



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

ANA CARINE DE MIRANDA RIOS

PRODUÇÃO DA PORÇÃO PROTEASE DA PROTEÍNA NS3 DO VÍRUS DA ZIKA

Recife
2022

ANA CARINE DE MIRANDA RIOS

PRODUÇÃO DA PORÇÃO PROTEASE DA PROTEÍNA NS3 DO VÍRUS DA ZIKA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre/doutor em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde.

Orientador: Antonio Carlos de Freitas

Co-orientadora: Anna Jéssica Duarte Silva

Recife
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Rios, Ana Carine de Miranda

Produção da porção protease da proteína NS3 do vírus da Zika/ Ana Carine de Miranda Rios– 2022.

75 f. : il., fig., tab.

Orientador: Antônio Carlos de Freitas

Coorientadora: Anna Jéssica Duarte Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2022.

Inclui referências.

1. Vacinas 2. Vírus da Zika 3. Proteínas I. Freitas, Antônio Carlos de (orient.) II. Silva, Anna Jéssica Duarte (coorient.) III. Título

615.372

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022 -255

ANA CARINE DE MIRANDA RIOS

PRODUÇÃO DA PORÇÃO PROTEASE DA PROTEÍNA NS3 DO VÍRUS DA ZIKA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Biociências, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde.

.

Aprovado em: 28/01/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Christian Robson de Souza Reis (Examinador Externo)
Fundação Oswaldo Cruz

Prof. Dr. André Luiz Santos de Jesus (Examinador Externo)
Instituto Federal de Ciência e Tecnologia de Mato Grosso

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por tornar tudo isso possível. Por ter me concedido o dom da vida, da oportunidade de fazer um mestrado (com bolsa) e ter me amparado nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, Solange e Osvaldo, que sempre me apoiaram, mesmo quando eu não passei de primeira no mestrado. Mas eles me guiaram e fizeram possível a aprovação acontecer da maneira que foi.

Ao meu namorado, Guilherme, que me acompanha desde a graduação, passou por todas as etapas do mestrado comigo. Mesmo nos dias mais difíceis, ele estava lá para me apoiar e me mostrar que tudo daria certo no final. As minhas amigas da graduação, Vanessa, Natália e Millena, que mesmo distantes fisicamente, sempre estiveram dispostas a me amparar.

Aos meus amigos do colégio, Amanda da Fonte, Amanda Gabriela, Dani, Júlia, Gabi, Cella, Arthur e Marcos, que me acompanham há mais de 8 anos e conhecem a minha história mais do que eu. Mesmo quando eles não sabiam, sempre me deram força e me vibraram comigo em todas as alegrias.

Ao meu orientador, Antonio Carlos, que me recebeu de braços abertos ainda na graduação, quando era uma estudante de Farmácia querendo fazer uma iniciação na área de Genética e com horários tão complicados, mas isso não foi empecilho para iniciar o meu grande sonho. O senhor teve um papel muito importante na minha vida, sabendo reconhecer meus erros e acertos, me recebendo no mestrado mesmo nas condições de não ter bolsa e precisar trabalhar, compreendendo todas as situações. Muito obrigada por ter me aceitado de início.

A minha co-orientadora, Anna Jéssica, foi como uma mãe para mim nesses 2 anos. Sempre com palavras de carinho para me acalmar e mostrar que tudo daria certo. Vou levar para sempre seus ensinamentos, seja no ramo científico ou na vida.

Aos meus colegas de laboratório, Lígia, Bianca, Daffany, Larissa, Conceição, Guilherme e Renata que fizeram a rotina ser mais leve e me ajudar nos momentos de incerteza, mesmo que vocês não soubessem.

RESUMO

O vírus da Zika (ZIKV) foi responsável por surtos da doença nos últimos anos, principalmente no Brasil, associado aos casos de microcefalia e a síndrome de Guillain-Barré. Este cenário apontou para a necessidade de investigar estratégias vacinais, drogas anti-virais e métodos de diagnóstico, visto que, as medidas profiláticas de controle de disseminação do mosquito- vetor são pouco efetivas, sobretudo em países subdesenvolvidos. A grande maioria das estratégias utilizadas para o vírus da Zika foram oriundas do vírus da Dengue, como por exemplo as estratégias envolvendo a proteína NS3. Esse antígeno vem sendo estudado como um alvo interessante para diagnóstico e também para vacinas, pela presença de epítopsos específicos que induzem a ativação de células T. Estudos têm apontado que esta proteína não induz efeitos de resposta exacerbada da doença, após o indivíduo ter sido contaminado previamente por outro flavívirus e já possuir anticorpos sub- neutralizantes para o mesmo. Bactérias como *Escherichia coli*, são muito utilizadas como biofábricas, para produção de proteínas heterólogas, com benefícios de rápido crescimento e custo baixo de manutenção. O presente trabalho visou a produção e purificação da porção protease da proteína NS3 do vírus da Zika em *E. coli*. O gene foi clonado no vetor de expressão pGEX-4T3 e transformado em células de *E.coli* BL21(DE3). SDS-PAGE e Western Blot foram utilizados para confirmar a produção. Após comprovar a expressão da porção protease da proteína NS3, experimentos para purificação da mesma foram realizados através de ensaios com resina de níquel e Glutathione Sepharose. Contudo, os resultados obtidos não foram suficientes para prosseguimento dos experimentos in vitro, pois o processo de purificação da proteína não foi bem sucedido, impossibilitando a avaliação do potencial imunoestimulatório da porção protease da proteína NS3. Ainda assim, a proteína NS3 é apontada como importante alvo terapêutico para controle da doença, e por isso, seu uso deve continuar sendo explorado, afim de elucidar respostas acerca do seu perfil imune, visto que maioria dos estudos acerca da proteína são voltados para a sua estrutura e função.

Palavras-chave: *Escherichia coli*; recombinante; Zika vírus; Vacinas; Proteínas; NS3.

ABSTRACT

The Zika virus (ZIKV) was responsible for outbreaks of the disease in recent years, mainly in Brazil, associated with cases of microcephaly and Guillain-Barré syndrome. This scenario pointed to the need to investigate vaccine strategies, antiviral drugs and diagnostic methods, since prophylactic measures to control the spread of the mosquito-vector are ineffective, especially in underdeveloped countries. The vast majority of strategies used for the Zika virus originated from the Dengue virus, such as strategies involving the NS3 protein. This antigen has been studied as an interesting target for diagnosis and also for vaccines, due to the presence of specific epitopes that induce T cell activation. Studies have pointed out that this protein does not induce exacerbated disease response effects, after the individual has been previously contaminated by another flavivirus and already has sub-neutralizing antibodies for the same. Bacteria such as *Escherichia coli* are widely used as biofactories for the production of heterologous proteins, with the benefits of rapid growth and low maintenance cost. The present work aims at the production and purification of the protease portion of the Zika virus NS3 protein in *E. coli*. The gene was cloned into the pGEX-4T3 expression vector and transformed into *E. coli* BL21(DE3) cells. SDS-PAGE and Western Blot were used to confirm production. After proving the expression of the protease portion of the NS3 protein, experiments for its purification were carried out through assays with nickel resin and Glutathione Sepharose. However, the results obtained were not sufficient to continue the *in vitro* experiments, as the protein purification process was not successful, making it impossible to evaluate the immunostimulatory potential of the protease portion of the NS3 protein. Even so, the NS3 protein is identified as an important therapeutic target to control the disease, and therefore, its use should continue to be explored, in order to elucidate responses about its immune profile, since most studies about the protein are focused on its structure and function.

Keywords: *Escherichia coli*; recombinant; Zika virus; Vaccines; Proteins; NS3.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
1.1	OBJETIVOS	10
1.1.1	Objetivo Geral	10
1.1.2	Objetivos específicos	9
2	REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1	BREVE HISTÓRICO EPIDEMIOLÓGICO DO ZIKA	11
2.2	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E TRANSMISSÃO	15
2.3	GENOMA DO VÍRUS	19
2.4	CICLO VIRAL DOS FLAVIVÍRUS NA CÉLULA HOSPEDEIRA	21
2.4	ESTRATÉGIAS VACINAIS EM DESENVOLVIMENTO PARA ZIKV	24
2.5	PROTEÍNA NS3	26
2.6	<i>E.coli</i> COMO SISTEMA DE EXPRESSÃO HETERÓLOGA	29
3	MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1	MATERIAIS	30
3.1.1	Gene	30
3.1.2	Vetor de Expressão	30
3.1.3	Linhagem de Microorganismos	32
3.1.4	Meio de Cultura e Condições de Cultivo	32
3.1.5	Tampões e Soluções	33
3.1.6	Géis de Eletroforese para DNA e Proteínas	34
3.1.7	Enzimas	34
3.2	MÉTODOS	35
3.2.1	Clonagem no vetor pGEX	35
3.2.2	Indução da Expressão Gênica	36
3.2.3	Purificação da Proteína NS3 por Resina de Níquel	37
3.2.4	Purificação da Proteína NS3 por Resina de Glutathione Sepharose	38
3.2.5	Precipitação de Proteínas por TCA/Acetona Gelada	39
3.2.6	Análises por SDS-PAGE e Western Blot	40
4.	RESULTADOS	41
4.1	CLONAGEM NO VETOR pGEX	41
4.2	EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS EM <i>E.coli</i> BL21 DE3	42
4.3	PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA NS3 EM RESINA DE NÍQUEL	43
5.	DISCUSSÃO	56

6	CONCLUSÃO.....	63
	REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

As arboviroses são doenças causadas por artrópodes, sendo a Dengue, Zika e Chikungunya umas das mais conhecidas, e despertam atenção por terem causado grandes surtos na América Central. A infecção pelo ZIKV é responsável por causar a síndrome congênita em recém-nascidos, relacionado a microcefalia e transtornos neurológicos, e em adultos, a síndrome de Guillain-Barré. Após o surto de casos em 2015-2016 no Brasil, a doença foi declarada pela OMS como um problema de saúde pública, necessitando do desenvolvimento de estratégias vacinais, drogas antivirais e métodos de diagnóstico, para controlar e diminuir os casos de infecção.

Diferentes grupos de pesquisa vêm trabalhando em vacinas para a doença, importando estratégias que já eram utilizadas para o vírus da Dengue, devido a similaridade entre eles. O vasto número de vacinas em desenvolvimento não limita o estudo de estratégias alternativas, ao passo que fornece opções que sejam eficazes e seguras, principalmente para gestantes, mulheres em idade fértil e pessoas imunossuprimidas, pois são os mais afetados e fazem parte do grupo prioritário. Além disso, uma maior opção de estratégias viabiliza a imunização em massa em áreas endêmicas, levando em consideração o suprimento de insumos e o custo para a produção.

A proteína NS3 vem sendo considerada um alvo interessante para o vírus da Dengue e conseqüentemente para o Zika, por conta do seu papel durante a replicação viral e a indução das células T no controle da infecção. Grande parte dos estudos dessa proteína, são acerca da sua estrutura e função, apresentando dados limitados sobre a imunogenicidade e antigenicidade, necessitando de pesquisas nesse sentido para o desenvolvimento de estratégias antivirais.

A expressão de proteínas heterólogas por bactérias, como a *E.coli*, é um sistema muito utilizado na indústria biofarmacêutica, principalmente pelo seu baixo custo, fácil manuseio e crescimento rápido, sendo utilizado como um ótimo meio de obtenção de proteínas para utilização nos estudos *in vitro*. Sendo assim, o presente estudo tem como proposta a produção e purificação da porção protease da proteína NS3 do Zika vírus em *Escherichia coli*.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Obter a porção protease da proteína NS3 do vírus da Zika em *Escherichia coli*.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Produzir a proteína NS3 do ZIKV em sistema de expressão procariótico;
- Purificar a proteína de interesse;

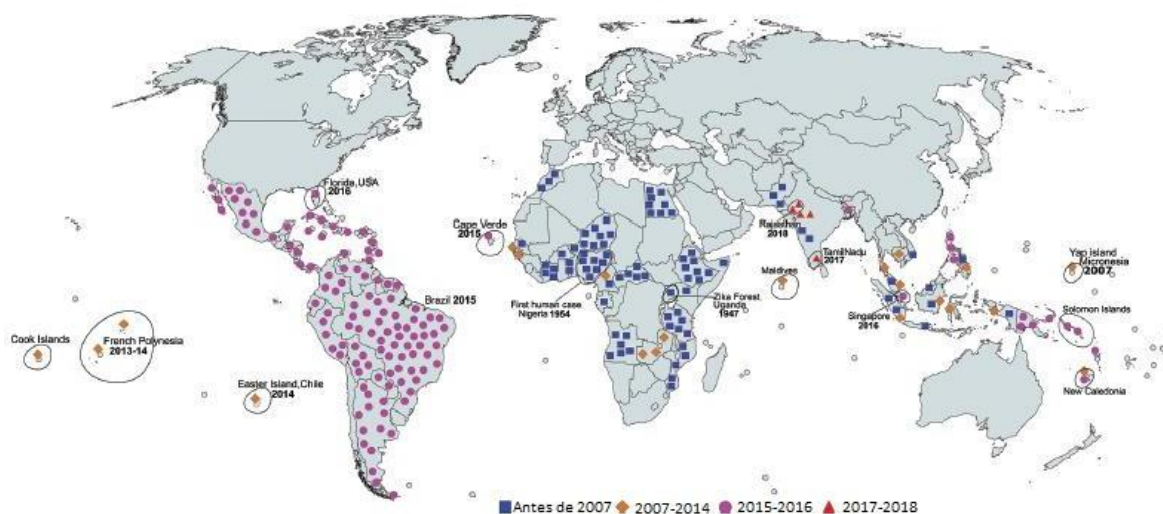
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 BREVE HISTÓRICO EPIDEMIOLÓGICO DO ZIKA

O vírus da Zika (ZIKV) foi identificado primeiramente no ano de 1947, em amostras de soro oriundos de macacos Rhesus, que habitavam florestas na região de Uganda (SIMPSON, 1964). Após isso, foram realizadas investigações acerca do contágio em humanos na área, no entanto, não foram evidenciadas pessoas infectadas, mas sim que já possuíam anticorpos, indicando que o vírus teria a capacidade de infectar a espécie (DICK, 1952). Em 1954, durante um surto de icterícia na Nigéria, o vírus foi detectado em humanos pela primeira vez e com o passar dos anos, casos de infecção foram surgindo em outros países da Ásia e África, como Indonésia e Uganda, ocorrendo em 2007 seu primeiro grande surto na Ilha Yap, localizado no nordeste do Pacífico (MACNAMARA, 1954; SIMPSON, 1964; OLSONI et al., 1981; HAYES et al., 2009). Três anos depois, casos foram reportados na Tailândia, Indonésia, Camboja e Filipinas, demonstrando sinais de que a doença estaria passando de um estado autolimitado para casos mais graves (BUATHONG et al., 2015; ALERA et al., 2015; HEANG et al., 2012; KWONG, et al., 2013; NOORBAKHSI et al., 2019).

Por ser uma doença com uma transmissão que ocorre principalmente através de mosquitos vetores, como *Aedes aegypti*, regiões com uma grande população desses vetores, como a Polinésia Francesa, em 2013, registraram seus primeiros casos da doença, chegando a cerca de 30.000 infectados (AUBRY et al., 2015). Após um ano, a infecção pelo ZIKV se espalhou por outras localidades do Pacífico Sul, como Nova Caledônia e Ilha de Páscoa, que tiveram seus primeiros casos importados da Polinésia Francesa (Figura 1) (DUPONT-ROUZEYROL et al., 2015; TOGNARELLI et al., 2016).

Figura 1: Distribuição geográfica do vírus da Zika de acordo com os anos.



Fonte: Adaptado de SHARMA et al., 2020

Em 2015-2016, foram notificados um grande número de casos da doença no Brasil, com uma estimativa de 440.000 entre 1.300.000 de casos suspeitos, com o primeiro caso sendo reportado em maio de 2015 (HENNESSEY et al., 2016; FARIA et al., 2016). Acredita-se que o vírus tenha entrado em circulação no país a partir de 2013, quando foram realizados eventos importantes, como Copa das Confederações, Copa do Mundo e competição de canoagem na cidade do Rio de Janeiro, atraindo uma grande quantidade de turistas e atletas de países em que estavam ocorrendo surtos de Zika no momento, principalmente no último evento, visto que as regiões do Pacífico, como Polinésia Francesa, não participaram dos eventos da FIFA (ZANLUCA et al., 2015; MEYER et al., 2015; MUSSO et al., 2015). Através do sequenciamento de genoma de amostras brasileiras, foi identificado similaridade com o genótipo asiático e as que circularam na Polinésia Francesa (FARIA et al., 2016).

No Brasil, as regiões Sudeste e Nordeste concentraram a maior parte dos casos de infecção (Tabela 1), enquanto os casos de microcefalia, mais tarde incluída chamada “Síndrome congênita do Zika”, foram maiores na região Nordeste (Tabela 2). Através de dados epidemiológicos e moleculares, foi possível analisar que as cepas circulantes nessa região foram responsáveis pela propagação do ZIKV na região sudeste do país, América do Sul, Central e Caribe (FARIA et al., 2017). No final de 2015, já eram

relatados casos confirmados na Venezuela, México, Paraguai e em mais 8 regiões do Caribe e Américas (MUSSO; GUBLER, 2016).

Tabela 1: Número de casos e incidência do vírus da Zika no Brasil até a Semana Epidemiológica 52 de 2016.

Região/Unidade da Federação	Casos (n)	Incidência (/100 mil hab.)
Norte	12.973	74,2
Rondônia	976	55,2
Acre	58	7,2
Amazonas	4.493	114,1
Roraima	178	35,2
Pará	4.524	55,3
Amapá	452	59,0
Tocantins	2.292	151,3
Nordeste	76.016	134,4
Maranhão	4.523	65,5
Piauí	233	7,3
Ceará	4.305	48,3
Rio Grande do Norte	3.953	114,8
Paraíba	3.750	94,4
Pernambuco	391	4,2
Alagoas	6.874	205,8
Sergipe	220	9,8
Bahia	51.767	340,5
Sudeste	91.053	106,2
Minas Gerais	14.436	69,2
Espírito Santo	2.354	59,9
Rio de Janeiro	68.542	414,2
São Paulo	5.721	12,9
Sul	993	3,4
Paraná	714	6,4
Santa Catarina	92	1,3
Rio Grande do Sul	187	1,7
Centro-Oeste	34.284	222,0
Mato Grosso do Sul	1.719	64,8
Mato Grosso	21.911	671,0
Goiás	10.297	155,8
Distrito Federal	357	12,2
Brasil	215.319	105,3

Fonte: Sinan NET (atualizado em 17/01/2017)

Tabela 2: Distribuição de casos suspeitos de microcefalia até a Semana Epidemiológica 49, Brasil, 2015.

Unidade da Federação	Total de municípios com casos notificados	Casos suspeitos de microcefalia relacionada ao vírus Zika		Óbitos suspeitos (n)
		n	%	
Centro-Oeste				
Distrito Federal	1	2	0,08	0
Goiás	4	5	0,21	0
Mato Grosso	8	72	3	0
Mato Grosso do Sul	2	3	0,12	0
Nordeste				
Alagoas	41	107	4,46	0
Bahia	60	316	13,16	7
Ceará	30	79	3,29	1
Maranhão	24	63	2,62	1
Paraíba	64	371	15,45	4
Pernambuco	145	920	38,32	0
Piauí	15	39	1,62	1
Rio Grande do Norte	40	140	5,83	9
Sergipe	36	118	4,91	4
Norte				
Pará	2	3	0,12	0
Tocantins	24	50	2,08	0
Sudeste				
Espírito Santo	9	14	0,58	0
Minas Gerais	25	35	1,46	0
Rio de Janeiro	12	57	2,37	2
São Paulo	6	6	0,25	0
Sul				
Rio Grande do Sul	1	1	0,04	0
Brasil	549	2401	100	29

Fonte: Ministério da Saúde e Secretarias Estaduais de Saúde (atualizado em 12/12/2015).

Na América do Norte foram registrados casos de ZIKV por volta de 2016, nos estados da Flórida e do Texas, sendo os viajantes oriundos do Caribe os principais responsáveis pela transmissão, além de serem regiões com populações do mosquito vetor, *Ae. aegypti* (LIU et al., 2016; GRUBAUGH et al., 2017). Em 2017, a Índia confirmou alguns casos, contudo, o surto só ocorreu em 2018 nos estados de Rajasthan e Madhya Pradesh, somando cerca de 289 casos, sendo bem inferior quando comparado com o surto no Brasil (WHO, 2018; SHARMA et al., 2020).

Em 2020, segundo dados do Ministério da Saúde foram notificados 6.705 casos prováveis de ZIKV no Brasil, com o estado da Bahia concentrando o maior número. Em relação a gestantes, foram identificados 597 casos, sendo 186 confirmados. Por conta da pandemia da COVID-19, acredita-se que muitos casos foram subnotificados, assim como de outras arboviroses (Ministério da Saúde, 2020).

2.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E TRANSMISSÃO

Os sintomas mais comuns do ZIKV são erupção cutânea, febre, conjuntivite, dores nas articulações e normalmente persistem por 7 dias (MUSSO; GUBLER, 2016; DUFFY et al., 2009; MUSSO; NILLES; CAO-LORMEAU, 2014). Outras manifestações que já foram relatadas, mas menos frequentes são dores de cabeça, fadiga, mal estar e erupção maculopapular (HEANG et al., 2012; NIKOOKAR et al., 2020). No entanto, a maioria das pessoas que são infectadas não desenvolvem sintomas ou quando desenvolvem, estes são confundidos com outras arboviroses, como Dengue e Chikungunya, fator que contribuiu para a subnotificação da doença (DUFFY et al., 2009; IOOS et al., 2014). Devido ao neurotropismo viral, pela infecção do ZIKV são associadas síndromes neurológicas, como microcefalia em recém-nascidos e Guillain-Barré em adultos (OEHLER et al., 2014; SCHULER-FACCINI et al., 2016).

