

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

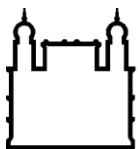
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

ÁGATHA REZENDE PACHECO

Respostas imunes induzidas por vacinas de DNA contra Zika e neuroadaptação de um isolado viral em camundongos para futuros testes de vacinas

RIO DE JANEIRO

2021



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

ÁGATHA REZENDE PACHECO

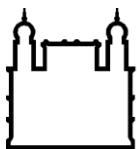
Respostas imunes induzidas por vacinas de DNA contra Zika e neuroadaptação de um isolado viral em camundongos para futuros testes de vacinas

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof. Dra. Ada Maria de Barcelos Alves

RIO DE JANEIRO

2021



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTORA: ÁGATHA REZENDE PACHECO

**RESPOSTAS IMUNES INDUZIDAS POR VACINAS DE DNA CONTRA ZIKA E
NEUROADAPTAÇÃO DE UM ISOLADO VIRAL EM CAMUNDONGOS PARA
FUTUROS TESTES DE VACINAS**

ORIENTADORA: Prof. Dra. Ada Maria de Barcelos Alves

Aprovada em: 07/10/2021

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Patricia Carvalho de Sequeira (Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/RJ)

Profa. Dra. Silvia Maria Baeta Cavalcanti (Instituto Biomédico – UFF/RJ)

Prof. Dra. Adriana Ribeiro Silva (Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/RJ)

Profa. Dr. Zilton Vasconcelos (Instituto Fernandes Figueira – FIOCRUZ/RJ)

Prof. Dr. Cassiano Felipe Gonçalves de Albuquerque (UNIRIO/RJ)

Rio de Janeiro, 07 de outubro de 2021.

PACHECO, ÁGATHA REZENDE.

Respostas imunes induzidas por vacinas de DNA contra Zika e neuroadaptação de um isolado viral em camundongos para futuros testes de vacinas / ÁGATHA REZENDE PACHECO. - Rio de Janeiro, 2021.

xviii, 99 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2021.

Orientadora: Ada Maria de Barcelos Alves.

Bibliografia: f. 82-99

1. Zika. 2. Vacina de DNA. 3. Envelope. 4. NS1. 5. Resposta Imune. I. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/Icict/Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Igor Falce Dias de Lima - CRB-7/6930.

Dedico este trabalho à minha família, especialmente ao meu sobrinho, João Pedro, e a todos que contribuíram com a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, com toda certeza se não fosse Ele eu não teria chegado até aqui.

Agradeço aos meus pais, Andrea e Alexandre, por todo apoio que me deram durante toda a minha vida. Obrigada por sempre acreditarem em mim e me incentivarem. Agradeço aos meus irmãos, Filipe e Isabel, que sempre me acompanharam e incentivaram. Agradeço à toda minha família e amigos por sempre me apoiarem e torcerem por mim.

Agradeço às minhas orientadoras Ada e Simone, por todo conhecimento que me passaram, por toda orientação e paciência ao longo de todos esses anos. Vocês foram fundamentais no meu crescimento e desenvolvimento desde que cheguei ao laboratório.

Agradeço aos demais integrantes do laboratório de Biotecnologia e Fisiologia de Infecções Virais: Dra Cristina, Paolla Beatriz, Maysa, Beatriz, Thiago e Larissa. Vocês foram essenciais na realização deste trabalho, muito obrigada!

Agradeço aos colaboradores do grupo. À Dra. Ana Bispo por ceder a amostra de ZIKV isolado no Brasil. Ao Dr. Luís Carlos Ferreira por ceder as proteínas recombinantes. Ao Dr. Helton da Costa Santiago por ceder as bibliotecas de peptídeos das proteínas E e NS1. À Dra. Isabele Barbieri dos Santos por todo apoio nos experimentos com animais. Agradeço à todos pela colaboração!

Agradeço ao Biotério de Experimentação do Pavilhão Leônidas Deane e toda a sua equipe pelo auxílio e apoio.

Agradeço às plataformas de ELISPOT e Sequenciamento de DNA por todo suporte oferecido.

Agradeço à Dra. Adriana Ribeiro pela colaboração durante a revisão desta dissertação.

Agradeço a coordenação Pós-graduação Stricto sensu de Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz (PGBCM/Fiocruz) pela excelência do programa e por todo auxílio fornecido.

Por último agradeço a todos que tornaram possível a realização do presente trabalho, muito obrigada!

“Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre.”

Paulo Freire

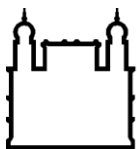
ABREVIATURAS E SIGLAS

AcN	Anticorpos neutralizantes
ADE	Aumento da replicação viral dependente de anticorpos (do inglês: <i>antibody-dependent enhancement</i>)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASC	do inglês “ <i>apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i> ”
BGH	Hormônio de crescimento bovino (do inglês “ <i>bovine growth hormone</i> ”)
CFP	Células formadoras de pontos
cGAS	do inglês “ <i>Cyclic GMP-AMP synthase</i> ”
CHIKV	Vírus da febre Chikungunya
DCs	Células dendríticas (do inglês “ <i>dendritic cells</i> ”)
DC-Sign	Molécula intracelular 3 de adesão específica de células dendríticas (do inglês “ <i>dendritic cell specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbin nonintegrin</i> ”)
DENV	Vírus da dengue
DI	Domínio I da proteína do envelope de ZIKV
DII	Domínio II da proteína do envelope de ZIKV
DIII	Domínio III da proteína do envelope de ZIKV
DMEM	Meio mínimo essencial de Eagle, modificado por Dubelcods
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês “ <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> ”)
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês “ <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> ”)
ELISPOT	Ensaio de imunoabsorção enzimática de pontos (do inglês “ <i>enzyme-linked immunosorbent spot assay</i> ”)
FcγR	Receptor de membrana da porção Fc de imonoglobulina G
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
IFN	Interferon
IFN-α	Interferon-alfa

e IFN- β	Interferon-beta
IFN- γ	Interferon-gamma
IFNAR	Receptor de IFN- α e β (do inglês “ <i>interferon-α/β receptor</i> ”)
IRF3	Fator regulador de interferon 3 (do inglês “ <i>interferon regulatory factor 3</i> ”)
ISGs	Genes estimulados por interferon (do inglês “ <i>interferon stimulated genes</i> ”)
JEV	Vírus da encefalite japonesa (do inglês “ <i>Japanese encephalitis virus</i> ”)
LB	Meio de cultura <i>Luria-Bertani</i>
mAbs	Anticorpos monoclonais (do inglês “ <i>monoclonal antibody</i> ”)
MAVS	Proteína adaptadora antiviral mitocondrial (do inglês “ <i>mitochondrial antiviral-signaling</i> ”)
MDA5	(do inglês, “ <i>melanoma differentiation-associated gene 5</i> ”)
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
mtDNA	DNA mitocondrial
NGC	Cepa de vírus da dengue Nova Guiné C
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NS1	Proteína não estrutural 1
NS2A	Proteína não estrutural 2A
NS2B	Proteína não estrutural 2B
NS3	Proteína não estrutural 3
NS4A	Proteína não estrutural 4A
NS4B	Proteína não estrutural 4B
NS5	Proteína não estrutural 5
NTPase	Nucleosídeo trifostase
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	Fase de leitura aberta (do inglês “ <i>open reading frame</i> ”)
PAMPs	Padrões moleculares associados ao patógeno (do inglês “ <i>pathogen-associated molecular</i> ”)

PBS	Tampão fosfato-salino
pcTPA	Plasmídeo baseado no vetor comercial pcDNA3 que contém a sequência que codifica o peptídeo sinal do ativador de plasminogênio de tecido humano
pcTPANS1	Plasmídeo recombinante que contém a sequência que codifica a proteína NS1 de DENV2.
pE1D2	Plasmídeo que contém a sequência que codifica o ectodomínio da proteína E (domínio I, II e III) de DENV2
poli-A	Sequência de poliadenilação
prM	Precursor da proteína de membrana
proteína C	Proteína do capsídeo
proteína E	Proteína do envelope
proteína M	Proteína de membrana
proteína NS	Proteína não estrutural 1
pZKEctoE	Plasmídeo que contém a sequência que codifica o ectodomínio da proteína E (domínio I, II e III) de ZIKV
pZKNS1	Plasmídeo que contém a sequência que codifica a proteína NS1 de ZIKV
RE	Retículo endoplasmático
RIG-I	Receptores semelhantes ao gene I indutível por ácido retinóico
RPMI	Meio de cultura <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RTPase	RNA trifosfatase
SFB	Soro fetal bovino
STAT	Transdutor de sinal e ativador da transcrição (do inglês “ <i>signal transducer and activator of transcription</i> ”)
TAE	Tampão Tris-acetato-EDTA
TB	Meio de cultura <i>Terrific Broth</i>
TBK1	do inglês <i>TANK binding kinase 1</i>
t-PA	Sequência que codifica o peptídeo sinal do ativador de plasminogênio de tecido

USP8	do inglês “ <i>Ubiquitin Specific Peptidase 8</i> ”
UTR	Região não traduzida
UV	Luz ultravioleta
WNV	Vírus da febre do Oeste do Nilo (do inglês “West Nile virus”)
YF17D	Vírus vacinal da febre amarela
YFV	Vírus da febre amarela (do inglês <i>yellow fever virus</i>)
ZIKV	Vírus Zika



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

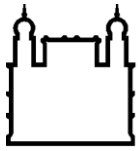
RESPOSTAS IMUNES INDUZIDAS POR VACINAS DE DNA CONTRA ZIKA E NEUROADAPTAÇÃO DE UM ISOLADO VIRAL EM CAMUNDONGOS PARA FUTUROS TESTES DE VACINAS

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Ágatha Rezende Pacheco

Em geral, a doença causada pelo vírus Zika (ZIKV) é clinicamente semelhante às de outros arbovírus. No entanto, ocasionalmente ela é associada a síndromes neurológicas como a síndrome de Guillain-Barré. Além disso, durante a gravidez a infecção pode causar a síndrome congênita do zika, com danos cerebrais e sistêmicos no feto e/ou bebês, incluindo microcefalia. O genoma do ZIKV codifica três proteínas estruturais, capsídeo, pré-membrana/membrana e envelope (E), e sete proteínas não estruturais (NS1-5). As proteínas E e NS1 são indicadas como antígenos promissores, sendo consideradas alvos importantes no desenho de vacinas contra diversos flavivírus. Nosso grupo construiu dois plasmídeos recombinantes que codificam o ectodomínio da proteína E (pZKectoE) e a proteína NS1 (pZKNS1) do ZIKV. O objetivo deste trabalho foi investigar a capacidade desses plasmídeos de mediar a expressão de proteínas recombinantes e induzir respostas imunes. Células BHK-21 foram transfectadas com estes plasmídeos e a expressão das proteínas recombinantes foi avaliada. Como esperado, o pZKectoE e o pZKNS1 mediarão a expressão das proteínas recombinantes E e NS1, respectivamente. A ativação das respostas imunes humoral e celular em camundongos foi avaliada por ELISA e por ELISPOT. Ambos os plasmídeos induziram títulos de anticorpos específicos significativamente mais elevados do que o plasmídeo controle (pcTPA). Além disso, induziram respostas de células T com produção de IFN- γ após estimulação com duas bibliotecas de peptídeos derivadas de E e NS1. O mapeamento de peptídeos imunogênicos através de ensaios de ELISPOT identificou cinco epítomos imunodominantes na proteína E e três na proteína NS1. A maioria dos modelos murinos para estudos de ZIKV usa animais imunocomprometidos, que fornecem infecções robustas e letais, mas talvez não sejam ideais para testes de vacinas. Portanto, a fim de estabelecer um modelo murino imunocompetente suscetível à infecção pelo ZIKV, iniciamos experimentos de neuroadaptação de um vírus isolado de um paciente no Brasil, por sucessivas passagens no cérebro de camundongos recém-nascidos. Grupos de camundongos Swiss, com idades entre três e nove dias, foram infectados pela via intracerebral com ZIKV. No sétimo dia após a infecção, os animais foram eutanasiados e os cérebros foram coletados. As amostras foram tituladas por ensaio de plaques em células Vero. Em cada passagem, a amostra com o título viral mais alto foi usada para inoculação subsequente no cérebro de outros camundongos recém-nascidos. Nossos resultados mostraram uma alteração na morfologia do plaque produzido pela infecção com o vírus em comparação àquelas observadas com a amostra inicial de ZIKV. Em relação à carga viral, houve um aumento de 4 log durante as primeiras quatro passagens, seguido por uma ligeira redução e o sequenciamento do genoma viral revelou algumas mutações pontuais. De modo geral, as vacinas pZKectoE e pZKNS1 foram capazes de mediar a expressão das proteínas recombinantes E ou NS1 com ativação das respostas imunes humoral e celular. Até o momento, não foi possível o estabelecimento de um modelo murino imunocompetente. Para obtenção do vírus neuroadaptado, com capacidade de causar sinais clínicos da infecção em animais adultos, deverão ser realizadas mais passagens em cérebros de camundongos Swiss.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

DNA VACCINES-INDUCED IMMUNE RESPONSES AGAINST ZIKA AND NEUROADAPTATION OF A VIRAL ISOLATE IN MICE FOR FUTURE VACCINES TESTS

ABSTRACT

MASTERS DISSERTATION

Ágatha Rezende Pacheco

In general, the disease caused by Zika virus (ZIKV) is clinically similar to those of other arboviruses. However, occasionally it has been associated with neurological syndromes such as Guillain-Barré syndrome. Yet, ZIKV infections during pregnancy may cause the Congenital Zika Syndrome, with brain and systemic damages in the fetus and/or infants, including microcephaly. The genome of ZIKV encodes three structural proteins, capsid, pre-membrane/membrane and envelope (E), and seven non-structural proteins (NS1-5). The E and NS1 proteins are indicated as promising antigens, and are considered important targets in vaccine design against several flaviviruses. Our group constructed two recombinant plasmids encoding the E protein ectodomain (pZKEctoE) and the NS1 protein (pZKNS1) from ZIKV. The aim of this work was to investigate the ability of these plasmids to mediate the expression of recombinant proteins and to induce immune responses. BHK-21 cells were transfected with each plasmid and the expression of recombinant proteins was evaluated. As expected, the pZKEctoE and pZKNS1 mediated expression of E and NS1 recombinant proteins, respectively. Activation of humoral and cellular immune responses in mice was evaluated by ELISA and by ELISPOT. The pZKEctoE and pZKNS1 induced significant higher E- and NS1-specific antibody titers, respectively, than the control plasmid (pcTPA). Both plasmids were able to elicit T-cell responses with IFN- γ production upon stimulation with two libraries of E- and NS1-derived peptides. Mapping the immunogenic peptides through ELISPOT assays identified five immunodominant epitopes in E, and three in the NS1 protein. Most murine models for ZIKV studies use immunocompromised animals, which provides robust and lethal infections, but maybe they are not the ideal for vaccine tests. Therefore, in order to establish an immunocompetent murine model susceptible to ZIKV infection, we initiated experiments for neuroadaptation of a virus isolated from a patient in Brazil, by successive passages in the brain of newborn mice. Groups of newborn Swiss mice, ranging from three to nine days old, were infected by the intracerebral route with ZIKV. On the seventh day following infection, animals were euthanized and brains were collected. Samples were titrated by plaque assay in Vero cell cultures. At each passage, the sample with the highest viral titer was used for subsequent inoculation in the brain of other newborn mice. Our results showed an alteration in the plaque morphology produced by infection with virus isolated after the mouse passage comparing to those observed with the initial sample. Regarding viral load, there was a 4-log increase during the first four passages followed by a slight reduction. Sequencing of the virus genome revealed some point mutations and experiments will be continued by virus passages in older mice. Overall, the pZKEctoE and pZKNS1 vaccines were able to mediate expression of E or NS1 recombinant proteins with activation of humoral and cellular immune responses. So far, the establishment of an immunocompetent murine model has not been possible. To obtain neuroadapted virus capable of causing clinical signs of infection in adult animals, further passages in Swiss mouse brains should be performed.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Representação esquemática do vírus Zika	06
Figura 1.2	Esquemas da organização do genoma infeccioso do ZIKV e da poliproteína precursora das proteínas virais	07
Figura 1.3	Esquema representativo do ciclo de replicação do vírus Zika	08
Figura 1.4	Estrutura da glicoproteína do Envelope	10
Figura 1.5	Estrutura da proteína NS1	13
Figura 3.1	Esquema representativo dos plasmídeos utilizados no trabalho	34
Figura 4.1	Eletroforese em gel de agarose da digestão dos plasmídeos pZKEctoE e pZKNS1 com as enzimas de restrição <i>EcoR V</i> e <i>Xho I</i>	45
Figura 4.2	Células BHK-21 transfectadas com o plasmídeo pZKEctoE	46
Figura 4.3	Células BHK-21 transfectadas com o plasmídeo pZKNS1	47
Figura 4.4	Células BHK-21 transfectadas com o plasmídeo pcTPA	48
Figura 4.5	Título dos anticorpos IgG anti-domínio III da proteína E de ZIKV presentes no soro dos camundongos infectados com ZIKV (49 dpi)	49
Figura 4.6	Título dos anticorpos IgG anti-domínio III da proteína E de ZIKV presentes no soro dos camundongos inoculados com o plasmídeo pZKEctoE.	50
Figura 4.7	Título dos anticorpos IgG anti-proteína NS1 de ZIKV presentes no soro dos camundongos infectados com ZIKV (49 dpi)	50
Figura 4.8	Título dos anticorpos IgG anti-NS1 de ZIKV presentes no soro dos camundongos inoculados com o plasmídeo pZKNS1	51
Figura 4.9	Seleção de pools de peptídeos imunogênicos contidos na proteína E, reconhecidos por esplenócitos coletados após imunização com a vacina de DNA pZKEctoE	52
Figura 4.10	Identificação dos peptídeos imunogênicos contidos na proteína E, testados individualmente (pools 1, 2 e 5)	53

Figura 4.11	Identificação dos peptídeos imunogênicos contidos na proteína E testados individualmente (pools 7 e 8)	53
Figura 4.12	Confirmação dos peptídeos imunogênicos contidos na proteína E	54
Figura 4.13	Localização dos peptídeos 70, 76, 77, 99 e 129 na estrutura dimérica do ectodomínio da proteína E	55
Figura 4.14	Seleção de pools de peptídeos imunogênicos contidos na proteína NS1 reconhecidos por esplenócitos coletados após imunização com a vacina de DNA pZKNS1	56
Figura 4.15	Identificação dos peptídeos imunogênicos contidos na proteína NS1, testados individualmente (pools 2, 3 e 4)	57
Figura 4.16	Identificação dos peptídeos imunogênicos contidos na proteína NS1 testados individualmente (pools 5, 6 e 7)	57
Figura 4.17	Confirmação dos peptídeos imunogênicos contidos na proteína NS1	58
Figura 4.18	Localização dos peptídeos 181, 211 e 224 na estrutura dimérica da proteína NS1	59
Figura 4.19	Titulação de ZIKV em cérebros de camundongos Swiss.	60
Figura 4.20	Morfologia dos plaques	60
Figura 4.21	Titulação de ZIKV após passagens em cérebros de camundongos Swiss	61
Figura 4.22	Gráfico de sobrevivência dos animais desafiados com o ZIKV	62

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1	Vacinas candidatas contra o ZIKV em fase clínica	24
Tabela 3.1	Neuroadaptação ZIKV: Idade dos camundongos e o volume inoculado em cada passagem	41
Tabela 4.1	Carga viral inoculada e recuperada	61
Tabela 4.2	Quadro clínico e mortalidade dos neonatos	62
Tabela 4.3	Análise da sequência de ZIKV após a 2ª passagem em cérebro de camundongos	63
Tabela 4.4	Análise da sequência de ZIKV após a 4ª passagem em cérebro de camundongos	63
Tabela 5.1	Compilado dos peptídeos da proteína E descritos na literatura que possuem semelhança com os peptídeos identificados em nosso trabalho	73
Tabela 5.2	Compilado dos peptídeos da proteína NS1 descritos na literatura que possuem semelhança com os peptídeos identificados em nosso trabalho	75

ÍNDICE

1. Introdução	01
1.1 A descoberta do vírus Zika e sua propagação ao redor do mundo	02
1.2 Vírus Zika no Brasil.....	03
1.3 Manifestação clínica decorrente da infecção pelo ZIKV.....	04
1.4 Estrutura viral	05
1.5 Ciclo Replicativo	07
1.6 Proteínas Virais.....	09
1.6.1 <i>Proteínas estruturais</i>	09
1.6.1.2 <i>Proteína do envelope</i>	09
1.6.2 <i>Proteínas não estruturais</i>	11
1.6.2.1 <i>Proteína não-estrutural 1</i>	12
1.7 Resposta imune contra a infecção pelo ZIKV	13
1.8 Vacinas contra ZIKV	19
1.9 Vacinas de ácido nucleico.....	25
1.9.1 <i>Vacina de DNA</i>	26
1.10 Modelos murino para estudo da infecção pelo vírus Zika.....	28
2. Objetivos	30
2.1 Objetivo geral	31
2.2 Objetivos específicos/metas.....	31
3. Metodologia	32
3.1 Vacinas de DNA	33
3.1.1 <i>Plasmídeos</i>	33
3.1.2 <i>Produção de pZKectoE, pZKNS1 e pcTPA</i>	34
3.1.3 <i>Transfecção de células de mamífero com os plasmídeos recombinantes</i>	35
3.1.4 <i>Imunização de camundongos BALB/c</i>	36
3.1.5 <i>Deteção de anticorpos por ELISA</i>	37
3.1.6 <i>Ensaio de ELISPOT</i>	38
3.1.7 <i>Análise computacional da localização dos peptídeos selecionados</i>	40
3.2 Neuroadaptação de um isolado de ZIKV	40
3.2.1 <i>Titulação viral</i>	42
3.2.2 <i>Sequenciamento de ZIKV</i>	42
4. Resultados	44
4.1 Avaliação das vacinas de DNA	45

4.1.1 Purificação dos plasmídeos e confirmação de sua integridade	45
4.1.2 Transfecção de células de mamífero com os plasmídeos recombinantes e detecção das proteínas recombinantes	46
4.1.3 Resposta imune humoral induzida com as vacinas de DNA.....	48
4.1.3.1 Vacina <u>pZKEctoE</u>	49
4.1.3.2 Vacina <u>pZKNSI</u>	50
4.1.4 Resposta imune celular induzida com as vacinas de DNA.....	51
4.1.4.1 Vacina <u>pZKEctoE</u>	51
4.1.4.2 Vacina <u>pZKNSI</u>	55
4.2 Neuroadaptação viral	59
4.2.1 Análise das sequências de ZIKV após diferentes passagens em cérebro de camundongos	63
4.2.2 Inoculação do vírus Zika em camundongos adultos por via intracerebral.....	63
4.2.1 Análise das sequências de ZIKV após diferentes passagens em cérebro de camundongos	
5. Discussão	65
6. Conclusões	78
6.1 Vacinas de DNA	79
6.2 Neuroadaptação	79
7. Perspectivas	80
8. Referências	82

1. Introdução

O vírus Zika (ZIKV) pertence ao gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae* (Lindenbach *et al.*, 2007). Atualmente, o gênero compreende mais de 50 espécies de vírus, transmitidos pela picada de mosquitos (27 espécies), carrapatos (12 espécies) ou nenhum vetor de artrópodes conhecido (14 espécies) (Simmonds *et al.*, 2011). O ZIKV é intimamente relacionado a outros flavivírus transmitidos por mosquito, como os vírus da dengue (DENV), encefalite japonesa (JEV), Nilo Ocidental (WNV) e da febre amarela (YFV) (Gubler *et al.*, 2007). A principal forma de transmissão do ZIKV é através da picada de mosquitos do gênero *Aedes* infectados, no entanto, outras formas de transmissões já foram identificadas, como materno-fetal (transmissão de mãe para filho durante a gravidez), por contato sexual, amamentação ou transfusão de sangue (Song *et al.*, 2017). Os vários modos de transmissão do ZIKV dificultam o desenvolvimento de estratégias de controle contra o patógeno.

Através da análise filogenética do vírus foram identificadas duas linhagens do ZIKV: africana e asiática. Cepas da linhagem africana evoluíram para linhagens asiáticas que são responsáveis pelas recentes epidemias, como as que ocorreram na Ilha Yap em 2007, na Polinésia Francesa e no Pacífico Sul em 2013 e nas Américas em 2015 e 2016 (Dick *et al.*, 1952a; Duffy *et al.*, 2009; Enfissi *et al.*, 2016; Fauci & Morens, 2016; Ios *et al.*, 2014; Plourde & Bloch, 2016).

1.1 A descoberta do vírus Zika e sua propagação ao redor do mundo

Durante um estudo de febre amarela na península de Entebbe, localizada em Uganda, região com uma incidência relativamente alta de imunidade à febre amarela entre os macacos, um vírus que se acreditava não ter sido registrado até aquele momento foi isolado em 1947, de um macaco *Rhesus*, na Floresta Zika. No ano seguinte, o vírus foi novamente isolado de mosquitos *Aedes africanus*. Devido à localidade onde foram feitos os isolamentos o vírus foi denominado vírus Zika (Dick *et al.*, 1952a).

Apesar da ampla distribuição geográfica de ZIKV na África e na Ásia (Haddow *et al.*, 1964; Hayes, 2009; Ios *et al.*, 2014; Marchette *et al.*, 1969; Olson *et al.*, 1981; Weinbren *et al.*, 1958), foram relatados apenas casos esporádicos de infecção humana até 2007. Evidências sorológicas indicam um surto de ZIKV na ilha de Yap (Micronésia) com cerca de 5.000 pessoas afetadas, em 2007. A partir de então, o vírus foi considerado uma ameaça à saúde pública (Duffy *et al.*, 2009; Grard *et al.*, 2014; Ios *et al.*, 2014).

Em 2013 ocorreu uma epidemia do vírus Zika na Polinésia Francesa com mais de 8.000 casos suspeitos, com confirmação de alguns destes. Nesta epidemia foram notificados

casos com sintomas neurológicos graves, incluindo a síndrome de Guillain-Barré. No entanto, a correlação dessas apresentações graves com o ZIKV ainda não era clara. Nos anos seguintes alguns casos foram relatados no Japão, na França, na Noruega, na Ilha de Páscoa e na Nova Caledônia, onde a circulação autóctone do vírus foi observada (Ioos *et al.*, 2014).

Em março de 2015, a Organização Mundial da Saúde (OMS) relatou a primeira transmissão local do vírus Zika na Região das Américas, com casos autóctones identificados no Brasil, sendo registrados mais de um milhão de casos suspeitos. Diversos outros países também relataram transmissão autóctone de ZIKV nas Américas e a infecção pelo vírus atingiu toda a América do Sul, América Central e Caribe ocasionando uma pandemia explosiva (Fauci & Morens, 2016; Plourde & Bloch, 2016; Zanoluca *et al.*, 2015).

1.2 Vírus Zika no Brasil

No início de 2015 ocorreram os primeiros relatos de surto de uma doença exantemática no Nordeste, com prontuários relatando uma "síndrome semelhante à dengue". Exames laboratoriais indicaram que infecção não era ocasionada pelos vírus DENV ou Chikungunya (CHIKV) (Zanoluca *et al.*, 2015).

Em março de 2015, pesquisadores da Fiocruz detectaram por RT-PCR o RNA do ZIKV em amostras de soro de pacientes da cidade de Natal com a "síndrome da dengue". Das 21 amostras testadas, 8 pacientes tiveram a doença confirmada pelo ZIKV (Zanoluca *et al.*, 2015). Simultaneamente, a Universidade Federal da Bahia testou amostras de soro de 24 pacientes, das quais 7 foram positivas por RT-PCR para ZIKV (Campos *et al.*, 2015). No final de 2015, a infecção pelo ZIKV se expandiu para diversos estados brasileiros (Lowe *et al.*, 2018).

Em paralelo, o Ministério da Saúde do Brasil relatou um aumento acentuado no número de bebês nascidos com microcefalia nas áreas afetadas pelo ZIKV em 2015. Além disso, a síndrome de Guillain-Barré também foi relatada em pacientes após suspeita de infecção pelo vírus Zika (Hennessey *et al.*, 2016; Plourde & Bloch, 2016).

Devido à possibilidade da infecção pelo ZIKV estar associada às anomalias congênitas graves durante a gravidez e complicações neurológicas como a síndrome de Guillain-Barré, em novembro de 2015 o Ministério da Saúde declarou uma emergência nacional de saúde pública (Ministério da Saúde, 2015). Três meses depois, em 01 de fevereiro de 2016, a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou que a infecção com ZIKV era uma emergência de saúde pública de interesse internacional, em novembro de 2016 foi declarado o fim dessa emergência (Organização Mundial de Saúde, 2015, 2016).

Diversas evidências indicavam a ligação entre a infecção pelo ZIKV durante a gravidez e as malformações congênitas do sistema nervoso central, inclusive a detecção do ZIKV no líquido amniótico de mulheres grávidas com fetos com microcefalia e no tecido cerebral fetal (Oliveira *et al.*, 2016a). Os estudos realizados no Brasil foram fundamentais para confirmar essa associação. Dentre eles, um estudo realizado com mulheres grávidas no Rio de Janeiro, com coortes ZIKV-positivo e ZIKV-negativo identificou que de 117 nascidos vivos na coorte positiva, 49 bebês (42%) apresentaram anormalidades no exame clínico e/ou de imagem. Em contraste, na coorte negativa de 57 bebês, apenas 3 (5%) apresentaram tais anormalidades (Brasil *et al.*, 2016). Outro estudo realizado com recém-nascidos de mulheres residentes em Pernambuco, também concluiu que a epidemia de microcefalia foi resultado da infecção congênita pelo vírus Zika. Dos 32 casos de microcefalia, 41% apresentaram evidências laboratoriais de infecção por ZIKV, enquanto que, dos 64 neonatos controle sem microcefalia, nenhum apresentou evidências laboratoriais de infecção por ZIKV (de Araújo *et al.*, 2016). O risco de transmissão vertical durante a gravidez existe tanto para mães sintomáticas como para assintomáticas (Lowe *et al.*, 2018).

No presente momento, o Brasil não vivencia uma epidemia de ZIKV. O número de casos de ZIKV notificados no Brasil diminuiu consideravelmente. Em 2016, foram notificados 205.578 casos; em 2020, foram registrados 7.387 casos prováveis e em 2021 (de 03/01/2021 a 10/07), foram notificados 3.458 casos prováveis (Ministério da Saúde, 2021a, 2021b). A redução expressiva dos casos de ZIKV notificados no Brasil se deve principalmente à imunidade da população. No entanto, provavelmente o ZIKV continuará a circular podendo ocasionar novas epidemias (Aliota *et al.*, 2017).

1.3 Manifestação clínica decorrente da infecção pelo ZIKV

Em humanos, após a inoculação do vírus pela picada do mosquito, o período de incubação é de aproximadamente 3-12 dias até o início dos sintomas. A infecção ocasionada pelo ZIKV é frequentemente assintomática, cerca de 80% dos casos, ou causa uma doença clínica leve. Os casos sintomáticos são clinicamente semelhantes aos de outras arboviroses (como chikungunya e dengue) e podem apresentar uma ampla gama de sintomas clínicos como artralgia, edema das extremidades, febre leve, dores de cabeça, dor retro-orbital e conjutivite, vertigem, mialgia e distúrbio digestivo. Os sintomas persistem por até duas semanas e relatos de persistência mais longa são raros. A semelhança clínica com as demais arboviroses pode dificultar o diagnóstico da infecção por ZIKV (Ioos *et al.*, 2014; Plourde & Bloch, 2016).

Durante a epidemia que ocorreu na Polinésia Francesa em 2013, alguns casos de apresentações graves com sintomas neurológicos incluindo a síndrome de Guillain-Barré foram notificados (Ioos *et al.*, 2014). No entanto, a correlação de complicações neurológicas com a infecção pelo ZIKV só foi confirmada após a epidemia que ocorreu no Brasil, em 2015. A infecção durante a gravidez pode levar a anomalias congênitas graves, denominadas atualmente de síndrome congênita do vírus Zika e incluem: microcefalia fetal; atrofia e assimetria do cérebro com estruturas cerebrais anormalmente formadas ou ausentes; hidrocefalia; distúrbios de migração neuronal; calcificações subcorticais; anomalias oculares; contraturas congênitas e hipertonia (Brasil *et al.*, 2016; de Araújo *et al.*, 2016; Lowe *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2016). Os achados neurológicos relatados incluem hiperreflexia, irritabilidade, tremores, convulsões, disfunção do tronco cerebral e disfagia. Quanto aos achados oculares, a maioria das anormalidades foram relatadas em bebês com microcefalia, no entanto, também foram observadas anormalidades em bebês sem microcefalia ou outros achados do sistema nervoso central. As anormalidades oculares estruturais mais comumente relatadas envolvem a mácula (manchas pigmentares focais e atrofia coriorretiniana) e o nervo óptico (hipoplasia ou atrofia do nervo óptico). Além disso, diversos outros achados oculares foram relatados como glaucoma congênito, colobomas de íris, microftalmia, cataratas, subluxação da lente, calcificação intraocular e outras lesões retinianas (hemorragia subretiniana, hipopigmentação, tortuosidade vascular, terminação anormal dos vasos, dilatação vascular focal) (Centro de Controle e Prevenção de Doenças, 2021).

1.4 Estrutura viral

O vírus Zika possui um genoma de RNA de fita simples com aproximadamente 10,8 Kb de polaridade positiva. A partícula viral madura possui aproximadamente 50 nm e é composta por um envelope viral, com bicamada lipídica derivada da célula infectada, onde se inserem as proteínas do envelope (E) e membrana (M). Abaixo do envelope viral há um nucleocapsídeo, com o capsídeo formado por múltiplas cópias da proteína do capsídeo (C) complexado à molécula de RNA (Figura 1.1) (Heinz & Stiasny, 2017; Kuno & Chang, 2007; Lindenbach & Rice, 2007).

