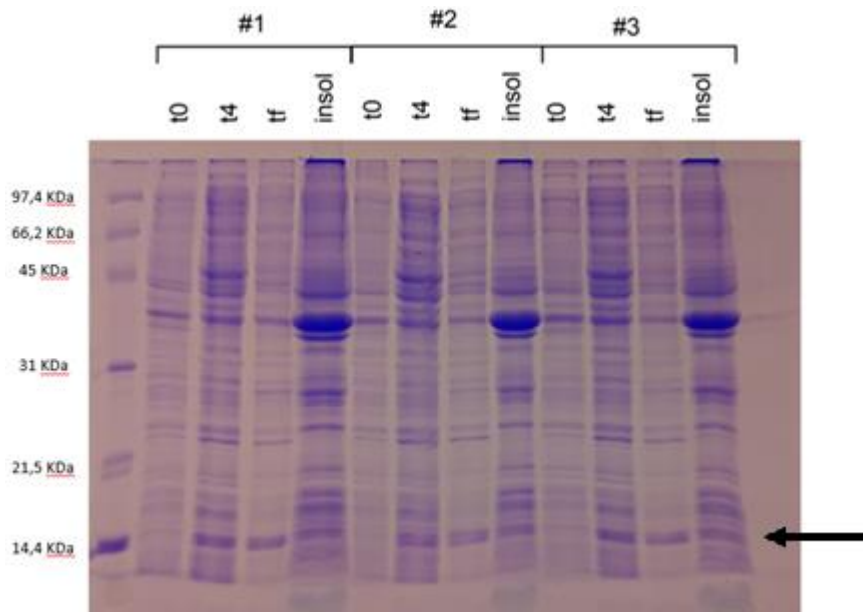


Figura 23 - SDS-PAGE de amostras de *E. coli* C43 pET-28a_ZIKV-C no momento da indução (t0), após 4 horas de indução (t4), e frações solúvel e insolúvel após 16 horas de expressão (tf e insol, respectivamente). A indução foi feita com a adição de 0,5 mM IPTG. A seta aponta para a banda correspondente à proteína ZIKV-C. #1, #2 e #3 se referem a 3 clones diferentes de *E. coli* pET-TRX_ZIKV-C obtidos a partir de uma única transformação. (Autoria própria)

4.2.3 Purificação de ZIKV-C

Foram feitos ensaios em bancada a fim de verificar a possibilidade da purificação através de cromatografia de afinidade. Todos os ensaios foram feitos utilizando tampão de lise EC, que se mostrou capaz de manter a proteína de interesse solúvel, como pode ser observado nos géis de poliacrilamida nas Figuras 21, 22 e 23.

Para TRX_ZIKV-C, foram testadas resinas a base de Ni^{2+} e a base de Co^{2+} . Tais resinas de cromatografia são utilizadas para a purificação de proteínas que contém "cauda" de histidina, explorando a interação reversível entre cátions divalentes e a cadeia lateral do aminoácido. Ambas resinas exploram as mesmas características físico-químicas para a purificação de proteínas, porém diferem na especificidade e força de ligação. Em relação a purificação em resinas com Ni^{2+} , resinas com Co^{2+} se ligam a polihistidina com maior seletividade, devido a requerimentos espaciais mais estritos, tendendo a ligar-se menos a proteínas do hospedeiro que possuem histidina exposta. Além disso, permitem eluição das proteínas ligadas em menor concentração de imidazol, que pode afetar passos seguintes da purificação, como por exemplo clivagem por protease TEV.

Inicialmente foram feitos testes em resina Ni-NTA (Qiagen), que contém íons Ni^{2+} , e a eluição foi feita com concentrações crescentes de imidazol (50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM). Foi possível observar no SDS-PAGE a purificação de proteína de tamanho adequado e com poucos contaminantes (Figura 24). No entanto testes de western blot não revelaram banda reativa em amostra purificada com esta resina. É possível que isso tenha ocorrido devido a ação proteolítica durante a expressão (Jones *et al.*, 2003) que tenha afetado a porção da proteína que apresenta polihistidina, região reconhecida pelo anticorpo primário, ou mesmo que apesar do tamanho adequado, a

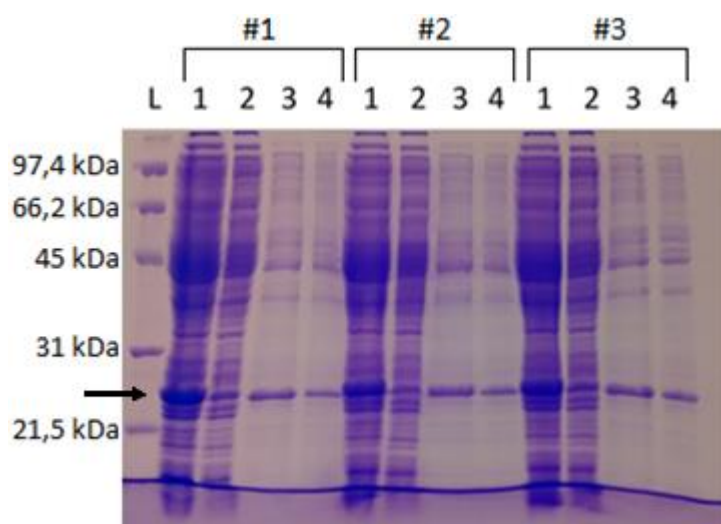


Figura 24 - SDS-PAGE do ensaio de purificação de TRX_ZIKV-C em Ni-NTA. 1: Lisado total; 2: Fração não ligada; 3: Eluído com imidazol 300 mM; 4: Eluído com tampão de amostra. #1, #2 e #3 se referem a 3 clones diferentes de *E. coli* pET-TRX_ZIKV-C obtidos a partir de uma única transformação. (Autoria própria)

banda represente uma proteína do hospedeiro que tenha se ligado inespecificamente à resina durante a cromatografia.