Na síndrome de Guillain-Barré, o sistema imunológico ataca as próprias células nervosas, resultando em fraqueza muscular e paralisia (NIKOOKAR et al., 2020) e seus sintomas começam a aparecer entre 5 e 10 dias após a infecção pelo Zika. Apesar de estar associada a outros tipos de infecção, a síndrome desencadeada pelo ZIKV causa uma maior morbidade e índices de neuropatia (MUÑOZ; PARRA; PARDO, 2017; DIRLIKOV et al., 2018).

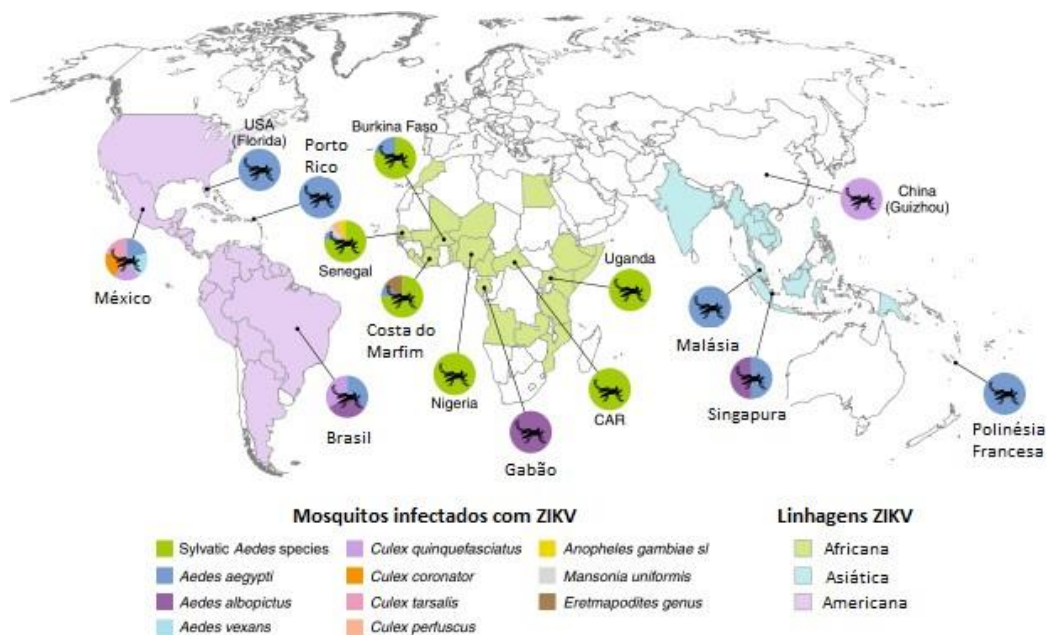
A microcefalia é caracterizada quando uma criança nasce com a circunferência da cabeça menor do que o esperado para o sexo e idade, sendo normalmente dois desvios-padrão abaixo do normal (ASHWAL et al., 2009). Em 2015, durante a epidemia de ZIKV no Brasil, o número de nascidos com essa condição aumentou notavelmente quando comparado com anos anteriores, sugerindo uma relação entre eles (KAZMI et al., 2020). Além disso, outras alterações foram associadas à doença, como calcificações subcorticais, sinais piramidais e extrapiramidais, manchas pigmentadas focais da retina, e mesmo podendo ocorrer relacionado com outras infecções, elas são associadas com maior frequência à infecção pelo ZIKV (MOORE et al., 2017). Mesmo que ao nascer não sejam detectadas malformações, caso a mãe tenha sido infectada durante a gestação, ainda se corre o risco do bebê desenvolver em outros períodos da vida convulsões e deficiência auditiva e

visual (MUSSO; KO; BAUD, 2019). Os riscos maiores durante a gravidez são durante o primeiro trimestre e a microcefalia pode ser detectada a partir do segundo trimestre durante o pré-natal (BRASIL et al., 2016; HOEN et al., 2018; SHAPIRO-MENDOZA et al., 2017; HONEIN et al., 2017; KAZMI et al., 2020).

As formas de transmissão do ZIKV são a sexual, vertical, transfusão sanguínea e a principal, através da picada de mosquitos vetores. Em 1947, o vírus foi isolado de um mosquito *Aedes africanus*, sem indícios de transmissão urbana, com apenas o ciclo silvestre sendo investigado. Alguns anos após, na região da Malásia, a espécie *Aedes aegypti* foi identificada com a presença do vírus, e desde então, esse mosquito é o mais relacionado com a transmissão da doença (GUTIÉRREZ-BUGALLO et al., 2019).

Com a evolução da doença, outras espécies de mosquitos tiveram o vírus detectado em seu organismo, mas nem todos tinham a capacidade de transmitir a doença, seja para humanos ou outros animais. Na Figura 2, temos a listagem dos mosquitos de acordo com a região encontrada, sendo o gênero *Aedes* o mais predominante, com as espécies *Ae. aegypti*, *Aedes albopictus*, *Culex quinquefasciatus*, *Aedes vexans*, *Culex coronator* e *Culex tarsalis*, os mais relacionados com a infecção urbana (MUSSO et al., 2016; GRARD et al., 2014; MARCHETTE; GARCIA; RUDNICK, 1969 ; ELIZONDO-QUIROGA et al., 2018; YEE et al., 2018; SMARTT et al., 2017; GUTIÉRREZ-BUGALLO et al., 2019). Apesar do *Culex* ter demonstrado a capacidade de ser um hospedeiro do vírus e estar presente em áreas urbanas, a sua transmissão aos seres humanos não é tão ativa quando comparado com as outras espécies, visto que possui uma preferência maior por sangue aviário do que o humano (GUTIÉRREZ-BUGALLO et al., 2019). Além destes, *Aedes hensilli* e *Aedes polynesiensis* também estão relacionados com a transmissão ao homem, sendo associados aos surtos na Ilha de Yap, Micronésia e Polinésia Francesa (LEDERMANN et al., 2014; MUSSO; NILLES; CAO-LORMEAU, 2014).

Figura 2: Espécies catalogadas com o vírus ZIKV no organismo, de acordo com a linhagem viral.



Fonte: Adaptado de (GUTIÉRREZ-BUGALLO et al., 2019b).

O Brasil, um dos países mais afetados pela doença, concentra populações das espécies *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, com predominância do primeiro nas regiões Centro-Oeste, Nordeste e Norte, enquanto a outra é mais encontrada na região Sul (MUSSO; GUBLER, 2016; VEGA-RÚA et al., 2014; COELHO, 2012).

O primeiro caso de transmissão sexual foi reportado em 2008 nos EUA, em uma mulher, sem histórico de viagens recentes e que começou a apresentar sintomas da doença. Ao investigar a possível causa da infecção, foi descoberto que seu marido tinha acabado de retornar de uma viagem ao Senegal e além de apresentar os sintomas, o mesmo teve relações sexuais com sua esposa, indicando que a via sexual poderia ter sido o modo de transmissão. Após isso, os casos em regiões não endêmicas começaram a aumentar, alertando para essa via de contato. A transmissão é mais comum de homem para mulher, mas podem acontecer casos de mulher para homem e de homem para homem, seja através de uma relação com contato vaginal, anal ou oral (MOREIRA et al., 2017; SAKKAS et al., 2018).

A principal forma de prevenção é o uso de preservativo, principalmente nos casos em que um parceiro retornou de viagem de uma área endêmica da

doença, sendo indicado o uso da proteção por algumas semanas para diminuir o risco de propagação. Segundo alguns estudos, o vírus pode ser detectado no sêmen por até 188 dias, no entanto, não é possível transmiti-lo durante todo esse período, ocorrendo até por volta do 40º dia após o início dos sintomas (TURMEL et al., 2016; MEAD; HILLS; BROOKS, 2018; SAKKAS et al., 2018).

Quanto à transfusão sanguínea, Musso et al (2014) conduziu uma investigação na Polinésia Francesa e alertou para a possibilidade de infecção por transfusão sanguínea. No Brasil, foi relatado um possível caso (BARJAS-CASTRO et al., 2016) e por conta disso, um estudo foi realizado no país e o fato foi confirmado, visto que o vírus foi detectado em amostras de sangue de doadores. No entanto, os dados encontrados no Brasil não foram tão significativos quanto os da Polinésia Francesa e a explicação seria para a região do país (Campinas, São Paulo) no qual a pesquisa foi conduzida, pois se trata de um local com um número de infectados bem inferior quando comparado com o território do Pacífico. Mesmo assim, fica o alerta para essa forma de transmissão e para o fato de muitos infectados serem assintomáticos, sendo necessário um controle de qualidade mais rígido para impedir a disseminação da doença, principalmente em mulheres grávidas que venham a necessitar de transfusões sanguíneas (MUSSO; NILLES; CAO-LORMEAU, 2014; MAGNUS et al., 2018).

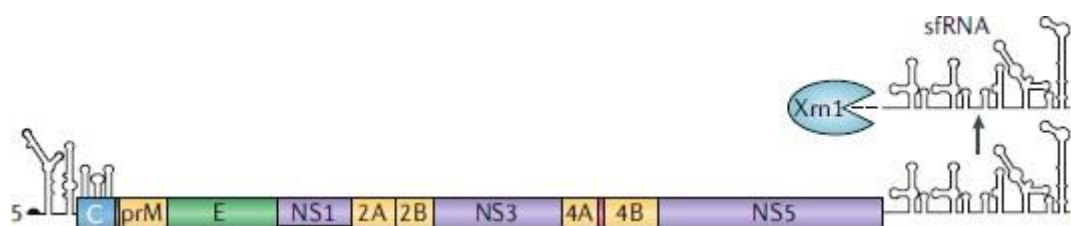
A transmissão vertical ocorre principalmente no estado gravídico, quando ocorre o transporte do vírus para a placenta e com isso, ocorre a replicação em células fetais e nos macrófagos (GREGORY et al., 2017; CAO; DIAMOND; MYSOREKAR, 2017; MINER et al., 2016; NOWAKOWSKI et al., 2016; SIMONI et al., 2017). Além disso, durante o parto pode ocorrer contaminação por conta da troca de sangue e fluidos entre a mãe e o bebê (GREGORY et al., 2017).

O vírus da Zika foi isolado de células nervosas fetais, soro fetal e fluido amniótico (KRAUER et al., 2017; BESNARD et al., 2014; SONG et al., 2017; (ZANLUCA et al., 2015), leite materno (BESNARD et al., 2014), urina e saliva (GRISCHOTT et al., 2016).

2.3 GENOMA DO VÍRUS

O vírus da Zika pertence ao gênero *Flavivirus* e a família *Flaviviridae*, assim como o vírus da Dengue, Febre Amarela, Febre do Nilo Ocidental e da encefalite Japonesa (LIU; SHI; QIN, 2019; WANG et al., 2017). Trata-se de um vírus envelopado, fita única, tendo o RNA como material genético e codifica uma poliproteína única que através da clivagem por proteases virais e do hospedeiro, dará origem à dois subconjuntos de proteínas: as estruturais e não-estruturais, sendo o primeiro grupo composto pelo capsídeo (C), pré-membrana (prM), envelope (E), e o segundo por NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Figura 3) (LIU; SHI; QIN, 2019).

Figura 3: Poliproteína viral de Flavivírus, mostrando a divisão das proteínas estruturais e não-estruturais, regiões 5' e 3' não traduzidas (UTRS), a estrutura Xrn1- RNA resistente (xrRNA) que é responsável por codificar a RNA subgenômico de flavivírus (sfRNA) envolvidos em evasão da resposta imune.



Fonte: (LIU; SHI; QIN, 2019).

As proteínas estruturais irão formar todo o esqueleto do vírus, e cada uma apresenta uma função específica. O capsídeo, possui uma forma icosaédrica e uma bicamada lipídica derivada do hospedeiro, que envolve o material genético, formando o nucleocapsídeo. Logo após, a pré-membrana e o envelope recobrem o nucleocapsídeo, formando a partícula viral imatura, que é transportada até o Aparelho de Golgi, onde ocorre a clivagem da prM em membrana (M), e assim, é formada a estrutura madura. Com as condições adequadas, como pH ácido, ocorre a fusão das proteínas M e E com a membrana do hospedeiro (LIU; SHI; QIN, 2019; YOON et al., 2017).

As proteínas não-estruturais possuem importantes atribuições na replicação, encapsulamento e evasão do sistema imune (PATKAR; KUHN, 2008; SCATURRO et al., 2015; KUMMERER et al., 2002; GRANT et al., 2016; (MIORIN et al., 2017). A NS1 atua nos processos de replicação e infecção

viral, contribui para diminuição dos mecanismos de defesa do sistema imunológico do hospedeiro e nas infecções por flavivírus no geral, é um importante biomarcador, pois apresenta níveis altos durante o processo de patogenicidade, sendo utilizado nos métodos de diagnóstico (AVIRUTNAN et al., 2010; CHUNG et al., 2006; AMORIM et al., 2014; ALCON et al., 2002). A proteína NS2 é subdividida em NS2A e NS2B, no qual a primeira promove uma degradação lisossomal e autofagossômica por mecanismos de interação com as proteínas do hospedeiro e geram uma desordem na proliferação das células gliais (YOON et al., 2017).

A proteína NS3 é essencial para a síntese de material genético viral, pois possui os domínios protease, helicase, NTPase e RTPase. O domínio protease realiza a hidrólise de algumas ligações peptídicas da poliproteína viral, sendo elas entre NS2A- NS2B, NS2B-NS3-NS4A e NS4B-NS5 (CHANPRAPAPH et al., 2005). O domínio helicase é responsável por separar a dupla-fita de RNA durante o processo de síntese e desdobrar estruturas secundárias que surgem nessa etapa. A atividade desenvolvida pela helicase necessita de energia, que é fornecida pela NTPase através da hidrólise das moléculas de ATP (CUI et al., 1998; XU et al., 2005; SAMPATH et al., 2006). Já a RTPase realiza a remoção do grupo fosfato da extremidade 5' e adiciona a estrutura cap no RNA do vírus (MURTHY; CLUM; PADMANABHAN, 1999; SAMPATH et al., 2006; QI; ZHANG; CHI, 2008).

A proteína NS4 também é subdividida em NS4A e NS4B, a primeira atua como cofator de NS3 e NS4B é uma das responsáveis da evasão do sistema imunológico e atua no complexo de replicação viral (ZMURKO; NEYTS; DALLMEIER, 2015; LIANG et al., 2016). A NS5 está envolvida na replicação do genoma, através dos seus dois domínios existentes, o C-terminal RNA polimerase RNA-dependente e o N-terminal metiltransferase. O primeiro é responsável diretamente pelo processo replicativo e o segundo atua na adição do cap 5' para conferir estabilidade à molécula, produção de proteínas bem sucedida e evasão da resposta imune, no qual promove a degradação de STAT2, acarretando numa diminuição da resposta do interferon pelo hospedeiro (GRANT et al., 2016; KUMAR et al., 2016).

2.4 CICLO VIRAL DOS FLAVIVÍRUS NA CÉLULA HOSPEDEIRA

O processo no qual a partícula viral penetra na célula é através da endocitose mediada por receptor, caracterizado principalmente, pela interação entre glicoproteínas ou lipídeos e receptores, tais quais a lectina do tipo-C, TIM e TAM (Figura 4) (DAI et al., 2016; KIM; LI; LINHARDT, 2017; HASTINGS et al., 2017; LIU et al., 2016; MEERTENS et al., 2017; SIROHI; KUHN, 2017). Durante a ligação, moléculas de clatrina, que são responsáveis pela endocitose de moléculas e proteínas da superfície para o meio intracelular, são ativadas na membrana da célula e o vírus é englobado, formando os endossomos (MOUSAVI et al., 2004). No interior deles, o pH acidifica, ocasionando a mudança conformacional da proteína do envelope e a fusão das membranas viral e endossomal, com consequente liberação do material genético para o citoplasma (MERCER et al., 2010; SMIT et al., 2011). A fita simples de RNA é encaminhada para o retículo endoplasmático, onde a poliproteína viral irá ser formada e posteriormente, clivada pelas proteases virais e do hospedeiro nas proteínas estruturais e não-estruturais. A partir disso, as proteínas NS5 e NS3 irão desempenhar funções importantes na replicação e desenrolamento do RNA, respectivamente.

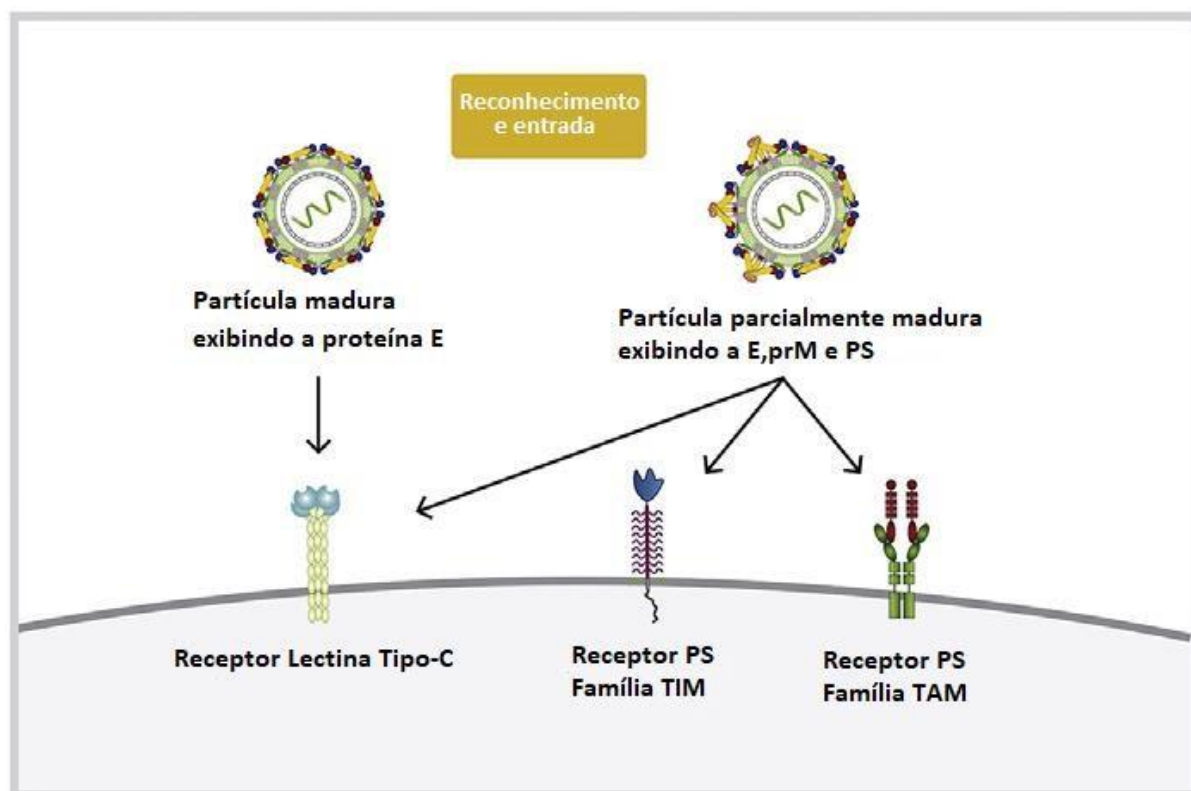
Ainda no retículo endoplasmático, a proteína NS5 será responsável por sintetizar uma nova fita simples do material genético, e com isso, dará origem a dupla fita de RNA que é composta pelo (-) RNA e o (+) RNA (ABRAMS; SOLIS; NATH, 2017; DIOSA-TORO et al., 2020). A porção helicase da proteína NS3 fará o desenrolamento da dupla fita para que o (-) RNA seja utilizado como molde para a produção de (+) RNA, visto que apenas esse é empacotado no vírion durante o processo de síntese, sendo o (-) RNA apenas um intermediário para a replicação (YU et al., 2008; ABRAMS; SOLIS; NATH, 2017; DIOSA-TORO et al. 2020). As proteínas do capsídeo, envelope, pré-membrana e a fita simples positiva do RNA irão se juntar para formar o vírion imaturo, e assim, ser liberado para o aparelho de Golgi para a etapa de amadurecimento (YU et al., 2008).

No Golgi, as proteínas E e prM estão ligadas entre si e devido ao pH ácido, formam uma conformação que resulta na exposição do sítio de clivagem

e assim, pela ação da protease do hospedeiro, a porção “pr” da proteína M é separada. No entanto, ambas ainda continuam ligadas ao envelope, só ocorrendo a completa separação no momento da exocitose, graças ao pH neutro extracelular. Após a liberação da célula, a partícula viral é considerada no estado maduro (Figura 5) (YU et al., 2008; YU et al., 2009; ZHANG et al., 2007).