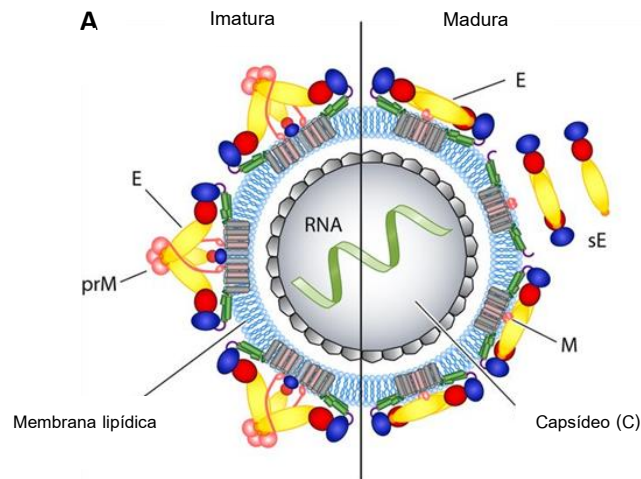


Figura 1.1.: Representação esquemática do vírus Zika. Representação esquemática de vírions imaturos (esquerda) e maduros (direita). C, proteína do capsídeo; prM, precursor da proteína de membrana (M); E, proteína do envelope (Modificado de Heinz e Stiasny, 2017).

O RNA viral compreende um único quadro de leitura aberto (ORF, do inglês *open reading frame*) que codifica uma poliproteína precursora das proteínas virais. Proteases celulares e viral clivam a poliproteína, gerando três proteínas estruturais: capsídeo, pré-membrana/membrana (prM/M) e envelope, e sete proteínas não estruturais NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 (Figura 1.2). As proteínas estruturais são incorporadas nas partículas virais durante a sua maturação. Já as proteínas não estruturais são responsáveis pela replicação e/ou montagem do vírion. O RNA genômico do ZIKV é flanqueado por regiões não traduzidas (UTRs) 5' e 3' com aproximadamente 107 e 428 nucleotídeos respectivamente. A extremidade 5' é modificada pela adição de uma estrutura *cap 5'* metilada, enquanto a região 3' carece de uma cauda poli-A, mas é finalizada por uma estrutura *stem-loop*. Ambas as extremidades são essenciais para a replicação e tradução eficiente do RNA (Göertz *et al.*, 2018; Kuno & Chang, 2007; Lindenbach & Rice, 2007).

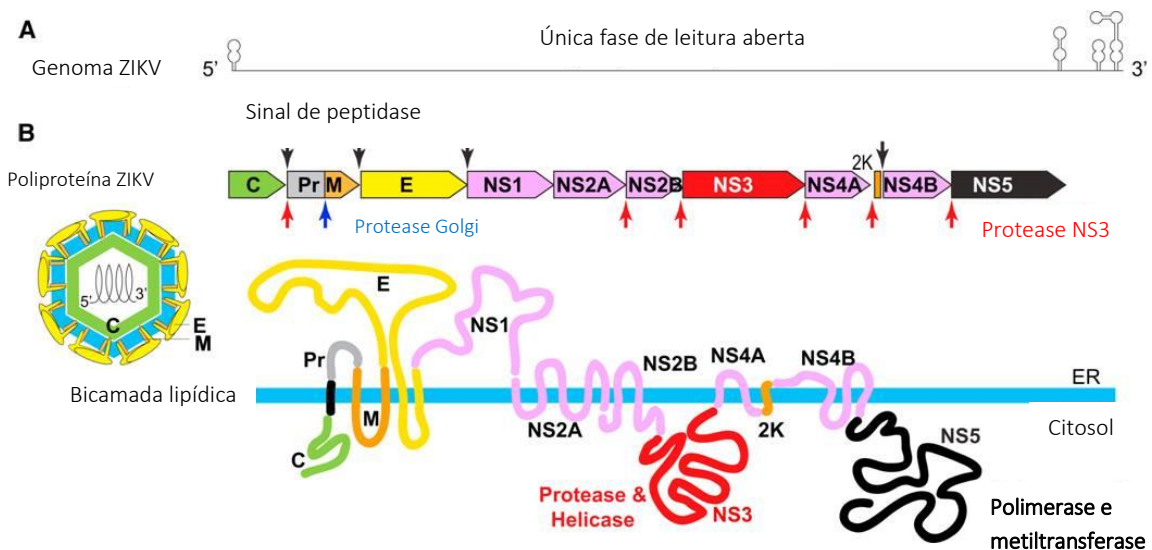


Figura 1.2: Esquemas da organização do genoma infeccioso do ZIKV e da poliproteína precursora das proteínas virais. (A) O genoma é constituído por uma fita simples de RNA com aproximadamente 11 kb de comprimento e codifica uma única ORF. Ambas as extremidades 5' e 3' do genoma contêm sequências de RNA estruturadas não traduzidas que são importantes para a replicação. (B) Estratégia de processamento e produtos proteicos. Ao longo da sequência da poliproteína existem sítios de clivagens onde proteases do hospedeiro (setas azuis e pretas) e viral (setas vermelhas) atuam gerando três proteínas estruturais (C, prM/M e E) e 7 proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Modificado de Ming *et al.*, 2016).

1.5 Ciclo Replicativo

Após a inoculação do vírus na epiderme e derme pela picada do mosquito, a internalização da partícula viral ocorre através da interação da proteína E com receptores presentes na superfície da célula-alvo, ativando um processo endocítico dependente de clatrina. Já foram descritos alguns receptores como participantes desse processo, como os receptores DC-Sign (do inglês *dedritic cell specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbin nonintegrin*) presentes nas células dendríticas e alguns membros da família de receptores de fosfatidilserina, incluindo AXL, Tyro3 e TIM1 (Hackett & Cherry, 2018; Hamel *et al.*, 2015; Heinz & Stiasny, 2017; Lindenbach & Rice, 2007; Nowakowski *et al.*, 2016). O ZIKV pode infectar diferentes células-alvo incluindo fibroblastos dérmicos, queratinócitos epidérmicos e células dendríticas imaturas (Hamel *et al.*, 2015; Lindenbach & Rice, 2007).

As partículas virais internalizadas se localizam em endossomos, onde ocorre alteração de pH. A acidificação da vesícula endocítica promove uma mudança conformacional na glicoproteína E, que passa a se organizar na forma de trímeros e expõe o peptídeo de fusão, permitindo que o envelope viral se funda à membrana endocítica, ocasionando a liberação do genoma viral no citoplasma da célula (Heinz & Stiasny, 2017; Lindenbach & Rice, 2007).

O RNA genômico do vírus funciona como RNA mensageiro. A replicação inicia-se com a tradução da fita de RNA em uma poliproteína que é clivada por proteases celulares e pela

protease viral NS3 associada à NS2B, gerando as proteínas estruturais e não estruturais. Em seguida, as proteínas não estruturais atuam em conjunto para promover a transcrição de fitas de RNA de polaridade negativa, a partir do RNA viral, que são utilizadas como moldes para a replicação do RNA viral genômico (Heinz & Stiasny, 2017; Lindenbach & Rice, 2007; Offerdahl *et al.*, 2017).

As proteínas do capsídeo interagem com o RNA viral formando o nucleocapsídeo. Concomitantemente, as proteínas prM e E formam o complexo prM-E que se insere na membrana do Retículo Endoplasmático (RE). Os nucleocapsídeos ancoram na membrana do RE e as partículas adquirem o envelope viral através do brotamento para o lúmen do RE (Heinz & Stiasny, 2017; Offerdahl *et al.*, 2017; Rossignol *et al.*, 2017; Sirohi & Kuhn, 2017). As partículas virais imaturas são então transportadas pela via exocítica da célula até a rede *trans*-Golgi. O pH levemente ácido desencadeia mudanças conformacionais que permitem a clivagem da proteína prM em proteína M, por meio da atividade da protease furina. Em consequência dessa clivagem ocorre uma reorganização da proteína E em dímeros, tornando a partícula madura e infecciosa. As partículas são carregadas por vesículas secretórias para a superfície celular e finalmente são liberadas por exocitose (Figura 1.3) (Heinz & Stiasny, 2017; Offerdahl *et al.*, 2017; Rossignol *et al.*, 2017; Sirohi & Kuhn, 2017).

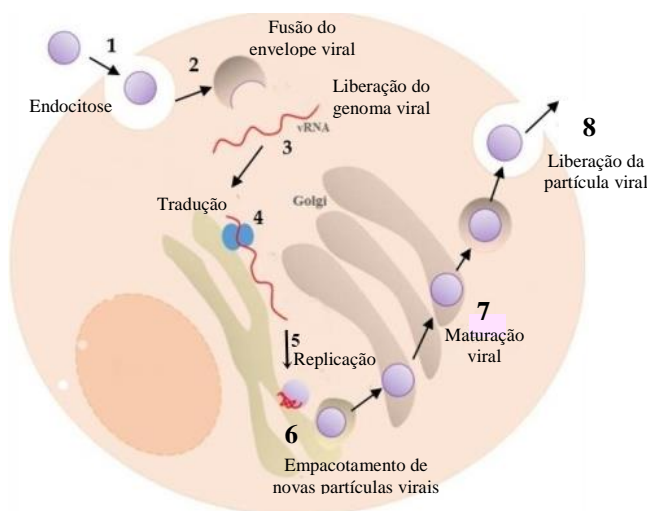


Figura 1.3: Esquema representativo do ciclo de replicação do vírus Zika. (1) A internalização da partícula viral ocorre por endocitose através da interação da proteína do envelope com receptores presentes na superfície da célula-alvo. (2) A fusão do envelope viral com a membrana celular é promovida pela acidificação do endossomo, (3) ocasionando a liberação do genoma viral no citoplasma da célula. (4) O genoma viral é traduzido em uma poliproteína que é clivada em 10 proteínas: três estruturais e sete não estruturais. (5) Os processos de replicação do genoma viral e a montagem de novas partículas ocorrem no retículo endoplasmático, (6) seguido pelo empacotamento e montagem do vírus, para formar novas partículas virais. (7) As partículas virais imaturas são então transportadas pela via exocítica da célula até a rede *trans*-Golgi, após clivagem da proteína prM em M pela protease furina, a proteína E se organiza em dímeros, tornando a partícula madura e infecciosa. (8) As partículas são carregadas por vesículas secretórias para a superfície celular e finalmente são liberadas por exocitose (Modificado de Silva *et al.*, 2020).

1.6 Proteínas Virais

1.6.1 Proteínas estruturais

A primeira proteína a ser traduzida é a do capsídeo (C), que possui aproximadamente 11 kDa e está envolvida no empacotamento do genoma viral e na formação do nucleocapsídeo. A proteína C está voltada principalmente para o citoplasma das células infectadas, onde se forma o complexo capsídeo-RNA. Após a clivagem da poliproteína, a proteína C é liberada no citosol e forma homodímeros. A distribuição de cargas na superfície dos homodímeros é assimétrica. Um domínio lateral contém regiões hidrofóbicas que interagem com a membrana lipídica viral, enquanto o outro domínio lateral contém resíduos carregados positivamente que se ligam ao genoma do RNA carregado negativamente (Hasan *et al.*, 2018; Javed *et al.*, 2018; Lindenbach & Rice, 2007; Tan *et al.*, 2020).

A proteína C é uma proteína multifuncional. Além de atuar na síntese do nucleocapsídeo viral, possui um importante papel no processo de infecção do vírus através da interação com proteínas celulares, modulando o metabolismo celular, apoptose e resposta imune. A proteína C também atua como uma chaperona, após a fusão da membrana endossômica, o genoma viral interage com os dímeros de C para escapar de nucleases do hospedeiro e evitar a degradação do RNA (Javed *et al.*, 2018; Shang *et al.*, 2018).

A proteína pré-membrana (PrM) é a glicoproteína precursora da proteína M e possui peso molecular de aproximadamente 26 kDa. A prM forma heterodímeros com a proteína do envelope e o seu domínio pr cobre a alça de fusão da proteína E, evitando que a mesma sofra alterações conformacionais durante a passagem das partículas virais imaturas através de compartimentos celulares ácidos. Conforme o vírus transita pelo Golgi, a porção N-terminal da prM é clivada pela protease furina, resultando na liberação do peptídeo pr e da proteína M (Hasan *et al.*, 2018; Heinz & Stiasny, 2017; Lindenbach & Rice, 2007; Javed *et al.*, 2018; Sirohi & Kuhn, 2017).

1.6.1.1 Proteína do envelope

A glicoproteína do envelope possui aproximadamente 53 kDa e é considerada a principal proteína na superfície da partícula viral madura. Essa glicoproteína se organiza em forma de dímeros, sendo cada monômero constituído por três domínios (DI, DII e DIII) que juntos compreendem o ectodomínio da proteína, o qual está conectado por uma região ligante curta a um domínio transmembrana, localizado na região C-terminal e constituído pelas

regiões de haste e âncora (Figura 1.4). Nas partículas virais imaturas, a proteína E encontra-se na forma trimérica e associada à proteína prM. Quando ocorre a maturação do vírion (clivagem de prM), a proteína E sofre rearranjo e se organiza na forma de homodímeros (Heinz & Stiasny, 2017; Lindenbach & Rice, 2007).

A proteína E desempenha funções essenciais durante a infecção viral. Ela é responsável pela adesão do ZIKV à célula-alvo por meio da interação do seu domínio III com receptores presentes na célula. Além disso, ela está envolvida na fusão do envelope viral com a membrana do endossoma, através da sua mudança conformacional e exposição do peptídeo de fusão (Heinz & Stiasny, 2017; Lindenbach & Rice, 2007), que medeia a fusão das membranas viral e do endossoma.

Alguns de seus epítomos são reconhecidos por anticorpos com capacidade neutralizante, que interrompem o ciclo de replicação viral ao impedir a entrada do vírus na célula alvo. Diversos estudos sugerem que os anticorpos neutralizantes (AcN) são os principais mediadores da proteção de longo prazo contra flavivírus. Como a maioria dos AcN são gerados contra a proteína E, ela é considerada um alvo ideal para o desenvolvimento de vacinas. Neste sentido, diversas propostas têm sido elaboradas para o desenvolvimento de uma vacina contra Zika baseadas na proteína E (Castanha *et al.*, 2020; Goo *et al.*, 2018; Heinz & Stiasny, 2017; Pattnaik *et al.*, 2020; Scherwitzl *et al.*, 2017; Schrauf *et al.*, 2020).

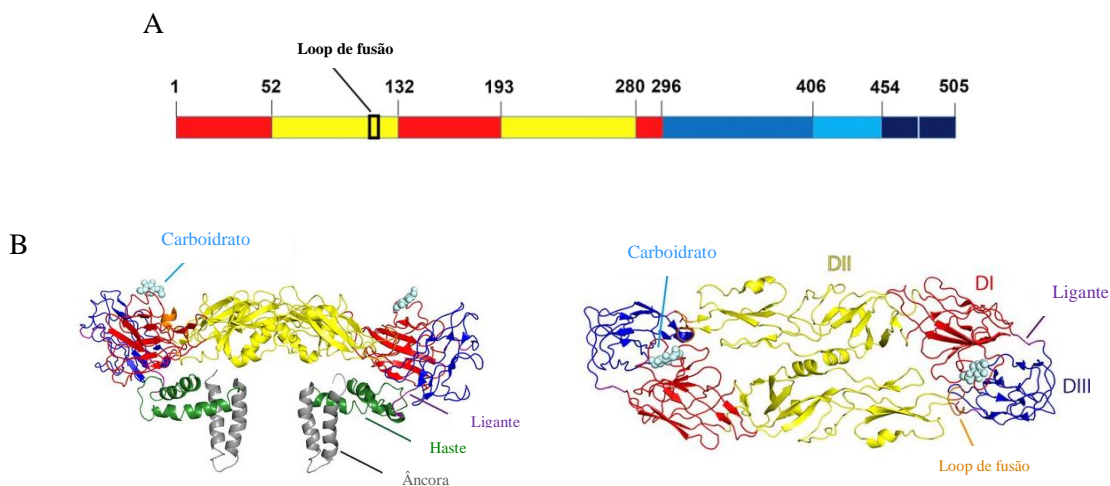


Figura 1.4: Estrutura da glicoproteína do envelope. (A) Diagrama esquemático da organização dos domínios da proteína E do ZIKV. (B) Organização 3D da fita dos dímeros da proteína E em suas vistas lateral e superior, respectivamente. Os carboidratos ligados ao Asn são mostrados como esferas azuis claras. Os três domínios da proteína E são exibidos em vermelho (DI), amarelo (DII) e azul (DIII), e a região ligante do domínio de haste é mostrada em roxo. O loop de fusão na ponta do domínio II é mostrado em laranja (Modificado de Dai *et al.*, 2016b; Heinz & Stiasny, 2017).

1.6.2 Proteínas não estruturais

O genoma de ZIKV codifica sete proteínas não estruturais (NS): NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. Essas proteínas são responsáveis pela síntese de RNA viral, morfogênese viral e evasão da resposta imune inata do hospedeiro (Heinz & Stiasny, 2017; Lindenbach & Rice, 2007; Zhang *et al.*, 2019). A proteína NS1, outro foco do nosso estudo, será apresentada mais adiante.

A NS2A é uma proteína hidrofóbica multifuncional com aproximadamente 22 kDa. Ela possui papel central no recrutamento do RNA viral, na montagem do vírion através do recrutamento dos complexos prM/E e NS2B/NS3 e na modulação da resposta imune (Hasan *et al.*, 2018; Javed *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2020a; Lindenbach & Rice, 2007; Zhang *et al.*, 2019)

A NS2B é uma proteína transmembrana do RE de aproximadamente 14 kDa, com uma longa cauda C-terminal exposta no citosol. Ela atua no recrutamento da NS3 para o RE e também como co-fator para a atividade de protease da região C-terminal da NS3 (formando o complexo serina-protease), sendo, portanto, essencial no processo de clivagem da poliproteína viral (Javed *et al.*, 2018; Lindenbach & Rice, 2007; Nitsche *et al.*, 2017).

A NS3 é uma proteína multifuncional com aproximadamente 70 kDa, dotada de atividades de protease, helicase, nucleosídeo trifostase (NTPase) e RNA 5' trifosfatase (RTPase). Na região C-terminal, o domínio helicase está associado à dissociação da fita dupla de RNA durante o processo replicativo do vírus, enquanto o domínio com atividade nucleosídeo trifostase (NTPase), fornece energia para a atividade de helicase e para a atividade RNA trifosfatase (RTPase), que provavelmente é necessária para remoção do grupo 5'-terminal e formação da estrutura de *cap* do RNA viral. Em sua porção N-terminal, a proteína possui um domínio serino-protease que atua, com o co-fator NS2B, no processamento da poliproteína viral (Javed *et al.*, 2018; Lindenbach & Rice, 2007; Luo *et al.*, 2008; Swarbrick *et al.*, 2017; White *et al.*, 2016).

A proteína NS4A, juntamente com a NS4B, induz a via de autofagia que promove a replicação viral. A NS4A (16 kDa) é responsável pela indução de alterações na membrana, que são fundamentais para replicação, e interage com outras proteínas não estruturais modulando a replicação viral. A NS4A apresenta um domínio citosólico N-terminal e três segmentos transmembranares (Kumar *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2017; Liang *et al.*, 2016; Lindenbach & Rice, 2007; Mclean *et al.*, 2011). A NS4B é a maior proteína não estrutural hidrofóbica dos flavivírus (27 kDa) e contém dois segmentos hidrofóbicos e três segmentos transmembranares C-terminal. Semelhante a NS4A, a NS4B atua na formação do complexo

de replicação viral e está envolvida na supressão da sinalização de Interferon (IFN) e citocinas inflamatórias (Kumar *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2020a; Li *et al.*, 2017; Miller *et al.*, 2006; Munoz-Jordán *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2017).

A proteína NS5 é a maior proteína não estrutural (103 kDa) e apresenta dois domínios: um domínio metiltransferase na sua região N-terminal, que é responsável pelo capeamento e metilação da extremidade 5' do RNA viral, e na região C-terminal um domínio de RNA polimerase RNA-dependente, que atua na síntese dos novos RNAs virais. Além disso, a NS5 suprime a sinalização de IFN por meio da degradação do transdutor de sinal e ativador da transcrição 2 (STAT2) humano dependente de proteassoma (Grant *et al.*, 2016; Lindenbach & Rice, 2007; Wang *et al.*, 2018).

1.6.2.1 Proteína não-estrutural 1

A proteína não estrutural 1 (NS1) é uma glicoproteína com aproximadamente 48 kDa que existe nas formas de dímero e hexâmero. No retículo endoplasmático da célula infectada, a NS1 é encontrada na forma dimérica. Após a adição de carboidratos ricos em manose, a proteína dimeriza-se rapidamente, sendo então direcionada para três locais: os sítios de replicação viral, a membrana citoplasmática e o meio extracelular (Lindenbach & Rice, 2007).

No lúmen do retículo endoplasmático a NS1 desempenha um papel crítico na reorganização das membranas do RE, essencial para replicação do genoma viral. A NS1 atua no remodelamento de membranas, criando uma estrutura semelhante a um compartimento de replicação através da inserção de suas regiões hidrofóbicas nas membranas do RE (Ci *et al.*, 2020).

A NS1 pode ser detectada no meio extracelular a partir da sua secreção pelas células infectadas, sendo a maior parte de hexâmeros em formato de barril. Esses hexâmetros são compostos por três dímeros que formam uma cavidade central hidrofóbica carregada de moléculas lipídicas (Figura 1.5). A NS1 também se associa à superfície das células infectadas, onde seu papel não é claro (Brown *et al.*, 2016; Chambers *et al.*, 1990; Flamand *et al.*, 1999; Gutsche *et al.*, 2011; Javed *et al.*, 2018).

Durante a infecção, a proteína NS1 desempenha um papel importante na evasão da resposta imune, suprimindo a sinalização de IFN tipo I através da ativação do inflamassoma do hospedeiro (Zheng *et al.*, 2018). Essa proteína é capaz de induzir uma forte resposta imune humoral durante a infecção viral. Além disso, estudos de imunização baseados na proteína NS1 de diversos Flavivirus mostram seu efeito protetor em diferentes modelos

animais (Brault *et al.*, 2017; Costa *et al.*, 2006a; Jacobs *et al.*, 1992; Li *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2018; Schlesinger *et al.*, 1985; Volpina *et al.*, 2005).

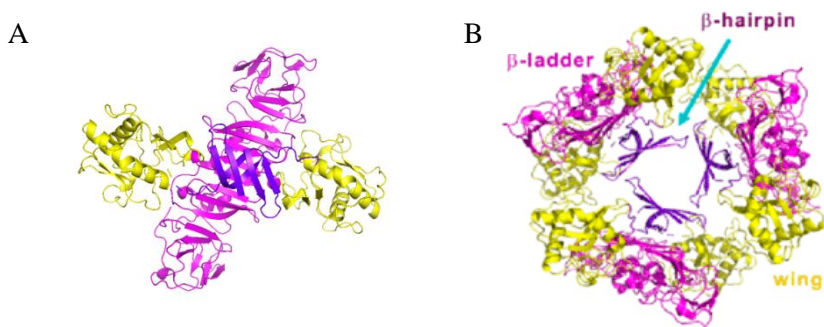


Figura 1.5: Estrutura da proteína NS1. (A) Organização 3D dos dímeros da proteína NS1. (B) Organização 3D do modelo de hexâmero da NS1 do ZIKV. Cada monômero contém três domínios: o domínio β -ladder (magenta), o domínio β -hairpin (roxo-azul) e o domínio wing (amarelo) (Modificado de Hu & Sun, 2019).

1.7 Resposta imune contra a infecção pelo ZIKV

A primeira linha de defesa do hospedeiro contra a infecção viral é a resposta imune inata, cuja resposta contra microrganismos invasores independe da ocorrência de uma infecção prévia (por isso *inata*), tal característica permite respostas rápidas contra esses microrganismos. A resposta imune inata atua nas primeiras horas ou dias após a infecção e fornece os primeiros sinais de perigo que estimulam as respostas imunes adaptativas. Por sua vez, as respostas imunes adaptativas frequentemente estimulam a resposta imune inata (Abbas *et al.*, 2019).

A resposta imune inata é composta por barreiras físicas e químicas (epitélios e os agentes antimicrobianos produzidos nas superfícies epiteliais); células fagocíticas (macrófagos e neutrófilos), células dendríticas (DCs, do inglês, dendritic cells), mastócitos, células natural killer (células NK) e outras células linfóides inatas e proteínas sanguíneas (componentes do sistema complemento e outros mediadores da inflamação). Diferentes receptores da imunidade inata reconhecem estruturas que são comuns a grupos de microrganismos relacionados, os chamados padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs, do inglês, pathogen-associated molecular), e não distinguem pequenas diferenças entre microrganismos. Após ativação da resposta imune inata, a eliminação do microrganismo pode ocorrer através da estimulação de uma reação inflamatória que ocasiona o recrutamento de fagócitos e outros leucócitos que destroem os microrganismos, assim como, pelo bloqueio da replicação viral ou pelo killing de células infectadas por vírus (Abbas *et al.*, 2019).

Após a infecção por flavivírus respostas antivirais são desencadeadas, o reconhecimento do vírus promove a ativação transcricional de citocinas e genes responsivos a interferons (IFNs) cuja ação é indispensável à infecção viral. Diferentes receptores de reconhecimento de padrões, dentre eles receptores do tipo Toll e receptores semelhantes ao gene I indutível por ácido retinóico (RIG-I), reconhecem PAMPs ativando diversos fatores de transcrição, incluindo fatores reguladores de interferon (IRFs) e NF- κ B, que cooperam na indução de IFNs e várias outras citocinas e quimiocinas inflamatórias que orquestram as respostas imunes inatas e adaptativas (Akira & Takeda, 2004; Schneider *et al.*, 2014). O reconhecimento do RNA viral pelo RIG-I citosólico e pelo gene 5 associado à diferenciação do melanoma (MDA5) ocasiona uma mudança conformacional no receptor favorecendo sua interação com a proteína adaptadora antiviral mitocondrial (MAVS). Devido essa interação, componentes de sinalização são recrutados, ocasionando a fosforilação do fator regulador de interferon 3 (IRF3); ao ser fosforilado o IRF3 se transloca para o núcleo e conduz a transcrição dos genes IFN tipo I (IFN- α e IFN- β). Os IFNs tipo I secretados sinalizam a expressão de genes estimulados por IFN (ISGs) com funções antivirais através do transdutor de sinal Janus quinase (JAK) e do ativador da proteína de transcrição (STAT). Os ISGs influenciam muitos processos celulares, incluindo processamento de RNA, estabilidade de proteínas e viabilidade celular, afetando diretamente etapas específicas do ciclo replicativo e, portanto, a replicação do vírus (Kato *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2015; Ngoni & Shresta, 2018; Schoggins, 2014).

Assim como o IFN tipo I, a sinalização do inflamassoma é fundamental na resposta à infecção viral, pois permite a ativação proteolítica da caspase-1, que por sua vez pode clivar vários substratos pró-inflamatórios, estimulando a maturação e secreção das citocinas inflamatórias (Martinon *et al.*, 2009). Proteínas sensoras reconhecem PAMPs citosólicos e induzem a formação de complexos multiproteicos denominados inflamassomos, cuja função é gerar formas ativas das citocinas inflamatórias IL-1 β e IL-18. A formação dos complexos multiproteicos ocorre após a ligação do antígeno em proteínas sensoras, em seguida, diversas proteínas sensoras idênticas interagem para formar um oligômero e cada proteína do oligômero se liga a uma proteína adaptadora chamada ASC (do inglês, apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD). Essa ligação promove uma alteração conformacional na proteína ASC que deflagra alterações conformacionais em outras moléculas ASC no citosol, favorecendo o recrutamento de um precursor inativo de caspase-1, chamado prócaspase-1 e posteriormente a ativação da caspase-1, devido ao acúmulo de seu precursor inativo. A principal função da caspase-1 é clivar as formas precursoras citoplasmáticas inativas de IL-1 β e IL-18. Após o processamento, as citocinas são secretadas e se ligam em

receptores específicos promovendo a ativação de fatores de transcrição envolvidos na inflamação (Abbas *et al.*, 2019).

Várias proteínas não estruturais do ZIKV atuam em diferentes níveis da via de sinalização de IFN e auxiliam cooperativamente para evadir da resposta imune do hospedeiro. As proteínas NS1 e NS4B do ZIKV bloqueiam a produção de IFN tipo I (IFN- α e IFN- β) ao atuar na etapa de formação do complexo TBK1 (do inglês *TANK binding kinase 1*), responsável por fosforilar IRF3 (Wu *et al.*, 2017; Xia *et al.*, 2018). Já as proteínas NS2A, NS2B e também NS4B atuam na etapa de fosforilação de TBK1 e a NS4A na etapa de fosforilação de IRF3 (Xia *et al.*, 2018). A proteína NS5 é capaz de promover a degradação de STAT2 e a NS2B3 pode degradar JAK1 (Bowen *et al.*, 2017; Grant *et al.*, 2016). A inibição da sinalização JAK-STAT, interfere na expressão dos ISGs favorecendo a replicação viral (Bowen *et al.*, 2017; Grant *et al.*, 2016).

Apesar do papel do inflamassoma mediante infecções virais, o ZIKV é capaz de utilizar a ativação do inflamassoma para suprimir a sinalização de IFN tipo I, auxiliando assim sua replicação. Para isso, a proteína NS1 recruta USP8 (do inglês *Ubiquitin Specific Peptidase 8*) para clivar as cadeias de poli-ubiquitina ligadas a caspase-1, aumentando a abundância da pró-caspase-1 no citoplasma e a ativação do inflamassoma. A caspase-1 ativada promove a clivagem e remoção do cGAS (do inglês *Cyclic GMP-AMP synthase*), aumentando a replicação do ZIKV, uma vez que cGAS reconhece o mtDNA (DNA mitocondrial) para iniciar a sinalização do IFN tipo I durante a infecção pelo ZIKV. Dessa forma, a produção de IFN tipo I é atenuada e o ZIKV evita a resposta antiviral do hospedeiro (Akira *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2018).

Outro componente essencial da resposta antiviral é a resposta imune adaptativa, incluindo células T CD4⁺ e CD8⁺ e respostas de anticorpos neutralizantes (AcN). A resposta imune adaptativa é mediada por células denominadas linfócitos (linfócitos B e linfócitos T) e seus produtos. Tais células expressam receptores altamente diversos que são capazes de reconhecer um vasto número de antígenos. Para ativação dos linfócitos é preciso a ligação específica de um antígeno em seu receptor, resultando na proliferação de células específicas para aquele antígeno. Indivíduos e linfócitos que nunca encontraram um determinado antígeno são considerados naive (são imunologicamente inexperientes) (Abbas *et al.*, 2019).

Existem dois tipos de respostas imunes adaptativas que atuam para eliminar diferentes tipos de microrganismos: imunidade humoral (linfócitos B); e imunidade mediada por células (linfócitos T). Os linfócitos B são responsáveis por mediar a imunidade humoral, após reconhecer o antígeno o linfócito B prolifera e se diferencia em plasmócito. Essa diferenciação permite a produção de moléculas denominadas anticorpos, presentes no sangue

e em secreções mucosas. Os anticorpos reconhecem antígenos microbianos, neutralizam a infectividade dos microrganismos e marcam microrganismos para sua eliminação pelos fagócitos e pelo sistema complemento (Abbas *et al.*, 2019).

Já a imunidade mediada por células ou a imunidade celular é mediada pelos linfócitos T. Os microrganismos intracelulares (como os vírus ou microrganismos que são ingeridos, mas sobrevivem dentro dos fagócitos) são inacessíveis aos anticorpos circulantes. Logo, a imunidade celular é responsável na defesa contra tais infecções, promovendo a destruição de microrganismos dentro dos fagócitos e a morte das células infectadas para eliminação dos reservatórios da infecção. Existem populações funcionalmente distintas de linfócitos T, incluindo as células T auxiliares (CD4⁺), os linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) (CTLs, do inglês, cytotoxic T lymphocytes) e células T reguladoras. As funções das células T CD4⁺ são mediadas principalmente pela secreção de citocinas que auxiliam os fagócitos a destruir os microrganismos e estimulam a produção de anticorpos pelas células B; os linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) produzem moléculas que matam outras células, já as células T auxiliares atuam principalmente na inibição das respostas imunes (Abbas *et al.*, 2019).

Durante uma infecção viral, a resposta imune humoral desempenha um papel importante na eliminação desse invasor. Estudos relatam que anticorpos neutralizantes são considerados um dos principais mecanismos na proteção contra infecções por ZIKV (Dai *et al.*, 2016a; Larocca *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017a; Zhao *et al.*, 2016). Os anticorpos neutralizantes que conferem proteção são direcionados principalmente contra a proteína E e possuem a capacidade de reconhecer diferentes sítios antigênicos da proteína (Dai *et al.*, 2016b; Hasan *et al.*, 2017; Sapparapu *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017bc). Os efeitos protetores de tais anticorpos são mediados pela neutralização do vírus ou por funções efetoras mediadas pela porção Fc (porção invariável presente na extremidade oposta das moléculas de anticorpos) (Lu *et al.*, 2018). Anticorpos monoclonais (mAbs) podem neutralizar o vírus ligando-se fortemente às proteínas E presentes na superfície da partícula viral, bloqueando a ligação viral à célula hospedeira ou evitando o rearranjo dessas proteínas antes da etapa de fusão de membrana (Munjaj *et al.*, 2017).

A importância de AcN durante a infecção viral já foi observada em diferentes estudos com primatas não humanos (Abbink *et al.*, 2016; Keeffe *et al.*, 2018; Magnani *et al.*, 2017; Van Rompay *et al.*, 2020). A combinação de dois anticorpos monoclonais humanos foi capaz de mediar proteção ao reduzir o pico de viremia em macacos Rhesus desafiados com ZIKV (Keeffe *et al.*, 2018). Em fêmeas Rhesus grávidas, os anticorpos não eliminaram totalmente a viremia materna, no entanto limitaram a transmissão vertical, protegendo o feto de danos neurológicos (Van Rompay *et al.*, 2020).