Foi realizado também ensaio de purificação utilizando a resina Talon® (resina com Co^{2+} imobilizado - Clonetech), seguindo mesmo protocolo utilizado com a resina Ni-NTA. SDS-PAGE do eluído mostrou a purificação de proteína de tamanho compatível com TRX-ZIKV e com poucos contaminantes (Figura 25).

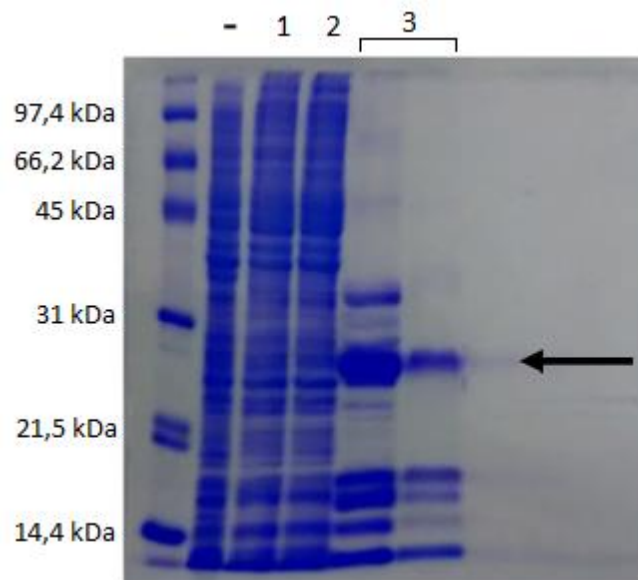


Figura 25 - SDS-PAGE do ensaio de purificação de TRX_ZIKV-C em TALON®. 1: Lisado total; 2: Fração não ligada; 3: Eluído com Imidazol 100 mM. (Autoria própria)

Com o intuito de investigar se a banda de interesse se tratava, de fato, da proteína TRX_ZIKV-C, foi transformado o clone *E. coli* Rosetta Gami 2 pET-TRX_GFP, como *E. coli* Rosetta Gami 2 pET-TRX_ZIKV-C, exceto pela substituição da sequência codificante de ZIKV-C pela sequência codificante de GFP. Tendo esse controle, foi feita nova expressão e purificação e também o western blot utilizando o anticorpo anti-His.

Na Figura 26 observa-se que a fração eluída da coluna apresenta uma banda compatível com TRX_ZIKV-C, de aproximadamente 26 kDa. No entanto, o western blot revelou que esta banda não era reativa a anti-His, e uma banda reativa com aproximadamente metade do tamanho. De fato, a fração eluída de TRX_GFP também apresenta banda correspondente com 26 kDa, indicando que a banda observada em TRX_ZIKV-C pode corresponder a uma proteína contaminante.

É possível observar no controle a presença de duas bandas reativas: uma banda esperada de 46 kDa e uma banda de menor tamanho, aproximadamente 20 kDa.

Considerando que tanto a massa molecular de GFP quanto de TRX é de 27 kDa e é possível que, durante o cultivo e expressão, a proteína seja alvo de proteases na porção final de TRX, não foi possível determinar qual a porção de TRX_ZIKV-C expressa está sendo purificada, dificultando a obtenção de ZIKV-C purificado.

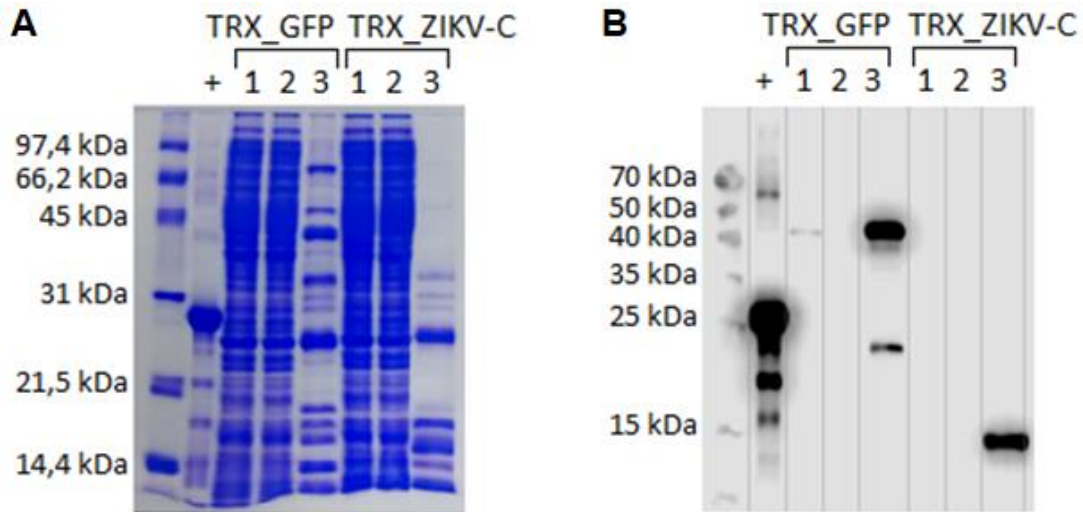


Figura 26 - SDS-PAGE (A) e Western Blot (B) do ensaio de purificação de TRX_ZIKV-C e TRX_GFP em TALON®.+: Controle positivo, 32 kDa; 1: Lisado total; 2: Fração não ligada; 3: Eluído com imidazol 100 mM. (Autoria própria)