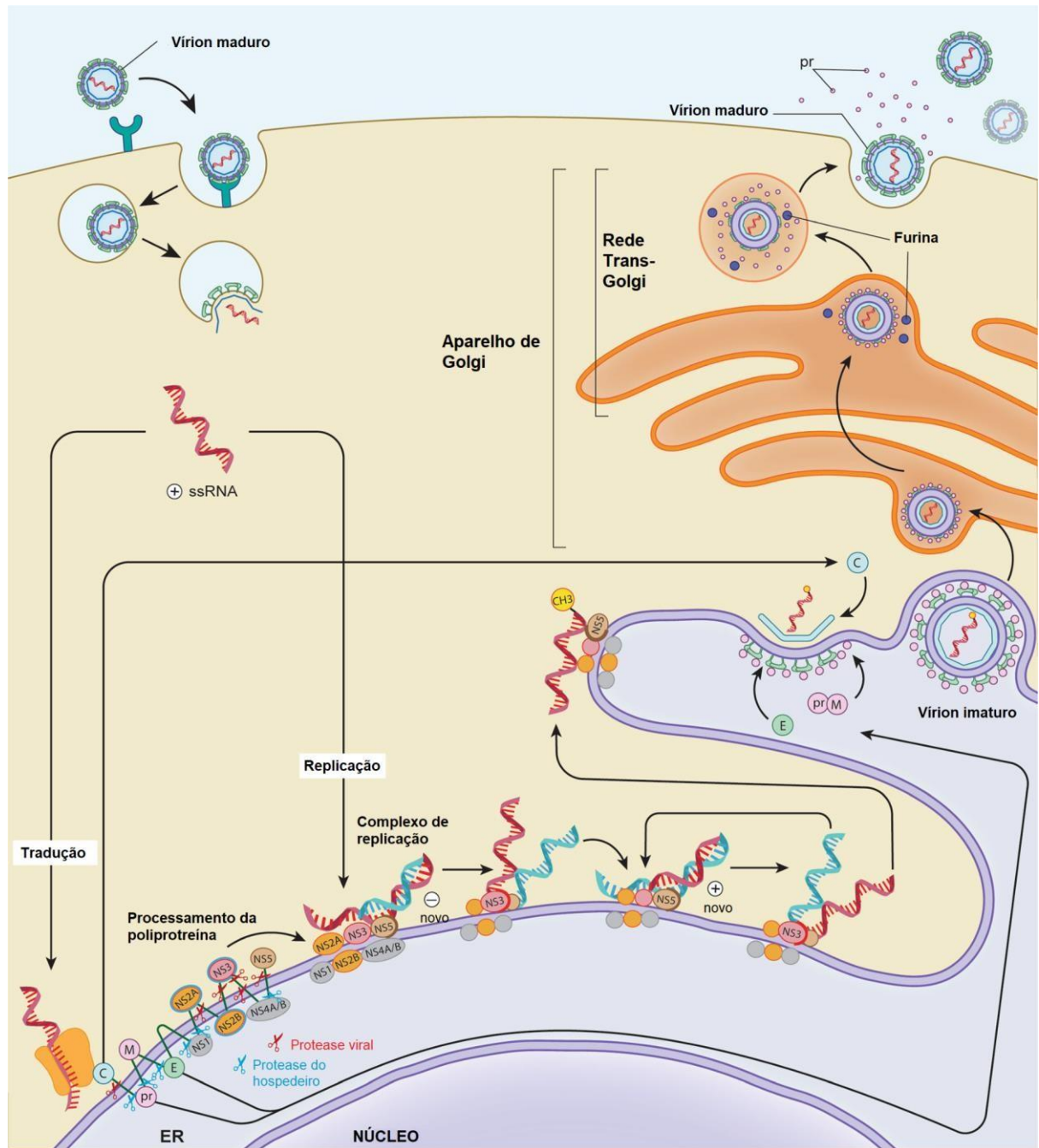
Alguns problemas podem acontecer na fase final da maturação e ocasionar a liberação de moléculas com partes maduras e imaturas, e que possuem a capacidade de infectar outras células (Figura 6). Por não estarem completamente desenvolvidas, essas partículas virais apresentam na sua superfície moléculas de lipídios, necessitando de receptores específicos para mediar a entrada celular, sendo eles o TIM e TAM (PLEVKA et al., 2011; AMARA; MERCER, 2015; REY; STIASNY; HEINZ, 2017; SIROHI; KUHN, 2017).

Figura 4: Principais receptores que medeiam a entrada do vírus da ZIKV nas células hospedeiras



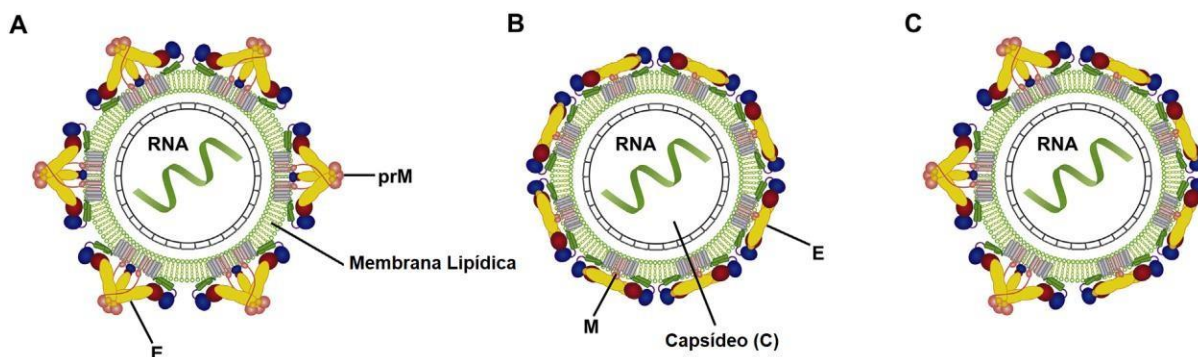
Fonte: Adaptado de (AGRELLI et al., 2019).

Figura 5: Processos celulares de entrada, translação, tradução e liberação da partícula viral do Zika.



Fonte: Adaptado de (ABRAMS;
SOLIS; NATH, 2017)

Figura 6: Estruturas virais maduras e imaturas. **A)** Partícula imatura exibindo as proteínas prM e E; **B)** Partícula viral madura; **C)** Partícula viral imatura heterogênea, com metade da molécula exibindo a proteína prM e E, e a outra metade só exibindo a E.



Fonte: Adaptado de (AGRELLI et al., 2019).

2.4 ESTRATÉGIAS VACINAIS EM DESENVOLVIMENTO PARA ZIKV

Após o surto de casos de ZIKV em 2015-2016 no Brasil, nenhum outro país notificou a mesma quantidade de casos, mas pelo risco do surgimento de novos surtos no futuro e pela principal população afetada ser de mulheres grávidas e seus bebês, por consequência dos casos de microcefalia, o desenvolvimento de estratégias de controle se faz necessário (LUNARDELLI et al., 2021). A vacina representa um dos principais meios para o controle de doenças infecciosas, como o ZIKV, e seu processo de desenvolvimento costuma durar anos (KENNEDY et al., 2018). Diversos grupos de pesquisa vêm investigando estratégias vacinais para a doença, como representado no Quadro 1. A maioria dos estudos se encontram ou finalizaram as fases de testes clínicos I e II, mas segundo dados do *Clinical Trials*, ainda não se tem nenhum em fase III de testes. É de extrema importância o desenvolvimento concomitantemente de diferentes estratégias, pois poderá ser necessário mais de um tipo vacinal para o controle da doença.

Quadro 3: Estudos de vacinas em desenvolvimento para o ZIKV

Tipo de vacina	Antígeno	Fase Clínica	Referência
DNA	prM-E	I/II	(DOWD et al., 2016; GAUDINSKI et al., 2018)
mRNA	prM-E	I	(PARDI et al., 2017)
Vírus atenuado	Vírus	I	(XIE et al., 2017; COX et al., 2018)
Vetor viral	prM-E	I	(LÓPEZ-CAMACHO et al., 2018)
Vírus atenuado (ZPIV)	Cepa do vírus	I	(STEPHENSON et al., 2020; MODJARRAD et al., 2018)
DNA	prM-E	I	GAUDINSKI et al., 2018
Vírus inativado	Vírus	I	(HAN et al., 2021)
DNA	prM-E	II	Clinical Trials (NCT03110770)

Fonte: Dados do Clinical Trials e (LUNARDELLI et al., 2021).

Uma vacina de DNA construída com a porção prM desenvolveu títulos altos de anticorpos neutralizantes e induziu respostas celulares em camundongos e primatas não-humanos (DOWD et al., 2016; GAUDINSKI et al., 2018). O mesmo tipo de resposta foi encontrado em uma vacina de mRNA com a fusão das proteínas prM-E, e uma outra vacina de RNA viral apresentou inibição da transmissão em camundongos gestantes, indicando uma segurança maior para o grupo principal a ser imunizado (PARDI et al., 2017; JAGGER et al., 2019).

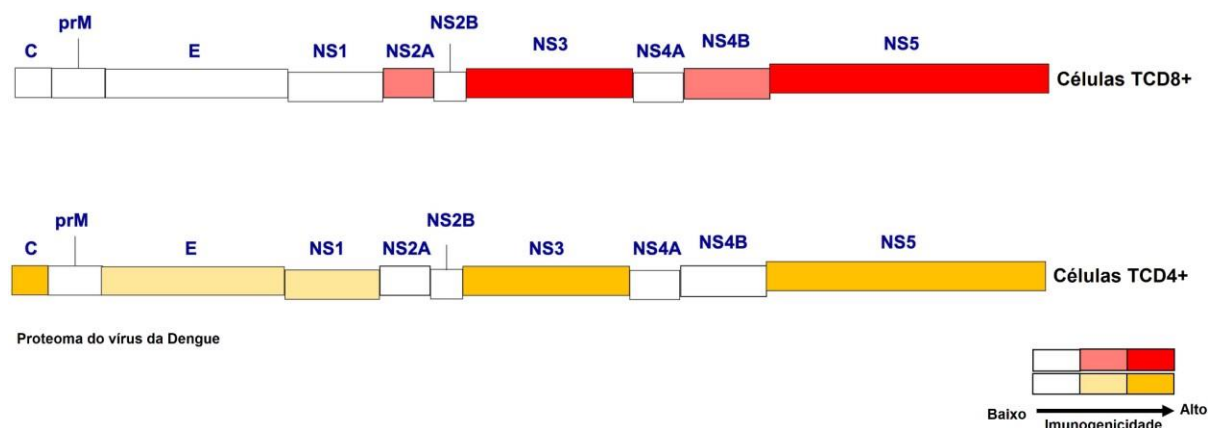
O uso de vírus inativado é uma estratégia tradicional, e um estudo de fase I foi realizado com uma vacina que continha a cepa do ZIKV inativada e alumínio como adjuvante. A mesma foi considerada segura e imunogênica, apresentando títulos de anticorpos neutralizantes, no entanto, esses níveis decaíram algumas semanas após a segunda aplicação, sugerindo a hipótese que doses de reforço devem ser aplicadas periodicamente ou um aumento na concentração do princípio ativo (MODJARRAD et al., 2018; STEPHENSON et al., 2020).

Os estudos em fases clínicas empregam as proteínas prM, E e NS1, em razão de suas funções durante o ciclo viral e essa mesma estratégia foi empregada para o vírus da Dengue. Os anticorpos neutralizantes têm como alvo as proteínas E e NS1, como já demonstrado em experimentos com camundongos, e a porção prM incrementa a dosagem do antígeno, por induzir a produção de partículas subvirais *in vivo* pelas células infectadas (HEINZ; STIASNY, 2012; GOO et al., 2018; KENNEDY et al., 2018).

2.5 PROTEÍNA NS3

A proteína não estrutural 3 desempenha funções importantes durante o processo de replicação, como separação da dupla fita de RNA e processamento da poliproteína, e vem sendo identificada como um importante alvo terapêutico para as células T, pela presença de epitopos específicos (MLADINICH et al., 2012; NGONO; SHRESTA, 2019) (Figura 7). É composta por duas porções, a N-terminal, denominada de protease e a C-terminal, a helicase, e um estudo demonstrou que as respostas de células T para NS3 protease eram específicas para Zika ou dengue, enquanto que para helicase, ocorriam respostas cruzadas, sugerindo que a primeira porção seria mais específica para ambos os vírus (HERRERA et al., 2018; LESCAR et al., 2008; LUO et al., 2012; XU et al., 2005).

Figura 7: Representação das proteínas estruturais (C,M,E) e não estruturais (NS1, 2A, 2B, 3, 4A, 4B,5)do proteoma do vírus da Dengue, de acordo com a imunogenicidade para células CD4+ e CD8+.



Fonte: Adaptado de (NGONO; SHRESTA, 2019).

A atividade antigênica da NS3 já foi estudada para o vírus da Dengue, como por exemplo, em países como Índia, Tailândia e Sri Lanka, evidenciando a proteína como alvo de células T (CHANDELE et al., 2016; DUANGCHINDA et al., 2010; WEISKOPF et al., 2013). Contudo, para a proteína NS3, a grande maioria dos trabalhos abordam as diferenças e semelhanças estruturais entre a Família Flaviridae, especificamente para o vírus da Dengue, contudo, pode ocorrer uma mudança de resposta entre os quatro tipos de Dengue, sendo assim, a resposta pode variar também para o vírus da Zika, necessitando de estudos que avaliem o perfil antigênico específico.

A proteína NS3 vem sendo apontada como alvo interessante no estudo de vacinas para ZIKV, pois induz respostas de células T (GRIFONI et al., 2017; NGONO; SHRESTA, 2019) e não ativa anticorpos sub-neutralizantes, eliminando o risco do desenvolvimento de resposta do tipo ADE (antibody-dependent enhancement), em que os anticorpos produzem uma resposta fraca ao flavivírus de interesse, mas produz uma resposta exacerbada a uma infecção subsequente, como ao vírus da Dengue, por exemplo. Alguns trabalhos demonstram resposta exacerbada devido à reação cruzada de anticorpos para dengue em camundongos infectados pelo vírus (BARDINA et al., 2017; RATHORE et al., 2020; BROWN et al., 2019) da Zika e o contrário aconteceu em macacos rhesus (GEORGE et al., 2017) e camundongos

(STETTLER et al., 2016). O efeito em humanos ainda apresenta controvérsias, necessitando de uma maior investigação epidemiológica, contudo, esses e outros dados fornecem base para a importância de uma vacina que não induza o efeito ADE.

Quanto às respostas geradas por células T, muitas vezes podem ser protetoras, como camundongos infectados previamente com Dengue, desenvolveram TCD8+ protetivas para Zika, resultando em diminuição da carga viral (WEN et al., 2017a; WEN et al., 2017b). Em outros estudos relacionados a infecção aos dois flavivírus, dengue e Zika, foram observadas respostas aos epítopos NS5 e NS3, principalmente está última (HERRERA et al., 2018; LIM et al., 2018), enquanto que pessoas imunes à dengue, a resposta foi direcionada a proteínas estruturais, como E, prM, e C (GRIFONI et al., 2017).

Devido ao grande número de casos de microcefalia durante o surto epidemiológico mais recente, existe uma preocupação quanto a uma vacina que seja segura e eficaz para grávidas. Estudo em camundongos que eram imunes à dengue e posteriormente infectados com Zika, apresentaram fetos de tamanho normais e células TCD8+ que protegiam quanto à doença, enquanto que o contrário não foi observado em não imunes (REGLA-NAVA et al., 2018).

Pelo motivo de não induzir resposta de anticorpos neutralizantes, a proteína NS3 pode oferecer segurança ao ser utilizada como um antígeno vacinal (KATZELNICK et al., 2017; SRIDHAR et al., 2018; SALJE et al., 2018). Ngono et al., 2020 produziu uma vacina de RNA derivado de alfavírus sintético expressando NS3 e avaliou a resposta deles frente a camundongos HLA-B*0702 *Ifnar1*^{-/-}, AG129 (*Ifna*^β₁*R*^{-/-}) e C57BL/6J em desafios contra vírus e proteção em fêmeas gestantes. Os resultados foram que a proteína NS3 foi capaz de induzir respostas de células TCD8+, reduzindo a transmissão transplacentária e danos ao feto, com níveis de titulação viral indetectáveis no soro, placenta e cérebro. A vacinação ofereceu proteção à infecção pelo ZIKV, porém após ensaios de desafio com o vírus observou-se que não houve indução da produção de anticorpos neutralizantes. A proteína já tinha sido estudada para o vírus da Dengue, demonstrando resultados favoráveis na ativação de células T (HURTADO-MELGOZA et al., 2016) e na

ativação de anticorpos neutralizantes (SIMMONS; SUN; PUTNAK, 2016), indicando ser um alvo em potencial a ser estudado (NGONO et al., 2020).

2.6 *E.coli* COMO SISTEMA DE EXPRESSÃO HETERÓLOGA

A utilização de sistemas de expressão heteróloga, como bactérias, fungos filamentosos e leveduras, é comum na indústria biofarmacêutica, sendo a maioria dos produtos produzidos em *E.coli*, como a insulina e o hormônio do crescimento (BAESHEN et al., 2015). Essa bactéria possui características atrativas, que justificam o seu uso, como cinética de crescimento rápida, presença de códons raros em algumas cepas, transformação rápida em DNA exógeno, fácil manuseio, alta expressão de proteínas heterólogas e amplo conhecimento disponível na literatura acerca de sua genética e biologia molecular (ROSANO; CECCARELLI, 2014; DIECI et al., 2000). De acordo com a proteína que se deseja obter, alguns pontos devem ser analisados como a escolha do plasmídeo adequado, região promotora, marcador de seleção, cepa de *E.coli* a ser utilizada, tradução e expressão da proteína (ROSANO; CECCARELLI, 2014).

A maioria das estratégias empregadas para a ZIKV foram importadas do vírus da Dengue, inclusive quanto aos sistemas de expressão. Foram relatados emprego de leveduras e bactérias, para a produção de proteínas NS1 e E, alvos muito empregados no desenvolvimento de vacinas para as duas arboviroses. A *E.coli* também foi utilizada para expressar a proteína NS3 da dengue (HURTADO-MELGOZA et al., 2016; SIMMONS; SUN; PUTNAK, 2016), evidenciado que seu uso também poderia ser empregado na mesma proteína do ZIKV.

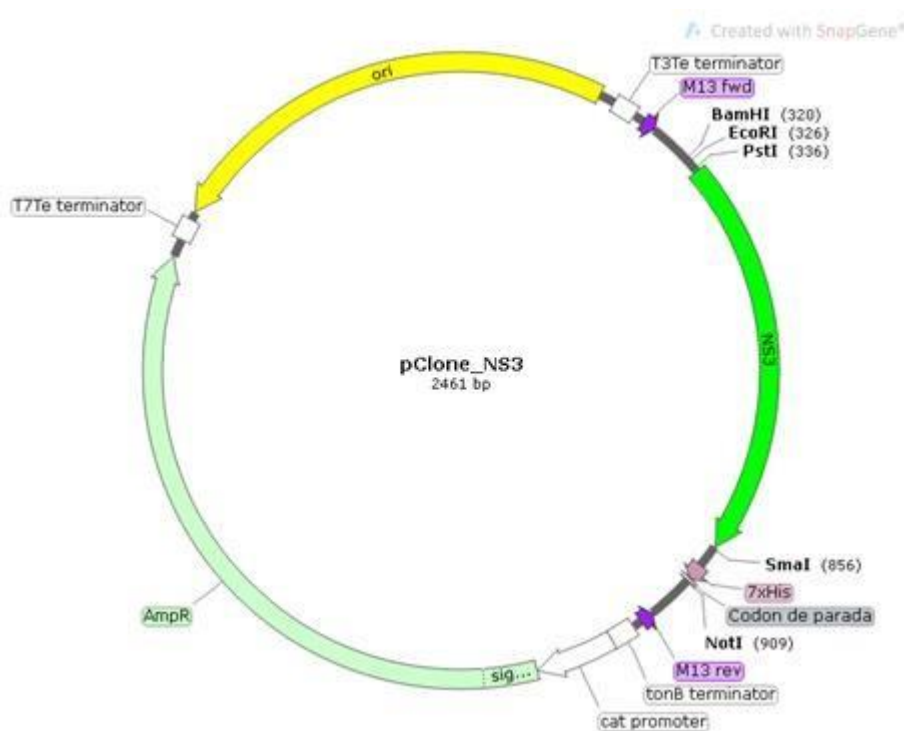
3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Gene

O gene utilizado nesse estudo foi o domínio protease da proteína NS3 do Zikavírus (171 aa e 513pb), obtido de maneira sintética, de acordo com a sequência especificada no artigo de HURTADO-MELGOZA et al., 2016. A empresa responsável pela síntese foi a GenOne Biotecnologies (Brasil) e durante o processo, foi adicionado um tag de histidina (7xHis) na porção final do gene, para auxiliar no processo de purificação e imunodetecção da proteína. O gene foi clonado no vetor plasmidial pClone, sendo este utilizado apenas como vetor de passagem para o gene NS3 e possuindo o gene de resistência a ampicilina como marcador de seleção (Figura 7).

Figura 7: Mapa da construção do pCloneNS3-7xHis.



Fonte: Autora.