Por outro lado, diversos trabalhos também evidenciam a participação das células T CD4⁺ e T CD8⁺ em mediar proteção contra a infecção primária por ZIKV (Dudley *et al.*, 2016; Hassert *et al.*, 2018; Hassert *et al.*, 2019; Lucas *et al.*, 2018; Ngono & Shresta, 2018; Pardy *et al.*, 2017). Em um estudo com camundongos C57BL/6 sem o receptor para o IFN-I (tratados com anti-receptor de IFN ou geneticamente deficientes do receptor, mas com níveis normais de receptores em células T, células B e na maioria das células dendríticas), as células T CD8⁺ desempenharam um papel protetor contra a infecção (Ngono & Shresta, 2018). Os autores observaram maior expansão e ativação das células T CD8⁺ após a infecção primária com ZIKV, sendo que a depleção destas células ocasionou maiores cargas virais em diversos tecidos. Além disso, a transferência adotiva de células T CD8⁺ de camundongos infectados com ZIKV para camundongos naives resultou na diminuição da carga viral quando esses foram infectados.

De modo semelhante, outro estudo com camundongos A129 (deficiente de receptores de IFN tipo 1) indicou que a sobrevivência de camundongos frente ao desafio com ZIKV foi associada às respostas das células B, células T CD4⁺ e CD8⁺ e sinalização de IFN γ (Lucas *et al.*, 2018). Neste estudo, a depleção de células T CD4⁺, CD8⁺ ou B tornou os camundongos A129 suscetíveis à infecção. Além disso, usando um modelo de transferência adotiva de células, os resultados indicaram um papel crítico das células T CD4⁺ e dos anticorpos neutralizantes na proteção contra o desafio letal com o ZIKV. As células T CD4⁺ de camundongos infectados ativaram uma resposta robusta de células B, associada à produção de anticorpos IgG2a neutralizantes.

Devido às semelhanças genéticas e estruturais entre ZIKV e DENV, vários grupos relataram extensa reatividade cruzada entre ambos os vírus, tanto em relação à resposta humoral quanto à celular (Bardina *et al.*, 2017; Sirohi & Kuhn, 2017; Stettler *et al.*, 2016; Wen *et al.*, 2017). Diversos trabalhos evidenciam que o soro imune (porção líquida do sangue, isenta de células e fibrinogéneo, que contém anticorpos) e anticorpos monoclonais humanos derivados de pacientes previamente expostos ao DENV apresentam reação cruzada com o ZIKV. Por isso, existe uma preocupação de que esta resposta cruzada possa levar ao fenômeno de aumento da replicação viral dependente de anticorpos (ADE, do inglês *antibody-dependent enhancement*). Em DENV já é bem caracterizado que anticorpos originados em uma infecção prévia por um sorotipo (principalmente contra as proteínas E e M) podem reconhecer, mas não neutralizar o vírus de uma segunda infecção com um sorotipo diferente. Consequentemente, os complexos imunes resultantes facilitam a entrada do DENV em células que contêm receptores para Fc γ (Fc γ R) em sua superfície, como células dendríticas e

macrófagos, amplificando a infecção viral (Halstead, 1977; Katzelnick *et al.*, 2017; Scherwitzl *et al.*, 2017; Yacoub *et al.*, 2013).

Sendo assim, vários estudos foram realizados para investigar o efeito da infecção prévia pelo DENV na infecção pelo ZIKV. Foram identificados diversos anticorpos de reação cruzada, dentre os quais alguns apresentaram capacidade de neutralização *in vitro* (Barba-Spaeth *et al.*, 2016; Dejnirattisai *et al.*, 2016; Kam *et al.*, 2017; Priyamvada *et al.*, 2016; Stettler *et al.*, 2016; Swanstrom *et al.*, 2016). Já outros estudos *in vitro* confirmaram que o soro imune isolado de pacientes infectados com dengue, assim como anticorpos monoclonais, podem aumentar a infecção com ZIKV (Dejnirattisai *et al.*, 2016; Priyamvada *et al.*, 2016). No entanto, foi observado que com uma maior concentração de anticorpos anti-DENV, o efeito do ADE poderia ser revertido (Dejnirattisai *et al.*, 2016). Em estudos *in vivo*, menores concentrações de plasma de pacientes imunes ao DENV inoculadas em camundongos ocasionavam aumento da infecção viral, mas quando inoculadas maiores concentrações apresentavam papel protetor (Bardina *et al.*, 2017). O mesmo foi observado com anticorpos monoclonais (Fernandez *et al.*, 2017). Sendo assim, os dados sugerem que o ADE *in vivo* pode ocorrer em baixas concentrações de IgG reativa ao ZIKV, enquanto níveis elevados podem ser protetores.

Outros estudos *in vivo* evidenciaram o papel protetor da imunidade prévia a DENV durante a infecção por ZIKV. Em camundongos, tanto o soro imune de pacientes infectados com DENV como anticorpos monoclonais foram protetores (Swanstrom *et al.*, 2016). Em primatas não humanos, a imunidade pré-existente contra DENV favoreceu uma melhor resposta durante infecção pelo vírus Zika (Pantoja *et al.*, 2017). Além disso, estudos epidemiológicos corroboram estes dados, tendo em vista que indivíduos com imunidade pré-existente ao DENV durante a infecção com ZIKV apresentaram menor risco de infecção sintomática (Gordon *et al.*, 2019; Pedroso *et al.*, 2019; Rodriguez-Barraquer *et al.*, 2019).

Por outro lado, o efeito da imunidade prévia pelo ZIKV na infecção com DENV necessita ser melhor elucidado. Até o momento, sabe-se que anticorpos monoclonais humanos anti-ZIKV podem aumentar a infecção e doença por DENV em camundongos (Stettler *et al.*, 2016), e camundongos nascidos com anticorpos circulante materno contra ZIKV desenvolvem doença grave após infecção por DENV (Fowler *et al.*, 2018). Neste mesmo estudo, Fowler e colaboradores observaram que a transferência passiva de IgG isolada de camundongos nascidos de mães imunes ao ZIKV para camundongos naives resultou em aumento da viremia na infecção com DENV, sugerindo, portanto, que a resposta materna com anticorpos anti-ZIKV, gerada após infecção ou vacinação, pode predispor à doença grave da dengue.

1.8 Vacinas contra ZIKV

As vacinas são consideradas umas das principais ferramentas no controle e combate de doenças infecciosas. O desenvolvimento de uma vacina segura, eficaz e acessível contra Zika é essencial. Apesar dos sintomas da infecção serem tipicamente leves, durante a gravidez a pode ocasionar anomalias congênitas graves, e em casos mais raros, complicações neurológicas como a síndrome de Guillain-Barré, sendo então considerada uma ameaça à saúde pública internacional (de Oliveira *et al.*, 2017; Krauer *et al.*, 2017; Ioos *et al.*, 2014).

A vacina contra ZIKV tem como alvo principal mulheres grávidas ou que podem engravidar. Sendo assim, a vacina deverá atender altos padrões de segurança e eficácia para impedir a transmissão vertical do vírus durante a gravidez. A experiência com vacinas contra outros flavivírus, como o vírus da encefalite japonesa e o vírus da febre amarela, sugere que uma vacina contra o ZIKV precisará atender a critérios exclusivos. De acordo com as diretrizes do Centro de Controle de Doenças (CDC), a vacina do Vírus Inativado Purificado (PIV) contra o JEV e a vacina viva atenuada contra o YFV são amplamente contra-indicados em mulheres grávidas, a menos que os benefícios superem o risco (Garg *et al.*, 2018). Além do mais, o custo da vacinação também será um ponto importante para campanhas de vacinação em massa, já que as infecções por ZIKV atingem países em desenvolvimento e subdesenvolvidos. Consequentemente, uma vacina contra o ZIKV deve superar as barreiras econômicas, de segurança e eficácia para ter sucesso (Garg *et al.*, 2018).

Diversas estratégias vêm sendo utilizadas para o desenvolvimento de uma vacina contra o ZIKV que atenda a esses critérios. Algumas destas abordagens, descritas a seguir, estão em fase avançada de estudo (Tabela 1.1), mas até o presente momento não existe uma vacina licenciada. Previamente a sua aprovação para uso comercial uma vacina é submetida a testes pré-clínicos (*in vitro* e/ou *in vivo*) para avaliar a segurança e o seu potencial imunogênico. E posteriormente, são realizados os ensaios clínicos em seres humanos, classificados em estudos de Fase I (dose e segurança), Fase II (segurança e eficácia) e Fase III (comprovar a eficácia). No ensaio clínico de fase I a vacina candidata é administrada a um pequeno número de pessoas (normamente até 100 participantes), nesta primeira fase além de avaliar a segurança e a dose da vacina candidata, a capacidade inicial de estimular o sistema imunológico também é testada; já na fase II a vacina candidata é administrada em um numero maior de pessoas (de 100 a 1000), sendo assim, mais dados sobre segurança são fornecidos e a imunogenicidade da vacina, ou seja, a capacidade de estimular o sistema imunológico através da ativação de linfócitos B e T, e eficácia são avaliadas; na última etapa dos ensaios clínicos (Fase III) a vacina candidata é administrada a milhares de pessoas, permitindo a

confirmação de sua eficácia em prevenir a infecção e a identificação de mais dados sobre reações adversas em grupos variados de indivíduos.

As vacinas inativadas não são infecciosas, sendo consideradas mais seguras que as vacinas atenuadas. Contudo, devido exatamente a sua incapacidade de replicação, estas vacinas geralmente induzem títulos mais baixos de AcN que as vacinas atenuadas e não induzem uma resposta celular muito eficiente. A ausência de respostas imunes contra as proteínas não estruturais compromete respostas robustas de células T, ocasionando baixa imunogenicidade (Flipse & Smit, 2015; Liu *et al.*, 2016). Cinco vacinas diferentes inativadas possuem registro no ClinicalTrials.gov e se encontram em ensaios clínicos de fase I.

O *Walter Reed Army Institute of Research* (WRAIR) com apoio do *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (NIAID) desenvolveu uma vacina candidata (ZPIV), utilizando ZIKV purificado, inativado com formalina, que mostrou proteção contra a viremia em camundongos (Hassert *et al.*, 2019) e primatas não humanos (Abbink *et al.*, 2016) após o desafio com ZIKV. Até o momento foram realizados quatro estudos de Fase I (NCT02963909, NCT02952833, NCT02937233 e NCT03008122). Em 2018, os resultados de três desses ensaios (NCT02963909, NCT02952833 e NCT02937233) foram publicados (Modjarrad *et al.*, 2018). A vacina ZPIV foi bem tolerada, causou apenas uma reatogenicidade leve a moderada (dor ou sensibilidade no local da injeção, fadiga, cefaleia e mal-estar) em adultos saudáveis imunizados nas semanas 0 e 4, que é um esquema padrão para vacinas purificadas de flavivírus inativados. Além disso, ela induziu títulos robustos de AcN, mais de 90% dos participantes soroconverteram (apresentaram anticorpos específicos contra o ZIKV após a imunização) e os títulos não apresentaram divergência significativa entre os participantes naives para flavivírus e aqueles com imunidade pré-existente no início do estudo. Em camundongos, a transferência adotiva de IgG purificada de indivíduos vacinados forneceu proteção parcial ou completa contra viremia em animais posteriormente desafiados com ZIKV. Em 2020, novos resultados relacionados a um desses ensaios (NCT02937233) foram publicados. Além de testar o esquema padrão de duas doses, os autores também examinaram os esquemas de dose única e de duas doses administradas nas semanas 0 e 2. O regime de duas doses mais próximas induziu títulos de AcN semelhantes ao anterior (com pico de concentração mais precoce), enquanto que uma única dose de ZPIV foi minimamente imunogênica, com baixos níveis de anticorpos. Entretanto, a durabilidade da resposta de anticorpos foi curta, os níveis diminuíram consideravelmente 16 semanas após a imunização com esquema de dose padrão e 6 semanas no esquema de duas doses aceleradas, provavelmente devido à baixa resposta de células T específicas do ZIKV induzidas pela vacina inativada (Stephenson *et al.*, 2020).

Em 2016, após um acordo com o WRAIR, a empresa farmacêutica Sanofi Pasteur otimizou a escala de produção, condições de cultura e purificação da vacina ZPIV, denominada então ZIPV-SP (Lecouturier *et al.*, 2019; Schrauf *et al.*, 2020). A vacina otimizada ZPIV-SP demonstrou maior imunogenicidade e eficácia em comparação com a vacina de primeira geração ZPIV em estudos pré-clínicos com camundongos A129 (Lecouturier *et al.*, 2019). Em relação aos estudos com primatas não humanos, diferentes doses da ZPIV-SP forneceram proteção completa contra um desafio de ZIKV em macacos cynomolgus, a imunização induziu a produção de AcN, células T e células B de memória (Lecouturier *et al.*, 2020). Esses dados fornecem evidências de que a vacina ZPIV-SP tem um desempenho pelo menos tão bom quanto a vacina ZPIV.

Seguindo uma abordagem semelhante, a Takeda, outra empresa farmacêutica, desenvolveu uma vacina usando vírus inteiros inativados por formalina. Em ensaios pré-clínicos a vacina conferiu proteção contra desafio letal em camundongos (Baldwin *et al.*, 2018) e em primatas não humanos (Young *et al.*, 2020). Os resultados indicam que os anticorpos neutralizantes persistem e são capazes de prevenir a infecção pelo ZIKV por pelo menos 1 ano após a vacinação, com uma correlação entre os títulos de AcN e a proteção contra a infecção pelo ZIKV (Young *et al.*, 2020). O PIZV está sendo avaliado quanto a segurança e a imunogenicidade em estudos de fase I (NCT03343626).

Outra vacina inativada candidata contra o ZIKV é VLA1601, desenvolvida pela Valneva & Emergent BioSolutions. Semelhante à ZPIV e PIZV, trata-se de uma vacina de vírus inteiro, purificada e inativada por formalina. Em um estudo clínico de fase I foi testada em adultos naives para flavivírus (NCT03425149). Os resultados preliminares indicam que a vacina foi segura e imunogênica em todas as doses e esquemas testados, sendo capaz de induzir a produção de AcN com taxa de soroconversão de até 85% entre os vacinados (Emergent BioSolutions e Valneva, 2019).

A Bharat Biotech International (Índia) desenvolveu uma a vacina de vírus total inativada por formalina (BBV121) diferente das demais vacinas, utilizando uma linhagem africana (Zika MR 766). Em estudos pré-clínicos com camundongos imunodeficientes AG129 (deficientes dos receptores de IFN tipo I e II), duas doses da vacina forneceram 100% de eficácia contra mortalidade e doença após o desafio com as linhagens asiática ou africana (Sumathy *et al.*, 2017). A BBV121 está sendo avaliada em um ensaio clínico de Fase I na Índia (NCT04478656) e os resultados ainda não foram divulgados.

As vacinas atenuadas contêm o microrganismo vivo atenuado, sendo capazes de induzir uma resposta imune de amplo espectro, humoral e celular. No entanto, o desenvolvimento de uma cepa de vacina viva atenuada para um patógeno emergente é demorado e apresenta um

risco inerente de falha devido à atenuação inadequada e/ou instável. Como alternativa, cepas de vacinas seguras e eficazes bem caracterizadas podem ser geneticamente modificadas para apresentar antígenos críticos do patógeno de interesse, funcionando como vetores para o antígeno em questão. As vacinas baseadas em vetores virais podem induzir respostas imunes humorais e celulares eficientes, levando a proteção contra a infecção em modelos pré-clínicos (Lauer *et al.*, 2017).

O NIH (*National Institute for Health*) desenvolveu uma vacina atenuada através de técnicas de engenharia genética, constituída de um vírus quimérico contendo as proteínas de superfície do ZIKV, prM e E, em um esqueleto de DENV4. A vacina foi atenuada por meio da deleção de 30 nucleotídeos na região 3' UTR do genoma de DENV que resulta em replicação reduzida. Esta vacina candidata, foi denominada rZIKV / D4Δ30-713 e está sendo testada em um ensaio clínico de Fase I (NCT03611946) para avaliação da segurança, reatogenicidade e imunogenicidade de uma dose única em adultos sem história de infecção prévia por flavivírus (*National Institute for Health*, 2018; Pattnaik *et al.*, 2020; Schrauf *et al.*, 2020).

A Themis Bioscience GmbH desenvolveu duas vacinas que incluem o vírus da vacina contra o sarampo como plataforma de entrega para os antígenos do ZIKV. Ambas as vacinas se encontram em ensaios clínicos de Fase I para análise da imunogenicidade e segurança em adultos. A MV-ZIKA expressa as proteínas prM/E do ZIKV e o ensaio clínico de fase I, que iniciou em dezembro de 2016, já foi concluído, mas os resultados ainda não foram publicados (NCT02996890). A outra vacina, MV-ZIKV-RSP, também expressa as proteínas prM/E do ZIKV e iniciou o ensaio clínico de fase I em julho de 2019 (NCT04033068) (Castanha *et al.*, 2020).

Outra construção gerada com base na plataforma de vetor viral foi desenvolvida pela Universidade de Oxford. A vacina candidata baseada no adenovírus de chimpanzé com deficiência de replicação (ChAdOx1) codifica as proteínas prM e E (sem o domínio transmembrana) do ZIKV (Castanha *et al.*, 2020; López-Camacho *et al.*, 2018). Em ensaios pré-clínicos, a vacina se mostrou protetora contra o desafio de ZIKV e induziu imunidade de longa duração em camundongos. Além disso, nenhuma evidência de ADE para dengue foi observada *in vitro* (López-Camacho *et al.*, 2018). Dois ensaios clínicos de fase I (NCT04015648 e NCT04440774) estão sendo realizados para determinar a segurança e imunogenicidade em adultos saudáveis administrados com esta vacina isoladamente ou co-administrada com uma vacina contra o vírus Chikungunya.

O adenovírus humano também foi utilizado como vetor no desenvolvimento de uma vacina contra ZIKV. A Janssen Vaccines & Prevention BV construiu uma vacina baseada no

adenovirus humano tipo 26 incompetente para replicação (AD26). A vacina foi denominada Ad26.ZIKV.001 e codifica as proteínas M e E do ZIKV (cepa ZIKV BeH815744). Uma única dose de Ad26.ZIKV.001 forneceu proteção total contra o desafio de ZIKV em vários modelos de camundongos e primatas não humanos, com respostas robustas de AcN e resposta celular (Cox *et al.*, 2018). A segurança, reatogenicidade e imunogenicidade desta vacina estão sendo avaliadas em um ensaio clínico de fase I (NCT03356561).

Tabela 1.1: Vacinas candidatas contra o ZIKV em fase clínica.

Vacina candidata	Fabricante	Tipo de vacina	Ensaio clínico
ZPIV	WRAIR/ NIAID	Inativada Vírus Inteiro	NCT02963909 Fase I
			NCT02952833 Fase I
			NCT02937233 Fase I
			NCT03008122 Fase I
PIZV	Takeda	Inativada Vírus Inteiro	NCT03343626 Fase I
VLA1601	Valneva Austria GmbH	Inativada Vírus Inteiro	NCT03425149 Fase I
BBV121	Bharat Biotech International Limited	Inativada Vírus Inteiro	NCT04478656 Fase I
rZIKV / D4Δ30-713	NIH	Atenuada Proteínas prM e E	NCT03611946 Fase I
MV- ZIKA	Themis Bioscience GmbH	Atenuada Proteínas prM e E	NCT02996890 Fase I
MV- ZIKA-RSP	Themis Bioscience GmbH	Atenuada/ Quimérica Proteínas prM e E	NCT04033068 Fase I
ChAdOx1 Zika	Universidade de Oxford	Vetor Viral prM e E	NCT04015648 Fase I
			NCT04440774 Fase Ib
Ad26.ZIKV.001	Janssen Vaccines & Prevention BV	Vetor Viral M e E	NCT03356561 Fase I
mRNA-1325	ModernaTX	RNA prM e E	NCT03014089 Fase I
mRNA-1893	ModernaTX	RNA prM e E	NCT04064905 Fase I
GLS-5700	GeneOne Life Science	DNA prM e E	NCT02809443 Fase I
			NCT02887482 Fase I
VRC5283	NIAID	DNA prM e E	NCT02996461 Fase I
VRC5288	NIAID	DNA prM e E	NCT02840487 Fase I
VRC5283	NIAID	DNA prM e E	NCT03110770 Fase II

1.9 Vacinas de ácido nucleico

Nos últimos anos, as vacinas baseadas em ácido nucleico (DNA e mRNA) geraram interesse significativo como candidatas contra doenças infecciosas, pois podem ser desenvolvidas rapidamente a partir da sequência que codifica uma proteína desejada (Pattnaik *et al.*, 2020; Wallis *et al.*, 2019).

Nas vacinas de RNA, o mRNA é feito por transcrição *in vitro* a partir de um molde linearizado de DNA. Após a transcrição *in vitro*, o molde de DNA é eliminado por digestão com DNAses, o mRNA pode então ser purificado (Liu, 2019). Já as vacinas de DNA consistem em um vetor de expressão eucariótica (plasmídeo) onde está clonado um ou mais genes de um patógeno. Após a inoculação do DNA, as células são transfectadas *in vivo*. Inicialmente o DNA é transportado para o núcleo da célula, onde é transcrito em um mRNA. Posteriormente esse mRNA é exportado para o citoplasma onde é traduzido e o antígeno pode ser expresso no citoplasma, na superfície da célula do hospedeiro ou secretado pela célula, dependendo da sequência de sinalização presente na construção. O antígeno é então apresentado ao sistema imune via MHC I e II. As vacinas de RNA funcionam de maneira semelhante às de DNA, contornando a etapa de transporte até o núcleo da célula hospedeira e transcrição do mRNA. Sendo assim, o mRNA só precisa estar presente no citoplasma da célula (Castanha *et al.*, 2020; Khan, 2013; Liu, 2019; Williams, 2013).

Dentre as principais vantagens das vacinas de ácido nucleico se destacam: a capacidade de induzir uma resposta imune de amplo espectro celular e humoral; a ausência do risco de reversão (associado a certos patógenos atenuados); um processo de fabricação genérico (são rapidamente construídas a partir da sequência genética da proteína desejada) e o potencial uso em configurações de baixo recurso, no caso das vacinas de DNA. Além disso, ao induzir a expressão de proteínas *in vivo*, é mais provável que a estrutura antigênica se assemelhe à estrutura da proteína nativa, incluindo as modificações pós-transducionais essenciais (Castanha *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2012; Williams, 2013). O desenvolvimento e produção das vacinas de ácidos nucleicos é muito mais fácil e rápido, quando comparado com cultura de agentes patogênicos infecciosos inteiros ou expressão e purificação de proteínas recombinantes. Inclusive a primeira vacina candidata contra ZIKV a ser testada em ensaio clínico foi justamente uma construção de DNA (Tebas *et al.*, 2017). Somado a isso, o DNA é uma molécula altamente estável à temperatura ambiente, permitindo seu fácil transporte e armazenamento, o que representa uma economia significativa em vacinações em grande escala (Li *et al.*, 2012; Williams, 2013).

Logo após o início do surto brasileiro em 2015, diversos grupos de pesquisa trabalharam no desenvolvimento de vacinas baseadas em ácido nucleico utilizando diferentes estratégias. As vacinas candidatas que avançaram para os ensaios clínicos são todas baseadas na expressão das proteínas prM e E.

A empresa ModernaTX desenvolveu duas vacinas candidatas baseadas em mRNA, chamadas mRNA-1325 (NCT03014089) e mRNA-1893 (NCT04064905), ambas com ensaios clínicos de fase I. As duas construções contêm os genes prM / E de ZIKV (cepa asiática - Micronésia 2007) e diferem apenas em relação ao peptídeo sinal na região amino-terminal da prM. A mRNA-1325 expressa a sequência sinal de IgE humana e a mRNA-1893 expressa a sequência do JEV. Em ensaios pré-clínicos, ambas as construções foram imunogênicas e protetoras contra a infecção por ZIKV em vários modelos de camundongos (Castanha *et al.*, 2020; Richner *et al.*, 2017), e a vacina mRNA-1893 protegeu a transmissão do vírus durante a gravidez em camundongos (Jagger *et al.*, 2019). Os resultados preliminares da fase I com a mRNA-1893 foram divulgados para a imprensa em abril de 2020 e os dados indicam que a vacinação foi bem tolerada em adultos saudáveis com e sem exposição preexistente a outros flavivírus. A vacina se mostrou imunogênica e após a segunda dose todos os indivíduos soronegativos para flavivírus soroconverteram. Entre os participantes com exposição preexistente para outros flavivírus, 75% apresentaram um aumento de quatro vezes nos títulos de AcN após segunda dose. Nenhum evento adverso sério relacionado à vacina foi relatado pelos voluntários (Moderna TX, 2020).

1.9.1 Vacina de DNA

Algumas vacinas de DNA de uso veterinário já foram licenciadas, tais como: vacinas preventivas para o vírus do Nilo Ocidental (*Flavivirus*) em cavalos e o vírus da necrose hematopoiética infecciosa em peixes, uma vacina terapêutica contra câncer para cães e uma terapia genética com hormônio do crescimento para aumentar a sobrevivência da ninhada em porcas reprodutoras (Dalmo, 2018; Davidson *et al.*, 2005; Draghia-Akli *et al.*, 2003; Liu, 2019).

Quanto ao desenvolvimento de vacina para humanos, existe certa dificuldade, em primatas não humanos e humanos foi observada uma baixa imunogenicidade induzida por essas vacinas (Williams, 2013), muito provavelmente devido à sua baixa eficiência de transfecção *in vivo*. Várias estratégias estão sendo desenvolvidas para melhorar essa imunogenicidade, como por exemplo: maior eficiência da transfecção das células através da eletroporação ou biobalística; uso de adjuvantes moleculares; reforço heterólogo das vacinas

de DNA com vetores virais vivos ou vacinas de subunidades proteicas. Outra alternativa envolve a otimização de códons dos genes de interesse, visando maximizar a expressão de proteínas (Li *et al.*, 2012; Saade & Petrovsky, 2012). Do ponto de vista da segurança, através de investigações clínicas em humanos foi confirmado que as vacinas de DNA apresentam bons resultados, sem relatos de integração do DNA no genoma do hospedeiro, tolerância ao antígeno ou autoimunidade (Williams, 2013). Neste ano, foi aprovada a primeira vacina de DNA para utilização em humanos. Trata-se de uma vacina contra a COVID-19 que está sendo produzida na Índia (Samal *et al.*, 2021).

A empresa Inovio Pharmaceuticals desenvolveu a primeira vacina de DNA candidata contra ZIKV testada em ensaios clínicos, a GLS-5700 (NCT02809443 e NCT02887482). Esta vacina é baseada em uma sequência consenso prM-E derivada de linhagens africanas e asiáticas. Em estudos pré-clínicos com camundongos e primatas não humanos, a vacina se mostrou imunogênica e protetora após o desafio com ZIKV (Muthumani *et al.*, 2016). De acordo com os resultados preliminares do ensaio clínico (NCT02809443), 95% dos participantes produziram anticorpos anti-ZIKV em um regime de vacinação de duas doses, com um regime de três doses 100% apresentaram anticorpos. Os testes de neutralização indicaram que 62% das amostras foram positivas e quando testadas em alvos de células neuronais mais de 95% das amostras apresentaram AcN. O soro imune dos participantes vacinados evitou a infecção por ZIKV em modelos celulares *in vitro* e preveniu a morte em um modelo de camundongo *in vivo* (Tebas *et al.*, 2017).

Cientistas do Centro de Pesquisa de Vacinas (VRC) do NIAID desenvolveram duas outras vacinas candidatas baseadas em DNA: VRC5283 e VRC5288. Ambas as vacinas candidatas codificam as proteínas prM-E do ZIKV (cepa da Polinésia Francesa 2013). Para melhorar a expressão das proteínas, a sequência sinal da prM do ZIKV foi substituída por uma sequência análoga do vírus da encefalite japonesa em ambas as vacinas. E na construção da VRC5288, os 98 aminoácidos finais da proteína E (regiões da haste e transmembrana) foram trocados com a sequência correspondente do JEV. A imunização de camundongos e primatas não humanos com duas doses demonstrou que ambas as candidatas, VRC5283 e VRC5288, foram capazes de induzir AcN, e após o desafio de primatas não humanos previamente imunizados foi observada proteção contra a infecção com ZIKV (Dowd *et al.*, 2016). Para avaliar a segurança, imunogenicidade, regimes de dosagem, bem como dispositivos de entrega, foram realizados dois ensaios clínicos de fase I (NCT02996461 e NCT02840487). Em 2018, os resultados foram publicados e demonstram que ambas as vacinas foram seguras, bem toleradas e imunogênicas. Os melhores resultados foram observados com a VRC5283, que induziu títulos de AcN mais elevados após a segunda administração da vacina em

comparação com o VRC5288, quando administrada com injeção sem agulha (Gaudinski *et al.*, 2018). Por ser mais imunogênica, a VRC5283 foi transferida para estudos clínicos de Fase II (NCT03110770).

Nos últimos anos nosso grupo vem trabalhando no desenvolvimento de vacinas de DNA contra a dengue baseadas nas proteínas E e NS1 de DENV. Dentre essas vacinas, a vacina pE1D2 contém 80% do gene E (região correspondente ao ectodomínio da proteína do envelope) de DENV2, fusionada à sequência que codifica o peptídeo sinal derivado do ativador de plasminogênio de tecido humano (t-PA), responsável pelo direcionamento da proteína recombinante para a via de secreção. Estudos realizados com camundongos BALB/c demonstraram que a imunização com esta vacina gerou 100% de sobrevivência frente ao desafio letal por via intracerebral com DENV2 neuroadaptado a camundongos, apesar de alguns animais apresentarem sinais leves da infecção (Azevedo *et al.*, 2011, 2013). De modo semelhante, uma vacina de DNA baseada na proteína NS1 de DENV2, fusionada ao peptídeo sinal t-PA e denominada pcTPANS1, foi capaz de induzir altos níveis de proteção em camundongos desafiados tanto por via intracerebral, com DENV2 neuroadaptado, como por via intraperitoneal, com o vírus isolado de um paciente (Costa *et al.*, 2006a, 2006b, 2007).

Apesar das diversas vacinas em ensaios clínicos, a necessidade de uma vacina efetiva ainda está presente devido à ausência de uma vacina licenciada. Uma alternativa interessante é o desenvolvimento de uma vacina baseada em DNA, pois essa vacina seria indicada para o grupo de maior preocupação (mulheres grávidas ou que podem engravidar), assim como, para a população em geral. Além disso, o baixo custo de produção favorece a distribuição em países subdesenvolvidos que apresentam a circulação do vírus. Baseado em nossos conhecimentos prévios, foram construídas duas vacinas de DNA contra o ZIKV: pZKectoE, que contém o gene que codifica o ectodomínio da proteína E, e pZKNS1, que contém a sequência completa do gene que codifica a proteína NS1. Nas duas construções, o gene da proteína recombinante está fusionado à sequência que codifica o peptídeo sinal t-PA, responsável pelo direcionamento da proteína para a via de secreção. Ambas as vacinas de DNA foram baseadas em sequências do ZIKV isolados no Brasil disponíveis no GenBank no momento de sua construção.

1.10 Modelos murino para estudo da infecção pelo vírus Zika

Uma das limitações para avaliar a proteção das vacinas contra a Zika é a falta de um modelo experimental murino imunocompetente suscetível à infecção com ZIKV isolado no Brasil. Em células humanas, a proteína NS5 do ZIKV antagoniza STAT2, suprimindo a

resposta do IFN tipo I contra o vírus e contribuindo assim com a infecção. No entanto, em camundongos a STAT2 não é inibida pela NS5, o que ocasiona uma forte resposta de IFN tipo I e a supressão da replicação do ZIKV (Grant *et al.*, 2016).

Camundongos com deficiências genéticas na via de sinalização de IFN tipo I ou tratados com anticorpos anti-receptores de IFN são suscetíveis à infecção pelo ZIKV, diferente dos camundongos do tipo selvagem que conseguem controlar a infecção. Sendo assim, foram desenvolvidos diferentes modelos de infecção para permitir o estudo da patogênese do ZIKV em camundongos, dentre eles, a infecção de camundongos neonatais ou camundongo deficientes de sinalização de IFN tipo I, com inoculação de títulos extremamente altos de ZIKV e/ou inoculação de vírus por via intracerebral (Cugola *et al.*, 2016; Miner & Diamond, 2017; Winkler *et al.*, 2017). Tais modelos são extremamente úteis para a caracterização da patogênese. No entanto, como os camundongos carecem de uma resposta imune completa, eles não são os mais ideais para a análise da resposta imune geral à infecção pelo ZIKV, assim como para testes de eficácia de vacinas. A ausência da resposta de IFN-I compromete a resposta imune inata e pode interferir na resposta adaptativa. Durante uma infecção os interferons do tipo I atuam na permanência dos linfócitos nos linfonodos, o que favorece o encontro com o antígeno; regulam positivamente a expressão de moléculas de MHC de classe I; aumentam a citotoxicidade das células NK e CTLs CD8⁺, além disso, atuam na diferenciação de células T naive na subpopulação Th1 de células T auxiliares.

A passagem do vírus em um determinado órgão pode resultar na sua adaptação a um tecido ou tipo de célula específico, de modo que este se diferencie geneticamente dos isolados clínicos originais pelo acúmulo de mutações. A cepa MR766 do ZIKV derivada de um vírus isolado em 1947 na floresta de Zika em Uganda foi adaptada a camundongos por meio de mais de 100 passagens em camundongos. Posteriormente, a inoculação desse vírus por via intracraniana causou doença neurológica em camundongos lactantes ou adultos (Dick *et al.*, 1952a, 1952b).

Sendo assim, outro objetivo do nosso grupo é estabelecer um modelo murino imunocompetente com animais adultos suscetíveis à infecção pelo ZIKV, através da neuroadaptação de uma amostra isolada no Brasil, para avaliação da eficácia e da resposta imune induzida pelas vacinas de DNA.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral:

Avaliar a resposta imune gerada com vacinas de DNA contendo os genes E (pZKectoE) e NS1 (pZKNS1) de ZIKV em camundongos e o estabelecimento de um modelo murino imunocompetente suscetível à infecção com este vírus isolado no Brasil.