#1, #2 e #3 se referem a 3 clones diferentes de *E. coli* pET-TRX_ZIKV-C obtidos a partir de uma única transformação Tendo apresentado melhor resultado entre as resinas utilizadas, TALON® foi utilizada também para a purificação de ZIKV-C a partir do extrato celular de *E. coli* C43 pET-28a_ZIKV-C. Os resultados iniciais revelaram uma banda de tamanho esperado (13 kDa) e reativa a anti-His, porém com proporção

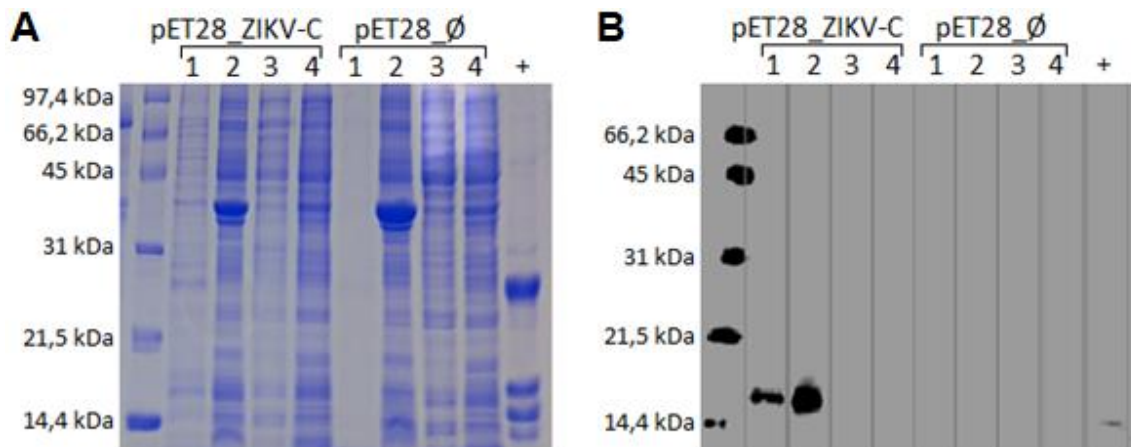


Figura 27 - SDS-PAGE (A) e Western Blot (B) do ensaio de purificação de ZIKV-C em TALON®. +: Controle positivo, 15 kDa; 1: Lisado no momento da indução; 2: Fração solúvel após indução; 3: Fração insolúvel após indução; 4: Eluído. (Autoria própria)

significativa presente na fração insolúvel do extrato, como é possível observar na Figura 27.

Com objetivo de aumentar a solubilidade da proteína expressa, foi testada condição em temperatura menor (20°C). Apesar de a diminuição da temperatura de indução aumentar a proporção de proteína solúvel, também resultou em menor produção de proteínas em geral, devido ao menor crescimento celular (Figura 28). Isso fez com que a quantidade de ZIKV-C solúvel expressa a 20°C ainda fosse inferior à concentração da mesma solúvel expressa a 37°C, portanto a temperatura mais alta foi utilizada para as expressões posteriores.

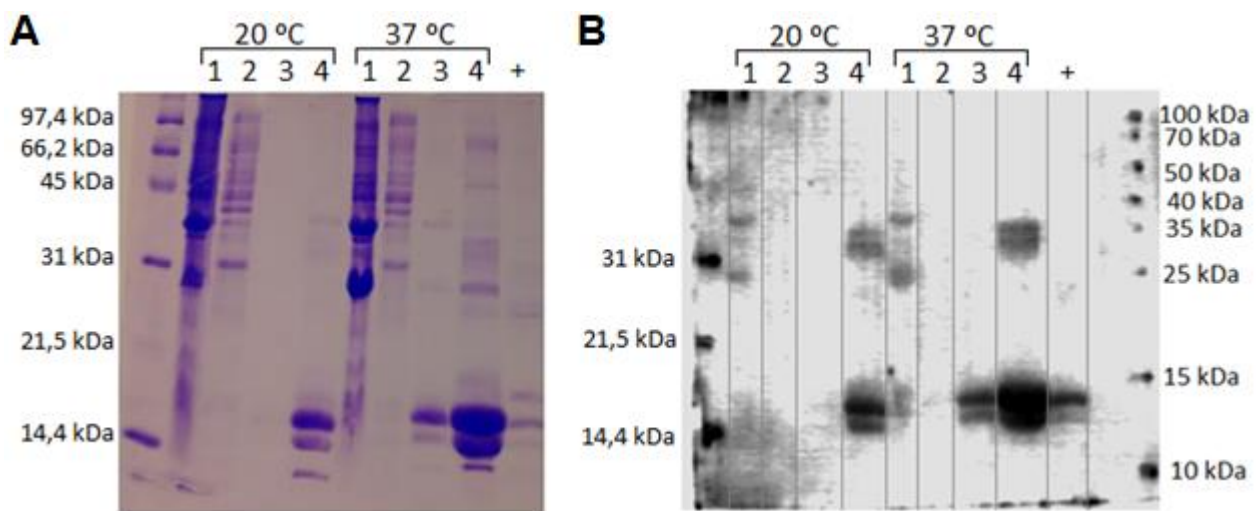


Figura 28 - SDS-PAGE (A) e Western Blot (utilizando como anticorpo primário Anti-His, 1:15000) (B) do ensaio de purificação de ZIKV-C, expressa em diferentes temperaturas, em TALON®. +: Controle positivo, 15 kDa; 1: Fração insolúvel; 2: Fração solúvel; 3: Purificação de cultura induzida por 3 horas; 4: Purificação de cultura induzida por 16 horas. (Autoria própria)