3.1.2 Vetor de Expressão

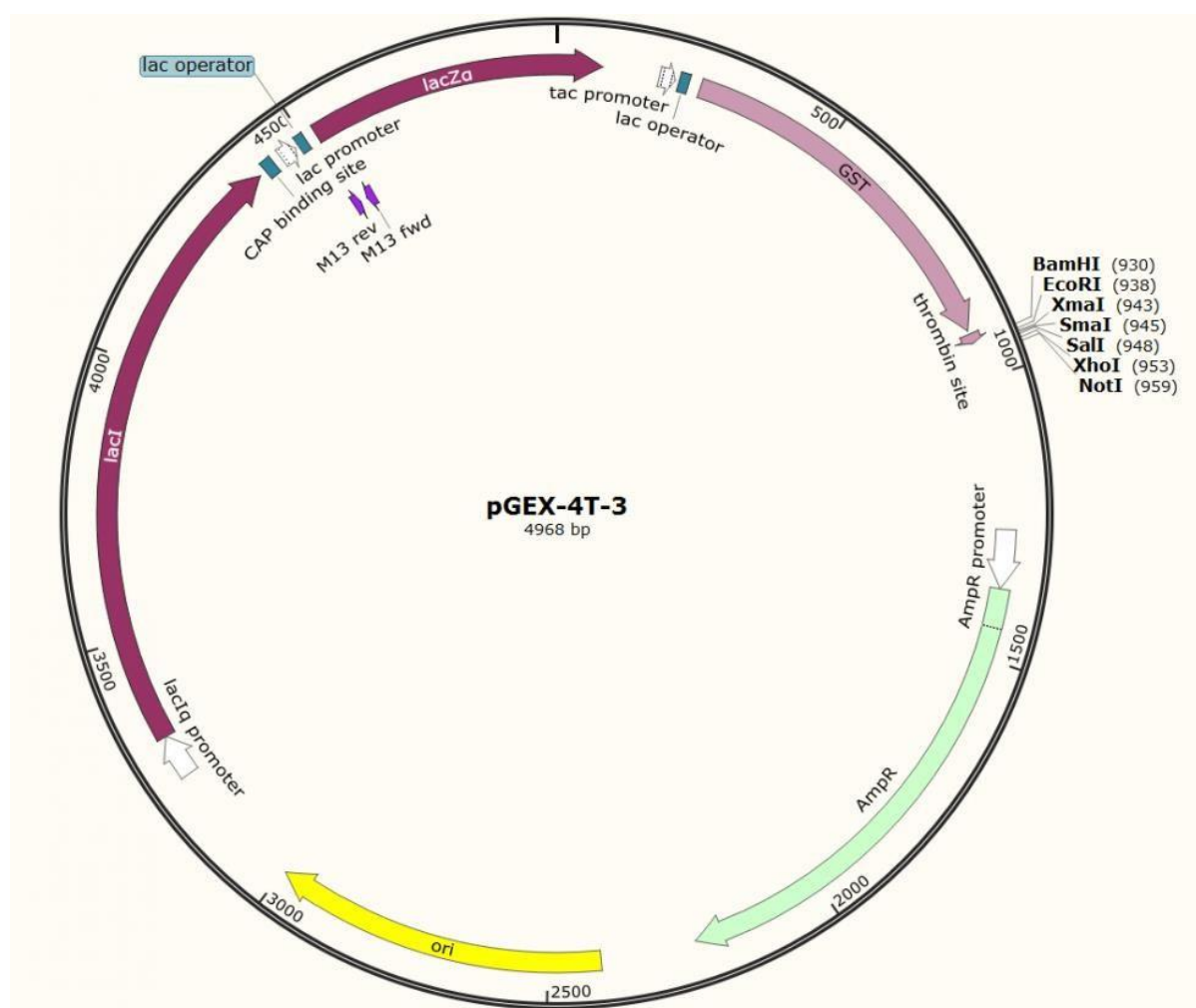
O vetor plasmidial pGEX4T-3 (GE healthcare) (Figura 8) foi utilizado na subclonagem, pois o mesmo permite a produção e purificação das proteínas

recombinantes em *Escherichia coli*. Esse vetor possui como proteína de fusão N- terminal, a GST (Glutathione S-transferase - 26KDa), que facilita a obtenção de proteínas solúveis. O promotor é o *tac*, que se torna ativo mediante adição de IPTG (isopropil- β -D-galactosídeo) à cultura, propiciando a expressão dos genes alvos. Além disso, assim como o pClone, também possui o gene de resistência à ampicilina.

Os vetores PGEX possuem o gene *lacIq*, que irá produzir uma proteína repressora na qual se liga na região promotora e impede a expressão de proteínas na ausência de IPTG, sendo um modo de controle traducional.

Sabe-se que o uso da GST como proteína de fusão é responsável por aumentar a expressão das proteínas a ela fusionadas, além de aumentar sua solubilidade (SMYTH; MROZKIEWICZ, 2003; ARNAU et al., 2006).

Figura 8: Mapa do vetor pGEX-4T-3



Fonte: <https://www.lifescience-market.com/plasmid-c-94/pgex4t3-plasmid-p-63181.html>. Acesso em 15/01/2022

3.1.3 Linhagem de Microorganismos

Para a clonagem e a expressão do gene recombinante foram utilizadas 2 linhagens de *E. coli*:

- Top 10 - Linhagem utilizada para a clonagem, pois mantém o DNA mais estável por conta da presença das mutações *endA1* e *recA1*, que são responsáveis por anular a atividade da enzima endonuclease I e assim, diminuir a ocorrência de recombinação não-específica.

Genótipo: F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 *recA1* *araD139* Δ (*ara* leu)7697 *galU* *galK* *rpsL* (StrR) *endA1* *nupG*

- BL21 DE3- Linhagem utilizada para expressão de proteína recombinante, por possuir uma quantidade diminuída de proteases, mantendo o produto gerado na tradução mais estável. Necessita da adição de IPTG para indução do promotor T7 durante a expressão das proteínas heterólogas.

Genótipo: F-ompT *hsdS*(rB- mB-) *gal* *dcm* λ (DE3)

A *E. coli* BL21 DE3 é defeituosa na produção de proteases OmpT e Lon, sendo geralmente a melhor escolha para se obter altos níveis de expressão de proteínas fusionadas à GST sem que haja degradação proteolítica da proteína de fusão.

3.1.4 Meio de Cultura e Condições de Cultivo

Nas etapas de transformação, repique e inóculo foi utilizado o meio de cultura líquido Luria-Bertani (LB) que apresenta a seguinte composição: tripton 1%, extrato de levedura 0.5% e NaCl 1%, adicionando 100 μ g/mL de Ampicilina e para obtenção do meio sólido, foi adicionado 1,5% de ágar. Durante os processos de transformação e pré-inóculo, a temperatura de incubação foi 37°C, overnight, e nos ensaios de inóculo e indução foram cultivados a 37°C e após a adição de IPTG a temperatura foi mantida a 25°C.

3.1.5 Tampões e Soluções

- **Soluções para extração de DNA plasmidial, segundo protocolo descrito por SAMBROOK et al (1989):** Solução I: TrisHCl 25mM, EDTA (Ácido Tetracético Etilenodiamina) 10mM, glicose 50mM, água destilada estéril; Solução II: NaOH 0,4N, SDS 2%; Solução III: acetato de potássio 5M, ácido acético glacial, água destilada estéril. Tampão de corrida para eletroforese de DNA: TAE 10x: Tris base 400mM, ácido acético 190mM, EDTA 10mM pH 7.6.
- **Soluções para SDS-PAGE:** Tampão de corrida (10x, pH 8.6): Tris 25mM, SDS 0,1%, glicina 192mM; Tampão de Amostra 2X (L2x): TrisHCl (pH 6,8 - 65,8 mM), glicerol 26,3%, SDS 2,1 %, Azul de bromofenol, 2-Mercaptoetanol. *Coomassie Brilliant Blue*: azul de Coomassie-blue G-250 0,05%, metanol 45%, ácido acético 10% e água destilada estéril 45%; Solução descorante: Ácido acético 7%, metanol 25% e água destilada estéril 68%.
- **Soluções para transferência e Western blot:** Tampão de transferência: Tris 60mM, Glicina 48mM, SDS 10%, metanol 20%; Solução tampão TBS (Tris- Salina) 10x: Tris-HCl 0.5M, NaCl 1.5M pH 7.6 (para solução de lavagem com TBS-Tween, diluir 1:100 e acrescentar 100µL de Tween para 1L de TBS 1x); Solução de bloqueio: leite 5% diluído em TBS-Tween.
- **SOLUÇÕES PARA PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA (RESINA NI-NTA AGAROSE QIAGEN):**

Quadro 2: Composição das soluções de purificação.

Soluções	Tris-HCl	NaCl	Imidazol
Tampão de lise (ph 8,0)	50mM	300mM	10mM
Tampão de lavagem (ph 8,0)	50mM	300mM	20mM

Tampão de eluição (ph 8,0)	50mM	300mM	500mM
----------------------------	------	-------	-------

3.1.6 Géis de Eletroforese para DNA e Proteínas

Na realização de eletroforese para DNA foram utilizados géis de agarose a 1% com o tampão TAE 1X. Foi adicionado ao gel solução de brometo de etídeo (0,5 µg/ml) para promover visualização das bandas de DNA através de um transluminador de luz ultravioleta. O material foi aplicado junto com tampão de amostra (Loading Dye 6X), tendo como referencial o marcador de 1Kb (Gene Ruler DNA Ladder, Loading Dye e água milliQ).

Os géis de poliacrilamida para SDS-PAGE foram preparados com concentração de 12,5%. As amostras do extrato protéico foram ressuspensas em tampão desnaturante (L2x) e aquecidas a 75°C (10 minutos). Foi empregado o tampão de corrida para SDS-PAGE 1X. As corridas de eletroforese foram realizadas com fonte de tensão constante e ajustável por cerca de 90 minutos, 150V. Para visualização das bandas de proteínas, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue. Como referencial para análise das bandas de proteínas, foi utilizado marcador de peso molecular Page Ruler Prestained Protein Ladder (ThermoScientific).

3.1.7 Enzimas

Quadro 3: Enzimas utilizadas na reação de digestão e ligação.

Reação	Enzima	Fabricante	Sítio de clivagem	Temperatura	Volume	Duração
Digestão	NotI	Thermo Scientific	GC▼GGCCGC	37°C	20µL	3h ou overnight
Digestão	BamHI	Thermo Scientific	G▼GATCC	37°C	20µL	3h ou overnight
Ligação	T4 DNA ligase	Promega	-	4°C ou temperatura ambiente (de acordo com a duração)	10µL	3h ou overnight

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Clonagem no vetor pGEX

O gene sintético NS3, clonado no vetor pClone, veio na forma liofilizada e foi recuperado a partir de ressuspensão em água estéril nuclease-free e o material foi utilizado para transformar células de *E. coli* Top 10, com o objetivo de se obter uma maior quantidade de material genético. O protocolo de transformação utilizado foi o seguinte: o produto ressuspendido (10µL) foi adicionado em 50µL de células quimiocompetentes (previamente tratadas com CaCl₂), homogeneizado e mantido no gelo por 30 minutos; passado esse período, as células foram submetidas a um choque térmico (42°C) por 1 minuto. Após essa etapa, o material foi mantido no gelo por mais 1 minuto e então foi adicionado 800µL de meio LB sem antibiótico, com posterior incubação a 37°C por 1 hora. As células foram então centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos, e alíquotas de 200µL foram semeadas em placas de LB com ampicilina e as placas foram incubadas a 37°C por 16 horas. Após esse processo, as colônias resistentes à ampicilina foram selecionadas, e foi realizado o repique das mesmas para triagem dos recombinantes, com posterior crescimento em meio líquido, extração de DNA plasmidial (segundo protocolo descrito por SAMBROOK et al., 1989) e digestão com as enzimas *Bam*HI e *Not*I para análises dos fragmentos e confirmação da composição plasmidial.

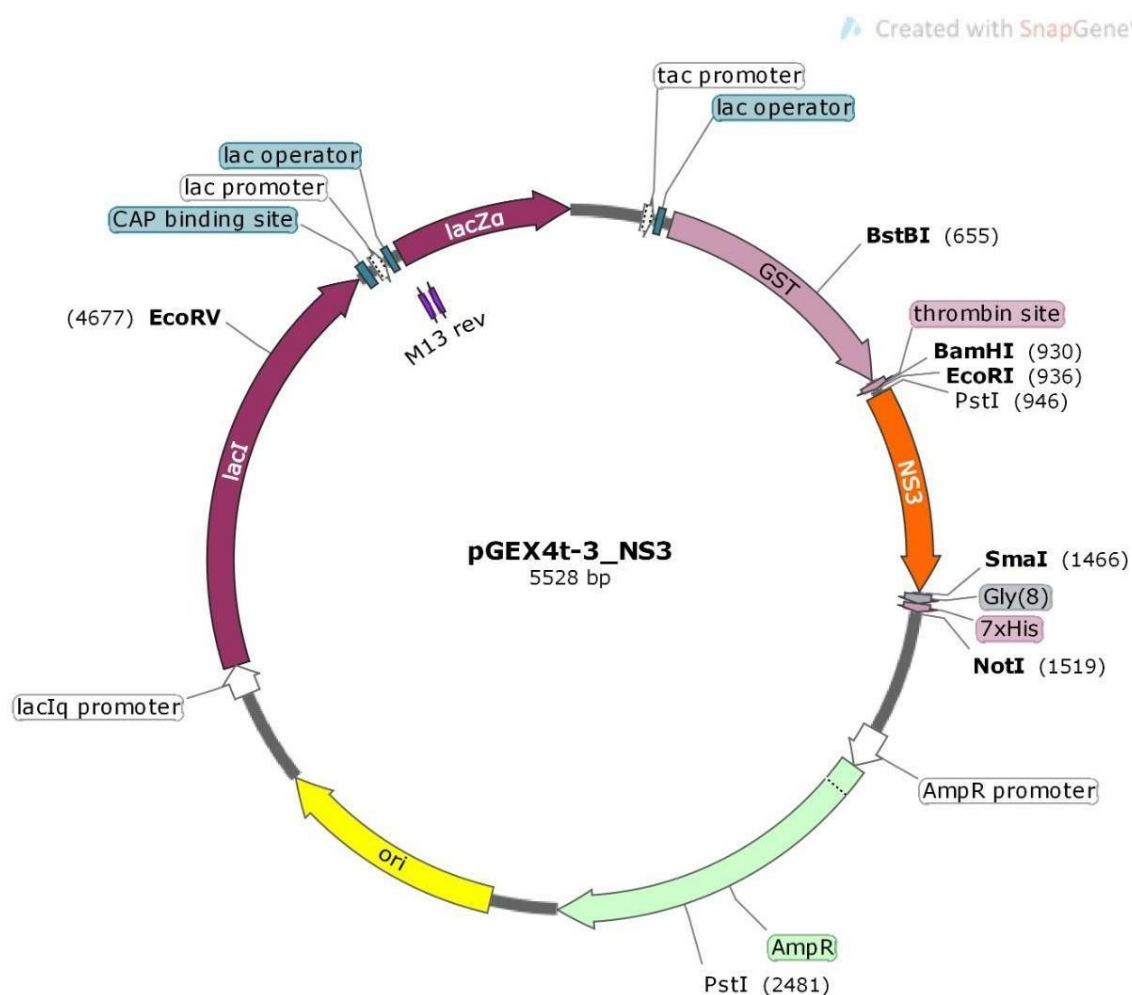
Após todo esse processo, o gene NS3 foi subclonado no vetor de expressão pGEX-4T-3, e para isso, ambos foram submetidos à reação de ligação com a enzima *T4 ligase*, de acordo com as orientações do fabricante, numa proporção 5:1 (inserto:vetor). O DNA recombinante foi inserido em células de *E. coli* da linhagem Top10, através do processo de transformação.

As colônias resultantes resistentes a ampicilina foram selecionadas e repicadas para respectiva triagem dos recombinantes, com os processos de inóculo e extração do DNA. A comprovação do processo de clonagem ocorreu através da análise dos fragmentos obtidos após a reação com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Not*I. Foram preparados preservados do clone (500µL de Glicerol 100% + 500µL de cultura), com acondicionamento a -80°C.

3.2.2 Indução da Expressão Gênica

O plasmídeo recombinante pGEX-4T-3_NS3 (Figura 9) através da reação de transformação, foi inserido nas células *E.coli* da linhagem BL21 DE3 e posteriormente, foi realizado o repique das colônias resultantes. O ensaio de indução, inicialmente, foi feito da seguinte forma: 2 mL de cultura overnight (37°C, 150 rpm) em meio LB com ampicilina foram inoculados (37°C, 150 rpm) em 100 mL de meio com antibiótico e após crescimento das colônias na Densidade ótica (D.O.) de 600 nm atingir 0,5, foi adicionado IPTG, que atua como agente indutor, numa concentração final de 0,3 mM e a temperatura de cultivo foi alterada para 25°C durante 4h, numa rotação de 150 rpm. Ao fim do período de indução, foi retirado uma alíquota de 1mL para posterior análise tanto por visualização em SDS-PAGE, quanto por Western blot. A alíquota foi centrifugada (12000 rpm, 10 minutos, 4°C), o sobrenadante resultante da centrifugação foi descartado e o pellet foi ressuscitado em 200 µL do tampão desnaturante (L2x) e submetida a aquecimento a 75°C por 10 minutos e visualização em SDS-PAGE para verificação da expressão da proteína. Uma linhagem recombinante contendo o vetor pGEX-4T-3 sem inserto também foi induzida para ser usada como controle negativo nos experimentos de imunodeteção.

Figura 9: Mapa da construção do vetor pGEX-4T-3-NS3. GST: gene da glutationa S-transferase; Sítio de trombina: utilizado na clivagem da proteína GST; AmpR: região do gene de resistência à ampicilina; ori: origem de replicação; lacI: gene do repressor lac e lacZa: gene codificador da enzima β -galactosidase.



Fonte: Autora

Após a visualização da expressão da proteína, o ensaio foi realizado em um volume maior (250mL) para obter uma quantidade maior de proteína, a fim de realizara purificação com resina de níquel (resina Ni-NTA agarose Qiagen). No final do processo de indução, a amostra foi centrifugada (4000 rpm, 10 minutos, 4°C), o sobrenadante descartado e o pellet armazenado na temperatura de 4°C, para posteriormente, ser utilizado na etapa de purificação.

3.2.3 Purificação da Proteína NS3 por Resina de Níquel

Durante o processo de síntese do gene NS3, uma tag de histidina

(6xHis) foi adicionada para auxiliar no processo de purificação, possibilitando que esse processo fosse realizado com uma resina de níquel (resina Ni-NTA agarose Qiagen). O pellet foi ressuspensionado em 25 mL de tampão de lise e PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride - Fenilmetilsulfonilflúor), que atua como inibidor de protease, na concentração final de 1mM, e a lise se deu por sonicação na potência de 50% no sonicador de ponteira ultrassônico Ultronique/Eco-sonics (6 ciclos de 30 segundos /1 min de repouso- 4°C) e após o procedimento, foi retirado uma alíquota de 1mL para análise em SDS-PAGE, a fim de verificar se o processo de lise foi bem sucedido. Simultaneamente, a resina de níquel foi pré-equilibrada com o seguinte processo: 1 mL de resina foi submetido a 4 equilíbrios com 10mL de tampão de lise, onde em cada etapa o volume era agitado por 2 minutos (100 rpm, 4°C), centrifugado (5.000 rpm, 2 minutos, 4°C) e o sobrenadante resultante da centrifugação foi descartado.

Com a confirmação do processo de lise, 5mL do lisado (sobrenadante) foi adicionado à resina equilibrada e o volume foi incubado sob agitação (100 rpm, 4°C) por 2 horas. Posteriormente, a amostra foi centrifugada por 15 minutos (5.000 rpm, 4°C) e do sobrenadante resultante foi coletado 1mL para análise, sendo o restante descartado. O pellet resultante foi ressuspensionado em 1mL do tampão de lavagem, o volume agitado (100 rpm, 5 minutos, 4°C), centrifugado (13.000 rpm, 2 minutos, 4°C), e o sobrenadante foi coletado para posterior análise, com o processo repetido 3 vezes. Após isso, o pellet resultante foi ressuspensionado em 500µL do tampão de eluição, o volume submetido a agitação (100 rpm, 30 minutos, 4°C), centrifugado (13.000 rpm, 2 minutos, 4°C) e o sobrenadante coletado, sendo o processo repetido 4 vezes. Ao final do experimento, as amostras foram analisadas no SDS-PAGE e Western Blot.

3.2.4 Purificação da Proteína NS3 por Resina de Glutathione Sepharose

O gene sintético NS3, por ser expresso no vetor pGEX4T-3, possui GST como proteína de fusão, possibilitando a purificação por Glutathione Sepharose. Com isso, o início do processo é similar ao realizado para resina de níquel. O pellet foi ressuspensionado em 20 mL de tampão de PBS 1x (137

mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na_2HPO_4 , 1.47 mM KH_2PO_4 , pH 7.3) e PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride - Fenilmetilsulfonilflúor), que atua como inibidor de protease, na concentração final de 1mM, e a lise se deu por sonicação na potência de 50% no sonicador de ponteira ultrassônico Ultronique/Eco-sonics (6 ciclos de 30 segundos /1 min de repouso- 4°C) e após o procedimento, foi adicionado 200µL de Triton X-100 e centrifugado a 4000 rpm/10 minutos a 4°C, após foi retirado uma alíquota de 1mL para análise em SDS- PAGE, a fim de verificar se o processo de lise foi bem sucedido. Simultaneamente, foi realizado o equilíbrio da resina, com a seguinte proporção: 250µL de resina (para um volume de cultura de 500mL) homogeneizado em 10mL de PBS 1x onde em cada etapa o volume era centrifugado (5.000 rpm, 1 minuto, 4°C) e o sobrenadante resultante da centrifugação foi descartado, sendo o processo repetido 3 vezes. O sobredanante pós-lise resultante foi incubado com a por 1h a 4°C sob agitação. Posteriormente, a amostra foi centrifugada por 3 minutos (6.000 rpm, 4°C) e do sobrenadante resultante foi coletado 1mL para análise, sendo o restante descartado. O sedimento resultante foi ressuspendido em 1mL de PBS 1x, centrifugado (13.000 rpm, 1 minuto), e o sobrenadante foi coletado para posterior análise, com o processo repetido 3 vezes. Após isso, o pellet resultante foi primeiramente ressuspendido em 500µL de solução de glutathione reduzida 20mM (em Tris-HCl, pH=8) e incubado por 1 hora a 4°C sob agitação. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 13000 rpm/ 1 minuto e o sobrenadante coletado. Em seguida, uma nova incubação foi realizada a 1 hora (4°C-agitação), sendo o sedimento ressuspendido em 500µL de solução de glutathione reduzida 50mM (em Tris-HCl, pH=9). Após, a amostra foi centrifugada a 13000 rpm/ 1 minuto e o sobrenadante coletado para análises no SDS-PAGE 12,5%.

3.2.5 Precipitação de Proteínas por TCA/Acetona Gelada

Adicionar TCA 100% a amostra, numa concentração final de 10%, homogeneizar no vórtex e incubar por 1h30 minutos a 4°C. Após isso, centrifugar por 12.000 rpm/15 minutos (4°C), descartar sobrenadante e ressuspende o pellet com 200µL de acetona absoluta gelada, centrifugar por 12.000 rpm/15 minutos (4°C) e repetir o processo duas vezes. Em seguida, secar o pellet por na centrífuga a vácuo e ressuspende o pellet em solução de lise no volume inicial da amostra.