2.2 Objetivos específicos/metas:

- ✓ Avaliar a expressão das proteínas E e NS1 em linhagens de células de mamífero transfectadas com os plasmídeos pZKectoE e pZKNS1, respectivamente;
- ✓ Avaliar por ELISA a resposta imune humoral gerada em camundongos imunizados com as vacinas de DNA;
- ✓ Avaliar a resposta imune celular com produção IFN- γ induzida em camundongos imunizados com as vacinas de DNA pZKectoE e pZKNS1, através de ELISPOT utilizando bibliotecas de peptídeos contidos nas proteínas E e NS1 do vírus Zika, e identificar peptídeos imunodominantes;
- ✓ Obter ZIKV neuroadaptado a camundongos com passagens em cérebros de animais neonatos para o estabelecimento de um modelo experimental murino.

3. Metodologia

3.1 Vacinas de DNA

3.1.1 Plasmídeos

O plasmídeo pZKectoE contém a sequência que codifica o ectodomínio (domínios DI, DII e DIII) da proteína do envelope de ZIKV, que possui comprimento total de 1215 pares de base e corresponde a 80% da proteína (Figura 3.1A). Para esta construção foi utilizada uma sequência consenso, a partir do alinhamento de 12 sequências brasileiras, disponíveis no GenBank em 2016, com alto índice de similaridade (99% a 100%) .

Por sua vez, o plasmídeo pZKNS1 contém a sequência que codifica a proteína NS1 inteira de ZIKV, com comprimento total de 1056 pares de base (Figura 3.1B). A sequência selecionada corresponde ao gene NS1 completo de um vírus brasileiro, obtida no GenBank (KU497555.1), com alto grau de similaridade com outras sequências de NS1 de ZIKV isolados no Brasil (99% a 100%).

Ambas as construções contendo as sequências de interesse foram desenhadas e enviadas à empresa GenScript (EUA), onde foram sintetizadas e clonadas no vetor de clonagem pUC57, em bactérias *Escherichia coli* (*E. coli*). Posteriormente, no laboratório, as sequências foram subclonadas no vetor de expressão pcTPA (derivado do plasmídeo comercial pcDNA3 - Invitrogen), que contém a sequência que codifica o peptídeo sinal derivado do ativador de plasminogênio de tecido humano (t-PA), sob controle do promotor constitutivo do citomegalovírus humano (CMV).

Os plasmídeos recombinantes pZKectoE e pZKNS1 possuem a região que codifica o ectodomínio da proteína E e o gene NS1, respectivamente, sítios de enzimas de restrição flanqueando tais genes (que foram utilizados na clonagem), e um códon de término de tradução. Além disso, possuem o gene de resistência à ampicilina, para a seleção das bactérias transformadas com tais plasmídeos.

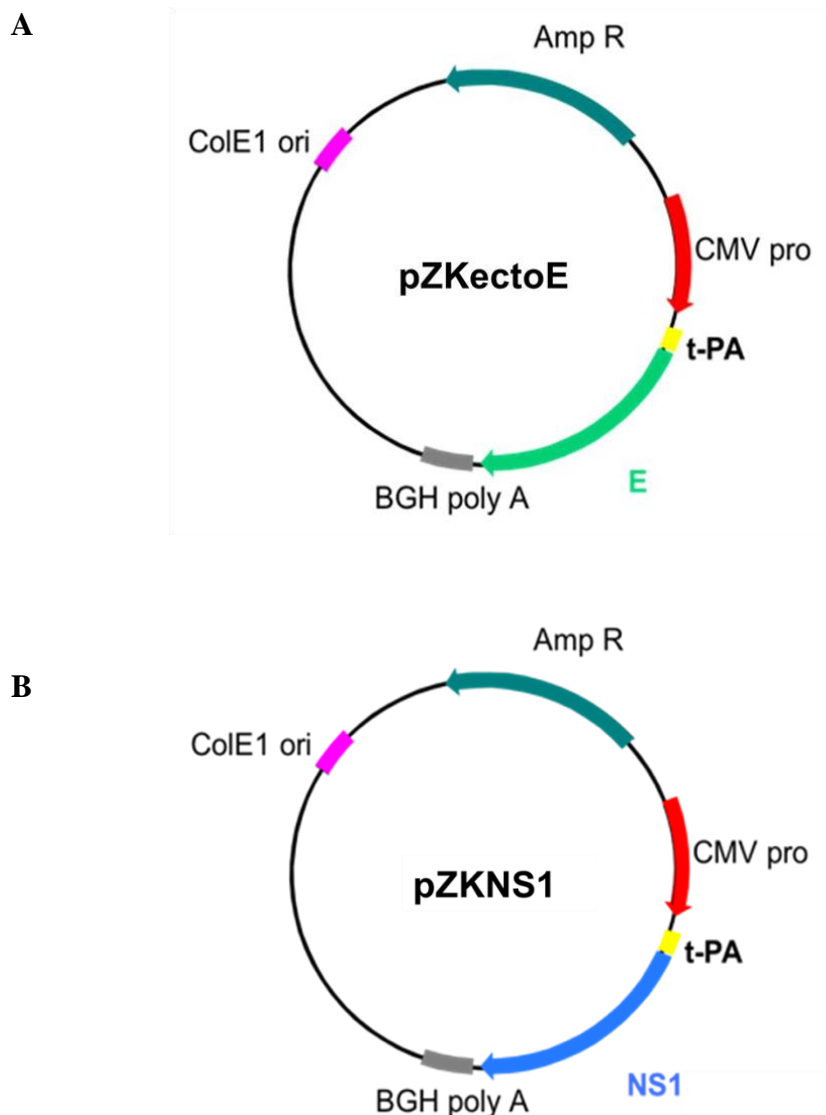


Figura 3.1 - Esquema representativo dos plasmídeos utilizados no trabalho: (A) pZKectoE, contendo a sequência que codifica o ectodomínio da proteína E de ZIKV. (B) pZKNS1 contendo a sequência que codifica a proteína NS1 de ZIKV. ColE1 ori – origem de replicação em *E. coli*; CMVpro – promotor do citomegalovírus; AmpR – gene que confere resistência à ampicilina; BGHpolyA – sequência de poliadenilação derivada do hormônio do crescimento bovino; t-PA - sequência que codifica o peptídeo sinal; E – sequência que codifica o ectodomínio da proteína E de ZIKV; NS1 – sequência que codifica a proteína NS1 de ZIKV.

3.1.2 Produção de pZKectoE, pZKNS1 e pCTPA

Para a produção de grande quantidade de DNA plasmideal, bactérias *E. coli* previamente transformadas com os plasmídeos pZKectoE ou pZKNS1 foram cultivadas em meio LB (*Luria-Bertani*) (10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 10 g de NaCl, água deionizada para completar 1 L), contendo 100 µg/mL de ampicilina. As culturas foram incubadas a 37 °C, sob agitação (120 rpm), durante a noite. No dia seguinte, 25 mL destas culturas foram adicionados a 1 L de meio TB (*Terrific Broth*) (12 g de triptona, 24 g de extrato de levedura, 4 ml de glicerol, 2,3 g de KH₂PO₄ e 12,5 g de K₂HPO₄, água deionizada

para completar 1 L), contendo 100 µg/mL de ampicilina, e mantidas a 37 °C sob agitação, durante a noite.

Utilizando o kit “Qiagen EndoFree Plasmid Mega Kit” (Qiagen), o DNA plasmidial foi extraído por lise alcalina e purificado em colunas de troca iônica, de acordo com as instruções do fabricante. Por fim, os plasmídeos foram ressuspensos em água deionizada e armazenados a -20 °C até o momento de uso. O plasmídeo controle pcTPA, sem os genes E ou NS1, também foi purificado e armazenado do mesmo modo.

Os DNAs foram quantificados em espectrofotômetro Bio Photometer (Eppendorf), no comprimento de onda de 260 nm. Para avaliação da integridade e pureza dos DNAs, foi realizada a digestão das amostras com as enzimas de restrição *EcoR* V e *Xho* I, por uma hora a 37 °C, em tampão indicado pelo fabricante. Os fragmentos gerados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TAE 1x (4,84 g de Tris, 1,142 mL de ácido acético, 2 mL de EDTA 0,5 M (pH 8,0) para 1 L), corado com Nancy – 520 (SIGMA) e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta (UV). Além disso, a região que compreende o promotor, o fragmento clonado e a cauda polyA foi sequenciada na plataforma de sequenciamento da Rede de Plataformas Tecnológicas Fiocruz.

3.1.3 Transfecção de células de mamífero com os plasmídeos recombinantes

Para a avaliação da produção das proteínas E e NS1 *in vitro*, células de rim de hamster neonato BHK-21 (ATCC, do inglês *American Type Culture Collection*, USA) foram transfectadas com as vacinas pZKectoE, pZKNS1, assim como com o controle negativo pcTPA, utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen), de acordo com instruções do fabricante. A expressão das proteínas recombinantes E e NS1 foi analisada por imunofluorescência, de acordo com protocolo já estabelecido no laboratório.

As células BHK-21 foram cultivadas em meio DMEM (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium* - SIGMA) (10 g de meio DMEM, 2,2 g de Ca(HCO₂)₂, 2 g de HEPES/L e água deionizada para completar 1 L, pH 7,4) contendo 5 % de soro fetal bovino (SFB). As células foram mantidas a 37 °C, sob ambiente úmido e 5 % de CO₂. Para a manutenção, a monocamada celular foi lavada a cada dois dias com solução salina BSS (8 g de NaCl, 0,4 g de KCl, 0,012 g de CaCl₂, 0,154 g de MgSO₄.7H₂O, 0,39 g de Na₂HPO₄.12H₂O, 0,15 g de KH₂PO₄, 1,1 g de glicose, 0,0025 g de vermelho de fenol, água deionizada para completar 1 L, pH 7,4). A propagação das culturas foi realizada através da lavagem com solução salina BSS-CMF (8 g de NaCl, 0,4 g de KCl, 0,1 g de Na₂SO₄, 0,39 g de Na₂HPO₄.12H₂O, 0,15 g

de KH_2PO_4 , 1,1 g de glicose, 0,0025 g de vermelho de fenol e água deionizada para completar 1 L, pH 7,4), com dissociação utilizando tripsina (Invitrogen).

Para imunofluorescência, foram plaqueadas $2,5 \times 10^4$ células por poço em lâminas contendo 8 câmaras (Lab-Tek, NUNC). No dia seguinte, as células foram transfectadas com 0,8 μg de um dos plasmídeos (pZKectoE, pZKNS1 e pcTPA) e 2 μL de lipofectamina (Invitrogen), em meio OPTMEM (Invitrogen). Cinco horas após a transfecção, o meio OPTMEM foi substituído pelo meio de manutenção das células (DMEM com 5 % de SFB).

No dia seguinte, as células foram fixadas com 4 % de paraformaldeído em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4), permeabilizadas com 0,6 % de saponina e bloqueadas com 1 % de albumina (SIGMA). Para avaliar a expressão da proteína E, as células foram incubadas com diferentes anticorpos policlonais: soro de camundongo infectados com ZIKV (anti-ZIKV – diluição 1:100), soro de coelho anti-domínio III da proteína E (anti-DIII de ZIKV - diluição 1:100) e soro de macaco infectado com ZIKV (anti-ZIKV - diluição 1:50). De modo semelhante, para detecção da proteína NS1 foram utilizados os soros de camundongo (diluição 1:100) e macaco (diluição 1:50), ambos anti-ZIKV, e um soro de coelho anti-NS1 de ZIKV (diluição 1:100).

Após uma hora de incubação a 37 °C, as células foram lavadas com tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) e, em seguida, foi adicionado o anticorpo conjugado a um fluoróforo para sua visualização. As células marcadas com soro de camundongo, coelho e de macaco foram incubadas com anticorpo anti-IgG de camundongo (conjugado à FITC), de coelho (conjugado à Alexa 488) e humano (conjugado à FITC), respectivamente. As células foram visualizadas em microscópio de fluorescência Eclipse 50i (Nikon).

3.1.4 Imunização de camundongos BALB/c

Os experimentos com animais foram realizados em conformidade com os princípios éticos determinados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Oswaldo Cruz (CEUA-IOC) (L-025/2016).

Grupos de camundongos machos BALB/c, com quatro semanas de idade, foram inoculados com duas doses de uma das vacinas: pZKectoE, pZKNS1 ou com o controle negativo pcTPA. As doses foram administradas por via intramuscular nos quadríceps posteriores dos animais, utilizando seringa de insulina com agulha ultrafina 30 G (Becton Dickinson). Em cada dose, os animais receberam 100 μg de DNA / 100 μl de PBS (50 μg /pata) com um intervalo de duas semanas entre as imunizações.

Duas semanas após a segunda dose de DNA os animais foram eutanasiados, o baço e sangue foram coletados para a avaliação da resposta imune celular e humoral, utilizando os esplenócitos e soro, respectivamente. Para o soro pré imune, o sangue foi coletado por punção retro-orbital, antes da primeira dose de DNA. Para a sangria por punção retro-orbital os camundongos foram anestesiados por via intramuscular com 100 µL de uma solução composta por 80 µL/mL de cloridrato de cetamina 10% (Konig), 200 µL/mL de cloridrato de xilazina 10% (Konig) e 720 µL/mL de solução salina estéril. Para a eutanásia foram utilizados 100 µL desta solução, com concentração dobrada (160 µL/mL de cloridrato de cetamina 10% (Konig), 400 µL/mL de cloridrato de xilazina 10% (Konig) e 440 µL/mL de solução salina estéril).

3.1.5 Detecção de anticorpos por ELISA

O ELISA (do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*) foi utilizado para quantificar os títulos dos anticorpos gerados nos camundongos BALB/c após a imunização com as vacinas de DNA (de acordo com o protocolo descrito no item 3.4) ou inoculação de ZIKV. Para obtenção de soro imune os animais foram anestesiados e o sangue foi coletado por punção cardíaca.

Para estabelecer a concentração dos antígenos a ser utilizada, inicialmente as placas de ELISA MaxiSorp (Nunc) de 96 poços foram sensibilizadas com 400 ng, 200 ng ou 100 ng por poço da proteína recombinante E (domínio DIII) de ZIKV em 100µL de PBS por poço, ou com 200 ng, 100 ng ou 50 ng da proteína recombinante NS1 de ZIKV. Ambas as proteínas foram produzidas em *E. coli* (gentilmente cedidas pelo Dr. Luis Carlos Ferreira, do Instituto de Biologia, USP). A melhor concentração destas proteínas foi escolhida para os testes posteriores.

Para a detecção de anticorpos anti-E ou anti- NS1, placas de ELISA MaxiSorp (Nunc) de 96 poços foram sensibilizadas com a proteína E ou NS1, respectivamente, por uma hora a 37 °C e em seguida os poços foram bloqueados com tampão de bloqueio (2 % de leite desnatado em PBS/Tween 0,05 %) a 4 °C durante a noite.

No dia seguinte, as placas foram lavadas com PBS/Tween 0,05 % e os soros dos animais foram adicionados às placas de ELISA, em diluições seriadas e em duplicatas, e incubados por uma hora a 37 °C. Em seguida, as placas foram novamente lavadas com PBS/Tween 0,05 % e incubadas por uma hora a 37 °C, com o segundo anticorpo (anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase - Southern Biotechnology), diluído em PBS (1:4000).

Após lavagem com PBS/Tween 0,05 %, foram adicionados 100 µL por poço de solução reveladora: 10 mg de OPD (O-fenilendiamina dihidrocloro – SIGMA) dissolvidos em 25 mL de tampão citrato (33 mM, pH 5,0) e 10 µL de peróxido de hidrogênio. Após 20 minutos, a reação foi interrompida com H₂SO₄ 9N e a leitura realizada a 490 nm no leitor de microplaca (Spectra Max 190, Molecular Devices).

Os títulos de anticorpos específicos foram estabelecidos através da regressão linear dos valores obtidos nas diluições logo acima e logo abaixo do valor de absorbância do soro pré-imune, conforme já descrito (Costa *et al.*, 2006; Gonçalves *et al.*, 2015). As diferenças dos títulos de anticorpos foram avaliadas pelo teste não paramétrico Mann-Whitney two-tailed, utilizando o programa GraphPad Prism v9.1.2, com nível de significância mínima de 95 %.

3.1.6 Ensaio de ELISPOT

Para avaliação da resposta celular induzida pelas vacinas de DNA e identificação dos peptídeos imunodominantes nas proteínas E e NS1, foram realizados ensaios de ELISPOT (do inglês, *Enzyme-Linked ImmunoSpot*) para detectar células produtoras de IFN- γ mediante estímulo com peptídeos.

Grupos de camundongos foram imunizados com duas doses dos plasmídeos, de acordo com o protocolo descrito no item 3.4, e duas semanas após a segunda dose da vacina os animais foram anestesiados e submetidos à eutanásia. Foram coletados o sangue, por punção cardíaca para obtenção de soro imune, e o baço. Um grupo controle foi inoculado com o plasmídeo pCTPA.

Com auxílio de peneiras, os baços foram macerados com PBS em placas de Petri e processados individualmente. As amostras foram transferidas para tubos contendo 15 mL de PBS e as suspensões foram sedimentadas por 10 minutos no gelo para remoção das cápsulas e agregados. Posteriormente, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e centrifugado por 10 minutos a 500 xg, 4 °C. Na etapa seguinte, o sobrenadante foi desprezado e 5 mL da solução BD Pharm Lyse (BD Biosciences) estéril foi adicionada ao pellet para lise de hemácias (10 minutos). Para bloquear a solução de lise, foi adicionado PBS e as células foram novamente centrifugadas por 10 minutos a 500 xg. Por fim, o sobrenadante foi descartado e as células foram suspensas em 2 mL de meio RPMI-1640 (SIGMA) suplementado com 10 % SFB (Invitrogen), 1 % de L-glutamina 200 nM (Sigma), acrescentado de sulfato de gentamicina (40 ng/mL, Sigma) para a contagem das células viáveis em câmara de Neubauer utilizando o corante azul de Trypan.

Os esplenócitos obtidos dos camundongos imunizados com a vacina pZKectoE e pZKNS1 foram estimulados com uma biblioteca de peptídeos contidos no ectodomínio da proteína E ou na proteína NS1 de ZIKV (linhagem africana – acesso GenBank: NC 012532.1), respectivamente. Ambas as bibliotecas são compostas por peptídeos com extensão de 15 aminoácidos cada, com sobreposição de 11 aminoácidos em relação ao peptídeo adjacente, e foram gentilmente cedidas pelo Dr. Helton da Costa Santiago (UFMG) que junto com o nosso grupo faz parte do INCTV coordenado pelo Dr. Ricardo Gazzineli (Fiocruz MG/UFMG). Inicialmente os peptídeos da biblioteca da proteína E (total 80 peptídeos) foram agrupados em 8 pools contendo 10 peptídeos sequenciais cada, já os peptídeos da proteína NS1 (total 71 peptídeos) agruparam-se em 7 pools. Realizamos uma análise mais inclusiva, utilizando um valor de corte arbitrário de 5 *spots*. Sendo assim, consideramos positivas todas as amostras acima deste valor, desde que também acima do detectado no controle negativo, esplenócitos coletados de camundongos inoculados com o plasmídeo pCTPA ou não inoculados e estimulados com os mesmo peptídeos.

Inicialmente, as suspensões celulares obtidas a partir dos baços de camundongos vacinados (pZKectoE ou PZKNS1) ou controles foram analisadas em pools na concentração de 5×10^6 células/mL e testadas em triplicatas com o *kit* BD ELISPOT IFN- γ Mouse gamma-Set (BD), conforme as recomendações do fabricante. Resumidamente, as células foram acondicionadas em placas de 96 poços, previamente sensibilizadas com anticorpo monoclonal de captura anti-IFN- γ de camundongo (5 mg/mL em 100 μ L/poço) a 4 °C durante a noite e no dia seguinte, lavadas e bloqueadas com meio RPMI-1640 (SIGMA) suplementado com 10 % SFB (200 μ L/poço) por duas horas a 37 °C.

Essas placas receberam 100 μ L/poço da suspensão celular, juntamente com 100 μ L/poço da solução dos peptídeos sintéticos (2,0 μ g/poço) ou de concanavalina A (2,0 μ g/poço). Para o controle negativo do ensaio, as células não foram estimuladas, sendo incubadas somente com meio RPMI-1640 suplementado no volume total de 200 μ L/poço (*background*). As placas foram incubadas por 18 horas a 37 °C, em atmosfera úmida com 5 % de CO₂. Após este período, as células foram desprezadas e as placas foram lavadas com água deionizada e com PBS/Tween 0,05 %, incubadas com anticorpo de detecção anti-IFN- γ biotilado por duas horas a temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas e incubadas com estreptavidina/peroxidase por uma hora. Posteriormente, as placas foram lavadas com PBS e reveladas por 20 minutos com a adição do substrato AEC (BD/Pharmingen). Por fim, a reação foi interrompida com a lavagem da placa com água deionizada. Posteriormente, os *spots* foram contados no leitor automatizado Immunospot

(AMBRIEX, Cellular Technology Ltd.) da Plataforma Multiusuário de ELISPOT da Rede de Plataformas Tecnológicas da Fiocruz.

Após identificação dos pools positivos, conforme descrito acima, novos ensaios de ELISPOT foram realizados para triagem individual dos peptídeos contidos nesses pools, com intuito de determinar os peptídeos envolvidos na resposta imune mediada pelas vacinas. Para a confirmação dos peptídeos que foram capazes de estimular a resposta celular com produção de IFN- γ foi realizado um novo ensaio de ELISPOT com esplenócitos e peptídeos testados individualmente.

Todos os resultados foram expressos como a média das triplicatas das células formadoras de pontos (CFP) em 5×10^5 células por poço, após a subtração dos valores detectados em esplenócitos não estimulados, incubados somente com o meio (*background*). As diferenças de ativação da resposta celular foram avaliadas pelo método não paramétrico ANOVA, utilizando o programa GraphPad Prism v8.1, com nível de significância mínima de 95%.

3.1.7 Análise computacional da localização dos peptídeos selecionados

Para determinar a localização dos peptídeos na estrutura tridimensional das proteínas E e NS1, inicialmente foi realizada uma varredura na base de dados SWISS-MODEL, para identificar a estrutura tridimensional com maior identidade com as sequências de aminoácidos codificadas pelos plasmídeos pZKectoE e pZKNS1. Após selecionar estrutura tridimensional das proteínas E e NS1, a visualização e localização dos peptídeos foi realizada através do *PyMOL Version 2.5.0*.

3.2 Neuroadaptação de um isolado de ZIKV

Visando estabelecer um modelo murino imunocompetente susceptível à infecção com o vírus Zika isolado no Brasil, foram realizadas sucessivas passagens em cérebros de camundongos neonatos com ZIKV obtido de um paciente no Espírito Santo e gentilmente cedido pela Dra. Ana Bispo (Laboratório de Flavivírus, IOC-Fiocruz).

Camundongos Swiss foram acasalados e todo o período gestacional das fêmeas até o nascimento dos filhotes foi acompanhado. Previamente, foi feita uma cinética da infecção com inoculação do vírus ($15\mu\text{L}/\text{animal}$) por via intracerebral (i.c.) em camundongos neonatos, com 3 dias de vida, a fim de identificar o pico de detecção viral no cérebro destes animais. Para a detecção dos títulos virais, os cérebros dos animais foram processados e as amostras

foram tituladas através de ensaio de formação de plaques em cultura de célula VERO, conforme descrito no item 3.2.1.

Grupos de camundongos Swiss recém-nascidos, inicialmente com três dias de vida, foram infectados por via i.c. Todos os animais de uma mesma ninhada (variando de 3 a 14 animais por ninhada) foram inoculados com o mesmo volume e isolado viral. Os animais com menos de sete dias não foram anestesiados, já animais com sete dias ou mais foram previamente anestesiados com Isoflurano e então inoculados com o ZIKV. Sete dias após a infecção, foi realizada a eutanásia dos animais, previamente anestesiados com Isoflurano. Os cérebros dos camundongos foram coletados, macerados em ambiente estéril com 4 µL/ 1mg de meio E199 (Meio 199 com Sais de Earle - Gibco, Life Technologies) (9,5 g de meio 199 Earle, 2,2 g de NaHCO₃, 1 % v/v de gentamicina, 2,5 mL de HEPES 1 M, pH = 7.4, água deionizada para completar 1 L), e submetidos a duas etapas de centrifugação (10 minutos a 1660 xg) para a remoção de todo material particulado, sendo recolhido apenas o sobrenadante. Todas as amostras foram tituladas em ensaio de formação de plaques para quantificação da carga viral. As suspensões de vírus provenientes dos cérebros dos camundongos foram estocadas a -80 °C. Posteriormente, a amostra de cada passagem com maior título viral foi utilizada para a inoculação no cérebro de outros camundongos, ou seja, para a passagem subsequente.

Com o avançar das passagens, o inóculo viral foi feito em neonatos com mais dias de vida. Além disso, a partir da segunda passagem, o volume do inóculo foi modificado para 20 µL, conforme detalhado na tabela abaixo.

Tabela 3.1: Neuroadaptação ZIKV: Idade dos camundongos e o volume inoculado em cada passagem.

Passagem	Idade	Volume inoculado
1ª passagem	3 dias	15µL
2ª passagem	3 dias	20µL
3ª passagem	2 dias	20µL
4ª passagem	4 dias	20µL
5ª passagem	4 dias	20µL
6ª passagem	5 dias	20µL
7ª passagem	6 dias	20µL
8ª passagem	8 dias	20µL
9ª passagem	9 dias	20µL
10ª passagem	8 dias	20µL
11ª passagem	9 dias	20µL
12ª passagem	9 dias	20µL

Também foram realizados experimentos de acompanhamento para avaliar se a inoculação intracerebral da amostra viral era capaz de gerar sinais clínicos da infecção em animais mais velhos. Quatro camundongos Swiss com 16 dias de vida foram inoculados com a amostra de ZIKV da 12^a passagem. Após inóculo os animais foram acompanhados diariamente para avaliar sinais clínicos da infecção.

Além disso, camundongos machos BALB/c com 7 semanas foram inoculados com a 11^a passagem do ZIKV. Os animais foram anestesiados por via intramuscular com cetamina e xilazina (80 µL/mL de cloridrato de cetamina 10% (Konig), 200 µL/mL de cloridrato de xilazina 10% (Konig) e 720 µL/mL de solução salina estéril) e inoculados por via i.c. com 30 µL ZIKV. Os camundongos foram monitorados durante 49 dias após a inoculação viral, para avaliar a existência de sinais clínicos da infecção.

3.2.1 Titulação viral

Células VERO (Rim de Macaco Verde) foram mantidas em meio E199 suplementado com 5 % de SFB a 37 °C, sob atmosfera úmida e 5 % de CO₂. A propagação das culturas foi realizada através da lavagem com solução salina contendo 0,1 % de Verseno (v/v) (solução estoque de Verseno 5%: 50g de EDTA, 1 mL de vermelho de fenol 1% e água deionizada para completar 1L, pH 7,6), com dissociação utilizando tripsina (Invitrogen). No dia anterior ao experimento, as células foram cultivadas em placas de 24 poços na concentração de 10⁵ células por poço em 1,0 mL de meio E199 suplementado com SFB e mantidas overnight a 37 °C, sob atmosfera úmida e 5 % de CO₂.

No dia do experimento, após diluição da amostra a ser titulada, o sobrenadante das células foi coletado e em seguida as células foram mantidas com as diferentes diluições virais por 1 hora a 37 °C, sob atmosfera úmida e 5 % de CO₂. Posteriormente, o sobrenadante das células foi descartado e 1 mL do meio semissólido E199 (meio E199 e 2% p/v de carboximetilcelulose, CMC - SIGMA) foi adicionado a cada poço. As placas foram incubadas por 4 ou 5 dias a 37 °C, sob atmosfera úmida e 5 % de CO₂. Passado o período de incubação, as placas foram fixadas com formalina 10 % e coradas com cristal violeta 0,02 %. Os plaques foram contados manualmente.

3.2.2 Sequenciamento de ZIKV

O genoma viral da amostra inicial (P0), assim como as passagens 2 e 4 (P2 e P4) da neuroadaptação foram sequenciadas pelo método de Sequenciamento de Alto Rendimento de

Nova Geração, em colaboração com a Dra. Ana Maria Bispo de Filippis do Laboratório de Flavivírus- IOC/Fiocruz. Posteriormente, as sequências obtidas foram alinhadas através da ferramenta BLASTn do NCBI/NIH e analisadas.

4. Resultados

4.1 Avaliação das vacinas de DNA

4.1.1 Purificação dos plasmídeos e confirmação de sua integridade

Os plasmídeos pZKectoE e pZKNS1 foram isolados, por lise alcalina de culturas de bactérias *E.coli* transfectadas, e purificados em colunas de troca iônica. Para confirmar a integridade e pureza do DNA, os plasmídeos foram submetidos à digestão com as enzimas de restrição *EcoR* V e *Xho* I e os fragmentos foram analisados por eletroforese, em gel de agarose. Conforme esperado, a digestão dos plasmídeos liberou os insertos clonados (Figura 4.1): fragmentos de 5,5 kb e 1,2 kb (inserto) na digestão do plasmídeo pZKectoE, e fragmentos de 5,5 kb e 1,1 kb (inserto), na digestão do plasmídeo pZKNS1. Além disso, o sequenciamento dos fragmentos clonados nos plasmídeos pZKectoE e pZKNS1 e alinhamento com as sequências originais confirmou o quadro de leitura aberto dos genes E e NS1, respectivamente.

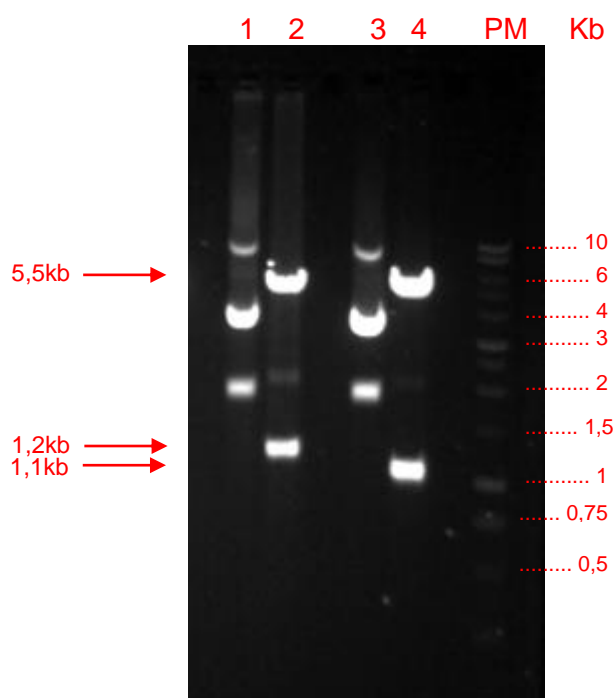


Figura 4.1 - Eletroforese em gel de agarose da digestão dos plasmídeos pZKectoE e pZKNS1 com as enzimas de restrição *EcoR* V e *Xho* I. Linha 1: pZKectoE não digerido; Linha 2: pZKectoE digerido com *EcoR* V e *Xho* I; Linha 3: pZKNS1 não digerido; Linha 4: pZKNS1 digerido com *EcoR* V e *Xho* I; PM: peso molecular 1Kb DNA.

4.1.2 Transfecção de células de mamífero com os plasmídeos recombinantes e detecção das proteínas recombinantes

Para a avaliação da produção das proteínas E e NS1 *in vitro*, células BHK-21 foram transfectadas com os plasmídeos pZKectoE e pZKNS1. A proteína recombinante E foi identificada a partir da incubação com diferentes anticorpos policlonais: soro de camundongo infectado com ZIKV (anti-ZIKV), soro de coelho anti-domínio III da proteína E de ZIKV (anti-DIII) e soro de macaco infectado com ZIKV (anti-ZIKV). Quando utilizamos os anticorpos anti-ZIKV produzidos em macaco ou anti-DIII produzido em coelho, observamos que o plasmídeo pZKectoE, que contém a sequência que codifica o ectodomínio da proteína E de ZIKV, foi capaz de mediar a expressão da proteína (Figura 4.2). Não foi possível detectar a proteína E quando utilizamos o soro de camundongos infectados com ZIKV na diluição testada (1:100).

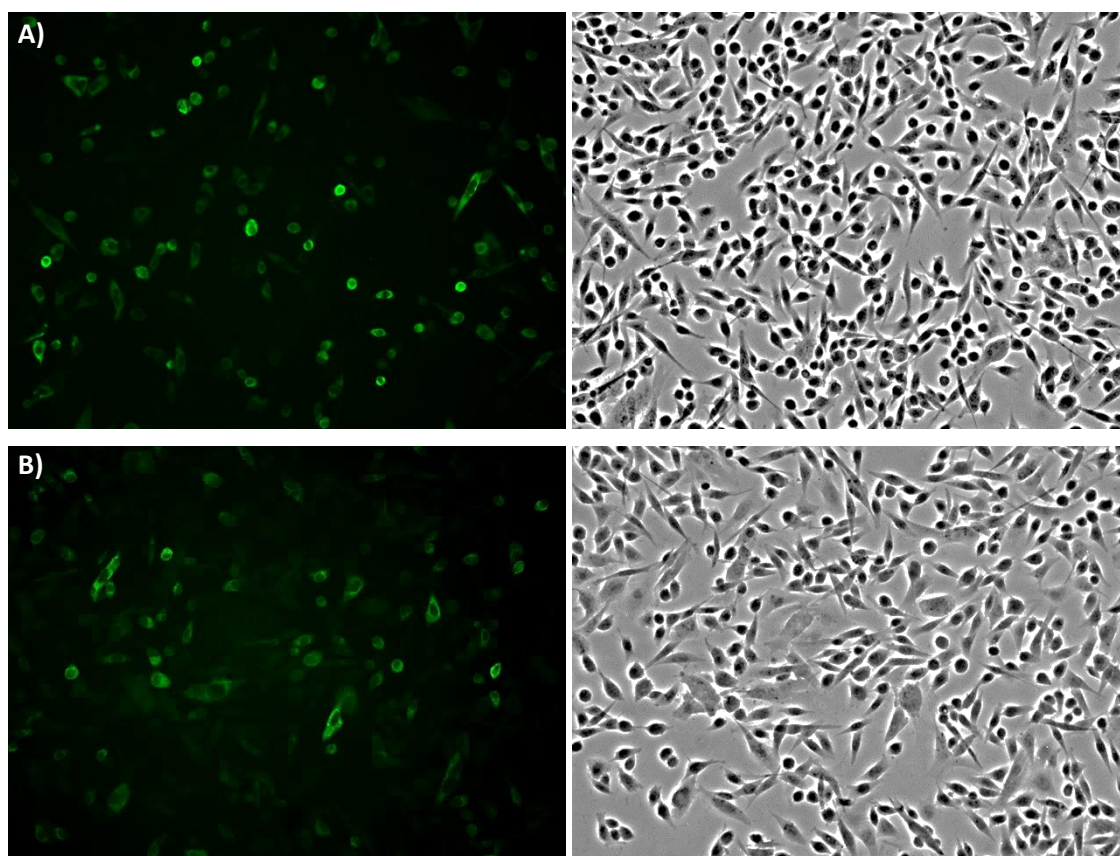


Figura 4.2: Células BHK-21 transfectadas com o plasmídeo pZKectoE. À esquerda fotomicrografia de fluorescência e a direita fotomicrografia em campo claro, com aumento de 200x. As células foram incubadas com (A) soro de coelho anti-DIII de ZIKV ou (B) soro de macaco anti-ZIKV e reveladas com anticorpo anti-IgG (A) de coelho ou (B) humano conjugado a fluoresceína.