Para obter ZIKV-C purificada em maior quantidade, o volume de cultivo foi aumentado e a purificação passou a ser feita em sistema de cromatografia AKTA, que permite um melhor acompanhamento e controle do processo de purificação. A eluição foi feita através de gradiente contínuo de imidazol, que permite aumentar a pureza da amostra separando com maior eficiência contaminantes com diferentes afinidades à resina, da proteína de interesse. Foi observado um único pico bem definido (Figura 29A), que foi coletado e submetido a SDS-PAGE e western blot assim como amostras do extrato anterior à purificação e da fração não ligada (Figura 29B). Foram observadas bandas reativas a anti-His na amostra purificada. A presença de mais de uma banda no Western Blot pode indicar alguma degradação ou atividade proteolítica sobre ZIKV-C.

A fim de aumentar a pureza da amostra e separar as proteínas presentes, foi introduzido um segundo passo de cromatografia, constituído de cromatografia de exclusão molecular. A coluna Sephacryl S-200 HR foi selecionada, devido a sua capacidade de separar proteínas de um espectro de tamanhos que inclui as proteínas presentes após a purificação em TALON®.

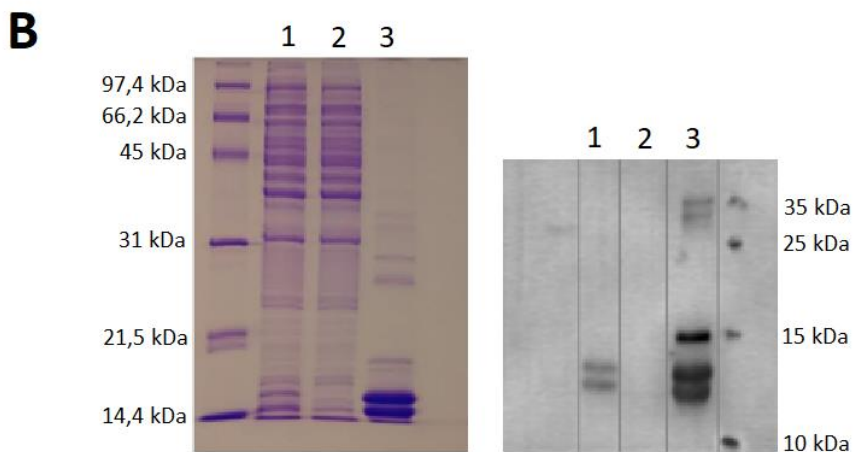
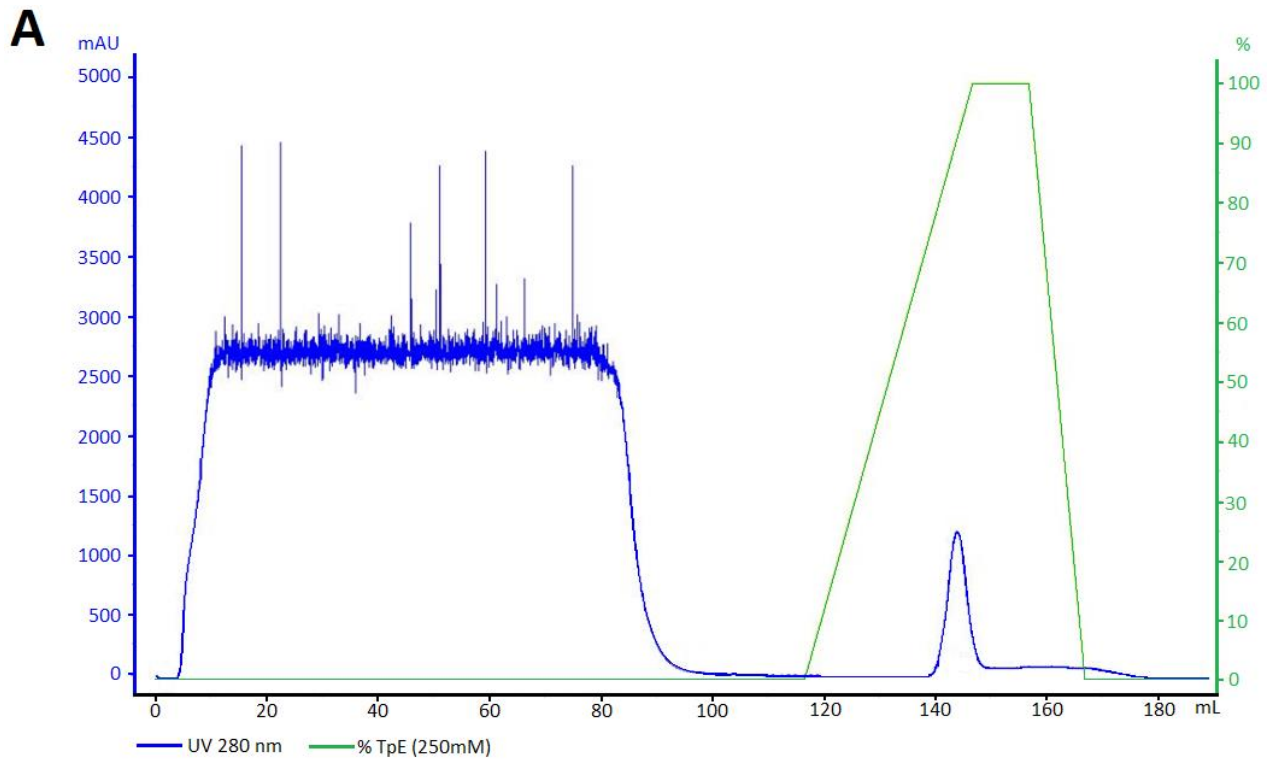