3.2.6 Análises por SDS-PAGE e Western Blot

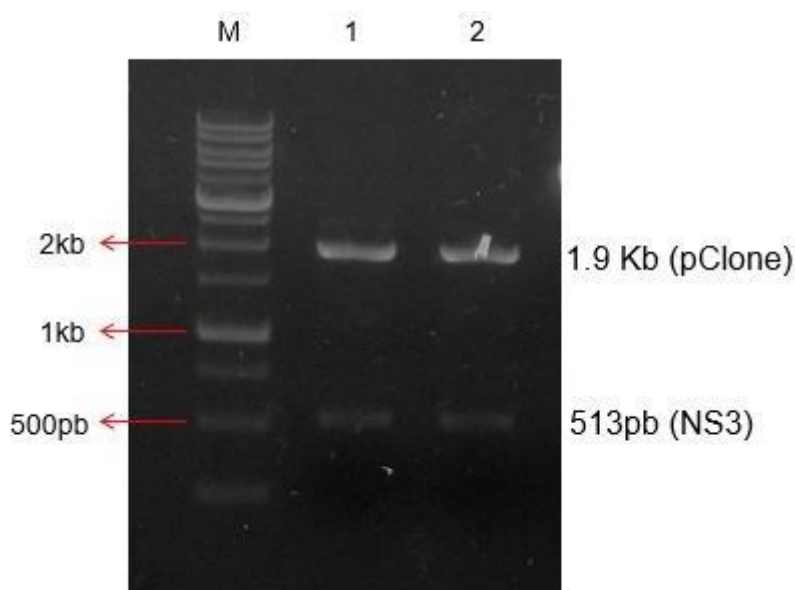
Tanto a visualização da expressão da proteína, quanto a análise do processo de purificação foram feitas por meio de eletroforese em SDS-PAGE e Western blot. As amostras foram submetidas a eletroforese por 90 minutos, 150 V, seguida por transferência (25V, 35 minutos) para membrana de PVDF (Fluoreto de Polivinilideno) em cuba de transferência semi-seca. A eficiência da transferência foi checada através da coloração da membrana com Ponceau-S. A imunodetecção foi realizada após bloqueio da membrana com solução de leite 5% em TBS-Tween, incubação com anticorpo monoclonal anti-His conjugado a fosfatase alcalina (Sigma), com diluição de 1:3000, e os períodos de bloqueio e incubação foram de 60 minutos. Foram realizadas três etapas de lavagem da membrana com TBS-Tween 1X após a incubação. A revelação foi feita pelo método colorimétrico, utilizando NBT/BCIP (nitro blue tetrazolium/ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) (Sigma) como substrato. Após a identificação da proteína por Western Blot, a concentração foi mensurada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

4 RESULTADOS

4.1 CLONAGEM NO VETOR pGEX

O gene NS3 foi previamente clonado no vetor de passagem pClone, no entanto, o mesmo não era compatível com os objetivos do estudo, visto que o mesmo não apresenta uma região promotora adequada para a expressão proteica desejada. Portanto, foi necessário clonar o gene em um vetor de expressão adequada, sendo o pGEX4T-3 escolhido. Com isso, a construção pCloneNS3-6xHIS foi submetida a uma reação de digestão com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Not*I, pois os dois vetores possuem sítios de restrição para as mesmas, e assim, é possível a geração de fragmentos com terminais coesivos compatíveis (Figura 10).

Figura 10: **Digestão dupla com as enzimas *Bam*HI e *Not*I.** Eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE; 1 e 2- pCloneNS3; M- Ladder Gene Ruler 1Kb Thermo Scientific.

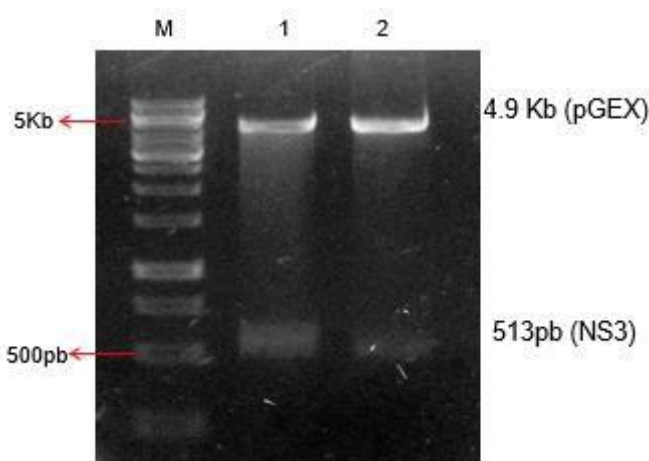


Fonte: Autora

O vetor pGEX sem inserto também foi submetido a reação de digestão com as mesmas enzimas. Após a geração dos fragmentos, o gene de interesse e o vetor foram submetidos a uma reação de ligação com a enzima T4 ligase. O produto dessa reação foi submetido a transformação de células *E.coli* top10 quimiocompetentes, e após o semeio em placa, as colônias se mostraram resistentes à ampicilina. Para a confirmação do processo de

clonagem, foram analisados os fragmentos liberados após a extração de DNA plasmidial e uma nova reação de digestão enzimática (Figura 11).

Figura 11: **Digestão dupla com as enzimas *Bam*HI e *Not*I.** Eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE; 1 e 2- pGEXNS3; M- Ladder Gene Ruler 1Kb Thermo Scientific.

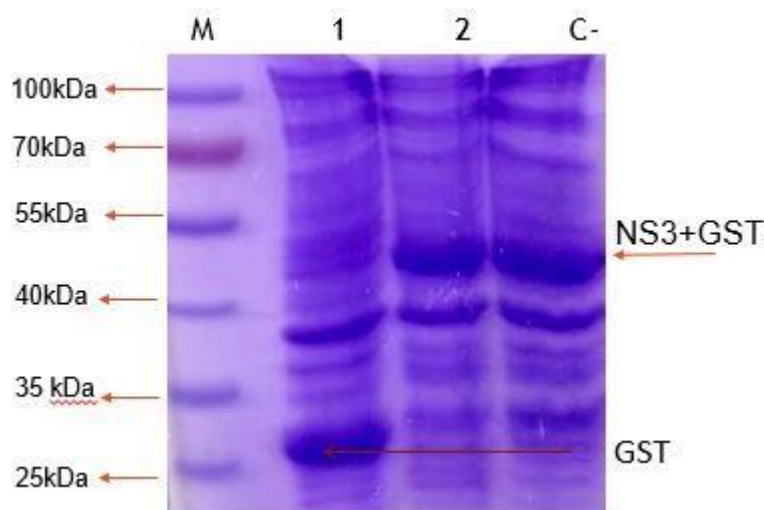


Fonte: Autora

4.2 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS EM *E.coli* BL21 DE3

Com a confirmação da clonagem do gene de interesse no vetor pGEX, o plasmídeo recombinante foi inserido em células de *E.coli* BL21 DE3. As colônias foram selecionadas para serem submetidas ao ensaio de indução para produção das proteínas heterólogas. Com a análise em SDS-PAGE, foi possível identificar a expressão das proteínas a partir da observação de uma banda em torno de 44kDa, que representam a fusão de NS3 e GST, visto que NS3 possui um tamanho de 18kDa e GST de 26kDa (Figura 12).

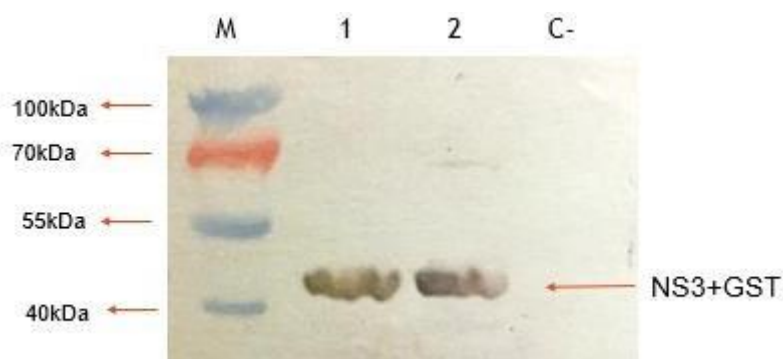
Figura 12: **Análise de expressão de extratos proteicos de células *E.coli* BL21 DE3 induzidas com IPTG 0,3mM.** Eletroforese em gel de poliácridamida 12,5%. M: Marcador de peso molecular Page Ruler Prestained Protein Ladder (ThermoScientific); C-: vetor plasmidial vazio (pGEXØ); 1- pGEXNS3 C3; pGEXNS3 C4.



Fonte:Autora

Através do western blot, foi possível confirmar a produção da expressão da proteína, conjugada a uma tag de Histidina que permitiu a imunodeteccção com o anticorpo monoclonal anti-His conjugado a fosfatase alcalina (Sigma) (Figura 13).

Figura 13: **Western Blot utilizando anticorpo anti-His (Sigma) para conjugação no extrato proteico de células *E.coli* BL21 DE3 induzidas com IPTG 0,3mM.** M: Marcador de peso molecular Page Ruler Prestained Protein Ladder (ThermoScientific); C-: vetor plasmidial vazio (pGEXØ); 1- pGEXNS3 C3; pGEXNS3 C4.



Fonte:Autora

4.3 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA NS3 EM RESINA DE NÍQUEL

Após a análise dos géis, foi possível verificar que o ensaio de indução foi

eficaz, com isso, prosseguiu-se com a purificação da proteína. Nessa etapa, foi realizado um ensaio de indução em escala maior (250mL), com o intuito de aumentar a concentração de proteínas recombinantes. O ensaio de purificação foi realizado por cromatografia por afinidade, utilizando a resina de níquel (Ni-NTA agarose Qiagen).

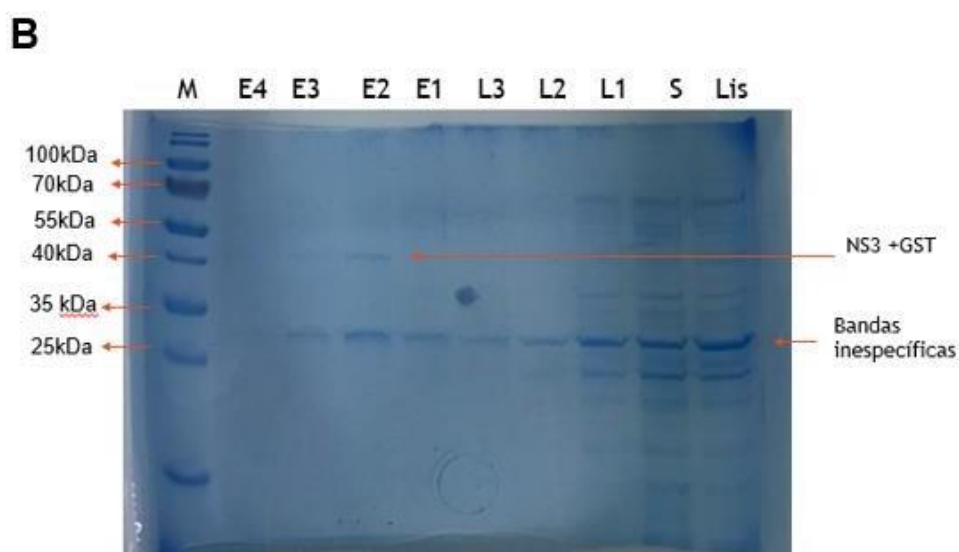
Durante os experimentos, foram necessários realizar ajustes no protocolo de acordo com as condições existentes no laboratório, então, inicialmente o processo de lise era realizado em ciclos de congelamento/descongelamento, em que consistia congelar a amostra no -80°C por um período de 1 minuto e descongelar no vórtex, repetindo o processo 5 vezes. Além disso, toda a etapa de agitação e centrifugação era realizada em temperatura ambiente (25°C). Com essas condições, os resultados obtidos não foram satisfatórios, visto que ocorreu o aparecimento de bandas inespecíficas em uma quantidade significativa e o não aparecimento da proteína NS3 na altura da banda desejada (Figura 14-16).

Figura 14: **Purificação da proteína recombinante NS3+GST a temperatura de 25°C.** Eletroforese em gel de poliacrilamida para SDS-PAGE 12,5%. M: Marcador de peso molecular Page Ruler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific); El.1-4: Eluições 1 a 4; Lav.1-3: Lavagens 1 a 3; S: Sobrenadante após a adição do lisado à resina; Lis: Lisado. Purificação realizada com 1 ml de resina e cerca de 2mL de lisado; a proteína eluída não corresponde a banda no NS3+GST, indicando uma ligação fraca na resina e/ou uma lise mal sucedida.



Fonte: Autora

Figura 15: **Purificação da proteína recombinante NS3+GST a temperatura de 25°C.** Eletroforese em gel de poliacrilamida para SDS-PAGE 12,5%. M: Marcador de peso molecular Page Ruler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific); El.1-4: Eluições 1 a 4; Lav.1-3: Lavagens 1 a 3; S: Sobrenadante após a adição do lisado à resina; Lis: Lisado. **B:** Purificação realizada com 2mL de resina e 7,5mL de lisado; a quantidade de proteína eluída foi um pouco melhor do que o resultado anterior, mas a banda referente a NS3+GST é fraca e com um aparecimento de uma banda inespecíficamais forte que ela.



Fonte:Autora

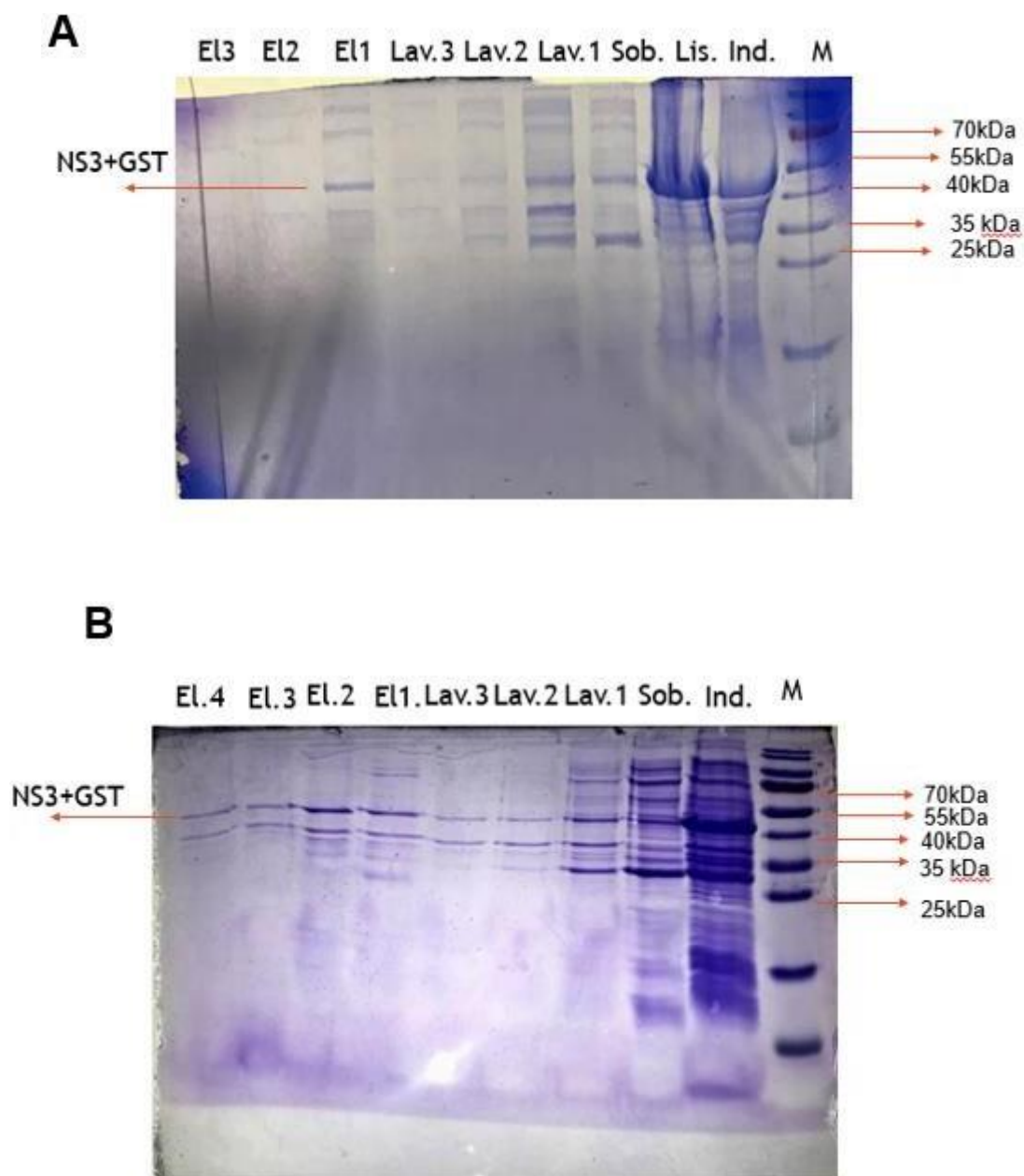
Figura 16: **Purificação da proteína recombinante NS3+GST a temperatura de 25°C.** Eletroforese em gel de poliacrilamida para SDS-PAGE 12,5%. M: Marcador de peso molecular Page Ruler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific); El.1-4: Eluições 1 a 4; Lav.1-3: Lavagens 1 a 3; S: Sobrenadante após a adição do lisado à resina; Lis: Lisado. Purificação realizada com 2mL de resina e 5,5mL de lisado e com uma bateria de gelo para diminuir a temperatura da reação; a banda de NS3+GST é um pouco mais forte do que o resultado anterior, mas fraca quando comparado com a banda inespecífica.



Fonte: Autora

Para melhorar o rendimento do experimento, passou a ser utilizado um sonicador e uma estufa refrigerada, visto que, após pesquisas na literatura, a temperatura influenciava no resultado final. Sendo assim, o processo de lise passou a ser feito no sonicador em 6 ciclos de 30 segundos /1 min de repouso (4°C), e as outras etapas do experimento utilizaram estufa e centrífuga refrigeradas. Após esses ajustes, os resultados obtidos foram melhores quando comparado com os anteriores, pois a proteína NS3 passou a aparecer na altura desejada, contudo juntamente com bandas inespecíficas na eluição, mesmo que numa proporção menor do que era observado nos outros experimentos (Figura 17). O ensaio de Bradford foi realizado para mensurar a concentração de proteína disponível, apesar das proteínas inespecíficas presentes no conteúdo da eluição (Quadro 4).

Figura 17: **Purificações da proteína recombinante NS3+GST a temperatura de 4°C.** Eletroforese em gel de poliacrilamida para SDS-PAGE 12,5%. M: Marcador de peso molecular Page Ruler Prestained Protein Ladder (ThermoScientific); Ind: indução; Lis: Lisado; Sob: Sobrenadante após a adição do lisado à resina; Lav.1-3: Lavagens 1 a 3; El.1-4: Eluições 1 a 4. Experimentos realizados com sonicator e nas mesmas condições de temperatura (4°C).



Fonte: Autora

Quadro 4: Quantificação das eluições pelo método de Bradford

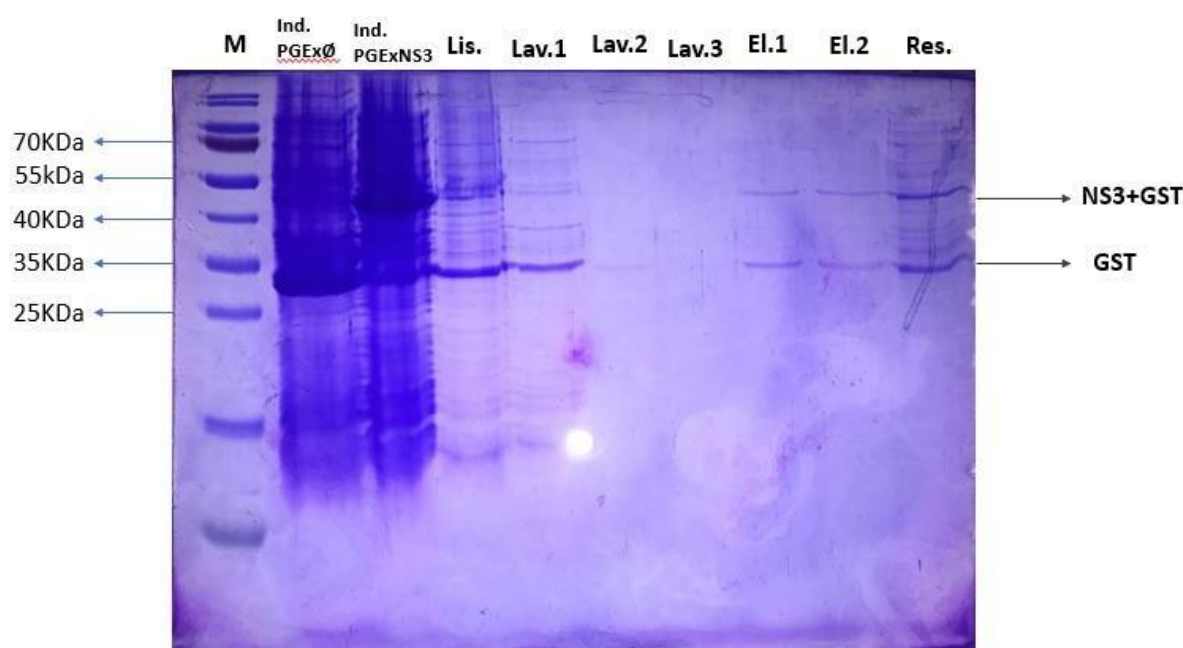
Amostra	Concentração ($\mu\text{g} / \text{mL}$)
Eluição 1 da figura 17 A	55,2
Eluição 1 da figura 17 B	140,9
Eluição 2 da figura 17 B	223,2

Fonte: Autora

Com o observado, a purificação pela resina de Níquel resultava em produtos impuros, então, optou-se por utilizar outro método de purificação, o da Glutathione S- Transferase, para verificar se o resultado encontrado era melhorado.