De modo semelhante, para detecção da proteína NS1 foram utilizados os soros de camundongo e macaco, ambos infectados com ZIKV (anti-ZIKV), e um soro de coelho anti-NS1 de ZIKV. As células transfectadas com o plasmídeo pZKNS1, que contém o gene NS1

completo de Zika, expressaram a proteína recombinante NS1, com reação positiva quando incubadas com todos os anticorpos acima listados (Figura 4.3).

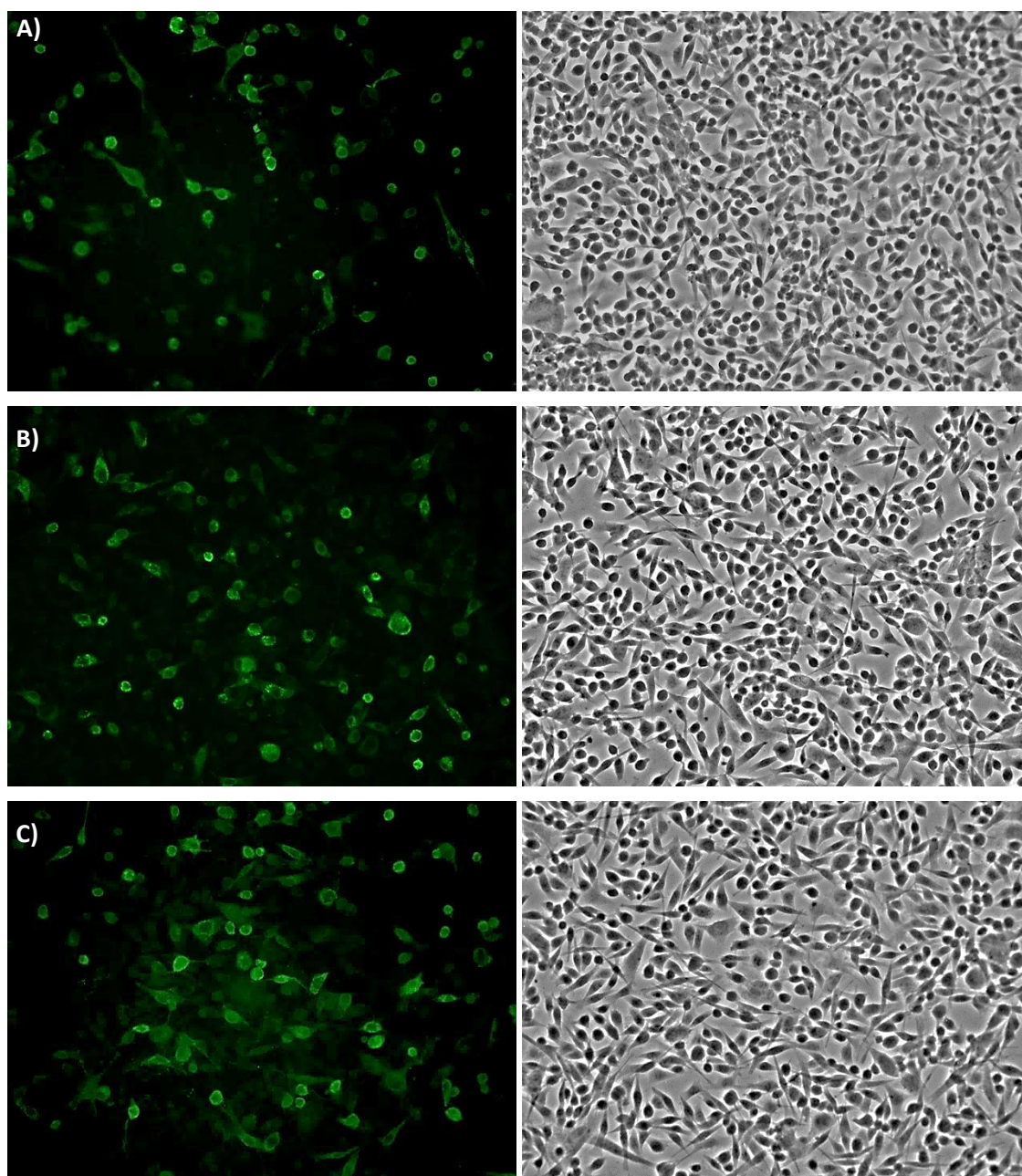


Figura 4.3: Células BHK-21 transfectadas com o plasmídeo pZKNS1. À esquerda fotomicrografia de fluorescência e a direita fotomicrografia em campo claro, com aumento de 200x. As células foram incubadas com (A) soro de camundongo anti-ZIKV, (B) soro de coelho anti-NS1 de ZIKV ou (C) soro de macaco anti-ZIKV e reveladas com anticorpo anti-IgG (A) de camundongo, (B) de coelho ou (C) humano conjugado a fluoresceína.

Como controle negativo, as células foram transfectadas com o plasmídeo pcTPA, que possui apenas a sequência que codifica o peptídeo sinal t-PA. Conforme esperado, as células não apresentaram marcação positiva (Figura 4.4).

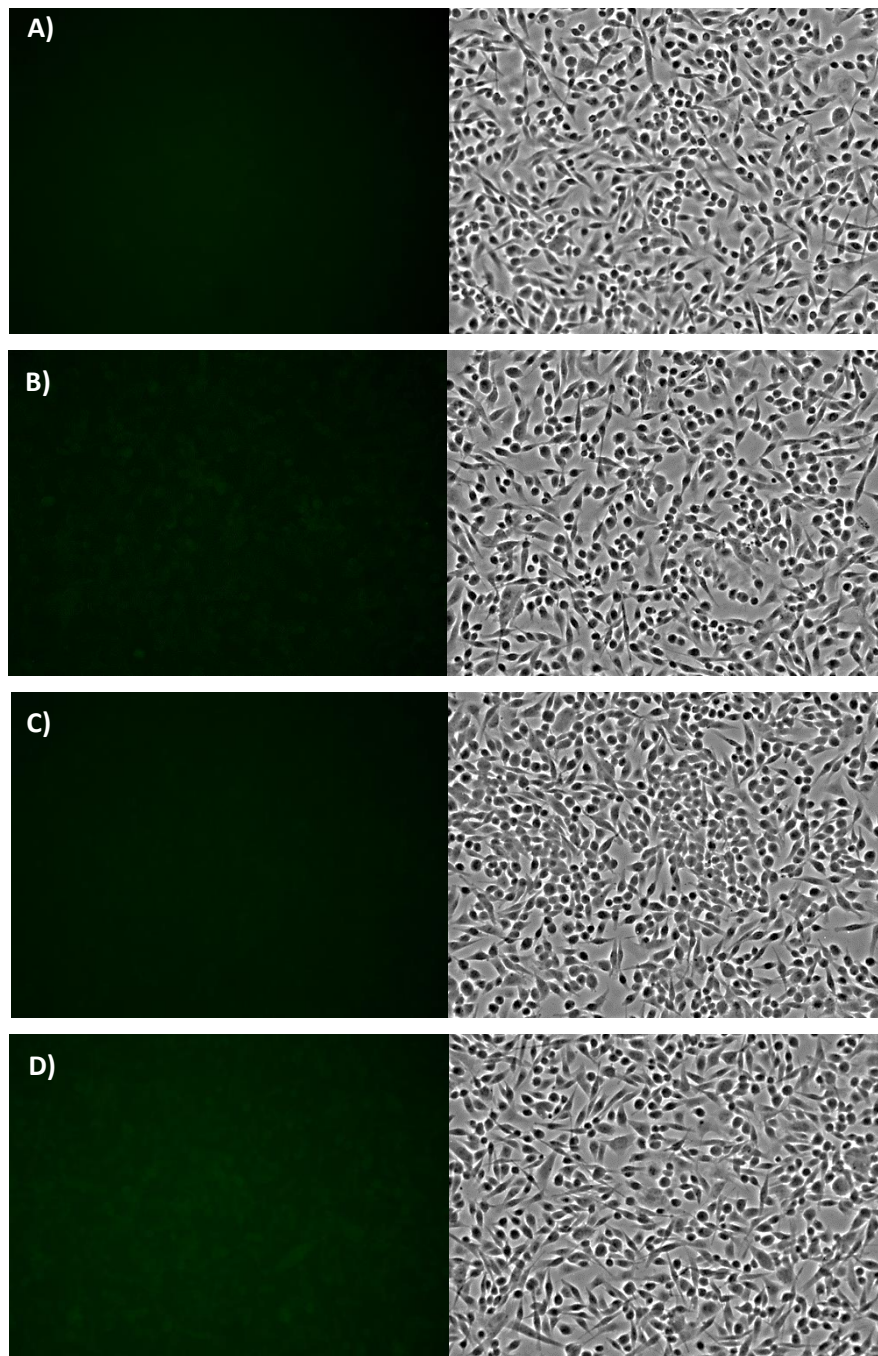


Figura 4.4: Células BHK-21 transfectadas com o plasmídeo pcTPA. À esquerda fotomicrografia de fluorescência e a direita fotomicrografia em campo claro, com aumento de 200x. As células foram incubadas com (A) soro de camundongo anti-ZIKV, (B) soro de coelho anti-NS1 de ZIKV, (C) soro de coelho anti-DIII de ZIKV ou (D) soro de macaco anti-ZIKV e reveladas com anticorpo anti-IgG (A) de camundongo, (B e C) de coelho ou (D) humano conjugado a fluoresceína.

4.1.3 Resposta imune humoral induzida com as vacinas de DNA

Para avaliar a resposta imune humoral induzida pela inoculação dos plasmídeos pZKectoE e pZKNS1, grupos de camundongos BALB/c foram imunizados com duas doses de uma das vacinas e duas semanas após a segunda dose de DNA, os animais foram eutanasiados

e foi realizada a coleta do soro destes animais. Os anticorpos específicos contra as proteínas E e NS1 foram quantificados por ELISA, utilizando como antígenos o domínio III da proteína E e a proteína NS1, respectivamente. Como controle negativo, avaliamos a presença de anticorpos específicos para a proteína E ou NS1 em animais inoculados com o plasmídeo pcTPA.

4. 1.3.1 Vacina pZKectoE

Inicialmente para definir a concentração de antígeno a ser utilizada, foram testadas três concentrações do domínio III da proteína E. Placas de ELISA foram sensibilizadas com 400 ng, 200 ng ou 100 ng por poço da proteína recombinante, e avaliamos o título de anticorpos no soro de camundongos BALB/c inoculados com ZIKV (49 dpi), agrupados em pool (n = 5). Foi possível detectar anticorpos específicos contra o domínio III da proteína E nas diferentes concentrações testadas (Figura 4.5).

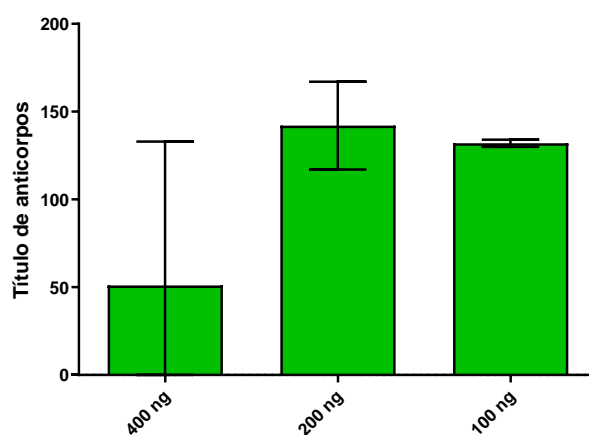


Figura 4.5: Título dos anticorpos IgG anti-domínio III da proteína E de ZIKV presentes no soro dos camundongos inoculados com ZIKV (49 dpi). Os anticorpos foram quantificados por ELISA, utilizando diferentes concentrações do domínio III da proteína E de ZIKV produzido em *E. coli*, como antígeno de fase sólida. As barras representam a média dos valores obtidos. O soro de animais não imunizados foi utilizado para o cálculo do título dos anticorpos.

Posteriormente, avaliamos a resposta imune humoral gerada pela vacina baseada na proteína E utilizando 200 ng da proteína recombinante nas placas de ELISA e testando os soros individualmente. O plasmídeo pZKectoE induziu a produção de anticorpos específicos contra o domínio III da proteína E (Figura 4.6), com título de 776 (níveis de anticorpos específicos dos 10 animais variaram entre 221 e 967) apresentando diferença significativa em relação aos animais inoculados com o controle pcTPA (106, média dos dois pools).

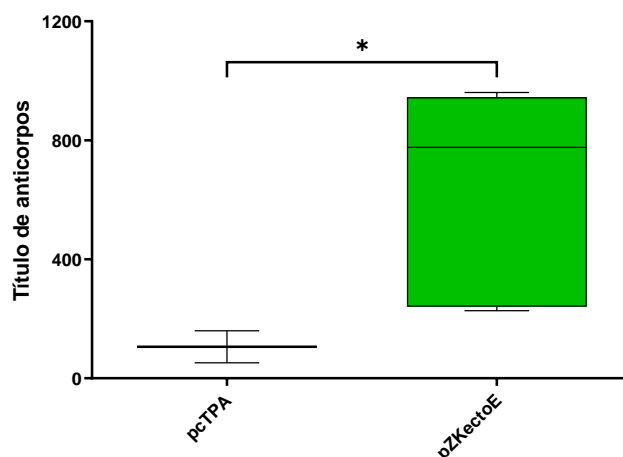


Figura 4.6: Título dos anticorpos IgG anti-domínio III da proteína E de ZIKV presentes no soro dos camundongos inoculados com o plasmídeo pZKectoE. Os anticorpos foram quantificados por ELISA, utilizando o domínio III da proteína E de ZIKV produzido em *E. coli* como antígeno de fase sólida e o soro dos animais coletados duas semanas após a segunda dose de DNA. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais (* $p < 0,05$). Estes dados representam dois experimentos independentes (N total = 10; 5 animais/ experimento). Os soros dos animais inoculados com o plasmídeo pcTPA foram organizados em 2 pools distintos (n=5 e n=3).

4. 1.3.2 Vacina pZKNS1

Semelhante à padronização que realizamos para proteína E, previamente testamos três concentrações distintas da proteína recombinante NS1 de ZIKV para definir a melhor concentração de antígeno a ser utilizada nos experimentos seguintes (200 ng, 100 ng ou 50 ng). Para essa análise, utilizamos o soro de camundongos BALB/c inoculados com ZIKV (49 dpi) em pool (n = 5). Em todas as concentrações testadas foi possível detectar anticorpos específicos contra a proteína NS1 (Figura 4.7).

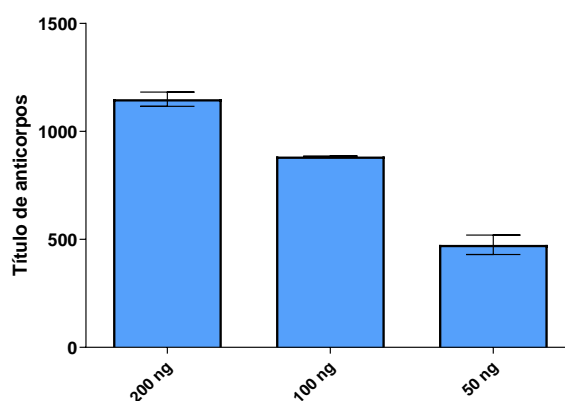


Figura 4.7: Título dos anticorpos IgG anti-NS1 de ZIKV presentes no soro dos camundongos inoculados com ZIKV (49 dpi). Os anticorpos foram quantificados por ELISA, utilizando diferentes concentrações do domínio NS1 de ZIKV produzido em *E. coli*, como antígeno de fase sólida. As barras representam a média dos valores obtidos. O soro de animais não imunizados foi utilizado para o cálculo do título dos anticorpos.

Para as análises seguintes utilizamos 100 ng da proteína recombinante NS1. Em relação à resposta imune humoral induzida pela vacina pZKNS1, observamos que a imunização com esta vacina foi capaz de induzir anticorpos específicos contra a proteína NS1 com média de 658 (10 animais), cujos valores variaram de 210 à 968. Foi observada uma diferença significativa quando comparamos com os animais inoculados com o controle pcTPA (60, média dos 2 pools) (Figura 4.8).

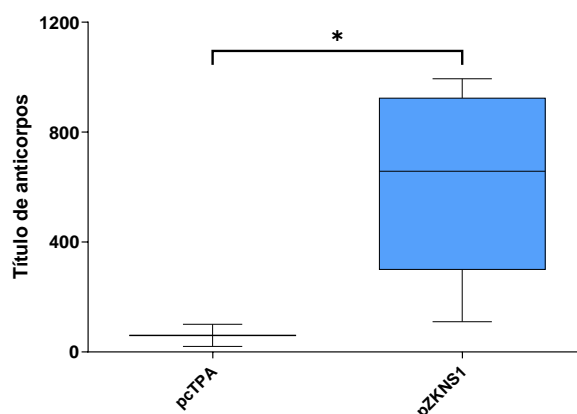


Figura 4.8: Título dos anticorpos IgG anti-NS1 de ZIKV presentes no soro dos camundongos inoculados com o plasmídeo pZKNS1. Os anticorpos foram quantificados por ELISA, utilizando a proteína NS1 de ZIKV produzida em *E. coli* como antígeno de fase sólida e o soro dos animais coletados duas semanas após a segunda dose de DNA. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas significativas entre os grupos experimentais (* $p < 0,05$). Estes dados representam dois experimentos independentes (N total = 10; 5 animais/ experimento). O soro dos animais inoculados com o plasmídeo pcTPA foram organizados em 2 pools distintos (n=5 e n=3).

4. 1.4 Resposta imune celular induzida com as vacinas de DNA

A ativação da resposta imune celular pelas vacinas de DNA foi avaliada através da produção de IFN- γ em ensaios de ELISPOT. Além disso, também foram identificados os peptídeos imunodominantes contidos nas proteínas E e NS1. Os esplenócitos obtidos dos camundongos imunizados com a vacina pZKectoE foram estimulados com uma biblioteca de peptídeos que engloba o ectodomínio da proteína E de ZIKV. Por sua vez, os esplenócitos dos camundongos imunizados com a vacina pZKNS1 foram estimulados com outra biblioteca de peptídeos contidos na proteína NS1 de ZIKV da linhagem africana.

4.1.4.1 Vacina pZKectoE

Inicialmente os peptídeos da biblioteca da proteína E foram agrupados em 8 pools contendo 10 peptídeos sequenciais em cada pool. Os esplenócitos dos camundongos imunizados com a vacina pZKectoE responderam produzindo IFN- γ quando estimulados com

os pools 1, 2, 5, 7 e 8 (Figura 4.9). Como esperado, as células dos animais não inoculados (naives) ou inoculados com o controle negativo, pcTPA, não reagiram a nenhum dos pools de peptídeos.

Como controle positivo, as células foram estimuladas inespecificamente com o mitógeno Concanavalina A (ConA). Os esplenócitos de todos os grupos, quando estimulados com ConA, responderam com a produção de IFN- γ , demonstrando a viabilidade das células durante a realização do experimento.

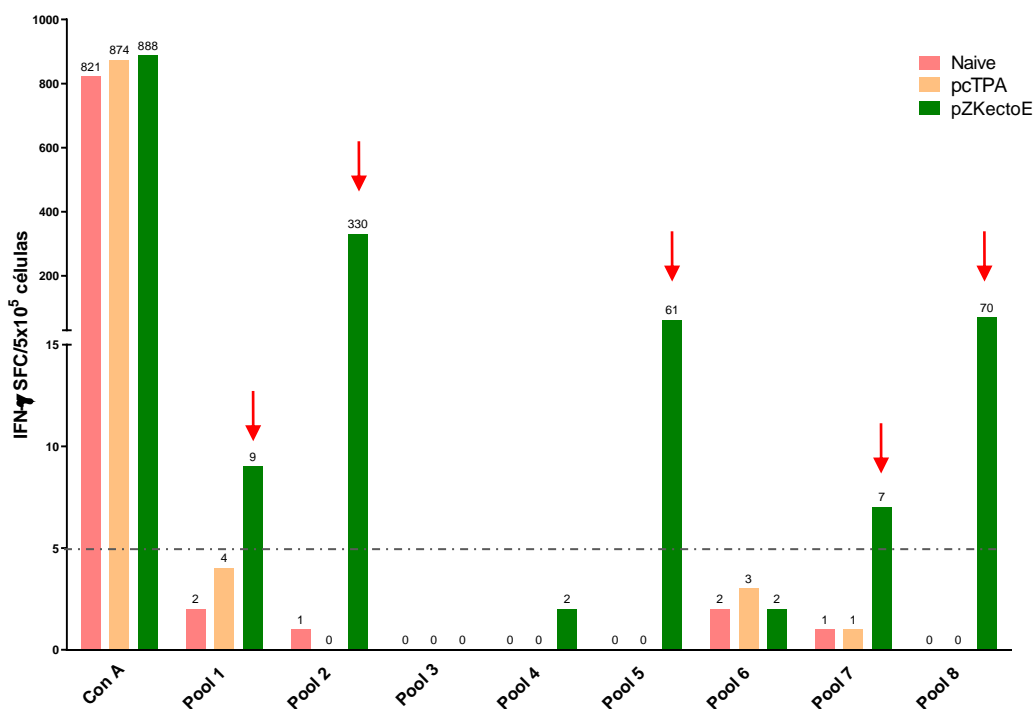


Figura 4.9: Seleção de pools de peptídeos imunogênicos contidos na proteína E, reconhecidos por esplenócitos coletados após imunização com a vacina de DNA pZKectoE. A produção de IFN- γ após a administração da vacina de DNA pZKectoE ou do controle negativo pcTPA foi determinada por ensaio de ELISPOT. Os esplenócitos, agrupados em vacinados (pZKectoE) e controles (pcTPA), foram incubados em triplicatas com os peptídeos contidos na proteína E de ZIKV agrupados (pools 1 a 8) ou com ConA, como controle positivo. Os dados representam o número de spots após a subtração do *background* (esplenócitos não estimulados e incubados somente com meio). Os valores foram expressos em número de *spots* formados em 5×10^5 células. As barras representam as médias dos valores obtidos. Os pools destacados (setas) foram selecionados para posterior avaliação individual dos peptídeos. O valor de corte assumido nos ensaios de ELISPOT para seleção dos peptídeos imunogênicos foi de 5 ou mais *spots*, desde que acima dos controles negativos.

Após identificar os pools positivos, novos ensaios de ELISPOT foram realizados para a triagem individual dos peptídeos contidos nos pools 1, 2, 5, 7 e 8, com o objetivo de determinar os peptídeos envolvidos na resposta imune mediada pela vacina pZKectoE. Os esplenócitos dos camundongos imunizados com a vacina pZKectoE foram responsivos aos peptídeos 62, 69, 70, 71, 75, 76, 77, 78, 99, 100, 106, 107, 108 (Figura 4.10), assim como aos peptídeos 120, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 129, 130, 131, 135 e 139 (Figura 4.11). Conforme esperado, os esplenócitos isolados de animais inoculados com o controle negativo, pcTPA, não responderam ao estímulo e as células isoladas de todos os grupos foram reativas

ao estímulo inespecífico com ConA, indicando a viabilidade celular durante o teste (Figuras 4.10 e 4.11).

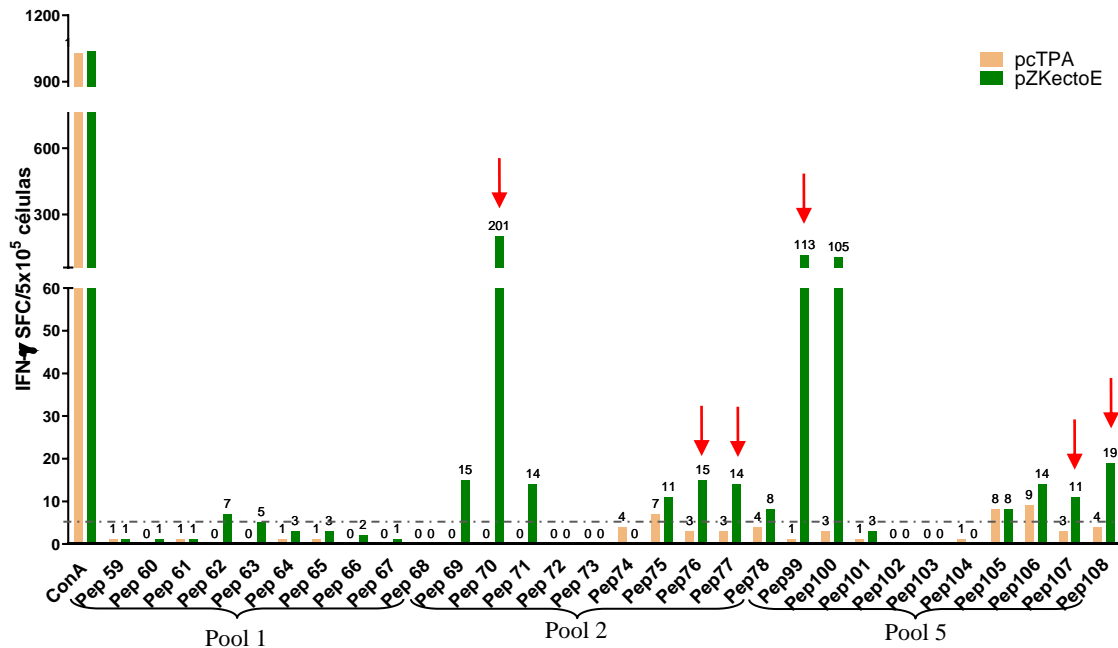


Figura 4.10: Identificação dos peptídeos imunogênicos contidos na proteína E, testados individualmente (pools 1, 2 e 5). A produção de IFN- γ após inóculo com a vacina de DNA pZKectoE ou com controle negativo pCTPA foi determinada por ensaio de ELISPOT. Os esplenócitos foram testados em triplicatas com os peptídeos sintéticos contidos na proteína E de ZIKV presentes nos pools 1, 2 e 5 ou com ConA, como controle positivo. Os dados representam o número de spots após a subtração do *background* (esplenócitos não estimulados e incubados somente com meio). Os valores foram expressos em número de *spots* formados por 5×10^5 células. As barras representam as médias dos valores obtidos. As setas indicam os peptídeos imunogênicos escolhidos para os testes seguintes.

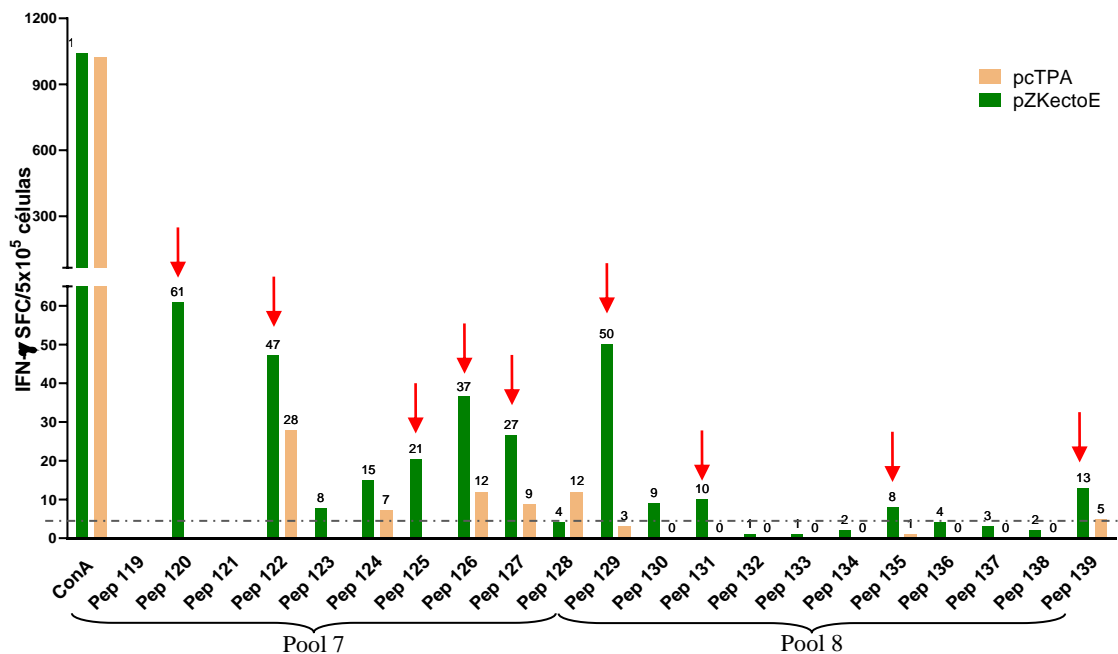


Figura 4.11: Identificação dos peptídeos imunogênicos contidos na proteína E testados individualmente (pools 7 e 8). A produção de IFN- γ após inóculo com a vacina de DNA pZKectoE ou com controle negativo pCTPA foi determinada por ensaio de ELISPOT. Os esplenócitos foram testados em triplicatas com os peptídeos sintéticos contidos na proteína E de ZIKV presentes nos pools 7 e 8, ou com ConA, como controle positivo. Os dados representam o número de spots após a subtração do *background* (esplenócitos não estimulados e incubados somente com meio). Os valores foram expressos em número de *spots* formados por 5×10^5 células.

As barras representam as médias dos valores obtidos. As setas indicam os peptídeos imunogênicos escolhidos para os testes seguintes.

A fim de confirmar os peptídeos que foram capazes de estimular a resposta celular com produção de IFN- γ e avaliar possíveis variações dentro de cada grupo experimental, foi realizado um novo ensaio de ELISPOT com esplenócitos e peptídeos testados individualmente. Dentre os peptídeos adjacentes, escolhemos o que induziu maior número de *spots* e com maior diferença do controle negativo, uma vez que a região compreendida por tais peptídeos é bastante semelhante. Os peptídeos 76-77, por apresentarem resultados semelhantes, e 125-127, por estimularem valores mais discrepantes em relação ao controle, também foram escolhidos. Sendo assim, os esplenócitos de 5 camundongos vacinados e controles foram estimulados individualmente com os seguintes peptídeos: 70, 76, 77, 99, 107, 108, 120, 122, 125, 126, 127, 129, 131, 135 e 139.

Conforme observado na figura 4.12, os esplenócitos dos camundongos vacinados foram responsivos aos peptídeos 70, 76, 77, 99 e 129, sendo a produção de IFN- γ significativamente diferente da observada pelos esplenócitos dos animais imunizados com o controle negativo pcTPA. Novamente, as células de todos os grupos foram reativas ao estímulo inespecífico com ConA, demonstrando a viabilidade celular.

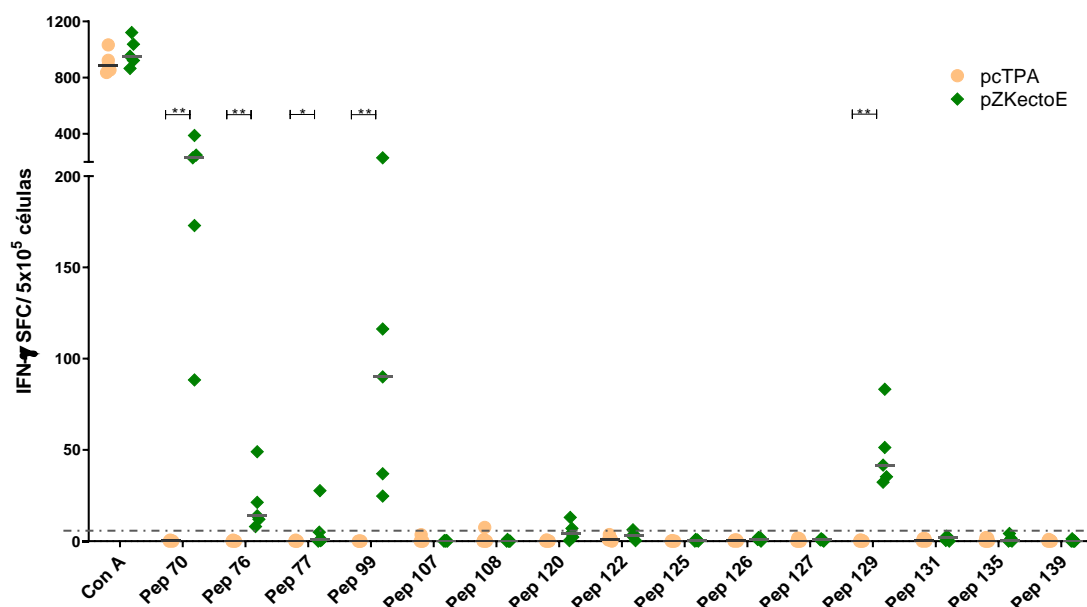


Figura 4.12: Confirmação dos peptídeos imunogênicos contidos na proteína E. A produção de IFN- γ após inóculo com a vacina de DNA pZKectoE ou com controle negativo pcTPA foi determinada por ensaio de ELISPOT, utilizando células de cada animal testadas individualmente. Os esplenócitos foram incubados em triplicata com os peptídeos selecionados contidos na proteína E de ZIKV. Os dados representam o número de *spots* após a subtração do *background* (esplenócitos não estimulados e incubados somente com meio). Os valores foram expressos em número de *spots* formados por 5×10^5 células. Asteriscos representam diferenças estatísticas entre os grupos usando teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Após a confirmação dos peptídeos 70, 76, 77, 99 e 129 como os mais imunogênicos, a localização de tais peptídeos na estrutura dimérica da proteína E de ZIKV foi verificada através de uma análise computacional. A estrutura tridimensional com maior identidade com a sequência de aminoácidos da vacina pZKectoE apresentou 99,76% de identidade e está disponível no *Protein data bank* (identificador 5jhm.1.A). Com exceção do peptídeo 129 que está localizado no DIII da proteína E, os demais peptídeos identificados como imunogênicos estão localizados no DII (Figura 4.13).