Figura 29 – A: Cromatograma da purificação por afinidade na resina TALON® de ZIKV-C. A concentração de tampão de eluição (250mM de imidazol) variou de 0% a 100% em 3 volumes de coluna. B: SDS-PAGE e Western Blot da fração solúvel (1), fração não ligada (2) e amostra referente ao pico eluído (3). (Autoria própria)

Para isso, nova purificação foi feita em resina Talon®, a fração referente ao pico foi coletada, concentrada e aplicada na coluna de exclusão molecular. Foram coletadas

amostras referentes aos picos observados, que foram precipitadas e analisados por SDS-PAGE e Western Blot, e os resultados estão apresentados na Figura 30. As amostras coletadas foram precipitadas e ressuspensas em volumes menores, para aumento de sua concentração. Isso foi necessário devido à baixa concentração proteica das amostras, como pode ser observado no cromatograma, onde o maior pico apresentou absorvância em UV280 nm de 200 mAu, em comparação com a absorvância observada na purificação anterior, quando o pico atingiu 1200 mAU.

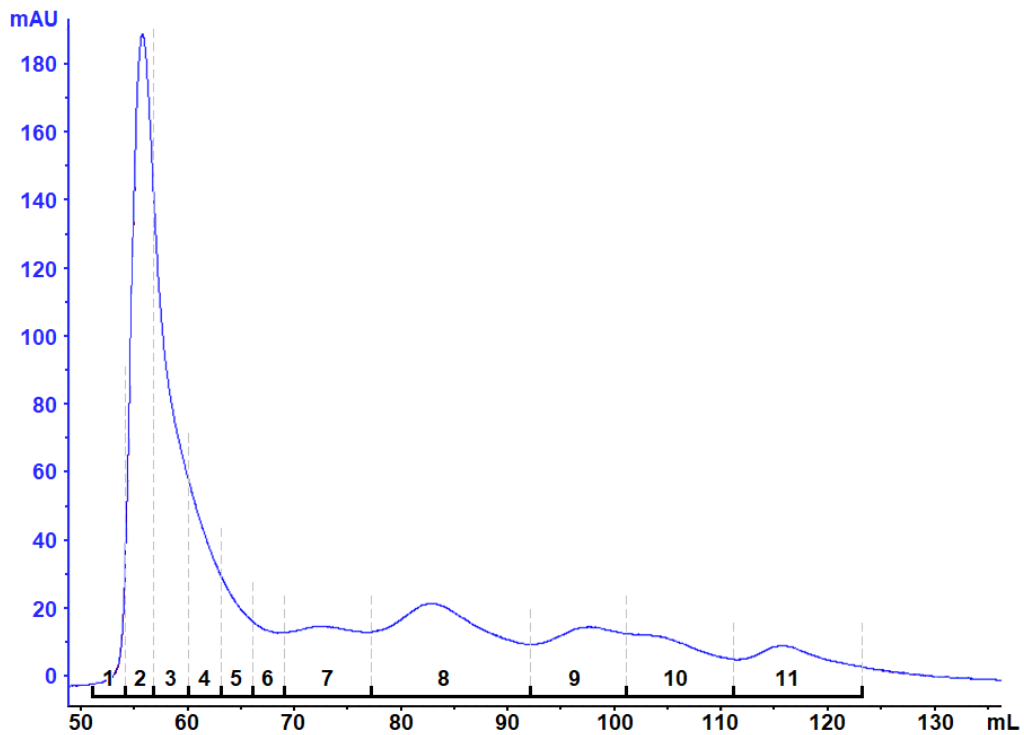
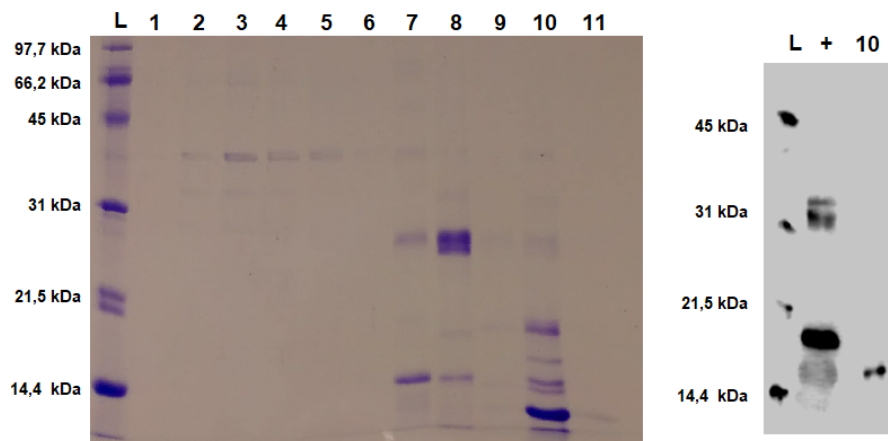
A**B**