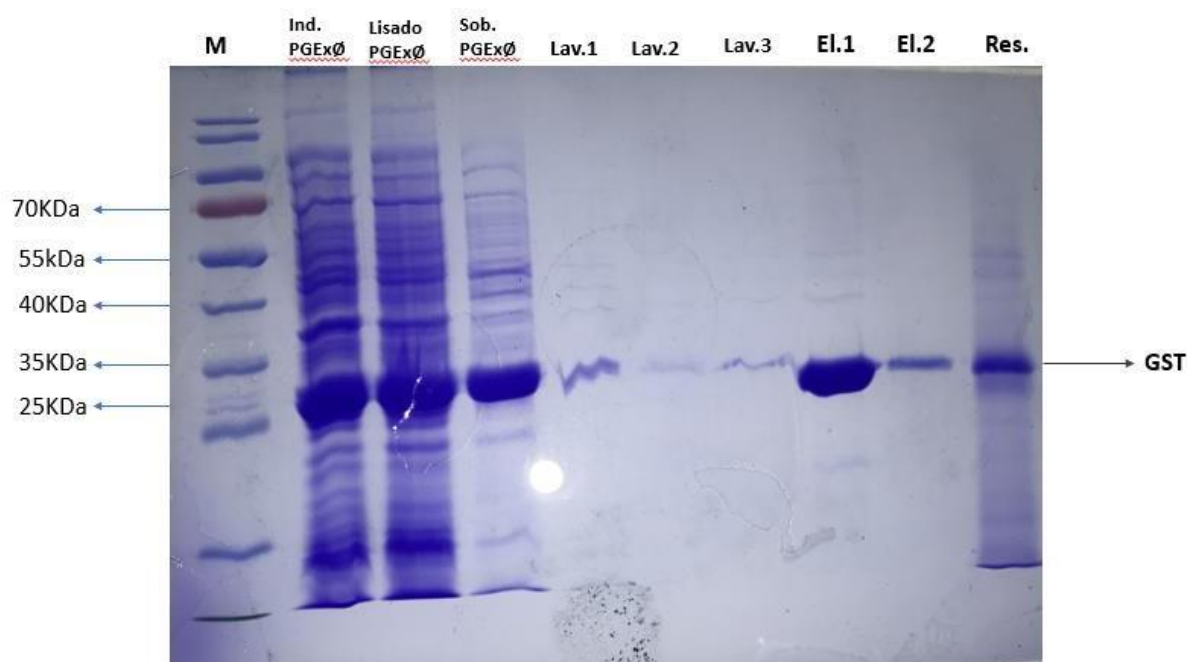
No primeiro experimento, com volume de cultura de 250 mL, tanto na primeira eluição quanto na segunda, o aparecimento de bandas inespecíficas foi mínimo, podendo ser considerado como inexistente e a banda de NS3+GST apareceu na altura desejada, ainda que tenha ficado retido uma quantidade considerável na resina (Figura 18). Além disso, na altura de 26 KDa, foi observado a banda de GST. Com isso, foi feito um volume de cultura do pGEXØ de 250mL, para utilizar na purificação com Glutathione S-transferase e obter a proteína GST (Figura 19).

Figura 18: **Purificação da proteína recombinante NS3+GST com a resina de Glutathione Sepharose.** Eletroforese em gel de poliacrilamida para SDS-PAGE 12,5%. M: Marcador de peso molecular Page Ruler Prestained Protein Ladder (ThermoScientific); Ind. pGEXØ: indução do pGEXØ; Ind. pGEXNS3: indução do pGEXNS3; Lis: Lisado; Lav.1-3: Lavagens 1 a 3; El.1-2: Eluições 1 e 2.



Fonte: Autora

Figura 19: **Purificação da proteína GST com a resina de Glutathione Sepharose.** Eletroforese em gelde poliacrilamida para SDS-PAGE 12,5%. M: Marcador de peso molecular Page Ruler Prestained Protein Ladder (ThermoScientific); Ind. pGEXØ: indução do pGEXØ; Lis. pGEXØ: Lisado do pGEXØ; Sob. pGEXØ: sobrenadante do pGEXØ; Lav.1-3: Lavagens 1 a 3; El.1-2: Eluições 1 e 2; Res.: Resina.

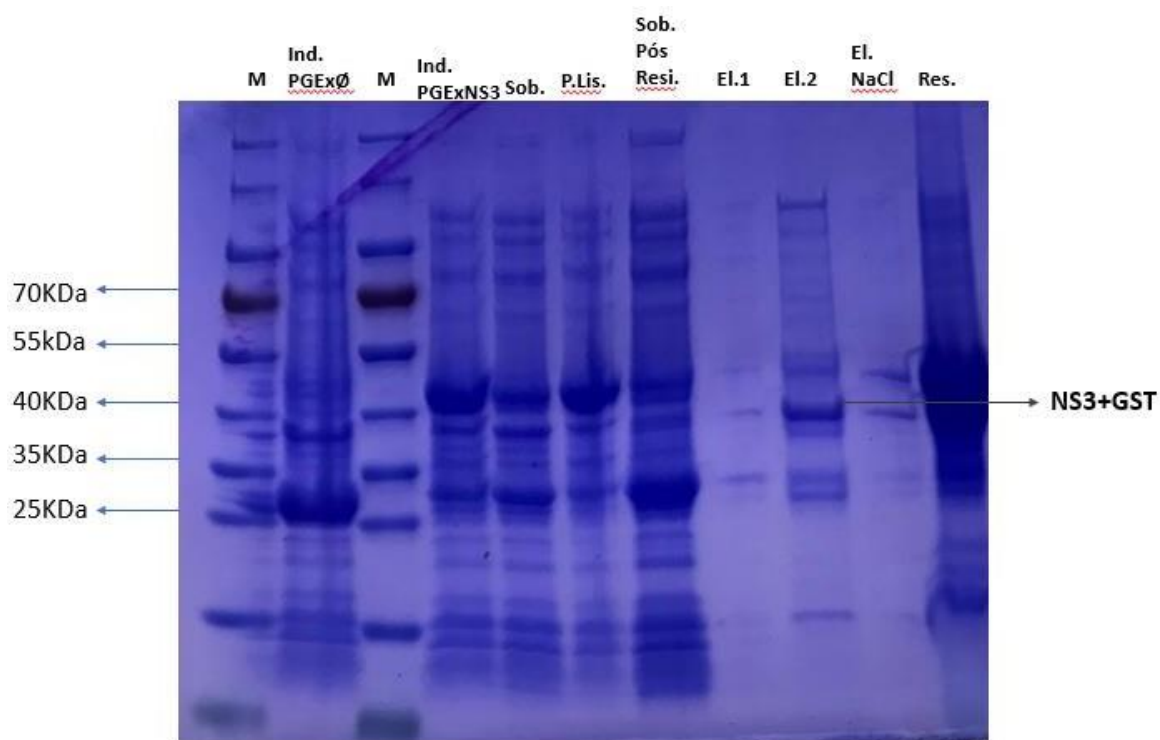


Fonte: Autora

No entanto, no período em que o experimento foi realizado, os equipamentos necessários para realização dos experimentos *in vitro* não estavam disponíveis, sendo assim, a amostra foi armazenada na temperatura de -20°C para posterior utilização e outros experimentos com purificação de Glutathione S-Transferase foram realizados a fim de obter uma maior quantidade de proteína para utilização. Contudo, no momento em que os experimentos *in vitro* puderam ser realizados, foi feita novamente uma análise por SDS-PAGE para averiguar o estado da proteína, mas a mesma já se encontrava degradada, impossibilitando o uso. Portanto, novos ensaios foram feitos a fim de obter novamente o mesmo resultado.

Devido ao fato da grande retenção da proteína na resina, modificações foram realizadas com o intuito de aprimorar o experimento. A condição da primeira eluição foi mantida, mas a segunda eluição foi incubada overnight e ocorreu a adição de uma eluição extra, com uma solução de 50mM de glutathione reduzida, contendo NaCl, visto que o protocolo sugere essas alterações para auxiliar no desprendimento da proteína. Contudo, o resultado como um todo não foi o esperado, pois na primeira eluição, uma quantidade muito insignificante de proteína foi liberada, com ocorrência de bandas inespecíficas. Na segunda eluição, uma quantidade significativa de proteínas foi desprendida, ocasionando muitas bandas inespecíficas e a eluição com NaCl também foi não satisfatória (Figura 20).

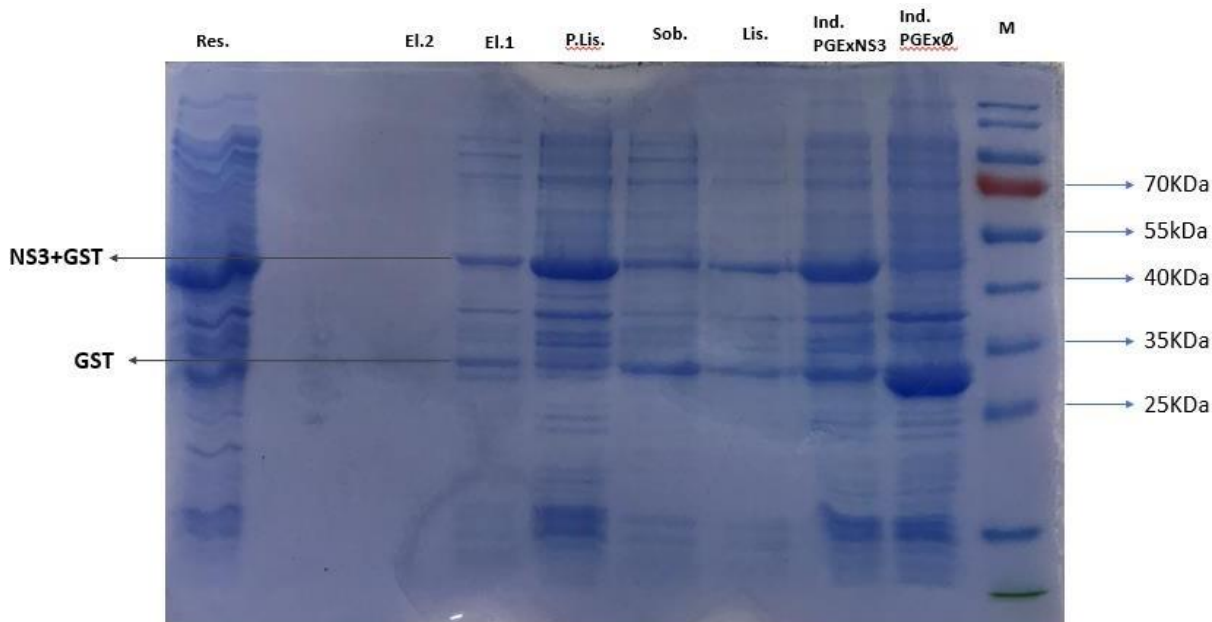
Figura 20: **Purificação da proteína recombinante NS3+GST com a resina de Glutathione Sepharose.** Eletroforese em gel de poliacrilamida para SDS-PAGE 12,5%. M: Marcador de peso molecular Page Ruler Prestained Protein Ladder (ThermoScientific); Ind. pGEXØ: indução do pGEXØ; Ind. pGEXNS3: indução do pGEXNS3; Sob: Sobrenadante; P. Lis: pellet do lisado; Sob pós res.: Sobrenadante pós resina; El.1-2: Eluições 1 e 2; El. NaCl: eluição com solução com NaCl; Res: Resina.



Fonte: Autora

Com os resultados obtidos no experimento anterior, novas soluções foram preparadas e o experimento com glutathione S-transferase foi repetido (Figura 21). A eluição 1 apresentou a banda de NS3+GST na altura desejada, entretanto, é observado o desprendimento da resina, de bandas inespecíficas. Contudo, pelo fato da construção do gene possibilitar também a purificação pela resina de níquel, esse volume de eluição foi utilizado na purificação pela His, para verificar se o produto obtido seria mais puro. Antes da segunda purificação, foi realizada a troca de tampão, pois a proteína encontrava-se na solução de eluição de glutathione reduzida, incompatível com a resina de níquel. A substituição foi através da precipitação de proteínas por TCA/acetona gelada.

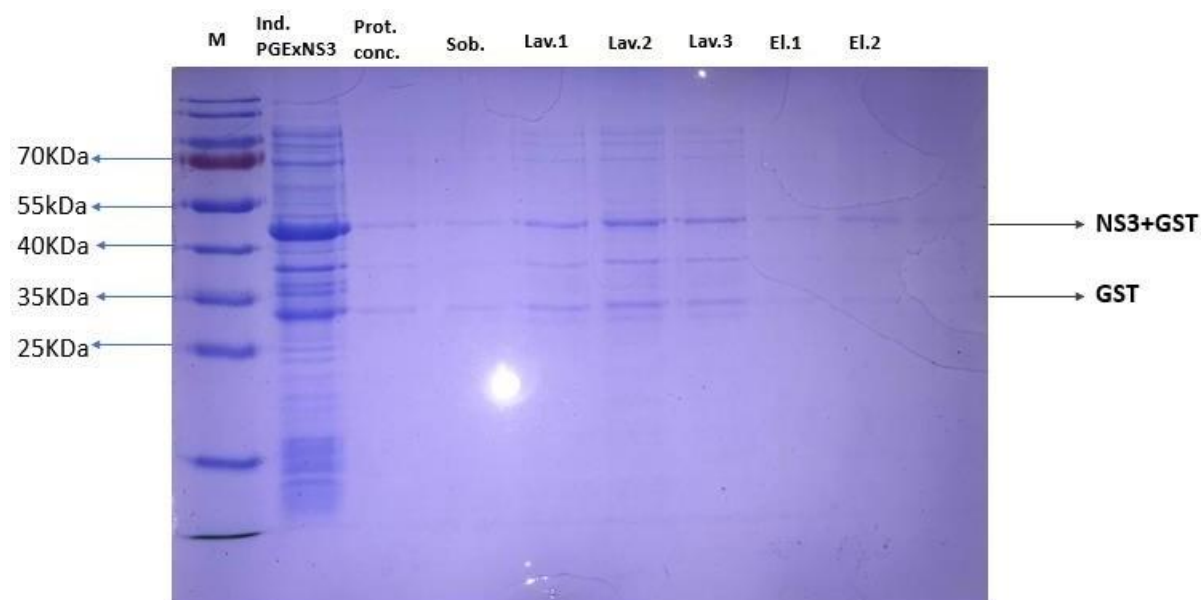
Figura 21: **Purificação da proteína recombinante NS3+GST com a resina de Glutathione Sepharose.** Eletroforese em gel de poliacrilamida para SDS-PAGE 12,5%. M: Marcador de peso molecular Page Ruler Prestained Protein Ladder (ThermoScientific); Ind. pGEXØ: indução do pGEXØ; Ind. pGEXNS3: indução do pGEXNS3; Lis: lisado; Sob: Sobrenadante; P. Lis: pellet do lisado; El.1-2: Eluições 1 e 2; Res: Resina.



Fonte: Autora

No experimento com a resina de níquel, a concentração de proteína inicial foi baixa, significando que uma grande quantidade de proteína foi perdida no momento da precipitação (Figura 22), e consequentemente, durante a etapa de eluição, o rendimento obtido foi baixo, além de também apresentar bandas inespecíficas, mesmo que a segunda purificação tenha eliminado parte das proteínas indesejadas.

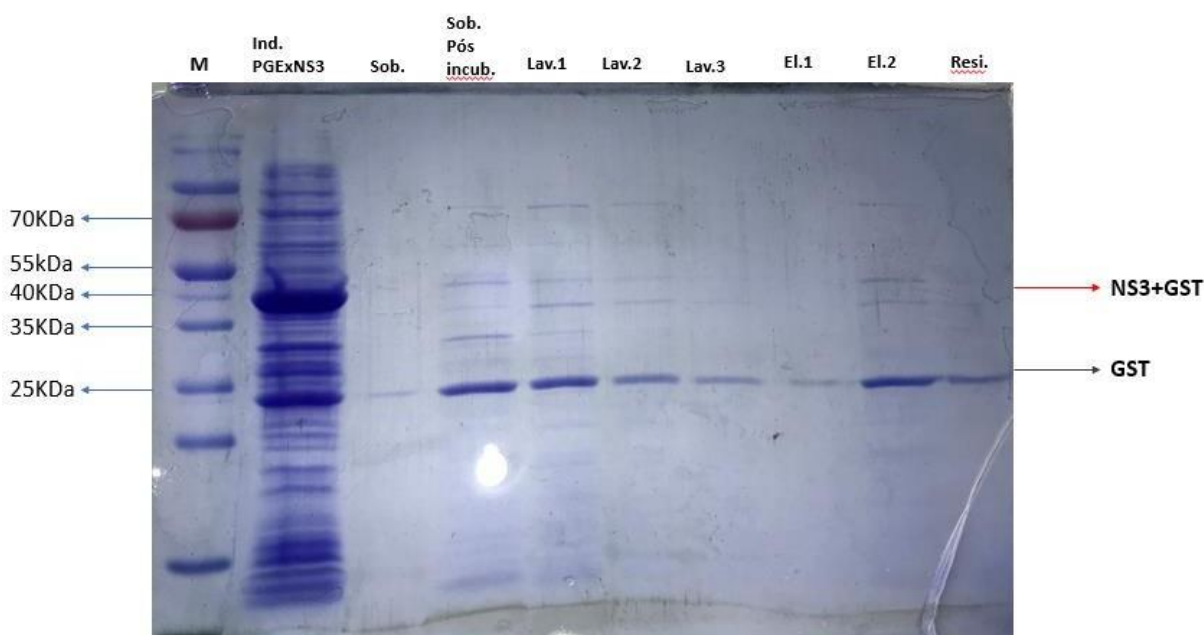
Figura 22: **Purificação da proteína recombinante NS3+GST com a resina de Níquel, após precipitação de proteína com TCA/acetona gelada.** Eletroforese em gel de poliacrilamida para SDS-PAGE 12,5%. M: Marcador de peso molecular Page Ruler Prestained Protein Ladder (ThermoScientific); Ind. pGEXNS3: indução do pGEXNS3; Prot. conc.: proteína concentrada; Lis: lisado; Sob: Sobrenadante; P. Lis: pellet do lisado; El.1-2: Eluições 1 e 2; Res: Resina.



Fonte: Autora

Sendo assim, o experimento com GST foi repetido, diminuindo o tempo de incubação durante as duas eluições para 30 minutos, pois foi observado em um experimento anterior que quanto maior tempo de incubação, mais proteínas inespecíficas foram eluídas. Contudo, a proteína NS3+GST foi obtida em uma quantidade inexpressiva, sendo inválido para utilização nos experimentos *in vitro* (Figura 23).

Figura 23: **Purificação da proteína recombinante NS3+GST com a resina de Glutathione Sepharose.** Eletroforese em gel de poliacrilamida para SDS-PAGE 12,5%. M: Marcador de peso molecular Page Ruler Prestained Protein Ladder (ThermoScientific); Ind. pGEXNS3: indução do pGEXNS3; Sob: Sobrenadante; Sob pós incub.: Sobrenadante pós incubação; Lav. 1-3: Lavagens de 1 a 3; El.1-2: Eluições 1 e 2; Res: Resina. Seta em vermelho: altura desejada de NS3+GST.



No intuito de melhorar o processo de purificação, alterações foram realizadas no experimento com o níquel (Quadro 6) e os resultados obtidos na terceira lavagem, e nas duas eluições foram satisfatórios. Apesar da etapa da lavagem, não ser considerada o estágio em que a proteína deva ser obtida, no presente trabalho, foi o momento em que NS3+GST apresentou uma banda mais significativa, mesmo com a presença de bandas inespecíficas. Contudo, as proteínas indesejadas possuem um rendimento baixo, indicando a hipótese de que a terceira lavagem poderia ser utilizada nos experimentos *in vitro* (Figura 24).

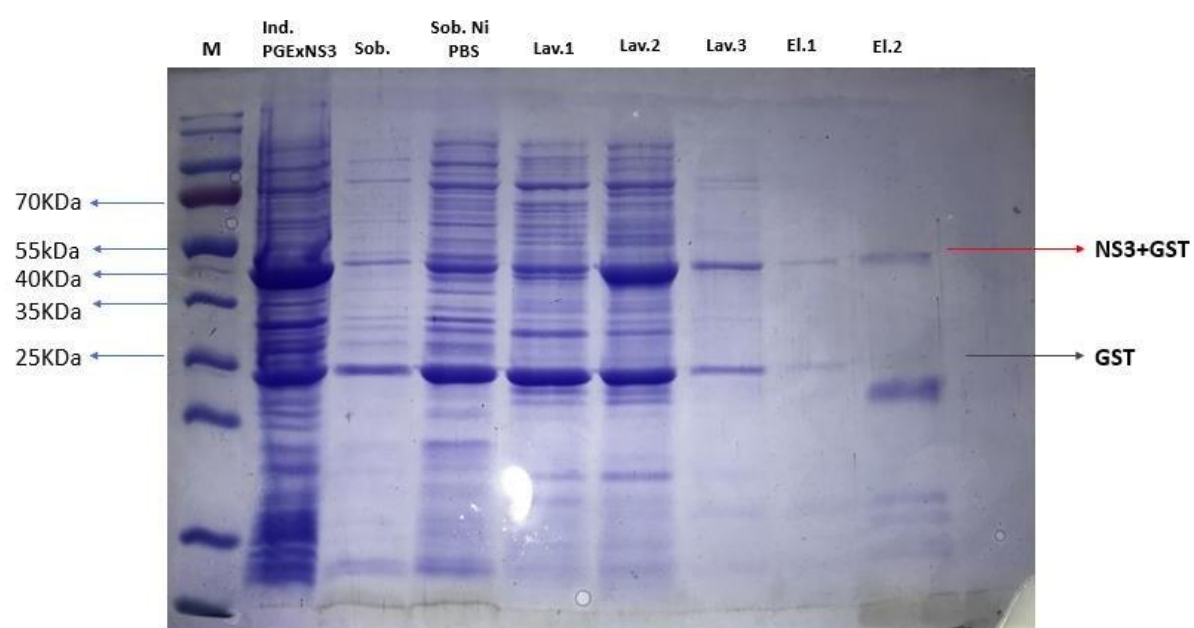
Quadro 5: Soluções utilizadas anteriormente na purificação com resina de Níquel

Soluções	Tris-HCl	NaCl	Imidazol
Tampão de lise (ph 8,0)	50mM	300mM	10mM
Tampão de lavagem (ph 8,0)	50mM	300mM	20mM
Tampão de Eluição (pH 8,0)	50mM	300mM	500mM

Quadro 6: Alterações realizadas nas soluções de purificação com resina de Níquel

Tampão de Lise	Tampão de Lavagem	Tampão de Eluição
NaH ₂ PO ₄ 0,09 M Tris 0,09 M Imidazol 20mM pH=8,0	NaH ₂ PO ₄ 0,09 M Tris 0,09 M Imidazol 30mM pH=6,0	NaH ₂ PO ₄ 0,1 M Tris 0,09M Imidazol 1M pH=4,6

Figura 24: **Purificação da proteína recombinante NS3+GST com a resina de Níquel.** Eletroforese em gel de poliacrilamida para SDS-PAGE 12,5%. M: Marcador de peso molecular Page Ruler Prestained Protein Ladder (ThermoScientific); Ind. pGEXNS3: indução do pGEXNS3; Sob: Sobrenadante; Sob. Ni PBS: Sobrenadante pós lavagem da resina de níquel com PBS 1x; Lav 1-3: lavagens de 1 a 3; El.1-2: Eluições 1 e 2.