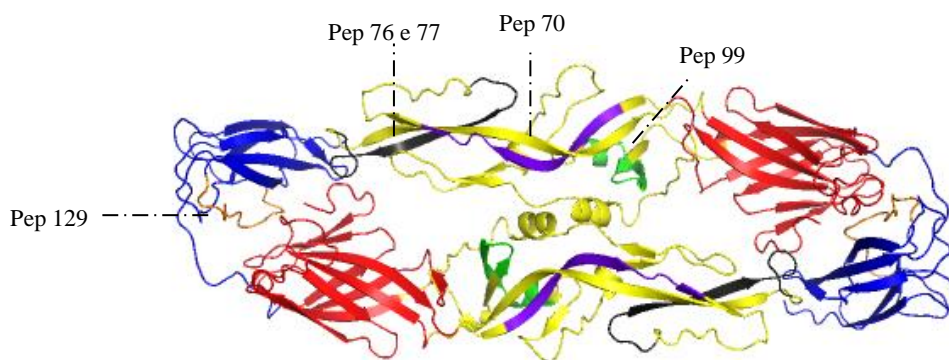


Figura 4.13: Localização dos peptídeos 70, 76, 77, 99 e 129 na estrutura dimérica do ectodomínio da proteína E. Os peptídeos acima se mostraram mais imunogênicos nos ensaios de ELISPOT com produção de IFN- γ e foram localizados na estrutura do ectodomínio da proteína E utilizando o programa PyMOL Version 2.5.0. Os três domínios da proteína E são exibidos em vermelho (D1), amarelo (D2) e azul (D3). Os peptídeos 70, 76, 77, 99 e 129 estão representados pelas cores roxo, preto, preto, verde e laranja, respectivamente. As regiões de haste e âncora não foram representadas por não fazerem parte do ectodomínio.

4.1.4.2 Vacina pZKNS1

Ensaio de ELISPOT também foram realizados para identificar os peptídeos que estimulam a produção de IFN- γ pelos esplenócitos derivados de camundongos imunizados com a vacina pZKNS1, de modo semelhante aos estudos referentes ao pZKectoE. Em um primeiro momento, os peptídeos da proteína NS1 foram agrupados em 7 pools, contendo 10 peptídeos sequenciais cada.

Os esplenócitos dos camundongos imunizados com a vacina pZKNS1 responderam quando estimulados com todos os pools, exceto o pool 1 (Figura 4.14). Como esperado, as células dos animais não inoculados (naives) ou inoculados com o controle negativo, pCTPA, não reagiram a nenhum dos pools de peptídeos. As células isoladas de todos os grupos foram reativas ao estímulo inespecífico com ConA, atestando a viabilidade celular durante o teste.

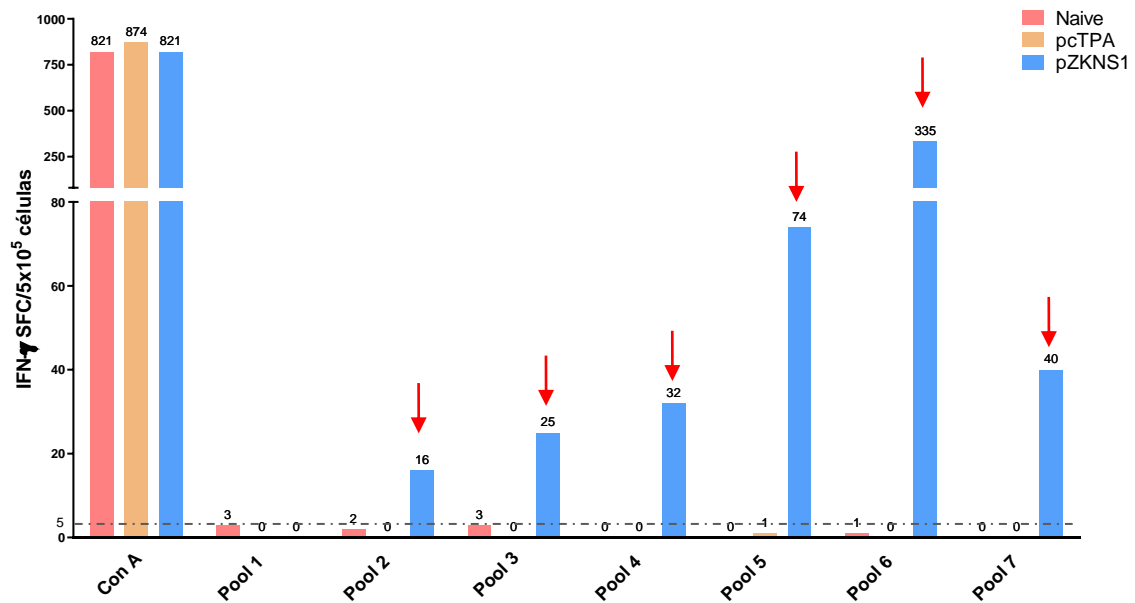


Figura 4.14: Seleção de pools de peptídeos imunogênicos contidos na proteína NS1 reconhecidos por esplenócitos coletados após imunização com a vacina de DNA pZKNS1. A produção de IFN- γ após administração da vacina de DNA pZKNS1 ou do controle negativo pCTPA foi determinada por ensaio de ELISPOT. Os esplenócitos, agrupados em vacinados (pZKNS1) e controles (pCTPA), foram incubados em triplicatas com os peptídeos contidos na proteína NS1 de ZIKV agrupados (pools 1 a 7) ou com ConA, como controle positivo. Os valores foram expressos em número de *spots* formados em 5×10^5 células. As barras representam as médias dos valores obtidos. Os dados representam o número de spots após a subtração do *background* (esplenócitos não estimulados e incubados somente com meio). Os pools destacados (setas) foram selecionados para posterior avaliação individual dos peptídeos. O valor de corte assumido nos ensaios de ELISPOT para seleção dos peptídeos imunogênicos foi de 5 ou mais *spots*, desde que acima dos controles negativos.

Em seguida, para identificar os peptídeos envolvidos na resposta imune mediada pela vacina, novos ensaios de ELISPOT foram realizados com os peptídeos contidos nos pools 2, 3, 4, 5, 6 e 7. Os esplenócitos dos camundongos imunizados com a vacina pZKNS1 foram responsivos aos peptídeos 169, 171, 175, 181, 182, 183, 184, 185, 189, 192, 193, 194 e 198 (Figura 4.15), além dos peptídeos 200, 201, 202, 204, 205, 206, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 219, 220, 221 e 224 (Figura 4.16). As células isoladas de todos os grupos foram reativas ao estímulo inespecífico com ConA, atestando a viabilidade celular durante o teste (Figuras 4.15 e 4.16).

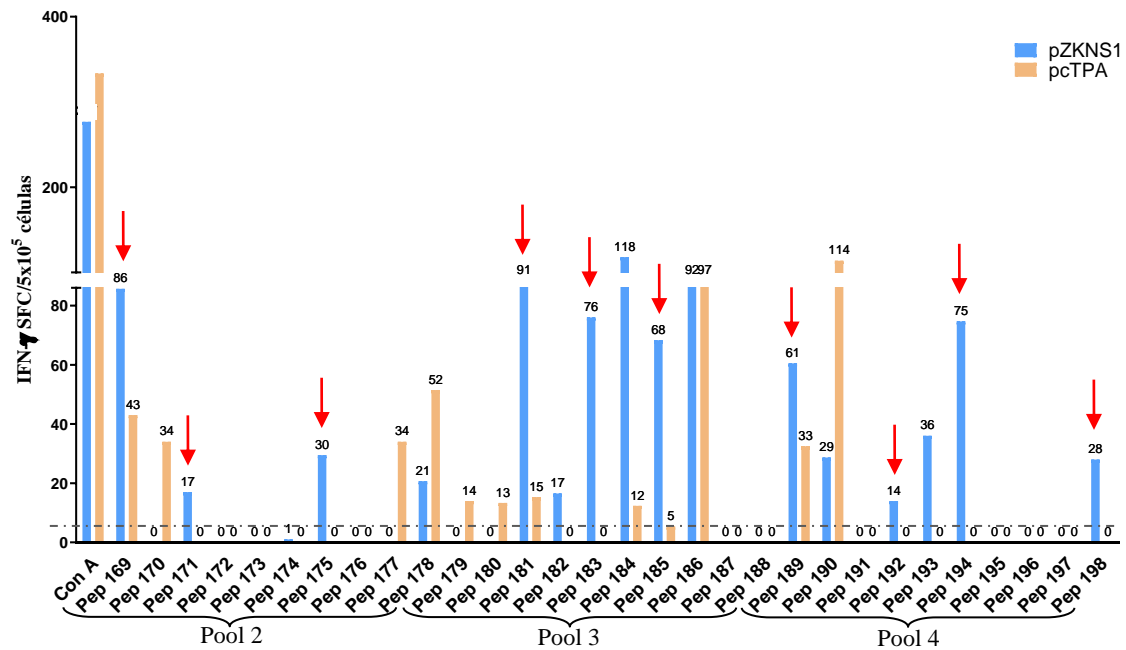


Figura 4.15: Identificação dos peptídeos imunogênicos contidos na proteína NS1, testados individualmente (pools 2, 3 e 4). A produção de IFN- γ após inóculo com a vacina de DNA pZKNS1 ou o controle negativo pcTPA foi determinada por ensaio de ELISPOT. Os esplenócitos foram testados em triplicatas com os peptídeos sintéticos contidos na proteína NS1 de ZIKV agrupados nos pools 2, 3 e 4 ou com ConA como controle positivo. Os valores foram expressos em número de *spots* formados por 5×10^5 células. As barras representam as médias dos valores obtidos. Os dados representam o número de *spots* após a subtração do *background* (esplenócitos não estimulados e incubados somente com meio). As setas indicam os peptídeos imunogênicos escolhidos para os testes seguintes.

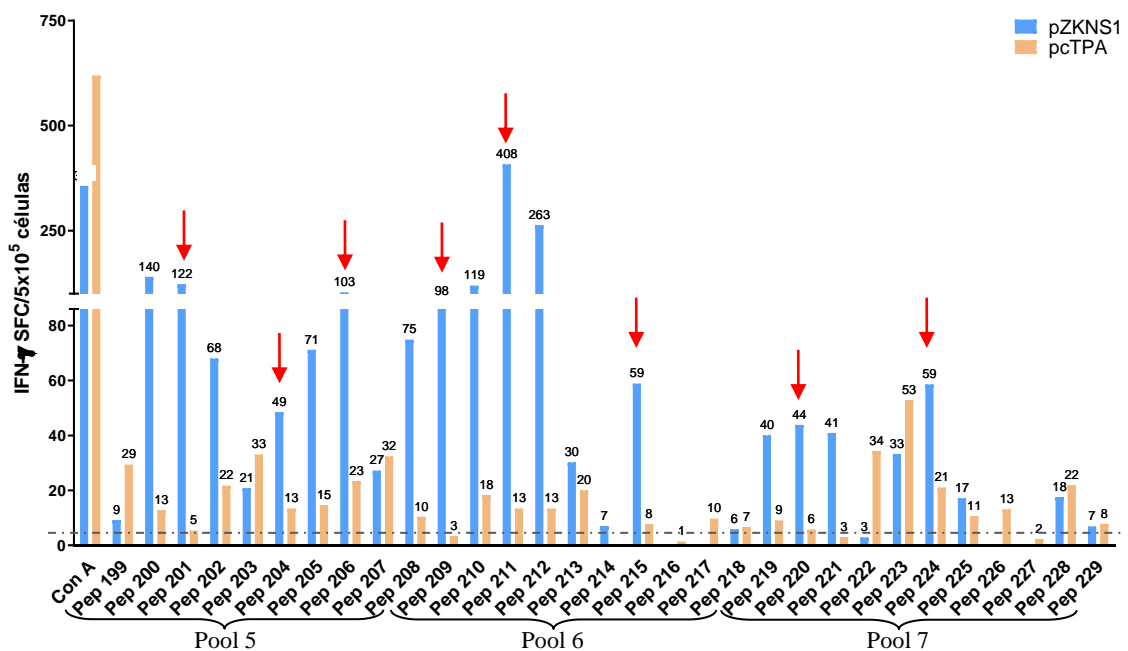


Figura 4.16: Identificação dos peptídeos imunogênicos contidos na proteína NS1 testados individualmente (pools 5, 6 e 7). A produção de IFN- γ após inóculo com a vacina de DNA pZKNS1 ou com controle negativo pcTPA foi determinada por ensaio de ELISPOT. Os esplenócitos foram testados em triplicatas com os peptídeos sintéticos contidos na proteína NS1 de ZIKV agrupados nos pools 5, 6 e 7 ou com ConA como controle positivo. Os valores foram expressos em número de *spots* formados por 5×10^5 células. Os dados representam o número de *spots* após a subtração do *background* (esplenócitos não estimulados e incubados somente com meio). As barras representam as médias dos valores obtidos. As setas indicam os peptídeos imunogênicos escolhidos para os testes seguintes.

Após a avaliação dos peptídeos individualmente, os seguintes peptídeos foram selecionados para a confirmação de sua imunogenicidade: 169, 171, 175, 181, 183, 185, 189, 192, 194, 198, 201, 204, 206, 209, 211, 215, 220 e 224. Nesta última avaliação os esplenócitos de cada animal vacinado ou controle foram testados individualmente, assim como os peptídeos. Observamos que os peptídeos 181, 211 e 224 estimularam a produção de IFN- γ nos esplenócitos de camundongos imunizados com a vacina de DNA pZKNS1 com diferença significativa em relação ao controle negativo, pcTPA (Figura 4.17).

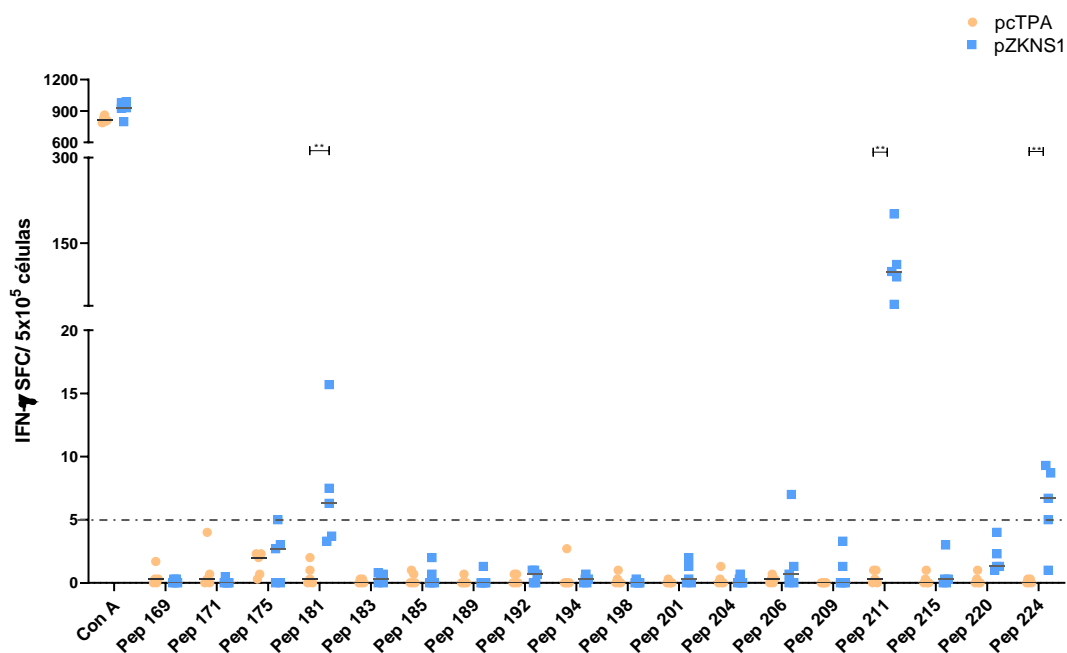


Figura 4.17: Confirmação dos peptídeos imunogênicos contidos na proteína NS1. A produção de IFN- γ após inóculo com a vacina de DNA pZKNS1 ou com controle negativo pcTPA foi determinada por ensaio de ELISPOT, utilizando células de cada animal testadas individualmente. Os esplenócitos foram incubados em triplicatas com os peptídeos selecionados contidos na proteína NS1 de ZIKV. Os dados representam o número de spots após a subtração do *background* (esplenócitos não estimulados e incubados somente com meio). Os valores foram expressos em número de *spots* formados por 5×10^5 células. Asteriscos representam diferenças estatísticas entre os grupos usando teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney (** $p < 0,01$).

De modo semelhante à análise computacional realizada com a proteína E, os peptídeos da proteína NS1 identificados como imunogênicos (181, 211 e 224) foram localizados na estrutura dimérica da proteína NS1 de ZIKV. A estrutura tridimensional selecionada está disponível no *Protein data bank* (identificador: 5gs6.1) e apresentou 100% de identidade com a sequência de aminoácidos da vacina pZKNS1. Os peptídeos 211 e 224 estão localizados no domínio β -ladder da NS1 enquanto que o peptídeo 181 se localiza no domínio Wing desta proteína (Figura 4.18).

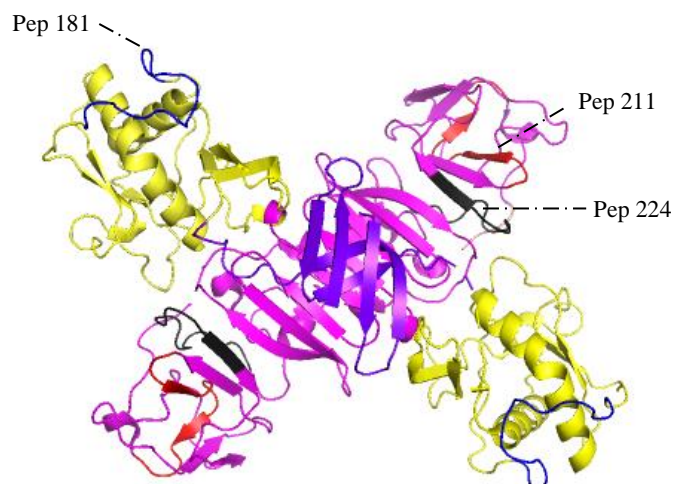


Figura 4.18: Localização dos peptídeos 181, 211 e 224 na estrutura dimérica da proteína NS1. Os peptídeos acima se mostraram imunogênicos nos ensaios de ELISPOT com produção de IFN- γ e foram localizados na estrutura da proteína NS1 utilizando o programa PyMOL Version 2.5.0. Os domínios β -ladder, β -hairpin e o domínio wing estão representados pelas cores magenta, roxo-azul e amarelo, respectivamente. Os peptídeos 181, 211 e 224 são representados pelas cores azul, vermelho e preto, respectivamente.

4.2 Neuroadaptação viral

Anteriormente ao início deste projeto, foi observado que camundongos BALB/c adultos com 8 semanas de vida (tempo mínimo para os testes de vacinas) não são suscetíveis à infecção por via i.c. com ZIKV isolado de um paciente no Brasil. Sendo assim, visando estabelecer um modelo murino imunocompetente susceptível à infecção com uma cepa brasileira de ZIKV para os futuros testes de desafio com as vacinas de DNA, foram realizadas sucessivas passagens de um isolado viral em cérebros de camundongos neonatos. Para isto, camundongos Swiss foram acasalados e acompanhamos todo o período de gestação das fêmeas até o nascimento dos filhotes. Inicialmente realizamos um estudo para avaliar a cinética da infecção com inoculação do vírus (20 μ L/animal) por via i.c. em camundongos neonatos, com 3 dias de vida. Para a detecção dos títulos virais, os cérebros dos animais foram processados e as amostras foram tituladas através de ensaio de formação de plaques em culturas de célula Vero. Previamente, observamos que o pico da infecção ocorre no 7º dia após o inóculo viral (Figura 4.19). Sendo assim, iniciamos as passagens de ZIKV em cérebros de camundongos Swiss neonatos, com eutanásia e coleta dos cérebros 7 dias após a infecção.

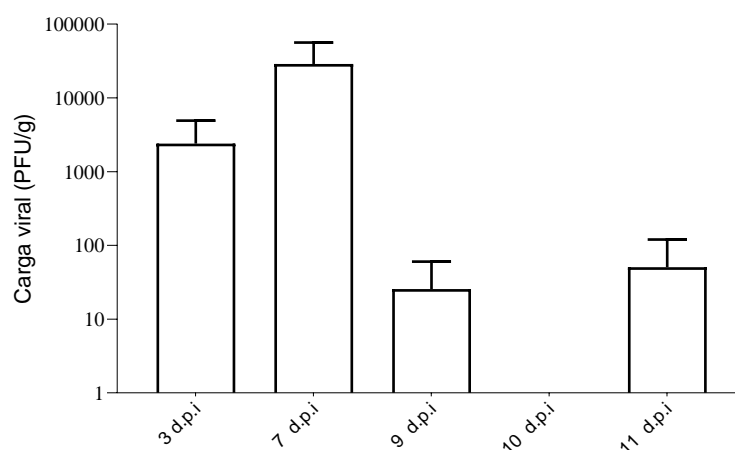


Figura 4.19: Titulação de ZIKV em cérebros de camundongos Swiss. Carga viral (em PFU/g de cérebro) observada em amostras oriundas do macerado de cérebro de camundongos Swiss inoculados com 06 dias de vida com ZIKV. Os animais foram eutanasiados 3, 7, 9, 10 ou 11 dias pós-infecção. As barras representam as médias dos valores obtidos em cada grupo (N = 1 – 4).

Durante o processo de neuroadaptação viral, notamos uma alteração na morfologia dos plaques produzidos pelos vírus Zika. Nas passagens iniciais em cérebros de camundongos neonatos, houve um aumento perceptível do diâmetro médio dos plaques. No entanto, nas últimas passagens observamos uma redução desse diâmetro (Figura 4.20).

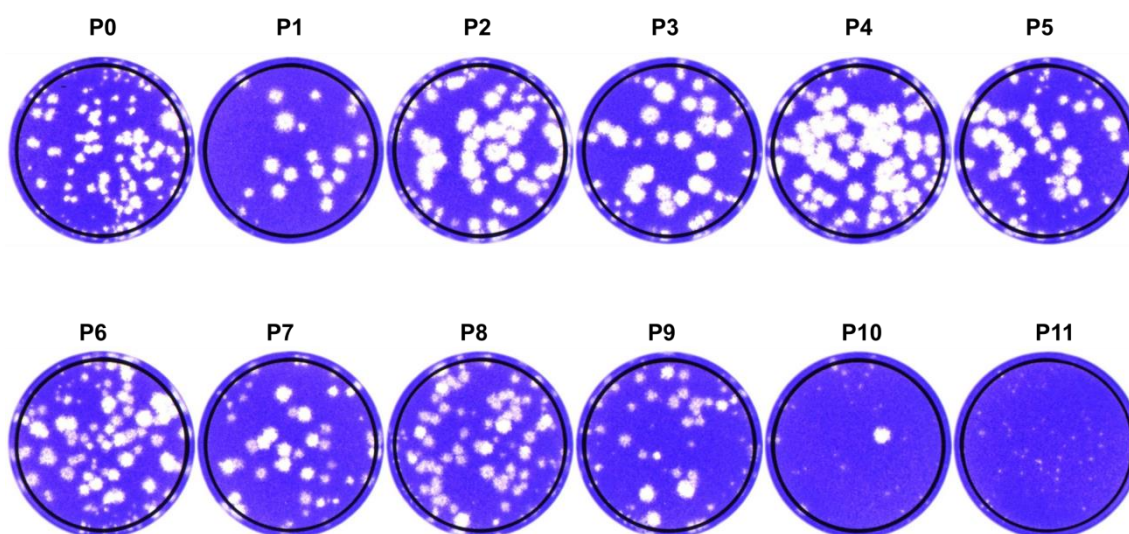


Figura 4.20: Morfologia dos plaques. Morfologia típica dos plaques formados em monocamadas de células Vero por isolados do vírus Zika oriundos do sobrenadante de cultura (P0) ou após passagens subsequentes (de P1 a P11) em cérebros de camundongos Swiss neonatos, durante o processo de neuroadaptação viral.

Quanto à carga viral, nas primeiras passagens houve um aumento considerável no título de ZIKV detectado em células Vero (de 10^4 na primeira passagem à 10^8 na terceira passagem). Nas demais passagens observamos uma variação da carga viral no cérebro dos neonatos infectados (de 10^8 a 10^5) (Figura 4.21). Tal variação pode ser devido não só a

modificações sofridas pelo vírus, mas também ao aumento da idade dos animais no momento da inoculação. Quanto á carga viral inoculada e a carga viral recuperada em cada passagem, os valores são apresentados na tabela 4.1.

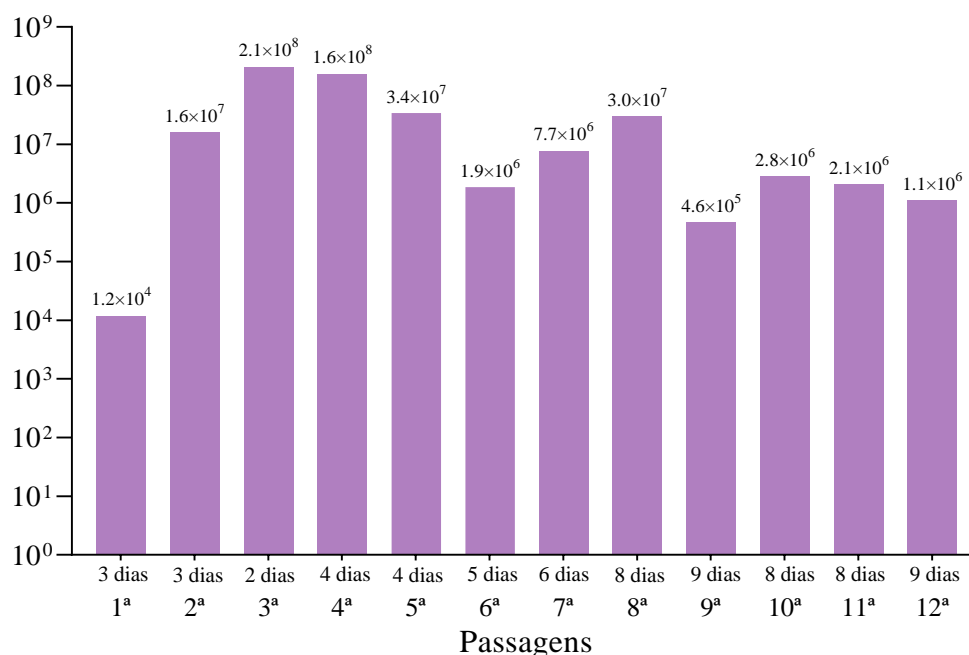


Figura 4.21: Titulação de ZIKV após passagens em cérebros de camundongos Swiss. Carga viral (em PFU/g de cérebro) observada em amostras oriundas do macerado de cérebro de camundongos Swiss inoculados com ZIKV nas diferentes passagens, no processo de neuroadaptação. Os valores correspondem ao maior título de vírus detectado em cada grupo de neonatos. A idade dos animais no momento do inóculo está indicada no eixo X, assim como o número da passagem no cérebro dos camundongos.

Tabela 4.1: Carga viral inoculada e recuperada

PASSAGEM	CARGA VIRAL INOCULADA (PFU)	CARGA VIRAL RECUPERADA (PFU/cérebro)
1ª passagem	$4,5 \times 10^5$	$4,4 \times 10^3$
2ª passagem	$5,9 \times 10^1$	$4,3 \times 10^6$
3ª passagem	$8,0 \times 10^4$	$4,3 \times 10^7$
4ª passagem	$1,1 \times 10^6$	$6,9 \times 10^7$
5ª passagem	$7,9 \times 10^5$	$6,0 \times 10^6$
6ª passagem	$1,7 \times 10^5$	$5,9 \times 10^5$
7ª passagem	$9,3 \times 10^3$	$3,6 \times 10^6$
8ª passagem	$3,9 \times 10^4$	$1,4 \times 10^7$
9ª passagem	$1,5 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$
10ª passagem	$2,3 \times 10^3$	$1,2 \times 10^6$
11ª passagem	$1,4 \times 10^4$	$7,4 \times 10^5$
12ª passagem	$1,0 \times 10^4$	$4,3 \times 10^5$

Em relação aos sinais clínicos e mortalidade, camundongos inoculados com 3 ou 4 dias de vida apresentaram sinais da infecção com taxa de mortalidade estimada em 30%. Por outro lado, animais inoculados com mais de cinco dias não mostraram sinais de infecção nas primeiras passagens do vírus, pelo menos até o momento da eutanásia (7 dias pós infecção). Entretanto, a partir da 10ª passagem do vírus, os animais inoculados com nove dias de vida apresentaram morbidade, como alteração no controle do equilíbrio, hiperatividade e convulsões (Tabela 4.2).

Tabela 4.2: Quadro clínico e mortalidade dos neonatos

PASSAGEM	IDADE	QUADRO CLÍNICO	MORTALIDADE
1ª passagem	3 dias	Com sinais clínicos	Sim
2ª passagem	3 dias	Com sinais clínicos	Sim
3ª passagem	2 dias	Com sinais clínicos	Sim
4ª passagem	4 dias	Com sinais clínicos	Sim
5ª passagem	4 dias	Com sinais clínicos	Sim
6ª passagem	5 dias	Com sinais clínicos	Sim
7ª passagem	6 dias	Sem sinais clínicos	Não
8ª passagem	8 dias	Sem sinais clínicos	Não
9ª passagem	9 dias	Sem sinais clínicos	Não
10ª passagem	8 dias	Com sinais clínicos	Sim
11ª passagem	9 dias	Com sinais clínicos	Sim
12ª passagem	9 dias	Com sinais clínicos	Não

Em um experimento paralelo de acompanhamento dos sinais da infecção, 4 animais com 16 dias de vida foram inoculados com a amostra de ZIKV da última passagem (12ª) e apresentaram 100% de mortalidade, conforme na Figura 4.22.

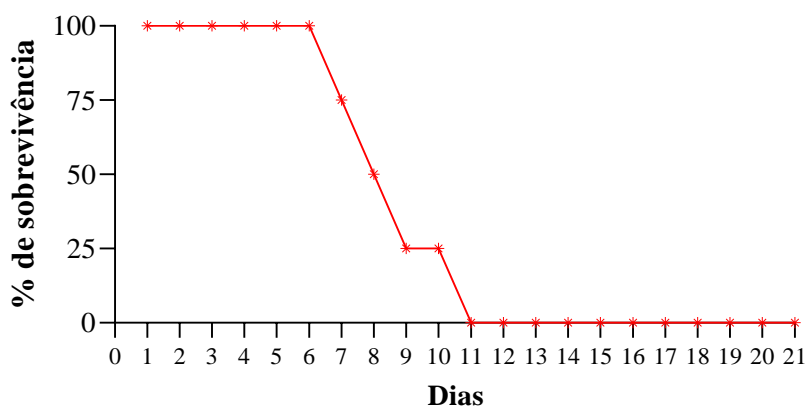


Figura 4.22 - Gráfico de sobrevivência dos animais desafiados com o ZIKV. Camundongos Swiss com 16 dias de vida foram inoculados com ZIKV (12ª passagem) por via intracerebral (N = 4).

4.2.1 Análise das sequências de ZIKV após diferentes passagens em cérebro de camundongos

As amostras de vírus obtidos após a 2ª (P2) e 4ª (P4) passagem em cérebro de camundongos foram sequenciadas, assim como a amostra inicial (P0), pelo método de Sequenciamento de Alto Rendimento de Nova Geração. Após o sequenciamento, as três amostras foram alinhadas utilizando o programa BLAST. Na P2 foram identificadas duas mutações que resultaram na troca de aminoácidos na proteína E (Tabela 4.3).

Tabela 4.3: Análise da sequência de ZIKV após a 2ª passagem em cérebro de camundongos.

Nucleotídeo mutado	Proteína	Posição do Aminoácido	Aminoácido modificado
2071	E	H401Y	Histidina - Tirosina
2431	E	T501A	Treonina - Alanina

Em relação à sequência da P4 observamos que a mutação no aminoácido T501A da proteína E, identificada anteriormente na P2 se manteve. Outras três mutações com troca de aminoácidos foram identificadas, uma na proteína M e duas na proteína NS1 (Tabela 4.4). Pretendemos sequenciar as amostras obtidas nas passagens mais tardias.

Tabela 4.4: Análise da sequência de ZIKV após a 4ª passagem em cérebro de camundongos.