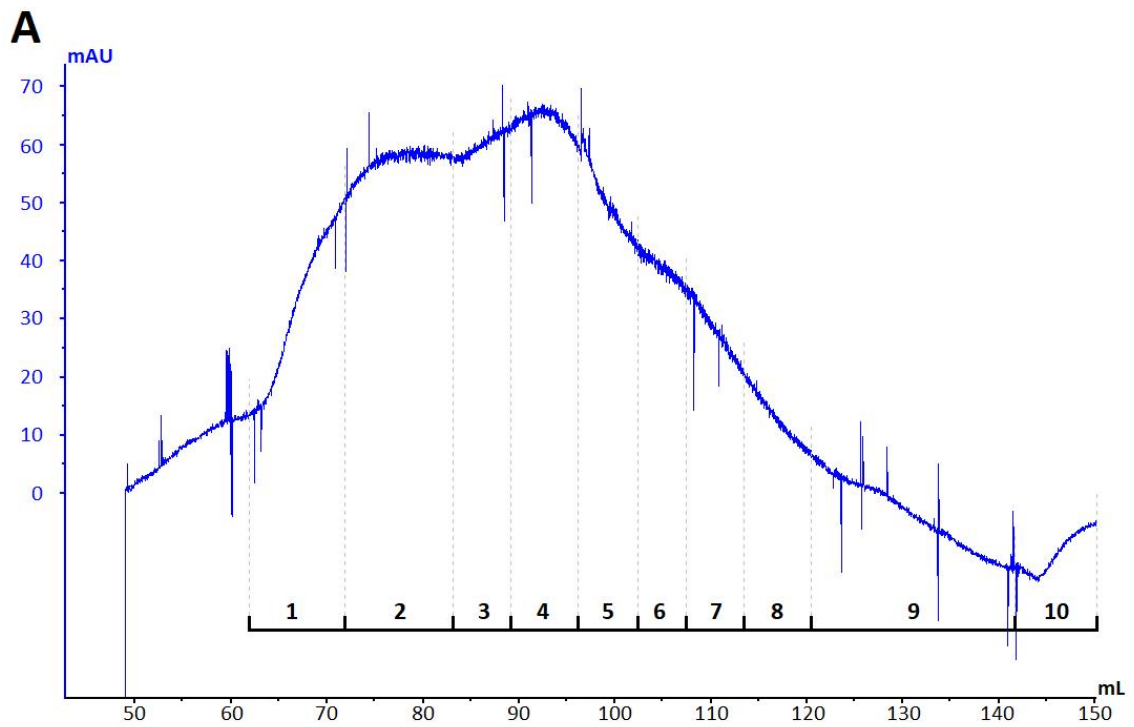
Figura 30 – A: Cromatograma de Exclusão molecular de ZIKV-C purificada em TALON. B: Gel de poliacrilamida dos picos coletados e western blot mostrando a presença de ZIKV-C na fração 10. L: Marcador molecular; +: Controle positivo. (Autoria própria)

Apesar de os resultados indicarem a presença de ZIKV-C, a concentração da proteína na amostra é baixa, e novas expressões de cultura e purificação resultaram em concentrações cada vez menores, mesmo com volumes maiores de cultura. Não é incomum durante a experiência em laboratório de biologia molecular deparar-se com clones produzidos para expressão de uma proteína heteróloga que, mesmo armazenados e manipulados corretamente, passem a produzir concentrações menores

de proteína recombinante ou mesmo não mais a expressem. Esta é uma possível razão para o resultado observado, por isso foi preparado novo clone. As condições de expressão e purificação foram reproduzidas conforme descrito anteriormente, porém o rendimento obtido foi muito pequeno, o que nos levou ao aumento do volume inicial de cultura.

A Figura 31 mostra o cromatograma, SDS-PAGE e western blot referentes à expressão e purificação em TALON de 10 litros de cultivo. Diferentemente da purificação mostrada na Figura 29A, o pico eluído atingiu apenas 65 mAU. Para que fosse possível a análise das proteínas presentes no eluído, as amostras coletadas (1 a 10 na Figura 31) foram concentradas 100x.

A fim de confirmar que a proteína purificada e reativa a anti-His correspondia à ZIKV-C, foram recortadas e submetidas a espectrometria de massas. O resultado mostrou a presença de peptídeos compatíveis com ZIKV-C e sem correspondência com proteínas no banco de *E. coli*, confirmando a expressão de ZIKV-C (Figura 32).