5 DISCUSSÃO

Devido a epidemia de ZIKV em 2015-2016 no Brasil, e todas as complicações geradas pela síndrome congênita provocada pela infecção, a doença se tornou um problema de saúde pública e pelo risco de um novo surto, é necessário a investigação de estratégias vacinais e drogas antivirais que auxiliem na diminuição dos casos (LUNARDELLI et al., 2021). Algumas estratégias já se encontram em fases de pesquisa clínica I e II (TEBAS et al., 2021; DOWD et al., 2016; GAUDINSKI et al., 2018), e o desenvolvimento concomitante de diversas estratégias não é um fator limitante, visto que, fornece uma ampla variedade de informações acerca do assunto e contribui para o controle da doença no futuro, pois será necessário mais de uma estratégia vacinal, levando em consideração ao tamanho da população que vive em áreas endêmicas, além do grupo prioritário, que inclui mulheres grávidas e em idade fértil (MORABITO; GRAHAM, 2017).

A maioria dos estudos relacionados ao ZIKV, utilizam abordagens que vêm sendo estudadas para o vírus da Dengue, em virtude da similaridade entre eles. As proteínas de Flavivírus mais empregadas nesse âmbito são as prM, E e NS1, em razão de suas funções durante o ciclo viral e a capacidade de ligação a anticorpos (HEINZ; STIASNY, 2012; GOO et al., 2018). Contudo, a proteína NS3 também apresenta funções importantes durante o processo de síntese viral, como na replicação e processamento da poliproteína. Além disso, também é capaz de induzir respostas imunes celulares do tipo T sendo apontada como um alvo interessante na produção de vacinas anti-ZIKV (RAMÍREZ et al., 2014; HURTADO-MELGOZA et al., 2016). Grande parte das informações disponíveis acerca da proteína são para o vírus da Dengue, e mesmo assim, carecem de estudos acerca da atividade imunogênica e antigênica. Nesse sentido, o presente estudo visou a clonagem, expressão e purificação da porção protease da proteína NS3 do ZIKV em *E.coli*, a fim de obtê-la para ser utilizada posteriormente em estudos funcionais para análise do perfil imune e obter respostas que auxiliem na compreensão acerca da atividade do NS3 como possível antígeno vacinal e alvo para métodos de diagnóstico.

Na expressão da proteína de interesse, foi necessário utilizar um

sistema adequado, sendo a *E.coli* escolhida por ser um modelo de baixo custo, fácil manuseio e que permite uma alta taxa de expressão de proteínas heterólogas (ROSANO; MORALES; CECCARELLI, 2019). Essa bactéria apresenta várias cepas disponíveis no mercado para esse tipo de produção, cada uma com sua especificidade, sendo escolhida de acordo com o objetivo que se deseja alcançar. Neste estudo, a cepa BL21 (DE3) foi utilizada em decorrência da deficiência em proteases (GOTTESMAN, 1996; GRODBERG E DUNN, 1988), fator que diminui a taxa de degradação das proteínas heterólogas, e pela presença da RNA polimerase do fago T7, controlado pelo promotor *lac*. Nesse sistema, tanto a lactose quanto seus análogos, como o IPTG, induzem a síntese de proteínas pela ativação do promotor, e quando essas substâncias atingem baixas concentrações a síntese é cessada, se tratando de um mecanismo de fácil controle e com produção elevada de proteínas (ROSANO; CECCARELLI, 2014).

Na produção pela *E.coli*, as proteínas geradas podem apresentar algumas características como baixa solubilidade e/ou baixa expressão, e o uso de tags pode solucionar alguns desses problemas. Para aumentar a solubilidade, existem algumas opções disponíveis, como a MBP (maltose binding protein), a GB1 (domínio Gb-1 da proteína G) e a GST (glutathione S-transferase), que é utilizada no presente estudo (BIRD, 2011). O vetor de expressão pGEX, possui a GST como proteína de fusão na porção N-terminal e por isso é utilizado na clonagem do gene de interesse. Além das tags com propriedades de melhorias na solubilidade, existem variedades específicas para imunodetecção e/ou purificação, como é o caso das tags de polihistidina. Durante a síntese do gene NS3, foi adicionado na porção C-terminal, uma pequena tag de 6xHis, para possibilitar a purificação da proteína recombinante por cromatografia por afinidade em resina de níquel. A GST também permite a sua utilização como um sistema de purificação, contudo, não foi utilizada a princípio devido a dificuldade de acesso.

Os resultados das purificações, inicialmente, apresentaram problemas, devido a questões técnicas e de infraestrutura disponíveis, impossibilitando a realização do experimento em temperatura em torno de 4°C e uma lise eficaz das células. Os principais resultados encontrados neste primeiro momento

foram o aparecimento de bandas inespecíficas, a proteína desejada não foi eluída adequadamente durante o processo, e o sinal detectado foi fraco quando comparado com o das bandas inespecíficas. Vários fatores são associados a esses problemas, como a degradação das proteínas heterólogas durante o processo, ligação insuficiente da proteína a resina de níquel, ou até uma lise insuficiente. De acordo com o handbook da Qiagen, fabricante da resina de níquel utilizada, e protocolos desenvolvidos por (KIELKOPF; BAUER; URBATSCH, 2020) e (SPRIESTERSBACH et al., 2015), às soluções de lise, lavagem e eluição devem ser armazenadas a 4°C, assim como a proteína eluída, para evitar degradações. Além disso, é recomendado que a lise seja realizada em aparelhos que facilitam a extração do conteúdo celular como sonicadores, para melhorar a liberação das proteínas heterólogas produzidas, e assim, possibilitar uma concentração ideal para a purificação.

Após o ajuste de temperatura e método de lise, os dados obtidos foram considerados melhores quando comparados com os que foram gerados antes das modificações, com o aparecimento da banda da proteína NS3 fusionada em GST em torno de 44kDa, contudo, ainda são observadas bandas inespecíficas. Fazendo uma analogia com Bernier et al., 2018, que realizou um estudo comparativo com diversas construções plasmidiais, mudando os tipos e a localização das proteínas de fusão. Uma dessas, era com a tag de His (10xHis) na porção C-terminal e a GST na N- terminal do plasmídeo pGEX-4T-1, e diferentes concentrações de imidazol foram testadas na solução de eluição, como 250mM e 500mM, sendo os melhores resultados encontrados nos reagentes de 500mM. Mesmo com baixos rendimentos proteicos resultantes, o resultado é semelhante ao presente trabalho que obteve com a mesma quantidade de imidazol na solução de eluição, rendimentos satisfatórias de proteína resultante, mesmo que com proteínas inespecíficas. Ainda no artigo de Bernier et al., 2018, outra construção com uma tag de 6xHis, igual ao presente estudo, apresentou melhores resultados em concentrações de 250mM de imidazol. Apesar de alguns estudos utilizarem uma tag de histidina maior (10xHis) que o presente trabalho, o uso de 6xHis é muito comum na literatura (BUCHER; EVDOKIMOV; WAUGH, 2002; ROUTZAHN; WAUGH, 2002; NALLAMSETTY et al., 2005; (RARAN-KURUSSI; WAUGH,

2012); RARAN-KURUSSI; WAUGH, 2014; DEMONTE; DUNDAS; PARK, 2014; JIANG et al., 2016; VU et al., 2016) e quando realizado o processo de purificação, apresenta resultados satisfatórios. A vantagem de utilizar uma tag maior seria a possibilidade de uma formação de ligação mais resistente a resina e assim, a obtenção de uma proteína mais pura, sendo uma possível hipótese a ser testada no futuro com a proteína NS3 (GRISSHAMMER; TUCKER, 1997; FU; MALONEY, 1997; HORCHANI et al., 2014).

Outra pesquisa envolvendo purificação por resina de níquel, realizada por Mosadeghi et al., 2015, utilizou a tag de His na porção N-terminal e solução de eluição com concentração de 500mM de imidazol e apresentou resultados satisfatórios. Mesmo que os estudos apresentem diferenças quanto ao presente trabalho, como o tamanho da tag de His e a sua localização na construção recombinante, as concentrações de imidazol na solução de eluição foram as mesmas, indicando que essa concentração é adequada ao processo.

Apesar do aparecimento de bandas inespecíficas, o resultado encontrado nas quantificações pelo método de Bradford demonstra a obtenção de uma quantidade de proteínas em torno de 50 a 200µg / mL. De acordo com os trabalhos publicados por Kim et al., 2018, para a realização de estudos *in vitro* com proteínas recombinantes, a concentração necessária de proteína recombinante é de 1 µg/mL por 1×10^6 células, então acredita-se que após o ajuste de protocolos, a concentração obtida da proteína NS3+GST irá ser suficiente para o andamento do estudo.

Após os resultados insatisfatórios da purificação com Níquel, o método por GST passou a ser utilizado, a fim de aprimorar o que estava sendo encontrado. No primeiro experimento realizado, as duas eluições demonstraram resultados satisfatórios, contudo, ocorreu o aparecimento de apenas uma banda específica, na altura de 26KDa, localizado logo abaixo da banda correspondente a proteína NS3+GST. Então, após buscas na literatura, foi observado que o estudo de Alvarez-Rodrigues et al., 2014, realizou um trabalho muito semelhante a este, consistindo na produção de uma proteína recombinante de NS3+GST dos quatro tipos do vírus da Dengue, e após o processo de purificação, também foi observado o aparecimento de duas

bandas, uma da proteína de interesse e outra na altura de 26KDa, correspondente a proteína GST. No trabalho de Alvarez-Rodrigues, na realização dos experimentos *in vivo*, para contornar a banda de GST que estava sendo expressa, foi utilizado um controle, a proteína GST em separado, para que durante as análises, a sua resposta fosse obtida e interpretada e assim, na análise da proteína recombinante, fosse possível identificá-la sua efetiva imunogenicidade. Sendo assim, o presente trabalho também produziu a proteína GST em separado, através da expressão do vetor pGEXØ e purificação por GST, para ser utilizado futuramente nos experimentos *in vitro*.

Após esse experimento, outros ensaios de purificação com GST foram realizados, com o intuito de obter uma maior quantidade de proteína, visto que naquele momento não era possível realizar os ensaios *in vitro* devido às condições do laboratório. Contudo, após a retomada dos equipamentos necessários para o experimento, foi verificada a condição da eluição que havia sido armazenada e a mesma tinha sido degradada devido ao longo tempo, impossibilitando a realização dos ensaios *in vitro*. Durante esse tempo, em que a amostra estava armazenada, repetições foram realizadas, no entanto, não foram bem-sucedidas, resultando em eluições com muitas bandas inespecíficas (Figura 20) e uma das possíveis soluções para esse problema, seria efetuar uma dupla purificação com GST e níquel.

O outro experimento com GST foi realizado, e na primeira eluição ainda era evidenciado o aparecimento de proteínas inespecíficas (Figura 21), então, foi realizada uma precipitação de proteínas com TCA/acetona gelada com o intuito de realizar uma troca de tampão, visto que no ensaio de GST era utilizado solução de glutatona reduzida, sendo incompatível com a resina de níquel, que utiliza tampão de imidazol. Após a troca, foi realizado o ensaio com níquel e o resultado demonstrou a eficiência do níquel em retirar proteínas indesejadas, contudo, ainda era possível observar bandas inespecíficas, além da intensidade de coloração no gel das mesmas estarem fracas, evidenciando que além da dupla purificação ter sido ineficaz, também ocorreu perda de proteína durante o processo, possivelmente no momento da troca do tampão.

Na tentativa de obter a proteína NS3+GST de forma mais pura, um novo experimento com GST foi feito, apenas com o preparo de novas soluções, e foram realizadas modificações no protocolo de níquel baseado no que era utilizado em um laboratório parceiro. Quanto ao GST, o resultado da eluição não foi eficaz, aparecendo somente a banda referente a GST no gel de SDS-PAGE 12,5%. No níquel, o resultado na terceira lavagem e nas duas eluições, foi um dos melhores, visto que na lavagem, é evidenciado a banda de NS3+GST (43KDa) e a de GST (26KDa), em intensidades fortes, mas ainda apresenta bandas inespecíficas, mesmo que em intensidades fracas de coloração. Nas eluições, são visualizadas as duas bandas, mas em concentrações menores que na lavagem e também com proteínas específicas. Foi realizado um ensaio de precipitação com TCA/acetona gelada com um volume de 300µl da terceira lavagem, para realizar a troca do tampão e verificar a possibilidade de realizar os ensaios *in vitro*, visto que não é possível efetuar a cultura de células com a proteína em um tampão de imidazol, pois o mesmo poderia interferir no resultado. Contudo, no gel de SDS-PAGE 12,5% não é possível observar banda de proteína, resultado muito parecido com o que foi encontrado durante a dupla purificação, evidenciado que a precipitação não foi eficaz, ocorrendo perda de proteína.

Apesar do protocolo realizado neste trabalho, utilizando a resina de Glutathione Sepharose, ter sido baseado em Harper e Seicher, 2013, foram realizadas modificações que deram resultados em trabalhos de laboratórios parceiros.

No futuro, para os ensaios *in vitro* e *in vivo*, será necessário realizar ajustes no protocolo de purificação, para produzir uma quantidade maior de recombinantes. As possíveis alterações seriam os testes com outras concentrações de imidazol nas soluções de eluição, como de 250mM, e de lavagem, para os ensaios com níquel e para o de GST, seria utilizar a concentração de 10mM, pois para o caso da proteína NS3 pode ser que obtenha um melhor resultado, ou até mesmo efetuar uma mudança de localização da tag de His para obter eluições mais puras da proteína. Após os ajustes de protocolos, a obtenção da porção protease da proteína NS3, possibilita a sua utilização em ensaios de diagnóstico, comparando como

métodos já disponíveis no mercado; análises do potencial imunológico frente ao vírus da Zika, para identificar possíveis diferenças que possam existir entre o vírus da Dengue e benefícios quanto ao seu uso como antígeno vacinal.

6 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste estudo demonstram a produção do antígeno recombinante NS3 porção protease em linhagem BL21(DE3), de *E.coli*. O estudo também comprova que os ensaios de purificação, tanto por níquel quanto por GST, foram insuficientes para obtenção da proteína na forma pura, para utilização em experimentos *in vitro*, seja do ponto de vista imunológico ou de diagnóstico, sendo necessário realizar ajustes nos protocolos para que futuramente seja possível realizar ensaios tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Como foi demonstrado, pela revisão da literatura, a proteína NS3 é um importante alvo para as células T, com isso, é necessário realizar estudos que compreendam sua atividade antigênica frente ao vírus da Zika, para que possam ser desenvolvidas estratégias vacinais e de diagnóstico que auxiliem no controle da doença.

REFERÊNCIAS

- ABRAMS, R. P. M.; SOLIS, J.; NATH, A. Therapeutic Approaches for Zika Virus Infection of the Nervous System. **Neurotherapeutics**, v. 14, n. 4, p. 1027–1048, 2017.
- AGRELLI, Almerinda et al. ZIKA virus entry mechanisms in human cells. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 69, p. 22-29, 2019.
- ALCON, S. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 376–381, 2002.
- ALERA, M. T. et al. Zika Virus Infection, Philippines, 2012. **Emerging infectious diseases**, v. 21, p. 722, 2015.
- ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, Laura Mónica et al. Expression, purification, and evaluation of diagnostic potential and immunogenicity of a recombinant NS3 protein from all serotypes of dengue virus. **Journal of tropical medicine**, v. 2012, 2012.
- AMARA, A.; MERCER, J. Viral apoptotic mimicry. **Nature Reviews Microbiology** **2015 13:8**, v. 13, n. 8, p. 461–469, 2015.
- AMORIM, J. H. et al. The dengue virus non-structural 1 protein: Risks and benefits. **Virus Research**, v. 181, p. 53–60, 6 mar. 2014.
- AUBRY, M. et al. Seroprevalence of arboviruses among blood donors in French Polynesia, 2011–2013. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 41, p. 11–12, 2015.
- AVIRUTNAN, P. et al. Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1. **Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 4, p. 793–806, 2010.
- BAESHEN, Mohammed N. et al. Production of biopharmaceuticals in *E. coli*: current scenario and future perspectives. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 25, n. 7, p. 953-962, 2015.
- BARDINA, S. V. et al. Enhancement of Zika virus pathogenesis by preexisting anti-flavivirus immunity. **Science**, v. 356, n. 6334, p. 175–180, 2017.
- BARJAS-CASTRO, M. L. et al. Probable transfusion-transmitted Zika virus in Brazil. **Transfusion**, v. 56, n. 7, p. 1684–1688, 2016.
- BERNIER, Sarah C.; CANTIN, Line; SALESSE, Christian. Systematic analysis of the expression, solubility and purification of a passenger protein in fusion with different tags. **Protein Expression and Purification**, v. 152, p. 92-106, 2018.
- BESNARD, M. et al. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French

Polynesia, December 2013 and February 2014. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 13, p. 20751, 2014.

BIRD, L. E. High throughput construction and small scale expression screening of multi-tag vectors in *Escherichia coli*. **Methods**, v. 55, n. 1, p. 29–37, 2011.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRASIL, P. et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 24, p. 2321–2334, 2016.

BROWN, J. A. et al. Dengue Virus Immunity Increases Zika Virus-Induced Damage during Pregnancy. **Immunity**, v. 50, n. 3, p. 751- 762.e5, 2019.

BUATHONG, R. et al. Detection of zika virus infection in Thailand, 2012-2014. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 2, p. 380–383, 2015.

BUCHER, Matthew H.; EVDOKIMOV, Artem G.; WAUGH, David S. Differential effects of short affinity tags on the crystallization of *Pyrococcus furiosus* maltodextrin-binding protein. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 58, n. 3, p. 392-397, 2002.

CAO, B.; DIAMOND, M. S.; MYSOREKAR, I. U. Maternal-Fetal Transmission of Zika Virus: Routes and Signals for Infection. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 37, n. 7, p. 287–294, 2017.

CHANDELE, A. et al. Characterization of Human CD8 T Cell Responses in Dengue Virus-Infected Patients from India. **Journal of Virology**, v. 90, n. 24, p. 11259–11278, 2016.

CHANPRAPAPH, S. et al. Competitive inhibition of the dengue virus NS3 serine protease by synthetic peptides representing polyprotein cleavage sites. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 330, n. 4, p. 1237–1246, 2005.

CHUNG, Kyung Min et al. West Nile virus nonstructural protein NS1 inhibits complement activation by binding the regulatory protein factor H. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 50, p. 19111-19116, 2006.

COELHO, G. E. Challenges in the control of *Aedes aegypti*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 54, n. SUPPL.18, p. 13–14, 2012.

COX, Freek et al. Adenoviral vector type 26 encoding Zika virus (ZIKV) M-Env antigen induces humoral and cellular immune responses and protects mice and nonhuman primates against ZIKV challenge. **PloS one**, v. 13, n. 8, p. e0202820, 2018.

CUI, T. et al. Recombinant Dengue Virus Type 1 NS3 Protein Exhibits Specific Viral

RNA Binding and NTPase Activity Regulated by the NS5 Protein. **Virology**, v. 246, n. 2, p. 409–417, 1998.

DAI, L. et al. Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. **Cell Host & Microbe**, v. 19, n. 5, p. 696–704, 2016.

DEMONTE, Daniel; DUNDAS, Christopher M.; PARK, Sheldon. Expression and purification of soluble monomeric streptavidin in *Escherichia coli*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 14, p. 6285-6295, 2014.

DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus (II). Pathogenicity and physical properties. **Transactions of the royal society of tropical medicine and DIECI, G. et al. tRNA-Assisted Overproduction of Eukaryotic Ribosomal Proteins. Protein Expression and Purification**, v. 18, n. 3, p. 346–354, 2000.

DIOSA-TORO, M. et al. Role of RNA-binding proteins during the late stages of Flavivirus replication cycle. **Virology Journal**, v. 17, n. 1, 2020.

DIRLIKOV, E. et al. Clinical Features of Guillain-Barré Syndrome With vs Without Zika Virus Infection, Puerto Rico, 2016. **JAMA Neurology**, v. 75, n. 9, p. 1089–1097, 2018.

DOWD, K. A. et al. Rapid development of a DNA vaccine for Zika virus. **Science**, v. 354, n. 6309, p. 237–240, 14 out. 2016.

DUANGCHINDA, T. et al. Immunodominant T-cell responses to dengue virus NS3 are associated with DHF. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 39, p. 16922–16927, 2010.

DUFFY, M. R. et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536–2543, 11 jun. 2009.

DUPONT-ROUZEYROL, M. et al. Co-infection with Zika and Dengue Viruses in 2 Patients, New Caledonia, 2014. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 381–382, 2015.

ELIZONDO-QUIROGA, D. et al. Zika Virus in Salivary Glands of Five Different Species of Wild-Caught Mosquitoes from Mexico. **Scientific Reports 2017 8:1**, v. 8, n. 1, p. 1–7, 2018.

ELONG NGONO, Annie et al. CD8+ T cells mediate protection against Zika virus induced by an NS3-based vaccine. **Science advances**, v. 6, n. 45, p. eabb2154, 2020.