Nucleotídeo mutado	Proteína	Mutação	Aminoácido modificado
691	M	S16P	Serina - Prolina
2431	E	T501A	Treonina - Alanina
2744	NS1	H113Y	Histidina - Tirosina
3190	NS1	S270G	Serina - Glicina

4.2.2 Inoculação do vírus Zika em camundongos adultos por via intracerebral

Com intuito de avaliar se camundongos adultos apresentavam morbidade ou mortalidade quando inoculados com a 11ª passagem de ZIKV nos cérebros dos animais, um grupo com cinco camundongos machos da linhagem BALB/c com 7 semanas de idade foi inoculado com a amostra desta passagem que apresentou maior carga viral.

Durante 49 dias, os animais foram acompanhados diariamente para a avaliação de morbidade (sinais clínicos como enfraquecimento, dificuldades respiratórias, paralisia nos membros posteriores e/ou anteriores e comprometimento da coluna vertebral) e mortalidade. Durante todo o período de acompanhamento, os camundongos não apresentaram quaisquer sinais clínicos da infecção. Ao término do período de acompanhamento todos os camundongos foram eutanasiados e coletamos os seus soros para avaliar a presença de anticorpos anti-ZIKV.

Apesar da ausência de morbidade, foi possível detectar anticorpos específicos contra a proteína recombinante NS1 de ZIKV no soro desses animais através de ensaio de ELISA, conforme observado anteriormente no item 4.1.3.2 (Figura 4.7). Tal resultado indica que o vírus inoculado foi capaz de se replicar nos camundongos adultos imunocompetentes, uma vez que a NS1 é uma proteína não estrutural que só é sintetizada durante a replicação viral.

5. Discussão

O vírus Zika se tornou uma importante arbovirose nos últimos anos. Apesar dos sintomas da infecção serem tipicamente leves, durante a gravidez pode ocorrer a síndrome congênita do vírus Zika, que consiste em anomalias congênitas graves (como a microcefalia fetal, retardo de crescimento intra-uterino, contraturas de membros, anormalidades auditivas e oculares e outras malformações congênitas), e em casos mais raros, complicações neurológicas associadas à infecção, como a síndrome de Guillain-Barré (Brasil *et al.*, 2016; de Araújo *et al.*, 2016; Ioss *et al.*, 2014; Lowe *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2016). Devido a essas complicações, o desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz contra o vírus é essencial.

O conhecimento prévio da biologia e imunidade de outros flavivírus foi fundamental no desenvolvimento de vacinas candidatas contra o vírus Zika (Gotuzzo *et al.*, 2013; Kimura-Kuroda *et al.*, 1988; Mason *et al.*, 1989; Scherwitzl *et al.*, 2017; Throsby & Kruif, 2006; Vogt *et al.*, 2009). A maioria das vacinas licenciadas contra flavivírus se baseia na indução de anticorpos neutralizantes, correlacionando-os com proteção, no entanto, a resposta imune celular também desempenha um papel importante (Hombach *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2008; Van Gessel *et al.*, 2011; Vratskikh *et al.*, 2013). Estudos com ZIKV revelam que as células T CD4⁺ são necessárias para uma resposta ótima de células B de memória, e acredita-se que as células T CD8⁺ facilitem a depuração viral, também importante para a proteção do feto (Dudley *et al.*, 2016; Hassert *et al.*, 2018; Hassert *et al.*, 2019; Lucas *et al.*, 2018; Ngono *et al.*, 2016; Pardy *et al.*, 2017).

Ainda não existem vacinas licenciadas contra a infecção pelo ZIKV, contudo, diversas vacinas utilizando diferentes estratégias já estão na fase de ensaios pré-clínicos e clínicos. Dentre as vacinas candidatas contra o ZIKV, grande parte tem como objetivo mediar respostas de anticorpos neutralizantes, tendo principalmente a glicoproteína E como antígeno (Castanha *et al.*, 2020; Cox *et al.*, 2018; López-Camacho *et al.*, 2018; Pattnaik *et al.*, 2020; Schrauf *et al.*, 2020). Sabe-se que os anticorpos específicos contra esta proteína podem fornecer imunidade esterilizante. Além do mais, uma série de anticorpos monoclonais direcionados à proteína E revelou alta atividade neutralizante (Hasan *et al.*, 2017; Robbiani *et al.*, 2017; Sapparapu *et al.*, 2016; Stettler *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017bc; Zhao *et al.*, 2016).

A proteína NS1 do ZIKV também é considerada um antígeno interessante para o desenvolvimento de vacina. Estudos anteriores demonstraram que anticorpos contra a proteína NS1 de outros flavivírus, como o YFV, WNV ou DENV, podem limitar ou prevenir a doença por flavivírus (Beatty *et al.*, 2015; Chung *et al.*, 2006; Schlesinger *et al.*, 1985; Schlesinger *et al.*, 1986; Schlesinger *et al.*, 1993). Outros estudos também demonstram a eficácia das vacinas baseadas em NS1 contra a infecção pelo ZIKV (Bailey *et al.*, 2017; Brault *et al.*, 2019; Grubor-Bauk *et al.*, 2019). As vacinas baseadas na proteína NS1 têm como destaque a

ausência da possibilidade de ADE. Como os anticorpos anti-NS1 não se ligam ao próprio vírion, as vacinas que induzem a produção de anticorpos específicos para NS1 não causam aumento da replicação viral dependente de anticorpos. As preocupações acerca do ADE são pertinentes. Como exemplo, a vacina Dengvaxia contra o vírus da dengue, que é um flavivírus intimamente relacionado com o ZIKV, levou ao aumento da frequência de doença grave em crianças naíves vacinadas contra DENV e que posteriormente se infectaram com o vírus (Ferguson *et al.*, 2016). Assim, uma vacina baseada na proteína NS1 pode ser uma opção, gerando respostas imunes contra ZIKV sem o risco de induzir ADE.

As vacinas de DNA, além de serem rapidamente construídas, se destacam pela capacidade de induzir respostas imunes de amplo espectro, humoral e celular, simulando uma infecção viral sem o risco associado ao uso de um agente infeccioso (Castanha *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2012; Williams, 2013).

Considerando a imunogenicidade das proteínas E e NS1 e a importância das respostas das células T CD4⁺ e T CD8⁺ contra outros flavivírus, nosso grupo construiu vacinas de DNA baseadas nestas duas proteínas de ZIKV. A vacina de DNA pZKectoE contém a sequência que codifica o ectodomínio da proteína E de ZIKV. A maioria das vacinas baseadas na proteína E que estão em desenvolvimento, codificam a proteína prM e E, no entanto, com o intuito de aumentar a eficiência de expressão e secreção da proteína recombinante, a proteína prM e a região haste-âncora da proteína E não foram incluídas no desenho desta vacina. A região haste-âncora consiste em uma sequência de aminoácidos altamente hidrofóbica que pode interferir na expressão e/ou secreção da proteína (Heinz & Stiasny, 2017). Já a vacina pZKNS1 contém o gene completo da proteína NS1 de ZIKV. Ambos os genes foram baseados em sequências de ZIKV isolado no Brasil e disponíveis no GenBank no momento de construção destas vacinas de DNA. Semelhante a construções anteriores do nosso grupo (Azevedo *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2006ab), em ambas as vacinas a sequência da proteína recombinante foi fusionada à sequência que codifica o peptídeo sinal derivado do ativador de plasminogênio de tecido humano (t-PA), responsável pelo direcionamento da proteína para a via de secreção. Em relação à região promotora, utilizamos o promotor derivado do citomegalovírus humano (CMV), amplamente empregado em vacinas de DNA, uma vez que é altamente ativo na maioria das células de mamíferos, transcrevendo altos níveis de mRNA. Estudos de vacinas de DNA em camundongos evidenciam que um promotor forte desempenha um papel importante no aumento da expressão do antígeno e, conseqüentemente, na imunogenicidade (Azevedo *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2006a, 2006b; Li & Petrovsky, 2016; Williams, 2013).

Primeiramente realizamos testes *in vitro* para avaliar se os plasmídeos pZKectoE e pZKNS1 eram capazes de mediar a expressão das proteínas E e NS1, respectivamente, em células de mamífero. Através da transfecção de células BHK-21 e análise da expressão das proteínas por imunofluorescência, observamos que ambos os plasmídeos induziram a expressão das respectivas proteínas recombinantes.

Posteriormente, avaliamos a indução da resposta imune em camundongos BALB/c imunizados com essas vacinas de DNA. Tal modelo murino foi escolhido principalmente devido aos trabalhos anteriores do nosso grupo com o DENV com resultados promissores para o desenvolvimento de vacinas (Azevedo *et al*, 2011, 2013; Costa *et al*, 2006a, 2006b, 2007).

A análise dos anticorpos circulantes contra o domínio III da proteína E (EDIII) de ZIKV no soro dos camundongos imunizados com a vacina pZKectoE mostrou que esse plasmídeo é capaz de estimular uma resposta imune humoral, com níveis de IgG significativamente mais altos do que os observados nos animais inoculados com o plasmídeo controle (pcTPA). A vacina pZKNS1 também foi capaz de estimular uma resposta imune humoral, com níveis de anticorpos IgG anti-NS1 significativamente diferente dos níveis observados no grupo controle, inoculado com pcTPA. Tais resultados demonstraram a capacidade destas vacinas de DNA induzirem respostas imunes humorais de modo semelhante ao observado anteriormente pelo nosso grupo com vacinas de DNA contra DENV2 (Azevedo *et al*, 2011; Costa *et al*, 2006a).

Também avaliamos a resposta imune celular gerada com as vacinas de DNA contra ZIKV e identificamos os epítomos imunodominantes. O IFN- γ é considerado um importante mediador da resposta imune celular (Lucas *et al.*, 2018). Desta forma, foram realizados ensaios de ELISPOT para avaliar a produção de IFN- γ , de modo semelhante a um estudo também realizado pelo nosso grupo com as vacinas de DNA contra DENV2, para o mapeamento da resposta imune celular (Pinto *et al.*, 2019). Para isto, os esplenócitos de camundongos imunizados com pZKectoE ou pZKNS1 foram estimulados com uma biblioteca de peptídeos sintéticos contidos nas proteínas E ou NS1 de ZIKV (linhagem africana – acesso GenBank: NC 012532.1). Utilizamos peptídeos com 15 aminoácidos de comprimento que podem estimular eficientemente as células T CD4⁺ e CD8⁺ (Kiecker *et al.*, 2004). As vacinas de DNA pZKectoE e pZKNS1 foram capazes de induzir respostas de células T direcionadas às proteínas E e NS1, sendo possível determinar os peptídeos responsáveis por estimular esta resposta em nosso modelo de estudo.

Para a proteína E, foram identificados 5 peptídeos imunodominantes nos animais vacinados com a vacina pZKectoE: Peptídeo 70 (VRSYCYEASISDMAS); 76

(SDTQYVCKRTLVDGRG); 77 (VCKRTLVDGRGWGNGC); 99 (TMNNKHWLVHKEWFH) e o peptídeo 129 (VGRLITANPVITEST). Alguns estudos em modelo murino e em humanos confirmam o potencial destes peptídeos (Delgado *et al.*, 2017; Hassert *et al.*, 2018; Kam *et al.*, 2017; Kam *et al.*, 2019; Koblishcke *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2020b; Ngonon *et al.*, 2017; Ngonon *et al.*, 2019; Paquin-Proulx *et al.*, 2017; Reynolds *et al.*, 2020; Schouest *et al.*, 202; Smith *et al.*, 2020; Zhan *et al.*, 2019).

Em um estudo, camundongos BALB/c foram imunizados com uma vacina de DNA que codifica as proteínas prM e E de ZIKV e os autores realizaram uma triagem dos epítomos imunodominantes específicos para proteína E via ELISPOT, usando pools de peptídeos sobrepostos que correspondem a proteína E de ZIKV. O peptídeo “VRSYCYEASISDMAS”, correspondente ao peptídeo 70 do nosso estudo, induziu forte resposta de IFN- γ (Zhan *et al.*, 2019). Análises semelhantes foram realizadas em camundongos C57BL / 6J infectados com ZIKV por via intravenosa (Hassert *et al.*, 2018). Nesse estudo, a resposta específica de células T CD4⁺ foi avaliada utilizando uma biblioteca de peptídeos de ZIKV que abrange toda a poliproteína e os autores avaliaram a produção de IFN- γ e TNF- α . Eles identificaram 18 epítomos de células T CD4⁺ específicos de ZIKV, sendo que o epítomo “GRLITANPVITESTE” (semelhante ao nosso peptídeo 129) induziu a melhor resposta, com células polifuncionais produtoras de IFN- γ e TNF- α .

Utilizando outro modelo de estudo para identificar potenciais epítomos de células T CD4⁺ nas proteínas de ZIKV, Ngonon e colaboradores selecionaram 49 peptídeos por meio de predição de epítomos de classe II (H-2 IA^b) (Ngonon *et al.*, 2019). Posteriormente, camundongos C57BL/6 *LysMCre⁺Ifnar1fl/fl* (deficientes do receptor de IFN tipo I em um subconjunto de células mielóides) foram infectados por via intravenosa com ZIKV e os esplenócitos recolhidos foram estimulados com os peptídeos individuais. Em seguida, foi avaliada a produção de diferentes citocinas através da marcação intracelular de citocinas (ICS - do inglês “*intracellular cytokine staining*”). Os animais infectados com a cepa asiática FSS13025 de ZIKV apresentaram resposta de IFN- γ com diferença significativa mediante estímulo com peptídeo “VRSYCYEASISDMAS”, semelhante ao nosso peptídeo 70, no entanto, não houve diferença em relação à produção de TNF e IL-2. Além disso, camundongos infectados com a cepa africana MR766 não apresentaram resposta com diferença significativa para nenhuma destas citocinas mediante estímulo com esses peptídeos. Por outro lado, o peptídeo “PVGRLITANPVITES”, semelhante ao peptídeo 129 (VGRLITANPVITEST), foi capaz de estimular uma forte resposta de células T CD4⁺. Os esplenócitos dos camundongos infectados com ambas as cepas de ZIKV (MR766 ou FSS13025), apresentaram níveis de IFN- γ e TNF significativamente mais altos quando

estimulados com este peptídeo em comparação aos demais peptídeos avaliados (Ngono *et al.*, 2019).

Em outro estudo, estes mesmos peptídeos da proteína E do vírus Zika identificados por Ngono e colaboradores (2019) foram descritos como promíscuos de células T. Partindo de uma abordagem diferente, pesquisadores desenvolveram uma estratégia de triagem de peptídeos MHC-II semiquantitativa de alto rendimento, denominada triagem de peptídeo assistida por microesfera (MAPS). Com o objetivo de identificar epítomos promíscuos de células T, foi sintetizada uma biblioteca com 37 peptídeos (com 20 aminoácidos cada) a partir da proteína E do vírus Zika, para avaliação da ligação desses peptídeos a quatro alelos MHCII comuns (DR1, DR4, DR7, DR15) e a ligação peptídeo-MHCII resultante foi medida por MAPS. Foram encontrados cinco peptídeos com ligação aos diferentes alelos MHCII avaliados, entre eles os peptídeos “SNMAEVRSYCYEASISDMAS” e “TLTPVGRLITANPVITESTE” (Smith *et al.*, 2020) que contêm a sequência dos nossos peptídeos 70 e 129, respectivamente.

Em um estudo realizado anteriormente para mapear a especificidade da resposta de células T CD8⁺ através de análise de bioinformática, foram previstos 244 peptídeos capazes de se ligarem com alta afinidade nos alelos MHC de classe I (H-2K^b e H-2D^b). Tais peptídeos foram avaliados individualmente em um ensaio de ELISPOT para IFN γ usando células T CD8⁺ de camundongos C57BL/6 tratados com anticorpo bloqueador do receptor de IFN- α e β (IFNAR) ou camundongos C57BL/6 LysMCre⁺ IFNAR^{fl/fl} infectados com ZIKV (cepa africana MR766 ou cepa asiática FSS13025). Embora as respostas das células T CD8⁺ ao MR766 e FSS13025 não tenham sido idênticas, os peptídeos derivados da proteína E predominaram em ambas as cepas de ZIKV. O peptídeo “RSYCYEASI”, cuja sequência está presente no peptídeo 129, foi capaz de estimular uma resposta de células T CD8⁺ com aumento das frequências de células produtoras IFN γ ⁺ e TNF nas duas linhagens de camundongos quando infectados com ZIKV (MR766 ou FSS13025) (Ngono *et al.*, 2017).

Outros trabalhos investigaram a resposta de células T CD4⁺ contra as proteínas estruturais (C, prM e E) do ZIKV em indivíduos infectados e em alguns casos os epítomos descritos são similares aos peptídeos identificados como imunodominantes em nosso trabalho estudo. Para avaliar a resposta de células T CD4⁺ às proteínas estruturais do ZIKV, foram realizados ensaios de ELISPOT com produção de IL-2, usando PBMCs de 14 pacientes com infecção por ZIKV. As células T CD8⁺ foram depletadas e posteriormente os PBMCs foram estimulados com peptídeos que cobrem toda a sequência das proteínas de C, prM e E. Diversos epítomos foram identificados nas três proteínas estruturais. Dentre os epítomos identificados na proteína E alguns possuem semelhança com os peptídeos identificados em

nosso trabalho, entre eles: “TVSNMAEVRSYCYEA” e “MAEVRSYCYEASISD” (compartilham regiões com peptídeo 70); “YLDKQSDTQYVCKRT” (compartilha regiões com o peptídeo 76); “QYVCKRTLVDARGWGN” (compartilha regiões com os peptídeos 76 e 77) e os peptídeos “KHVLVHKEWFHDIPL” e “VHKEWFHDIPLPWA” (compartilham regiões com o peptídeo 99) (Koblichke *et al.*, 2018). Em outro estudo com cinquenta mulheres de Sergipe, Brasil, que deram à luz a bebês com microcefalia após exposição ao ZIKV durante o surto de 2015–16, os epítomos de células T da proteína E de Zika foram previstos para os cinco alelos MHC de classe II mais comuns na região e nesta análise também foram considerados os dados de ligação de peptídeos publicados em outros estudos. Vinte peptídeos foram selecionados e as respostas foram rastreadas por ELISPOT. Todos os peptídeos testados apresentaram um epítopo de células T reconhecido por vários doadores com produção de IFN γ , incluindo o peptídeo LYYLTMNKNHVLVHKEWFHD (que corresponde ao peptídeo 99) e o peptídeo TLTPVGRLITANPVITESTE (que corresponde ao peptídeo 129). Esse último estimulou uma resposta de células polifuncionais com produção de IL-13, IL-4 e IFN γ (Reynolds *et al.*, 2020).

Alguns dos peptídeos contidos na proteína E e identificados no nosso trabalho também já foram descritos como epítomos de células B. Lee e colaboradores avaliaram o reconhecimento de peptídeos por anticorpos anti-ZIKV presentes no soro de camundongos C57BL/6 WT e C57BL/6 tratados com um anticorpo monoclonal que inibe transitoriamente o receptor de IFN tipo I (MAR1-5A3) e infectados com ZIKV. A avaliação foi realizada por meio de ELISA, usando uma biblioteca de peptídeos lineares compreendendo as proteínas E e NS1 do ZIKV. O peptídeo “VCKRTLVDARGWNGCGLF” (que contém a região do peptídeo 77) foi altamente reconhecido pelos soros dos animais competentes para IFN tipo I ou tratados com MAR1-5A3. Já o peptídeo “SDLYLTMNKNHVLVHKE” (que contém uma região do peptídeo 99) apresentou um reconhecimento moderado e apenas pelo soro dos camundongos C57BL/6 WT. Em seguida, os pesquisadores avaliaram se os anticorpos direcionados aos epítomos dominantes eram neutralizantes. A depleção de anticorpos direcionados ao epítopo “VCKRTLVDARGWNGCGLF” resultou em maior nível de infecciosidade, indicando a importância desses anticorpos na neutralização da infecção pelo ZIKV (Lee *et al.*, 2020b).

Devido à alta similaridade do ZIKV com o DENV, sabe-se que existe reação cruzada das respostas imunes contra esses vírus, e alguns estudos sugerem que a imunidade contra um vírus pode moldar as respostas específicas a uma infecção subsequente com o outro. Neste sentido, foram realizados estudos com amostras de doadores soropositivos para DENV antes do início da epidemia de ZIKV. Tais células foram estimuladas *in vitro* com peptídeos

abrangendo todas as proteínas do ZIKV e os autores identificaram 93 epítomos na proteína do ZIKV, incluindo os epítomos WL VHKEWFHDIPLPW e TLTPVGR LITANPVI (que são semelhantes aos peptídeos 99 e 129, respectivamente, do nosso estudo) (Schouest *et al.*, 2021). Outro grupo avaliou a reatividade cruzada de células T entre indivíduos infectados com ZIKV e indivíduos vacinados com DENV. Foram realizados ELISPOTS com PBMCs de pacientes brasileiros, 7 com infecção prévia por ZIKV e 9 previamente imunizados com uma vacina contra DENV tetravalente, constituída pela mistura dos quatro sorotipos de DENV atenuados. O peptídeo “PVGR LITANPVITES” (correspondente ao nosso peptídeo 129) foi capaz de estimular uma resposta celular com produção de IFN γ em ambos os grupos, infectados com ZIKV ou imunizados contra DENV (Paquin-Proulx *et al.*, 2017). Delgado e colaboradores também identificaram por ELISPOT, com produção de IFN γ , epítomos de células T em doadores de sangue com história de infecção apenas por ZIKV ou infecção por DENV e ZIKV. Dentre os peptídeos imunodominantes, o “DTQYVCKRTLVD RGW” (correspondente ao nosso peptídeo 76) foi identificado em indivíduos com imunidade previa ao dengue, mas não em indivíduos DENV naives (Delgado *et al.*, 2017).

Anticorpos contra DENV também podem reconhecer epítomos de ZIKV. Com intuito de identificar epítomos específicos de ZIKV, Kam e colaboradores investigaram a resposta de anticorpos em indivíduos adultos infectados com ZIKV ou DENV, utilizando bibliotecas de peptídeos contidos nas proteínas prM, E, e NS1 de ZIKV. Os autores identificaram três peptídeos reconhecidos por amostras de pacientes infectados por ZIKV, mas não por DENV, incluindo o peptídeo “TVSNMAEVR SYCYEASIS” que compartilha os 12 últimos aminoácidos com o peptídeo 70 do nosso estudo (Kam *et al.*, 2019). Ao investigar o nível de reatividade cruzada de um painel de mAbs humanos específicos de DENV com o ZIKV, pesquisadores observaram que o mAb B-H1L1, isolado de paciente com DENV, ligou-se a vários conjuntos de peptídeos de DENV e ZIKV. O 1B-H1L1 reconheceu fortemente os peptídeos das regiões de alça de fusão de DENV e ZIKV que são altamente conservados. O mAb em questão reconhece o peptídeo “TLVD RGWNGCGLFGKGS” de ZIKV que contém uma região do peptídeo 77 (Kam *et al.*, 2017).

De um modo geral, os nossos resultados sugerem um importante papel do domínio II (DII) da proteína E de ZIKV na modulação da resposta imune celular, uma vez que, quatro dos cinco peptídeos identificados como imunodominantes em nosso modelo de estudo estão localizados neste domínio e apenas o peptídeo 129 está localizado no DIII da proteína E.

Os dados discutidos acima estão resumidos na tabela abaixo (Tabela 5.1).

Tabela 5.1: Compilado dos peptídeos da proteína E descritos na literatura que possuem semelhança com os peptídeos identificados em nosso trabalho.

Peptídeo	Peptídeo descrito na literatura	Estudo	Ensaio	Referência
Peptídeo 70 VRSYCYEASISDMAS Localização: DII	VRSYCYEASISDMAS	Epítosos imunodominantes	ELISPOT	Zhan <i>et al.</i> , 2019
	VRSYCYEASISDMAS	Epítosos de células T CD4	ICS	Ngono <i>et al.</i> , 2019
	SNMAEVRSYCYEASISDMAS	Epítosos de células T CD4	MAPS	Smith <i>et al.</i> , 2020
	RSYCYEASI	Epítosos de células T CD8	ICS	Ngono <i>et al.</i> , 2017
	TVSNMAEVRSYCYEA	Epítosos de células T CD4	ELISPOT	Koblischke <i>et al.</i> , 2018
	MAEVRSYCYEASISD	Epítosos de células T CD4	ELISPOT	Koblischke <i>et al.</i> , 2018
	TVSNMAEVRSYCYEASIS	Epítosos de células B	ELISA	Kam <i>et al.</i> , 2019
Peptídeo 76 SDTQYVCKRTLVD RG Localização: DII	DTQYVCKRTLVD RGW	Epítosos imunodominantes	ELISPOT	Delgado <i>et al.</i> , 2018
	YLDKQSDTQYVCKRT	Epítosos de células T CD4	ELISPOT	Koblischke <i>et al.</i> , 2018
	QYVCKRTLVD RGWGN	Epítosos de células T CD4	ELISPOT	Koblischke <i>et al.</i> , 2018
Peptídeo 77 VCKRTLVD RGWNGC Localização: DII	QYVCKRTLVD RGWGN	Epítosos de células T CD4	ELISPOT	Koblischke <i>et al.</i> , 2018
	VCKRTLVD RGWNGCGLF	Epítosos de células B	ELISA	Lee <i>et al.</i> , 2020b
	TLVD RGWNGCGLFGKGS	Epítosos de células B	ELISA	Kam <i>et al.</i> , 2017
Peptídeo 99 TMNKHVHKEWFH Localização: DII	KHVLVHKEWFHDIPL	Epítosos de células T CD4	ELISPOT	Koblischke <i>et al.</i> , 2018
	VHKEWFHDIPLPWA	Epítosos de células T CD4	ELISPOT	Koblischke <i>et al.</i> , 2018
	LYYLTMNKHVHKEWFHD	Epítosos de células T CD4	ELISPOT	Reynolds <i>et al.</i> , 2020
	SDLYYLTMNKHVHKE	Reatividade cruzada entre mAbs humanos de DENV e peptídeos de ZIKV	ELISA	Lee <i>et al.</i> , 2020b
	WLVHKEWFHDIPLP	Células T com reatividade cruzada DENV-ZIKV	ELISPOT	Schouest <i>et al.</i> , 2021
Peptídeo 129 VGRLITANPVITEST Localização: DIII	GRLITANPVITESTE	Epítosos de células T CD4	ELISPOT	Hassert <i>et al.</i> , 2018
	PVGRLITANPVITES	Epítosos de células T CD4	ICS	Ngono <i>et al.</i> , 2019
	PVGRLITANPVITES	Células T com reatividade cruzada DENV-ZIKV	ELISPOT	Paquin-Proulx <i>et al.</i> , 2017
	TLTPVGRLITANPVITESTE	Epítosos de células T CD4	MAPS	Smith <i>et al.</i> , 2020
	TLTPVGRLITANPVI	Células T com reatividade cruzada DENV-ZIKV	ELISPOT	Schouest <i>et al.</i> , 2021
	TLTPVGRLITANPVITESTE	Epítosos de células T CD4	ELISPOT	Reynolds <i>et al.</i> , 2020

A avaliação da resposta imune celular mediada pela vacina de DNA pZKNS1 permitiu a identificação de 3 peptídeos imunogênicos contidos na proteína NS1: 181 (LPHGWKAWGKSYFVR); 211 (RTQMKGPDWHSEELEI) e 224 (KDGCWYGMEIRPRKE). Os estudos envolvendo proteína NS1 são menos frequentes, poucos trabalhos descrevem os peptídeos identificados em nosso estudo.

Grubor-Bauk e colaboradores avaliaram a ativação de resposta imune celular gerada com algumas vacinas de DNA que codificam a proteína NS1 de ZIKV em camundongos BALB/c e uma delas foi capaz de induzir níveis significativos de IFN- γ em ensaio ELISPOT, após estímulo *in vitro* com peptídeos que englobam a região entre os aminoácidos 172 a 352 desta proteína (Grubor-Bauk *et al.*, 2019). Além disso, os autores analisaram as respostas de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (CTL) e T CD4⁺ auxiliares (T_H) *in vivo* através da tecnologia de matriz de alvo fluorescente (FTA), que mede simultaneamente as respostas de células T CTL (CD8) e T_H (CD4) em tempo real. A morte celular mediada por CTL foi observada quando as células alvo foram pulsadas com dois peptídeos que possuem uma sequência de sobreposição "MKGPWHSEELEI" (presente na sequência do peptídeo 211 do nosso trabalho), sendo que a ausência desses peptídeos aboliu completamente tal efeito, confirmando assim que os peptídeos identificados contêm epítomos de CTL funcionais. Por outro lado, de modo semelhante às análises com peptídeos contidos na proteína E, Schouest e colaboradores (2021) avaliaram a resposta de células T cruzadas específicas contra DENV e ZIKV utilizando peptídeos presentes na proteína NS1 e identificaram o peptídeo QRLPVPVNELPHGWK que compartilha os seis últimos aminoácidos com o peptídeo 181 do nosso estudo.

Os epítomos imunodominantes de células T identificados em nosso trabalho também foram descritos como epítomos de células B. Ao avaliar a resposta de anticorpos em indivíduos adultos infectados pelo ZIKV frente uma biblioteca de peptídeos, Kam e colaboradores (2019) identificaram três peptídeos reconhecidos por amostras de pacientes infectados com ZIKV, mas não com DENV, entre eles o peptídeo "REGYRTQMKGPDWHSEELE" que compartilha os 14 últimos aminoácidos com o peptídeo 211 do nosso estudo. Visando identificar epítomos de células B específicos de ZIKV para aplicação clínica, Lee e colaboradores sintetizaram e avaliaram 33 peptídeos lineares que cobrem toda a proteína NS1, dos quais 13 se mostraram altamente antigênicos, incluindo os peptídeos "WGKSYFVRAAKTNSFVVDGDTLKECPLKH" (que compartilha os seis primeiros aminoácidos com o nosso peptídeo 181), "SLAGPLSHHNTREGYRTQVKGPDWHSEELEI" (que contém a sequência do nosso

peptídeo 211) e o peptídeo “GPWHSEELEIRFEEC” (que compartilha os dez primeiros aminoácidos com o nosso peptídeo 211). Esses três epítomos apresentaram baixa reatividade cruzada com soros positivos para DENV ou CHIKV, sendo considerados epítomos específicos do ZIKV, o epítomo que contém a sequência do peptídeo 181 apresentou maior sensibilidade aos soros positivos para ZIKV (Lee *et al.*, 2018).

Um resumo dos peptídeos imunodominantes detectados em nosso trabalho e já descritos na literatura é apresentado na Tabela 5.2. Até onde sabemos, nosso estudo é o primeiro a identificar a região presente no peptídeo 224 “KDGCWYGMEIRPRKE” como imunodominante para a resposta das células T.

Tabela 5.2: Compilado dos peptídeos da proteína NS1 descritos na literatura que possuem semelhança com os peptídeos identificados em nosso trabalho.

Peptídeo	Peptídeo descrito na literatura	Estudo	Ensaio	Referência
Peptídeo 181 LPHGWKAWGKSYFVR	QRLPVPVNELPHGWK	Células T com reatividade cruzada DENV-ZIKV	ELISPOT	Schouest <i>et al.</i> , 2021
Localização: domínio Wing	WGKSYFVRAAKTNSFVVD GDTLKECPLKH	Epítomos de células B	ELISA	Lee <i>et al.</i> , 2018
Peptídeo 211 RTQMKGPHWSEELEI	MKGPWHSEELEI	Linfócitos T CD8 ⁺ citotóxicos	ELISPOT E FTA	Grubor-Bauk <i>et al.</i> , 2019
Localização: domínio β -ladder	REGYRTQMKGPHWSEELEI	Epítomos de células B	ELISA	Kam <i>et al.</i> , 2019
	SLAGPLSHHNTREGYRTQVK GPWHSEELEI	Epítomos de células B	ELISA	Lee <i>et al.</i> , 2018
	GPWHSEELEIRFEEC	Epítomos de células B	ELISA	Lee <i>et al.</i> , 2018

Um ponto importante em relação ao nosso trabalho é que as bibliotecas de peptídeos utilizadas foram baseadas nas sequências de aminoácidos das proteínas E e NS1 da linhagem africana do ZIKV, enquanto que as sequências das proteínas codificadas pelos plasmídeos pZKectoE e pZKNS1 são baseadas no vírus isolado no Brasil, semelhante a cepa asiática, o que pode ter ocasionado na perda de algum peptídeo imunodominante no nosso estudo. No entanto, as sequências destas proteínas de ambas as cepas possuem alto índice de identidade (96,58% para a proteína E e 97,44% para a proteína NS1). Em relação aos peptídeos detectados como imunodominantes no nosso estudo, não encontramos nenhuma diferença na sequência da proteína E codificada pelo plasmídeo pZKectoE (linhagem asiática) e na sequência presente na biblioteca (linhagem africana). Somente uma única mutação foi localizada no peptídeo 211 da proteína NS1, com troca de uma metionina para uma valina, ambos não-polares (a sequência codificada pela vacina é “RTQMKGPHWSEELEI” e a sequência da biblioteca “RTQVKGPWHSEELEI”).

Nossos dados demonstram que ambas as vacinas candidatas pZKectoE e pZKNS1 são capazes de induzir um nível significativo de resposta imune humoral (IgG) com anticorpos específicos para as proteínas E e NS1, além de estimular a resposta imune mediada por células (com esplenócitos secretores de IFN- γ). Futuramente, pretendemos realizar a detecção dos níveis de anticorpos neutralizantes por ensaios de soroneutralização, presentes no soro dos animais imunizados com a vacina pZKectoE. Sabe-se que os anticorpos neutralizantes possuem um papel crítico na proteção contra o ZIKV e já foi estabelecido uma correlação entre os títulos de AcN e a proteção contra a infecção pelo vírus (Dai *et al.*, 2016a; Larocca *et al.*, 2016; Lucas *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2017a; Young *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2016).