B

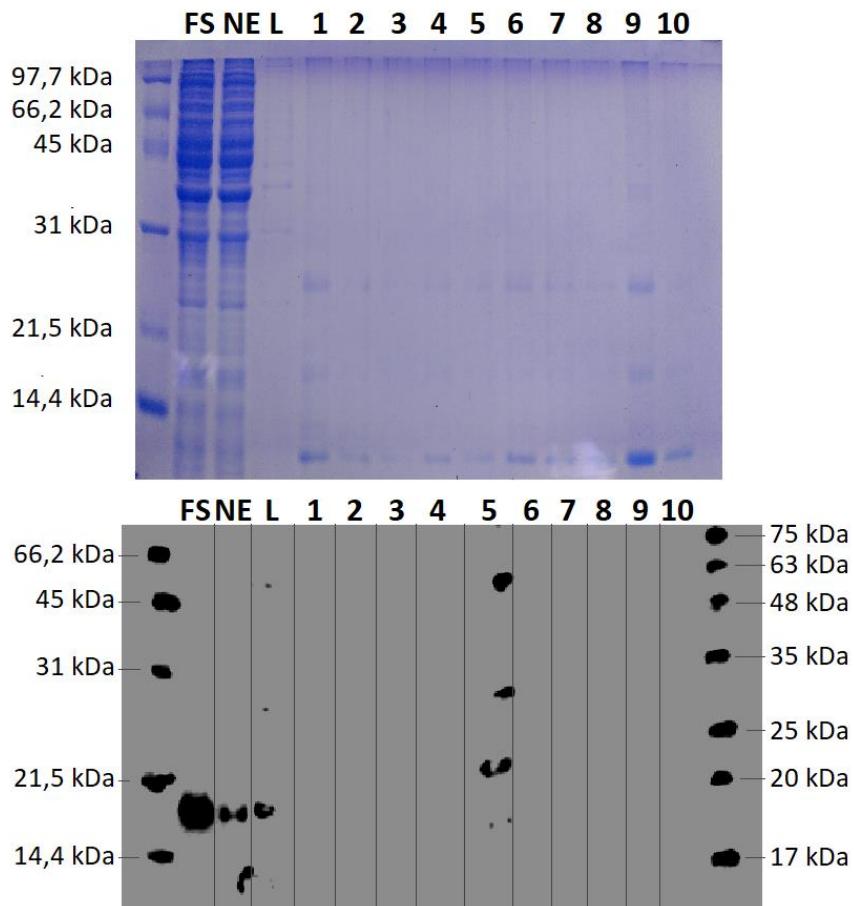


Figura 31 - A: Cromatograma de purificação em TALON de ZIKV-C. B: Gel de poliacrilamida e western blot dos picos coletados. FS: Fração Solúvel. NE: Não Ligado. L: Lavagem. As amostras 1-13 estão concentradas 100x. (Autoria própria)

5 Conclusão

Este estudo explorou a possibilidade da produção heteróloga de proteínas estruturais de *Zika virus*.

Foi possível observar a expressão das proteínas estruturais em *P. pastoris* através da presença de ZIKV-E, porém esta ou a formação de VLPs não pode ser comprovada com o uso de anticorpos anti-ZIKV.

Foi realizada a expressão da proteína do capsídeo recombinante em *E. coli*, e sua purificação é possível através de purificação de afinidade, mesmo que em baixa quantidade. A expressão foi comprovada através de reconhecimento por anticorpos anti-His e espectrometria de massas.

6 Perspectivas

- Testar outros tipos de gradiente de sacarose e tempos maiores para purificação de VLPs de ZIKV através de ultracentrifugação
- Otimizar a purificação de ZIKV-C para produção de anticorpos
- Realizar estudos biofísicos para caracterização estrutural de ZIKV-C
- Realizar ensaios para formação/detecção de NLPs a partir de ZIKV-C recombinante

7 Referências

- ALANIZ, A. J.; BACIGALUPO, A.; CATTAN, P. E. Spatial quantification of the world population potentially exposed to Zika virus. **International Journal of Epidemiology**, v. 46, n. 3, p. 966–975, 2017.
- AMBERG, S. M.; RICE, C. M. Mutagenesis of the NS2B-NS3-mediated cleavage site in the flavivirus capsid protein demonstrates a requirement for coordinated processing. **Journal of virology**, v. 73, n. 10, p. 8083–94, 1999.
- ARAGAO, M. F. V. V. *et al.* Nonmicrocephalic infants with congenital zika syndrome suspected only after neuroimaging evaluation compared with those with microcephaly at birth and postnatally: How large is the Zika virus “iceberg”? **American Journal of Neuroradiology**, v. 38, n. 7, p. 1427–1434, 2017.
- ARAÚJO, T. V. B. DE *et al.* Association between Zika virus infection and microcephaly in Brazil, January to May, 2016: preliminary report of a case-control study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 12, p. 1356–1363, 2016.
- BESNARD, M.; LASTERE, S.; TEISSIER, A. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. **Euro Surveill**, v. 19, n. February, p. 8–11, 2014.
- BLAZEVIC, J. *et al.* The membrane anchors of the structural flavivirus proteins and their role in virus assembly. **Journal of Virology**, v. 90, n. May, p. JVI.00447-16, 2016.
- BRASIL, P. *et al.* Guillain-Barré syndrome associated with Zika virus infection. **The Lancet**, v. 387, n. 10026, p. 1482, 2016.
- BYK, L. A.; GAMARNIK, A. V. Properties and Functions of the Dengue Virus Capsid Protein. **Annual review of virology**, n. July, p. 1–19, 2016.
- CAO-LORMEAU, V.-M. *et al.* Guillain-Barré syndrome outbreak caused by ZIKA virus infection in French Polynesia. **Lancet**, v. 387, n. 10027, p. 1531–1539, 2016.
- CAROD-ARTAL, F. J. Epidemiology and neurological complications of infection by the Zika virus: a new emerging neurotropic virus. **Rev Neurol**, v. 62, n. 7, p 317-328, 2016.
- CHAMBERS, T. J. *et al.* AND REPLICATION ORGJ \ NIZATION , EXPRESSION , I. 1990.
- CHANG, H.-H. *et al.* Systematic analysis of protein identity between Zika virus and other arthropod-borne viruses. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 95, n. 7, p. 517–525I, 2017.
- DAI, L. *et al.* Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. **Cell Host and Microbe**, v. 19, n. 5, p. 696–704, 2016.
- DICK, G. W.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus. I. Isolation and serological specificity. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 46, n. 5, p. 509-520, 1952.
- DUFFY, M. R. *et al.* Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **The New England Journal of Medicine**, v. 360, p. 2536–2543, 2009.

FAYE, O. *et al.* Molecular evolution of zika virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 9 jan. 2014. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0002636>>

FOY, B. D. *et al.* Probable Non-Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 880–882, 2011.

FRANCA, R. F. O. *et al.* First International Workshop on Zika Virus Held by Oswaldo Cruz Foundation FIOCRUZ in Northeast Brazil March 2016 – A Meeting Report. n. March, p. 10–14, 2016.