ELONG NGONO, Annie; SHRESTA, Sujan. Cross-reactive T cell immunity to dengue and Zika viruses: New insights into vaccine development. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 1316, 2019.

FARIA, N. R. et al. Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas. **Nature** **2017 546:7658**, v. 546, n. 7658, p. 406–410, 2017.

FARIA, N. R. et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. **Science**, v. 352, n. 6283, p. 345–349, 2016.

FU, DaXiong; MALONEY, Peter C. Evaluation of secondary structure of OxIT, the oxalate transporter of *Oxalobacter formigenes*, by circular dichroism spectroscopy. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 4, p. 2129-2135, 1997.

GAUDINSKI, Martin R. et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of two Zika virus DNA vaccine candidates in healthy adults: randomised, open-label, phase 1 clinical trials. **The Lancet**, v. 391, n. 10120, p. 552-562, 2018.

GEORGE, J. et al. Prior Exposure to Zika Virus Significantly Enhances Peak Dengue-2 Viremia in Rhesus Macaques. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2017.

GOO, L. et al. The Zika virus envelope protein glycan loop regulates virion antigenicity. **Virology**, v. 515, p. 191–202, 2018.

GOTTESMAN, Susan. Proteases and their targets in *Escherichia coli*. **Annual review of genetics**, v. 30, p. 465, 1996.

GRANT, A. et al. Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling. **Cell Host & Microbe**, v. 19, n. 6, p. 882–890, 2016.

GRARD, G. et al. Zika Virus in Gabon (Central Africa) – 2007: A New Threat from *Aedes albopictus*? **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 2, p. e2681, 2014.

GREGORY, C. J. et al. Modes of Transmission of Zika Virus. **Journal of Infectious Diseases**, v.216, n.10, p. S875-S883, 2017.

GRIFONI, A. et al. Prior Dengue Virus Exposure Shapes T Cell Immunity to Zika Virus in Humans. **Journal of Virology**, v. 91, n. 24, p. 1469–1486, 2017.

GRISCHOTT, F. et al. Non-vector-borne transmission of Zika virus: A systematic review. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 14, n. 4, p. 313–330, 2016.

GRISSHAMMER, Reinhard; TUCKER, Julie. Quantitative evaluation of neurotensin receptor purification by immobilized metal affinity chromatography. **Protein expression and purification**, v. 11, n. 1, p. 53-60, 1997.

GRODBERG, Jennifer; DUNN, John J. ompT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. **Journal of bacteriology**, v. 170, n. 3, p. 1245-1253, 1988.

GRUBAUGH, N. D. et al. Genomic epidemiology reveals multiple introductions of Zika virus into the United States. **Nature** **2017 546:7658**, v. 546, n. 7658, p. 401–405, 2017.

GUTIÉRREZ-BUGALLO, G. et al. Vector-borne transmission and evolution of Zika virus. **Nature Ecology and Evolution**, v.3, n.4, p. 561-569, 2019.

HAN, H. H. et al. Safety and immunogenicity of a purified inactivated Zika virus vaccine candidate in healthy adults: an observer-blind, randomised, phase 1 trial. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 21, n. 9, p. 1282–1292, 2021.

HARPER, Sandra; SPEICHER, David W. Purification of proteins fused to glutathione S-transferase. In: **Protein chromatography**. Humana Press, p. 259-280, 2011.

HASTINGS, A. K. et al. TAM Receptors Are Not Required for Zika Virus Infection in Mice. **Cell Reports**, v. 19, n. 3, p. 558–568, 2017.

HAYES, E. B. Zika virus outside Africa. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 9, p. 1347-1350, 2009.

HEANG, V. et al. Zika virus infection, Cambodia, 2010. **Emerging infectious diseases**, v. 18, n. 2, p. 349-351, 2012.

HEINZ, F. X.; STIASNY, K. Flaviviruses and their antigenic structure. **Journal of Clinical Virology**, v. 55, n. 4, p. 289–295, 2012.

HENNESSEY, M.; FISCHER, M.; STAPLES, J. E. Zika Virus Spreads to New Areas — Region of the Americas, May 2015–January 2016. **American Journal of Transplantation**, v. 16, n. 3, p. 1031–1034, 2016.

HERRERA, B. B. et al. Sustained Specific and Cross-Reactive T Cell Responses to Zika and Dengue Virus NS3 in West Africa. **Journal of Virology**, v. 92, n. 7, 2018.

HOEN, B. et al. Pregnancy Outcomes after ZIKV Infection in French Territories in the Americas. **New England Journal of Medicine**, v. 378, n. 11, p. 985–994, 2018.

HONEIN, M. A. et al. Birth Defects Among Fetuses and Infants of US Women With Evidence of Possible Zika Virus Infection During Pregnancy. **JAMA**, v. 317, n. 1, p. 59–68, 2017.

HORCHANI, Habib et al. Enzymatic activity of lecithin: retinol acyltransferase: a thermostable and highly active enzyme with a likely mode of interfacial activation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1844, n. 6, p. 1128-1136, 2014.

HURTADO-MELGOZA, M. L. et al. Differential humoral and cellular immunity induced by vaccination using plasmid DNA and protein recombinant expressing the NS3 protein of dengue virus type 3. **Journal of Biomedical Science**, v. 23, n. 1, p. 1–10, 2016.

IOOS, S. et al. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 44, n. 7, p. 302–307, 2014.

JAGGER, B. W. et al. Protective Efficacy of Nucleic Acid Vaccines Against

Transmission of Zika Virus During Pregnancy in Mice. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 220, n. 10, p. 1577–1588, 2019.

JIANG, Dawei et al. High level soluble expression and one-step purification of IBDV VP2 protein in Escherichia coli. **Biotechnology letters**, v. 38, n. 6, p. 901-908, 2016.

KATZELNICK, L. C. et al. Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. **Science**, v. 358, n. 6365, p. 929–932, 2017.

KAZMI, S. S. et al. A review on Zika virus outbreak, epidemiology, transmission and infection dynamics. **Journal of Biological Research (Greece)**, v.27, n.1, p.1-11, 2020.

KENNEDY, Richard B. et al. Zika Vaccines: Current State. In: **Vaccinations**. Elsevier, p. 75-88, 2019.

KIELKOPF, Clara L.; BAUER, William; URBATSCH, Ina L. Purification of polyhistidine-tagged proteins by immobilized metal affinity chromatography. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2020, n. 6, p. pdb. prot102194, 2020.

KIM, S. Y.; LI, B.; LINHARDT, R. J. Pathogenesis and Inhibition of Flaviviruses from a Carbohydrate Perspective. **Pharmaceuticals 2017, Vol. 10, Page 44**, v. 10, n. 2, p. 44, 2017.

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. e1002203, 2017.

KUMAR, A. et al. Zika virus inhibits type-I interferon production and downstream signaling. **EMBO reports**, v. 17, n. 12, p. 1766–1775, 2016.

KÜMMERER, Beate M.; RICE, Charles M. Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles. **Journal of virology**, v. 76, n. 10, p. 4773-4784, 2002.

KWONG, J. C.; DRUCE, J. D.; LEDER, K. Case Report: Zika Virus Infection Acquired During Brief Travel to Indonesia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 3, p. 516-517, 2013.

LEDERMANN, J. P. et al. Aedes hensilli as a Potential Vector of Chikungunya and Zika Viruses. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, p. e3188, 2014.

LESCAR, J. et al. Towards the design of antiviral inhibitors against flaviviruses: The case for the multifunctional NS3 protein from Dengue virus as a target. **Antiviral Research**, v. 80, n. 2, p. 94–101, 2008.

LIANG, Q. et al. Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Deregulate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy. **Cell Stem Cell**, v. 19, n. 5, p. 663–671, 2016.

LIM, M. Q. et al. Cross-reactivity and anti-viral function of dengue capsid and NS3-specific memory t cells toward Zika Virus. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. OCT, p. 2225, 2018.

LIU, S. et al. AXL-Mediated Productive Infection of Human Endothelial Cells by Zika Virus. **Circulation Research**, v. 119, n. 11, p. 1183–1189, 2016.

LIU, Z. Y.; SHI, W. F.; QIN, C. F. The evolution of Zika virus from Asia to the Americas. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 131-139, 2019.

LÓPEZ-CAMACHO, C. et al. Rational Zika vaccine design via the modulation of antigen membrane anchors in chimpanzee adenoviral vectors. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2018.

LUNARDELLI, V. A. S. et al. Zika virus—an update on the current efforts for vaccine development. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 17, n. 3, p. 904–908, 2021.

LUO, Dahai; LIM, Siew Pheng; LESCAR, Julien. The Flavivirus NS3 Protein: Structure and Functions. **Molecular Virology and Control of Flaviviruses**, v. 77, 2012.

MACNAMARA, F. N. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, n. 2, p. 139-145, 1954.

MAGNUS, M. M. et al. Risk of Zika virus transmission by blood donations in Brazil. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 40, n. 3, p. 250–254, 2018.

MARCHETTE, N. J.; GARCIA, R.; RUDNICK, A. Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 18, n. 3, 1969.

MEAD, P. S.; HILLS, S. L.; BROOKS, J. T. Zika virus as a sexually transmitted pathogen. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 31, n. 1, p. 39–44, 2018.

MEERTENS, L. et al. Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. **Cell Reports**, v. 18, n. 2, p. 324–333, 2017.

MERCER, Jason; SCHELHAAS, Mario; HELENIUS, Ari. Virus entry by endocytosis. **Annual review of biochemistry**, v. 79, n. 1, p. 803-833, 2010.

MEYER, A. G. et al. Time dependence of evolutionary metrics during the 2009 pandemic influenza virus outbreak. **Virus Evolution**, v. 1, n. 1, 2015.

MINER, J. J. et al. Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise. **Cell**, v. 165, n. 5, p. 1081–1091, 2016.

aude/pt-br/media/pdf/2020/outubro/23/boletim_epidemiologico_svs_41.pdf

MIORIN, L. et al. Antagonism of type I interferon by flaviviruses. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 492, n. 4, p. 587–596, 2017.

MLADINICH, K. M. et al. Dengue virus-specific CD4+ and CD8+ T lymphocytes target NS1, NS3 and NS5 in infected Indian rhesus macaques. **Immunogenetics**, v. 64, n. 2, p. 111–121, 2012.

MODJARRAD, K. et al. Preliminary aggregate safety and immunogenicity results from three trials of a purified inactivated Zika virus vaccine candidate: phase 1, randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trials. **The Lancet**, v. 391, n. 10120, p. 563–571, 2018.

MOORE, C. A. et al. Characterizing the Pattern of Anomalies in Congenital Zika Syndrome for Pediatric Clinicians. **JAMA Pediatrics**, v. 171, n. 3, p. 288–295, 2017.

MORABITO, K. M.; GRAHAM, B. S. Zika Virus Vaccine Development. **Journal of Infectious Diseases**, v. 216, p. S957–S963, 2017.

MOREIRA, J. et al. Sexually acquired Zika virus: a systematic review. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 23, n. 5, p. 296–305, 2017.

MOSADEGHI, Parvin et al. High-level soluble expression and one-step purification of HTLV-I P19 protein in Escherichia coli by Fusion Expression. **Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology**, p. 624-632, 2015.

MOUSAVI, S. A. et al. Clathrin-dependent endocytosis. **Biochemical Journal**, v. 377, n. Pt 1, p. 1, 2004.

MUÑOZ, L. S.; PARRA, B.; PARDO, C. A. Neurological Implications of Zika Virus Infection in Adults. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. suppl_10, p. 897–905, 2017.

MURTHY, H. M. K.; CLUM, S.; PADMANABHAN, R. Dengue Virus NS3 Serine Protease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 9, p. 5573–5580, 1999.

MUSSO, D. et al. Potential Sexual Transmission of Zika Virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 359-361, 2015.

MUSSO, D.; GUBLER, D. J. Zika virus. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n. 3, p. 487–524, 2016.

MUSSO, D.; KO, A. I.; BAUD, D. Zika Virus Infection — After the Pandemic. **New England Journal of Medicine**, v. 381, n. 15, p. 1444–1457, 2019.

MUSSO, D.; NILLES, E. J.; CAO-LORMEAU, V. M. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 10, p. 595–596, 2014.

NALLAMSETTY, Sreedevi et al. Gateway vectors for the production of combinatorially-tagged His6-MBP fusion proteins in the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli*. **Protein Science**, v. 14, n. 12, p. 2964-2971, 2005.

NIKOOKAR, S. H. et al. Zika; a continuous global threat to public health. **Environmental Research**, v. 188, p. 109868, 2020.

NOORBAKHS, F. et al. Zika virus infection, basic and clinical aspects: A review article. **Iranian journal of public health**, v. 48, n. 1, p. 20-31, 2019.

NOWAKOWSKI, T. J. et al. Expression Analysis Highlights AXL as a Candidate Zika Virus Entry Receptor in Neural Stem Cells. **Cell Stem Cell**, v. 18, n. 5, p. 591–596, 2016.

OEHLER, E. et al. Zika virus infection complicated by guillain-barré syndrome - case report, French Polynesia, December 2013. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 9, p. 20720, 2014.

OLSONI, J. G.; KSIAZEK, T. G.; TRIWIBOWO, A. 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.

OSA-TORO, M. et al. Role of RNA-binding proteins during the late stages of Flavivirus replication cycle. **Virology Journal**, v. 17, n. 1, 2020.

PARDI, N. et al. Zika virus protection by a single low-dose nucleoside-modified mRNA vaccination. **Nature**, v. 543, n. 7644, p. 248–251, 2017.

PATKAR, C. G.; KUHN, R. J. Yellow Fever Virus NS3 Plays an Essential Role in Virus Assembly Independent of Its Known Enzymatic Functions. **Journal of Virology**, v. 82, n. 7, p. 3342–3352, 2008.

PLEVKA, P. et al. Maturation of flaviviruses starts from one or more icosahedrally independent nucleation centres. **EMBO reports**, v. 12, n. 6, p. 602–606, 2011.

QI, R. F.; ZHANG, L.; CHI, C. W. Biological characteristics of dengue virus and potential targets for drug design. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 40, n. 2, p. 91–101, 2008.

RAMÍREZ, R. et al. Recombinant dengue 2 virus NS3 protein conserves structural antigenic and immunological properties relevant for dengue vaccine design. **Virus Genes**, v. 49, n. 2, p. 185–195, 2014.

RARAN-KURUSSI, Sreejith; WAUGH, David S. The ability to enhance the solubility of its fusion partners is an intrinsic property of maltose-binding protein but their folding is either spontaneous or chaperone-mediated. **PloS one**, v. 7, n. 11, p. e49589, 2012.

RARAN-KURUSSI, Sreejith; WAUGH, David S. Unrelated solubility-enhancing fusion partners MBP and NusA utilize a similar mode of action. **Biotechnology and**

bioengineering, v. 111, n. 12, p. 2407-2411, 2014.

RATHORE, A. P. S. et al. Maternal immunity and antibodies to dengue virus promote infection and Zika virus-induced microcephaly in fetuses. **Science Advances**, v. 5, n. 2, 2020.

REGLA-NAVA, J. A. et al. Cross-reactive Dengue virus-specific CD8⁺ T cells protect against Zika virus during pregnancy. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2018.

REY, F. A.; STIASNY, K.; HEINZ, F. X. Flavivirus structural heterogeneity: implications for cell entry. **Current Opinion in Virology**, v. 24, p. 132–139, 2017.

ROSANO, Germán L.; CECCARELLI, Eduardo A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 172, 2014.

ROSANO, Germán L.; MORALES, Enrique S.; CECCARELLI, Eduardo A. New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. **Protein science**, v. 28, n. 8, p. 1412-1422, 2019.

ROUTZAHN, Karen M.; WAUGH, David S. Differential effects of supplementary affinity tags on the solubility of MBP fusion proteins. **Journal of structural and functional genomics**, v. 2, n. 2, p. 83-92, 2002.

SAKKAS, H. et al. An update on sexual transmission of Zika virus. **Pathogens**, v. 7, n.3, p. 66-80, 2018.

SALJE, H. et al. Reconstruction of antibody dynamics and infection histories to evaluate dengue risk. **Nature**, v. 557, n. 7707, p. 719–723, 23 maio 2018.

SAMPATH, A. et al. Structure-Based Mutational Analysis of the NS3 Helicase from Dengue Virus. **Journal of Virology**, v. 80, n. 13, p. 6686–6690, 2006.

SCATURRO, P. et al. Dengue Virus Non-structural Protein 1 Modulates Infectious Particle Production via Interaction with the Structural Proteins. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 11, p. e1005277, 2015.

SCHULER-FACCINI, L. et al. Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly — Brazil, 2015. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.65, n.3, p. 59-62, 2016.

SHAPIRO-MENDOZA, C. K. et al. Pregnancy Outcomes After Maternal Zika Virus Infection During Pregnancy — U.S. Territories, January 1, 2016–April 25, 2017. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 66, n. 23, p. 615, 2017.

SHARMA, V. et al. **Zika virus: An emerging challenge to public health worldwide.** **Canadian Journal of Microbiology** Canadian Science Publishing, , 2020.

SIMMONS, M.; SUN, P.; PUTNAK, R. Recombinant Dengue 2 Virus NS3 Helicase Protein Enhances Antibody and T-Cell Response of Purified Inactivated Vaccine. **PLOS ONE**, v. 11, n. 4, p. e0152811, 2016.

SIMONI, M. K. et al. Zika virus infection of Hofbauer cells. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 77, n. 2, p. e12613, 2017.

SIMPSON, D. I. H. Zika virus infection in man. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 4, p. 335–338, 1964.

SIROHI, D.; KUHN, R. J. Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. suppl_10, p. S935–S944, 2017.

SMARTT, C. T. et al. Evidence of Zika Virus RNA Fragments in Aedes albopictus (Diptera: Culicidae) Field-Collected Eggs From Camaçari, Bahia, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 54, n. 4, p. 1085–1087, 2017.

SMIT, J. M. et al. Flavivirus Cell Entry and Membrane Fusion. **Viruses 2011, Vol. 3, Pages 160-171**, v. 3, n. 2, p. 160–171, 2011.

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

SPRIESTERSBACH, Anne et al. Purification of His-tagged proteins. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, p. 1-15, 2015.

SRIDHAR, S. et al. Effect of Dengue Serostatus on Dengue Vaccine Safety and Efficacy. **New England Journal of Medicine**, v. 379, n. 4, p. 327-340, 2018.

STEPHENSON, K. E. et al. Safety and immunogenicity of a Zika purified inactivated virus vaccine given via standard, accelerated, or shortened schedules: a single-centre, double-blind, sequential-group, randomised, placebo-controlled, phase 1 trial. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 20, n. 9, p. 1061–1070, 2020.

TEBAS, P. et al. Safety and Immunogenicity of an Anti-Zika Virus DNA Vaccine. **New England Journal of Medicine**, v. 385, n. 12, p. e35, 16 set. 2021.

TOGNARELLI, J. et al. A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. **Archives of Virology**, v. 161, n. 3, p. 665–668, 1 mar. 2016.

TURMEL, J. M. et al. Late sexual transmission of Zika virus related to persistence in the semen. **The Lancet**, v. 387, n. 10037, p. 2501, 2016.

VEGA-RÚA, A. et al. High Level of Vector Competence of Aedes aegypti and Aedes albopictus from Ten American Countries as a Crucial Factor in the Spread of Chikungunya Virus. **Journal of Virology**, v. 88, n. 11, p. 6294–6306, 2014.

VU, Thu Trang Thi et al. Soluble prokaryotic expression and purification of human interferon alpha-2b using a maltose-binding protein tag. **Microbial Physiology**, v. 26, n. 6, p. 359-368, 2016.

WANG, A. et al. Zika virus genome biology and molecular pathogenesis. **Emerging Microbes and Infections**, v. 6, n. 1, p. 1-6, 2017.

WEISKOPF, D. et al. Comprehensive analysis of dengue virus-specific responses supports an HLA-linked protective role for CD8+ T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 22, p. E2046–E2053, 2013.

WEN, J. et al. Identification of Zika virus epitopes reveals immunodominant and protective roles for dengue virus cross-reactive CD8+ T cells. **Nature Microbiology**, v. 2, n. 6, p. 1–11, 2017.

WEN, Jinsheng et al. Dengue virus-reactive CD8+ T cells mediate cross-protection against subsequent Zika virus challenge. **Nature communications**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2017.

WHO. 2018. Zika virus infection: India, 2 November 2018. Available at: <https://www.who.int/emergencies/diseases/zika/india-november-2018/en/>.

XIE, X. et al. Understanding zika virus stability and developing a chimeric vaccine through functional analysis. **mBio**, v. 8, n. 1, 2017.

XU, T. et al. Structure of the Dengue Virus Helicase/Nucleoside Triphosphatase Catalytic Domain at a Resolution of 2.4 Å. **Journal of Virology**, v. 79, n. 16, p. 10278–10288, 2005.

YEE, D. A. et al. Assessing natural infection with Zika virus in the southern house mosquito, *Culex quinquefasciatus*, during 2016 in Puerto Rico. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 32, n. 2, p. 255–258, 2018.

YOON, K. J. et al. Zika-Virus-Encoded NS2A Disrupts Mammalian Cortical Neurogenesis by Degrading Adherens Junction Proteins. **Cell Stem Cell**, v. 21, n. 3, p. 349- 358.e6, 2017.

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

YU, I.-M. et al. Association of the pr Peptides with Dengue Virus at Acidic pH Blocks Membrane Fusion. **Journal of Virology**, v. 83, n. 23, p. 12101–12107, 2009.

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

ZHANG, Y. et al. Structure of Immature West Nile Virus. **Journal of Virology**, v. 81, n. 11, p. 6141–6145, 2007.

ZMURKO, J.; NEYTS, J.; DALLMEIER, K. Flaviviral NS4b, chameleon and jack-in-the-box roles in viral replication and pathogenesis, and a molecular target for antiviral intervention. **Reviews in Medical Virology**, v. 25, n. 4, p. 205–223, 2015.