FREIRE, J. M. *et al.* Peptides as models for the structure and function of viral capsid proteins: Insights on dengue virus capsid. **Biopolymers**, v. 100, n. 4, p. 325-336, 2013.

HADDOW, A. D. *et al.* Genetic characterization of zika virus strains: Geographic expansion of the asian lineage. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, 2012.

HEINZ, F. X.; ALLISON, S. L. Flavivirus Structure and Membrane Fusion. **Advances in Virus Research**, v. 59, p. 63–97, 2003.

HEINZ, F. X.; STIASNY, K. The Antigenic Structure of Zika Virus and Its Relation to Other Flaviviruses: Implications for Infection and Immunoprophylaxis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 81, n. 1, p. e00055-16, 2017.

JONES L. C., *et al.* Flavivirus Capsid Is a Dimeric Alpha-Helical Protein. **J. Virol**, v. 77, n. 12, p. 7143-7149, 2003.

KOSTYUCHENKO, V. A. *et al.* Structure of the thermally stable Zika virus. 2016.

KRAUER, F. *et al.* Zika Virus Infection as a Cause of Congenital Brain Abnormalities and Guillain–Barré Syndrome: Systematic Review. **PLoS Medicine**, v. 14, n. 1, p. 1–27, 2017.

LIU, W.; JIANG, H.; ZHOU, J. Recombinant dengue virus-like particles from *Pichia pastoris*: efficient production and immunological properties. p. 53–59, 2010.

MANI, S. *et al.* *Pichia pastoris*-Expressed Dengue 2 Envelope Forms Virus-Like Particles without Pre-Membrane Protein and Induces High Titer Neutralizing Antibodies. v. 8, n. 5, p. 1–9, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL). Febre pelo vírus Zika: uma revisão narrativa sobre a doença. **Boletim Epidemiológico**, v. 46, n. 26, p. 1–7, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL). Portaria nº 204, de 17 de fevereiro de 2016. p. 1–2, 2016.

MURRELL, P. How grid Responds to Non-Finite Values. **October**, p. 1–2, 2010.

MUSSO, D. *et al.* Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia. **Euro Surveill**, v. 19, n. November 2013, p. 20761, 2014.

NGUYEN, J. B. *et al.* Physico-chemical requirements and kinetics of membrane fusion of flavivirus-like particles. n. 2015, p. 1702–1711, 2016.

OLIVEIRA MELO, A. S. *et al.* Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: Tip of the iceberg? **Ultrasound in Obstetrics and Gynecology**, v. 47, n. 1, p. 6–7, 2016.

- OLSON, J. G. *et al.* Zika virus, a cause of fever in central java, indonesia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 3, p. 389–393, 1981.
- PRASAD, V. M. *et al.* Structure of the immature Zika virus at 9 Å resolution. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 24, n. 2, p. 184–186, 2017.
- ROBY, J. A. *et al.* Post-translational regulation and modifications of flavivirus structural proteins. **Journal of General Virology**, v. 96, n. 7, p. 1551–1569, 2015.
- ROTH, A. *et al.* Eurosurveillance , Volume 19 , Issue 41 , 16 October 2014 Rapid communications CONCURRENT OUTBREAKS OF DENGUE , CHIKUNGUNYA AND ZIKA VIRUS INFECTIONS – AN UNPRECEDENTED EPIDEMIC WAVE OF MOSQUITO - BORNE VIRUSES IN THE PACIFIC 2012 – 2014. **Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin**, v. 19, n. 41, p. 1–8, 2014.
- SANTOS, T. DOS *et al.* Zika Virus and the Guillain – Barré Syndrome — Case Series from Seven Countries. p. 1–4, 2016.
- SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (BRASIL). Boletim epidemiológico 22. v. 49, n. 85, p. 1–13, 2018.
- SHANG, W. *et al.* Dengue virus-like particles : construction and application. p. 39–46, 2012.
- SHUSTOV, A. V.; MASON, P. W.; FROLOV, I. Production of Pseudoinfectious Yellow Fever Virus with a Two- Component Genome. v. 81, n. 21, p. 11737–11748, 2007.
- SIMMONDS, P. *et al.* ICTV virus taxonomy profile: Flaviviridae. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 10, p. 2421–2422, 2017.
- SIROHI, D. *et al.* The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. **Science (New York, N.Y.)**, v. 352, n. 6284, p. 467–70, 2016.
- SMITHBURN, K. C. Neutralizing antibodies against certain recently isolated viruses in the sera of human beings residing in East Africa. **J Immunol**, v. 69, p. 223–234, 1952.
- SUGRUE J. R. *et al.* Expression of the dengue virus structural proteins in *Pichia pastoris* leads to the generation of virus-like particles. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 1861-1866, 1997
- TO, A. *et al.* Recombinant Zika Virus Subunits Are Immunogenic and Efficacious in Mice. **mSphere**, v. 3, n. 1, p. e00576-17, 2018.
- URAKAMI, A. *et al.* An Envelope-Modified Tetravalent Dengue Virus-Like-Particle Vaccine Has Implications for Flavivirus Vaccine Design. v. 91, n. 23, p. 1–16, 2017.
- VANBLARGAN, L. A. *et al.* Context-Dependent Cleavage of the Capsid Protein by the West Nile Virus Protease Modulates the Efficiency of Virus Assembly. **Journal of virology**, v. 89, n. 16, p. 8632–42, 2015.
- VENTURA, L. O. *et al.* Visual impairment evaluation in 119 children with congenital Zika syndrome. **Journal of AAPOS**, p. 218–223, 2018.