Até o momento não foi possível avaliar se as nossas vacinas de DNA conferem proteção *in vivo*, por falta de um modelo experimental murino imunocompetente disponível e suscetível à infecção com ZIKV isolado no Brasil. Existem muitos estudos, já relatados na literatura, com modelos de infecção com ZIKV utilizando animais imunodeficientes, principalmente com deficiências genéticas na via de sinalização de IFN tipo I ou tratados com anticorpos anti-receptores (Aliota *et al.*, 2016; Cugola *et al.*, 2016; Dowall *et al.*, 2016; Lazear *et al.*, 2016; Rossi *et al.*, 2016; Winkler *et al.*, 2017). Tais modelos são úteis para estudo da patogênese viral, no entanto, para testes de vacina é importante o uso de animais com o sistema imunológico competente, pois o uso de camundongos sem respostas de IFN limitam a interpretação de alguns resultados, especialmente para vacinas de DNA que são bons indutores de respostas de células T. Por outro lado, outros grupos têm utilizado camundongos neonatos para estudo da infecção viral, por estes serem susceptíveis à infecção, principalmente na primeira semana de vida (Lazear *et al.*, 2016; Manangeeswaran *et al.*, 2016; Miner & Diamond, 2017). Entretanto, para a avaliação de vacinas cujo foco é a imunização de indivíduos adultos, é desejável o estabelecimento de um modelo experimental com animais também adultos.

A passagem do vírus em um determinado órgão pode resultar na sua adaptação a um tecido ou tipo de célula específica. Dessa forma, a passagem sucessiva do vírus DENV, isolado de paciente durante epidemias ocorridas no Hawaii e na Nova Guiné, em cérebros de camundongos neonatos permitiu a obtenção de uma cepa viral capaz de produzir doença neurológica letal nestes animais (Cole & Wisseman, 1969; Sabin & Schlesinger, 1945). Os vírus neuroadaptados são amplamente utilizados para testes de protótipos vacinais anti-dengue (Azevedo *et al.*, 2011; Bray *et al.*, 1989; Clementes *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2006; Falgout *et al.*, 1990; Kaufman *et al.*, 1987; Oliveira *et al.*, 2016; van Der Most *et al.*, 2000). De modo semelhante, o vírus Zika isolado na África também foi neuroadaptado, resultando na cepa MR766 que foi obtida após mais de 100 passagens em cérebros de camundongos.

Posteriormente, a inoculação desse vírus por via intracerebral causou doença neurológica em camundongos lactantes ou adultos (Dick *et al.*, 1952a, 1952b).

Sendo assim, visando estabelecer um modelo murino imunocompetente, foram realizadas sucessivas passagens de uma amostra de ZIKV, isolado de um paciente no Espírito Santo, em cérebros de camundongos Swiss recém-nascidos e posteriormente em animais jovens (com 15 ou mais dias de vida). Nossos resultados iniciais mostraram um aumento considerável da carga viral após a primeira passagem. No entanto, observamos uma variação nas diferentes passagens subsequentes. Os ensaios de plaque também revelaram alteração da morfologia. Inicialmente, os plaques apresentaram um aumento do diâmetro. No entanto, após a 10^a passagem, houve uma diminuição considerável no tamanho dos plaques, coincidindo com o aparecimento de sinais clínicos em animais mais velhos (inoculados com 9 dias). Animais com 16 dias quando inoculados com a última passagem do vírus, não sobreviveram ao desafio.

Posteriormente, camundongos adultos com 7 semanas de vida, foram inoculados com uma das últimas passagens do vírus em processo de neuroadaptação (11^a passagem), para avaliar se essa amostra era capaz de induzir morbidade e/ou mortalidade nesses animais. Os animais foram acompanhados por 49 dias após a inoculação, mas não apresentaram quaisquer sinais clínicos. Contudo, apesar da ausência de sinais clínicos, foi possível detectar anticorpos anti-NS1 no soro destes animais, indicando, assim, que o vírus foi capaz de replicar nestes camundongos, uma vez que a NS1 só é expressa durante a replicação viral.

O sequenciamento do genoma do vírus após as passagens iniciais revelou mutações pontuais que resultaram na troca de aminoácidos na sequência que codifica as proteínas M, E e NS1. As demais passagens também serão sequenciadas para identificação de outras possíveis mutações. Esses dados indicam que o vírus sofreu modificações que podem estar relacionadas à sua maior virulência. No entanto, mais passagens são necessárias para obtenção do vírus neuroadaptado, com capacidade de causar sinais clínicos da infecção em animais adultos.

6. Conclusões

6.1 Vacinas de DNA

- ✓ Ambas as vacinas, pZKEctoE e pZKNS1, foram capazes de mediar a expressão das proteínas recombinantes E e NS1, respectivamente;
- ✓ As vacinas pZKEctoE e pZKNS1 induziram a produção de anticorpos anti-E e anti-NS1 em camundongos, respectivamente, e foram capazes de gerar uma resposta celular com produção de IFN- γ ;
- ✓ Foram identificados 5 epítomos imunodominantes na proteína E e 3 na proteína NS1 capazes de estimular a produção de IFN- γ .

6.2 Neuroadaptação

- ✓ Camundongos BALB/c adultos inoculados com ZIKV não apresentaram sinais clínicos da infecção embora aparentemente o vírus replique nestes animais, uma vez que foram detectados anticorpos anti-NS1 após a inoculação;
- ✓ Até o momento, não foi possível o estabelecimento total de um modelo murino imunocompetente. Entretanto, os dados indicam que o vírus está se modificando ao longo das passagens em cérebro de camundongos, se tornando mais infeccioso;
- ✓ Ao longo das passagens os plaques apresentaram alteração da morfologia. Inicialmente, apresentaram um aumento do diâmetro e nas últimas passagens uma diminuição considerável no tamanho dos plaques foi observada.
- ✓ O sequenciamento do genoma do vírus revelou mutações pontuais que resultaram na troca de aminoácidos nas sequências que codificam as proteínas M, E e NS1;
- ✓ Camundongos Swiss, com 16 dias de vida inoculados com a última passagem do vírus apresentaram 100% de mortalidade, indicando um processo de neuroadaptação do vírus.

7. Perspectivas

- ✓ Avaliar se os anticorpos gerados com a vacina pZKEctoE apresentam atividade soroneutralizante por ensaios de redução de plaque em cultura de células;
- ✓ Fenotipar as células T dos animais imunizados com as vacinas de DNA de ZIKV que respondem aos peptídeos selecionados por ELISPOT;
- ✓ Continuar os ensaios para neuroadaptação em camundongo de ZIKV isolado;
- ✓ Avaliar a proteção induzida com as vacinas pZKEctoE e pZKNS1 em camundongos desafiados com o ZIKV.

8. Referências

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2019). *Basic immunology e-book: functions and disorders of the immune system*. Elsevier Health Sciences.
- Abbink, P., Larocca, R. A., Rafael, A., Bricault, C. A., Moseley, E. T., Boyd, M., ... & Barouch, D. H. (2016). Protective efficacy of multiple vaccine platforms against Zika virus challenge in rhesus monkeys. *Science*, *353*(6304), 1129-1132.
- Akira, S., & Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nature reviews immunology*, *4*(7), 499-511.
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, *124*(4), 783-801.
- Aliota, M. T., Bassit, L., Bradrick, S. S., Cox, B., Garcia-Blanco, M. A., Gavegnano, C., ... & Weaver, S. C. (2017). Zika in the Americas, year 2: What have we learned? What gaps remain? A report from the Global Virus Network. *Antiviral research*, *144*, 223-246.
- Alves, A. M. B., Costa, S. M., & Pinto, P. B. A. (2021). Dengue Virus and Vaccines: How Can DNA Immunization Contribute to This Challenge?. *Frontiers in Medical Technology*, *3*, 13.
- Azevedo, A. S., Gonçalves, A. J., Archer, M., Freire, M. S., Galler, R., & Alves, A. M. (2013). The synergistic effect of combined immunization with a DNA vaccine and chimeric yellow fever/dengue virus leads to strong protection against dengue. *PLoS One*, *8*(3), e58357.
- Azevedo, A. S., Yamamura, A. M., Freire, M. S., Trindade, G. F., Bonaldo, M., Galler, R., & Alves, A. M. (2011). DNA vaccines against dengue virus type 2 based on truncate envelope protein or its domain III. *PloS one*, *6*(7), e20528.
- Bailey, M. J., Broecker, F., Duehr, J., Arumemi, F., Krammer, F., Palese, P., & Tan, G. S. (2019). Antibodies elicited by an NS1-based vaccine protect mice against Zika virus. *MBio*, *10*(2), e02861-18.
- Baldwin, W. R., Livengood, J. A., Giebler, H. A., Stovall, J. L., Boroughs, K. L., Sonnberg, S., ... & Dean, H. J. (2018). Purified inactivated Zika vaccine candidates afford protection against lethal challenge in mice. *Scientific reports*, *8*(1), 1-13.
- Barba-Spaeth, G., Dejnirattisai, W., Rouvinski, A., Vaney, M. C., Medits, I., Sharma, A., ... & Rey, F. A. (2016). Structural basis of potent Zika–dengue virus antibody cross-neutralization. *Nature*, *536*(7614), 48-53.
- Bardina, S. V., Bunduc, P., Tripathi, S., Duehr, J., Frere, J. J., Brown, J. A., ... & Lim, J. K. (2017). Enhancement of Zika virus pathogenesis by preexisting antinflavivirus immunity. *Science*, *356*(6334), 175-180.
- Beatty, P. R., Puerta-Guardo, H., Killingbeck, S. S., Glasner, D. R., Hopkins, K., & Harris, E. (2015). Dengue virus NS1 triggers endothelial permeability and vascular leak that is prevented by NS1 vaccination. *Science translational medicine*, *7*(304), 304ra141-304ra141.
- Bowen, J. R., Quicke, K. M., Maddur, M. S., O’Neal, J. T., McDonald, C. E., Fedorova, N. B., ... & Suthar, M. S. (2017). Zika virus antagonizes type I interferon responses during infection of human dendritic cells. *PLoS pathogens*, *13*(2), e1006164.

- Brasil, P., Pereira Jr, J. P., Moreira, M. E., Ribeiro Nogueira, R. M., Damasceno, L., Wakimoto, M., ... & Nielsen-Saines, K. (2016). Zika virus infection in pregnant women in Rio de Janeiro. *New England Journal of Medicine*, 375(24), 2321-2334.
- Brault, A. C., Domi, A., McDonald, E. M., Talmi-Frank, D., McCurley, N., Basu, R., ... & Guirakhoo, F. (2017). A Zika vaccine targeting NS1 protein protects immunocompetent adult mice in a lethal challenge model. *Scientific reports*, 7(1), 1-11.
- Bray, M., Zhao, B. T., Markoff, L. E. W. I. S., Eckels, K. H., Chanock, R. M., & Lai, C. J. (1989). Mice immunized with recombinant vaccinia virus expressing dengue 4 virus structural proteins with or without nonstructural protein NS1 are protected against fatal dengue virus encephalitis. *Journal of Virology*, 63(6), 2853-2856.
- Brown, W. C., Akey, D. L., Konwerski, J. R., Tarrasch, J. T., Skinnotis, G., Kuhn, R. J., & Smith, J. L. (2016). Extended surface for membrane association in Zika virus NS1 structure. *Nature structural & molecular biology*, 23(9), 865-867.
- Campos, G. S., Bandeira, A. C., & Sardi, S. I. (2015). Zika virus outbreak, bahia, brazil. *Emerging infectious diseases*, 21(10), 1885.
- Castanha, P., & Marques, E. T. (2020). A glimmer of hope: recent updates and future challenges in Zika vaccine development. *Viruses*, 12(12), 1371.
- Centers for Disease Control and Prevention. Congenital Zika Syndrome & Other Birth Defects (2021). Acesso em 10 de junho de 2021. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/pregnancy/zika/testing-follow-up/zika-syndrome-birth-defects.html>>
- Chambers, T. J., Hahn, C. S., Galler, R., & Rice, C. M. (1990). Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annual review of microbiology*, 44(1), 649-688.
- Chung, K. M., Liszewski, M. K., Nybakken, G., Davis, A. E., Townsend, R. R., Fremont, D. H., ... & Diamond, M. S. (2006). West Nile virus nonstructural protein NS1 inhibits complement activation by binding the regulatory protein factor H. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(50), 19111-19116.
- Ci, Y., Liu, Z. Y., Zhang, N. N., Niu, Y., Yang, Y., Xu, C., ... & Shi, L. (2020). Zika NS1-induced ER remodeling is essential for viral replication. *Journal of Cell Biology*, 219(2).
- Clements, D. E., Coller, B. A. G., Lieberman, M. M., Ogata, S., Wang, G., Harada, K. E., ... & Humphreys, T. (2010). Development of a recombinant tetravalent dengue virus vaccine: immunogenicity and efficacy studies in mice and monkeys. *Vaccine*, 28(15), 2705-2715.
- Cole, G. A., & Wisseman JR, C. L. (1969). Pathogenesis of type 1 dengue virus infection in suckling, weanling and adult mice: The relation of virus replication to interferon and antibody formation. *American journal of epidemiology*, 89(6), 669-680.
- Costa, S. M. D., Freire, M. D. S., & Alves, A. M. B. (2006a). DNA vaccine against the non-structural 1 protein (NS1) of dengue 2 virus. *Vaccine*, 24(21), 4562-4564.
- Costa, S. M., Azevedo, A. S., Paes, M. V., Sarges, F. S., Freire, M. S., & Alves, A. M. B. (2007). DNA vaccines against dengue virus based on the ns1 gene: the influence of different

signal sequences on the protein expression and its correlation to the immune response elicited in mice. *Virology*, 358(2), 413-423.

Costa, S. M., Paes, M. V., Barreto, D. F., Pinhão, A. T., Barth, O. M., Queiroz, J. L., ... & Alves, A. M. (2006b). Protection against dengue type 2 virus induced in mice immunized with a DNA plasmid encoding the non-structural 1 (NS1) gene fused to the tissue plasminogen activator signal sequence. *Vaccine*, 24(2), 195-205.

Cox, F., van der Fits, L., Abbink, P., Larocca, R. A., van Huizen, E., Saeland, E., ... & Zahn, R. (2018). 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*, 13(8), e0202820.

Cugola, F. R., Fernandes, I. R., Russo, F. B., Freitas, B. C., Dias, J. L., Guimarães, K. P., ... & Beltrão-Braga, P. C. (2016). The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature*, 534(7606), 267-271.

Dai, L., Song, J., Lu, X., Deng, Y. Q., Musyoki, A. M., Cheng, H., ... & Gao, G. F. (2016b). Structures of the Zika virus envelope protein and its complex with a flavivirus broadly protective antibody. *Cell host & microbe*, 19(5), 696-704.

Dai, L., Wang, Q., Qi, J., Shi, Y., Yan, J., & Gao, G. F. (2016a). Molecular basis of antibody-mediated neutralization and protection against flavivirus. *Iubmb Life*, 68(10), 783-791.

Dalmo, R. A. (2018). DNA vaccines for fish: Review and perspectives on correlates of protection. *Journal of fish diseases*, 41(1), 1-9.

Davidson, A. H., Traub-Dargatz, J. L., Rodeheaver, R. M., Ostlund, E. N., Pedersen, D. D., Moorhead, R. G., ... & Salman, M. D. (2005). Immunologic responses to West Nile virus in vaccinated and clinically affected horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 226(2), 240-245.

de Araújo, T. V. B., Rodrigues, L. C., de Alencar Ximenes, R. A., de Barros Miranda-Filho, D., Montarroyos, U. R., de Melo, A. P. L., ... & Martelli, C. M. T. (2016). Association between Zika virus infection and microcephaly in Brazil, January to May, 2016: preliminary report of a case-control study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(12), 1356-1363.

de Oliveira, W. K., de França, G. V. A., Carmo, E. H., Duncan, B. B., de Souza Kuchenbecker, R., & Schmidt, M. I. (2017). Infection-related microcephaly after the 2015 and 2016 Zika virus outbreaks in Brazil: a surveillance-based analysis. *The Lancet*, 390(10097), 861-870.

Dejnirattisai, W., Supasa, P., Wongwiwat, W., Rouvinski, A., Barba-Spaeth, G., Duangchinda, T., ... & Screaton, G. R. (2016). Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with Zika virus. *Nature immunology*, 17(9), 1102-1108.

Delgado, F. G., Torres, K. I., Castellanos, J. E., Romero-Sánchez, C., Simon-Lorière, E., Sakuntabhai, A., & Roth, C. (2018). Improved immune responses against Zika virus after sequential dengue and Zika virus infection in humans. *Viruses*, 10(9), 480.

- Dick, G. W., Kitchen, S. F., & Haddow, A. J. (1952a). Zika virus (I). Isolations and serological specificity. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene*, 46(5), 509-520.
- Dick, G. W., Kitchen, S. F., & Haddow, A. J. (1952b). Zika virus (II). Pathogenicity and physical properties. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene*, 46(5).
- Dowall, S. D., Graham, V. A., Rayner, E., Atkinson, B., Hall, G., Watson, R. J., ... & Hewson, R. (2016). A susceptible mouse model for Zika virus infection. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(5), e0004658.
- Dowd, K. A., Ko, S. Y., Morabito, K. M., Yang, E. S., Pelc, R. S., DeMaso, C. R., ... & Graham, B. S. (2016). Rapid development of a DNA vaccine for Zika virus. *Science*, 354(6309), 237-240.
- Draghia- Akli, R., Ellis, K. M., Hill, L. A., Malone, P. B., & Fiorotto, M. L. (2003). High- efficiency growth hormone releasing hormone plasmid vector administration into skeletal muscle mediated by electroporation in pigs. *The FASEB journal*, 17(3), 1-17.
- Dudley, D. M., Aliota, M. T., Mohr, E. L., Weiler, A. M., Lehrer-Brey, G., Weisgrau, K. L., ... & O'Connor, D. H. (2016). A rhesus macaque model of Asian-lineage Zika virus infection. *Nature communications*, 7(1), 1-9.
- Duffy, M. R., Chen, T. H., Hancock, W. T., Powers, A. M., Kool, J. L., Lanciotti, R. S., ... & Hayes, E. B. (2009). Zika virus outbreak on Yap Island, federated states of Micronesia. *New England Journal of Medicine*, 360(24), 2536-2543.
- Emergent BioSolutions. Emergent BioSolutions e Valneva relatam resultados positivos de fase 1 para sua vacina candidata contra o vírus Zika (2018). Data de acesso: 19 de março de 2020. Disponível em: <<http://globenewswire.com/news-release/2018/11/19/1654097/0/en/Emergent-BioSolutions-and-Valneva-Report-Positive-Phase-1-Results-for-Their-Vaccine-Candidate-Against-the-Zika-Virus.html? Culture = en-us2018>>.
- Enfissi, A., Codrington, J., Roosblad, J., Kazanji, M., & Rousset, D. (2016). Zika virus genome from the Americas. *The Lancet*, 387(10015), 227-228.
- Falgout, B., Bray, M., Schlesinger, J. J., & Lai, C. J. (1990). Immunization of mice with recombinant vaccinia virus expressing authentic dengue virus nonstructural protein NS1 protects against lethal dengue virus encephalitis. *Journal of virology*, 64(9), 4356-4363.
- Fauci, A. S., & Morens, D. M. (2016). Zika virus in the Americas—yet another arbovirus threat. *New England journal of medicine*, 374(7), 601-604.
- Ferguson, N. M., Rodríguez-Barraquer, I., Dorigatti, I., Mier-y-Teran-Romero, L., Laydon, D. J., & Cummings, D. A. (2016). Benefits and risks of the Sanofi-Pasteur dengue vaccine: Modeling optimal deployment. *Science*, 353(6303), 1033-1036.
- Fernandez, E., Dejnirattisai, W., Cao, B., Scheaffer, S. M., Supasa, P., Wongwiwat, W., ... & Diamond, M. S. (2017). Anti-Dengue E-dimer epitope human antibodies have therapeutic activity against Zika virus infection. *Nature immunology*, 18(11), 1261.

- Flamand, M., Megret, F., Mathieu, M., Lepault, J., Rey, F. A., & Deubel, V. (1999). Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. *Journal of virology*, 73(7), 6104-6110.
- Flipse, J., & Smit, J. M. (2015). The complexity of a dengue vaccine: a review of the human antibody response. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(6), e0003749.
- Fowler, A. M., Tang, W. W., Young, M. P., Mamidi, A., Viramontes, K. M., McCauley, M. D., ... & Shresta, S. (2018). Maternally acquired Zika antibodies enhance dengue disease severity in mice. *Cell host & microbe*, 24(5), 743-750.
- Garg, H., Mehmetoglu-Gurbuz, T., & Joshi, A. (2018). Recent advances in Zika virus vaccines. *Viruses*, 10(11), 631.
- Gaudinski, M. R., Houser, K. V., Morabito, K. M., Hu, Z., Yamshchikov, G., Rothwell, R. S., ... & Mulligan, M. (2018). Safety, tolerability, and immunogenicity of two Zika virus DNA vaccine candidates in healthy adults: randomised, open-label, phase 1 clinical trials. *The Lancet*, 391(10120), 552-562.
- Göertz, G. P., Abbo, S. R., Fros, J. J., & Pijlman, G. P. (2018). Functional RNA during Zika virus infection. *Virus research*, 254, 41-53.
- Goo, L., DeMaso, C. R., Pelc, R. S., Ledgerwood, J. E., Graham, B. S., Kuhn, R. J., & Pierson, T. C. (2018). The Zika virus envelope protein glycan loop regulates virion antigenicity. *Virology*, 515, 191-202.
- Gordon, A., Gresh, L., Ojeda, S., Katzelnick, L. C., Sanchez, N., Mercado, J. C., ... & Harris, E. (2019). Prior dengue virus infection and risk of Zika: A pediatric cohort in Nicaragua. *PLoS medicine*, 16(1), e1002726.
- Gotuzzo, E., Yactayo, S., & Córdova, E. (2013). Efficacy and duration of immunity after yellow fever vaccination: systematic review on the need for a booster every 10 years. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 89(3), 434-444.
- Grant, A., Ponia, S. S., Tripathi, S., Balasubramaniam, V., Miorin, L., Sourisseau, M., ... & García-Sastre, A. (2016). Zika virus targets human STAT2 to inhibit type I interferon signaling. *Cell host & microbe*, 19(6), 882-890.
- Grard, G., Caron, M., Mombo, I. M., Nkoghe, D., Mboui Ondo, S., Jiolle, D., ... & Leroy, E. M. (2014). Zika virus in Gabon (Central Africa)—2007: a new threat from *Aedes albopictus*?. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(2), e2681.
- Grubor-Bauk, B., Wijesundara, D. K., Masavuli, M., Abbink, P., Peterson, R. L., Prow, N. A., ... & Gowans, E. J. (2019). NS1 DNA vaccination protects against Zika infection through T cell-mediated immunity in immunocompetent mice. *Science advances*, 5(12), eaax2388.
- Gubler, D.J., Kuno, G., Markoff, L., 2007. Flaviviruses. In: Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B., Straus, S.E. (Eds.), *Fields Virology*, fifth ed. Lippincott Williams & Wilkins Publishers, Philadelphia, PA, pp. 1153–1252.

- Gutsche, I., Coulibaly, F., Voss, J. E., Salmon, J., d'Alayer, J., Ermonval, M., ... & Flamand, M. (2011). Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(19), 8003-8008.
- Hackett, B. A., & Cherry, S. (2018). Flavivirus internalization is regulated by a size-dependent endocytic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(16), 4246-4251.
- Haddow, A. J., Williams, M. C., Woodall, J. P., Simpson, D. I., & Goma, L. K. (1964). Twelve isolations of Zika virus from *Aedes* (*Stegomyia*) *africanus* (Theobald) taken in and above a Uganda forest. *Bulletin of the World Health Organization*, *31*(1), 57.
- Halstead, S. B., & O'rourke, E. J. (1977). Antibody-enhanced dengue virus infection in primate leukocytes. *Nature*, *265*(5596), 739-741.
- Hamel, R., Dejarnac, O., Wichit, S., Ekchariyawat, P., Neyret, A., Luplertlop, N., ... & Missé, D. (2015). Biology of Zika virus infection in human skin cells. *Journal of virology*, *89*(17), 8880-8896.
- Hasan, S. S., Miller, A., Sapparapu, G., Fernandez, E., Klose, T., Long, F., ... & Rossmann, M. G. (2017). A human antibody against Zika virus crosslinks the E protein to prevent infection. *Nature communications*, *8*(1), 1-6.
- Hasan, S. S., Sevvana, M., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2018). Structural biology of Zika virus and other flaviviruses. *Nature structural & molecular biology*, *25*(1), 13-20.
- Hassert, M., Harris, M. G., Brien, J. D., & Pinto, A. K. (2019). Identification of protective CD8 T cell responses in a mouse model of Zika virus infection. *Frontiers in immunology*, *10*, 1678.
- Hassert, M., Wolf, K. J., Schwetye, K. E., DiPaolo, R. J., Brien, J. D., & Pinto, A. K. (2018). CD4+ T cells mediate protection against Zika associated severe disease in a mouse model of infection. *PLoS pathogens*, *14*(9), e1007237.
- Hayes, E. B. (2009). Zika virus outside Africa. *Emerging infectious diseases*, *15*(9), 1347.
- Heinz, F. X., & Stiasny, K. (2017). The antigenic structure of Zika virus and its relation to other flaviviruses: implications for infection and immunoprophylaxis. *Microbiology and molecular Biology reviews*, *81*(1), e00055-16.
- Hennessey, M., Fischer, M., & Staples, J. E. (2016). Zika virus spreads to new areas—region of the Americas, May 2015–January 2016. *American journal of Transplantation*, *16*(3), 1031-1034.
- Hombach, J., Barrett, A. D., Cardoso, M. J., Deubel, V., Guzman, M., Kurane, I., ... & Kieny, M. P. (2005). Review on flavivirus vaccine development: proceedings of a meeting jointly organised by the World Health Organization and the Thai Ministry of Public Health, 26–27 April 2004, Bangkok, Thailand. *Vaccine*, *23*(21), 2689-2695.
- Hu, Y., & Sun, L. (2019). Systematic analysis of structure similarity between Zika virus and other flaviviruses. *ACS infectious diseases*, *5*(7), 1070-1080.

- Ioos, S., Mallet, H. P., Goffart, I. L., Gauthier, V., Cardoso, T., & Herida, M. (2014). Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Medecine et maladies infectieuses*, *44*(7), 302-307.
- Jacobs, S. C., Stephenson, J. R., & Wilkinson, G. W. (1992). High-level expression of the tick-borne encephalitis virus NS1 protein by using an adenovirus-based vector: protection elicited in a murine model. *Journal of Virology*, *66*(4), 2086-2095.
- Jagger, B. W., Dowd, K. A., Chen, R. E., Desai, P., Foreman, B., Burgomaster, K. E., ... & Diamond, M. S. (2019). Protective efficacy of nucleic acid vaccines against transmission of zika virus during pregnancy in mice. *The Journal of infectious diseases*, *220*(10), 1577-1588.
- Javed, F., Manzoor, K. N., Ali, M., Haq, I. U., Khan, A. A., Zaib, A., & Manzoor, S. (2018). Zika virus: what we need to know?. *Journal of basic microbiology*, *58*(1), 3-16.
- Kam, Y. W., Lee, C. Y. P., Teo, T. H., Howland, S. W., Amrun, S. N., Lum, F. M., ... & Rénia, L. (2017). Cross-reactive dengue human monoclonal antibody prevents severe pathologies and death from Zika virus infections. *JCI insight*, *2*(8).
- Kam, Y. W., Leite, J. A., Amrun, S. N., Lum, F. M., Yee, W. X., Bakar, F. A., ... & Ng, L. F. (2019). ZIKV-specific NS1 epitopes as serological markers of acute Zika virus infection. *The Journal of infectious diseases*, *220*(2), 203-212.
- Katzelnick, L. C., Coloma, J., & Harris, E. (2017). Dengue: knowledge gaps, unmet needs, and research priorities. *The Lancet Infectious Diseases*, *17*(3), e88-e100.
- Kaufman, B. M., Summers, P. L., Dubois, D. R., & Eckels, K. H. (1987). Monoclonal antibodies against dengue 2 virus E-glycoprotein protect mice against lethal dengue infection. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, *36*(2), 427-434.
- Keeffe, J. R., Van Rompay, K. K., Olsen, P. C., Wang, Q., Gazumyan, A., Azzopardi, S. A., ... & Robbiani, D. F. (2018). A combination of two human monoclonal antibodies prevents Zika virus escape mutations in non-human primates. *Cell reports*, *25*(6), 1385-1394.
- Khan, K. H. (2013). DNA vaccines: roles against diseases. *Germs*, *3*(1), 26.
- Kiecker, F., Streitz, M., Ay, B., Cherepnev, G., Volk, H. D., Volkmer-Engert, R., & Kern, F. (2004). Analysis of antigen-specific T-cell responses with synthetic peptides—what kind of peptide for which purpose?. *Human immunology*, *65*(5), 523-536.
- Kimura-Kuroda, J. U. N. K., & Yasui, K. O. T. A. R. O. (1988). Protection of mice against Japanese encephalitis virus by passive administration with monoclonal antibodies. *The Journal of Immunology*, *141*(10), 3606-3610.
- Koblichke, M., Stiasny, K., Aberle, S. W., Malafa, S., Tsouchnikas, G., Schwaiger, J., ... & Aberle, J. H. (2018). Corrigendum: Structural Influence on the Dominance of Virus-Specific CD4 T Cell Epitopes in Zika Virus Infection. *Frontiers in immunology*, *9*, 2083.
- Krauer, F., Riesen, M., Reveiz, L., Oladapo, O. T., Martínez-Vega, R., Porgo, T. V., ... & WHO Zika Causality Working Group. (2017). Zika virus infection as a cause of congenital brain abnormalities and Guillain-Barré syndrome: systematic review. *PLoS medicine*, *14*(1), e1002203.

- Kumar, A., Kumar, P., & Giri, R. (2020). Zika virus NS4A cytosolic region (residues 1–48) is an intrinsically disordered domain and folds upon binding to lipids. *Virology*, *550*, 27-36.
- Kuno, G., & Chang, G. J. (2007). Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Archives of virology*, *152*(4), 687-696.
- Larocca, R. A., Abbink, P., Peron, J. P. S., Paolo, M. D. A., Iampietro, M. J., Badamchi-Zadeh, A., ... & Barouch, D. H. (2016). Vaccine protection against Zika virus from Brazil. *Nature*, *536*(7617), 474-478.
- Lauer, K. B., Borrow, R., & Blanchard, T. J. (2017). Multivalent and multipathogen viral vector vaccines. *Clinical and Vaccine Immunology*, *24*(1), e00298-16.
- Lazear, H. M., Govero, J., Smith, A. M., Platt, D. J., Fernandez, E., Miner, J. J., & Diamond, M. S. (2016). A mouse model of Zika virus pathogenesis. *Cell host & microbe*, *19*(5), 720-730.
- Lecouturier, V., Bernard, M. C., Berry, C., Carayol, S., Richier, E., Boudet, F., & Heinrichs, J. (2019). Immunogenicity and protection conferred by an optimized purified inactivated Zika vaccine in mice. *Vaccine*, *37*(20), 2679-2686.
- Lecouturier, V., Pavot, V., Berry, C., Donadieu, A., de Montfort, A., Boudet, F., ... & Heinrichs, J. (2020). An optimized purified inactivated Zika vaccine provides sustained immunogenicity and protection in cynomolgus macaques. *NPJ vaccines*, *5*(1), 1-10.
- Ledwith, B.J., Manam, S., Troilo, P.J., Barnum, A.B., Pauley, C.J., Griffiths II, T.G., ... & Nichols, W.W. (2000). Vacinas de DNA plasmídico: investigação da integração no DNA celular do hospedeiro após injeção intramuscular em camundongos. *Intervirolgy*, *43* (4-6), 258-272.
- Lee, C. Y. P., Carissimo, G., Chen, Z., Lum, F. M., Abu Bakar, F., Rajarethinam, R., ... & Ng, L. F. (2020b). Type I interferon shapes the quantity and quality of the anti- Zika virus antibody response. *Clinical & translational immunology*, *9*(4), e1126.
- Lee, H. J., Cho, Y., Kang, H. J., Choi, H., Han, K. R., Chong, C. K., & Kim, Y. B. (2018). Identification of peptide based B-cell epitopes in Zika virus NS1. *Biochemical and biophysical research communications*, *505*(4), 1010-1014.
- Lee, J. Y., Nguyen, T. T. N., & Myoung, J. (2020a). Zika Virus-Encoded NS2A and NS4A Strongly Downregulate NF-κB Promoter Activity.
- Li, A., Yu, J., Lu, M., Ma, Y., Attia, Z., Shan, C., ... & Li, J. (2018). A Zika virus vaccine expressing premembrane-envelope-NS1 polyprotein. *Nature communications*, *9*(1), 1-17.
- Li, G., Poulsen, M., Fenyvuesvolgyi, C., Yashiroda, Y., Yoshida, M., Simard, J. M., ... & Zhao, R. Y. (2017). Characterization of cytopathic factors through genome-wide analysis of the Zika viral proteins in fission yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(3), E376-E385.
- Li, L., Saade, F., & Petrovsky, N. (2012). The future of human DNA vaccines. *Journal of biotechnology*, *162*(2-3), 171-182.

- Liang, Q., Luo, Z., Zeng, J., Chen, W., Foo, S. S., Lee, S. A., ... & Jung, J. U. (2016). 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*, 19(5), 663-671.
- Lindenbach, B. D. & Rice, C. M. (2007). The viruses and their replication. *Fields virology*, 1101-1152.
- Liu, M. A. (2019). A comparison of plasmid DNA and mRNA as vaccine technologies. *Vaccines*, 7(2), 37.
- Liu, X., Qu, L., Ye, X., Yi, C., Zheng, X., Hao, M., ... & Chen, L. (2018). Incorporation of NS1 and prM/M are important to confer effective protection of adenovirus-vectored Zika virus vaccine carrying E protein. *npj Vaccines*, 3(1), 1-8.
- Liu, Y., Liu, J., & Cheng, G. (2016). Vaccines and immunization strategies for dengue prevention. *Emerging microbes & infections*, 5(1), 1-6.
- López-Camacho, C., Abbink, P., Larocca, R. A., Dejnirattisai, W., Boyd, M., Badamchi-Zadeh, A., ... & Reyes-Sandoval, A. (2018). Rational Zika vaccine design via the modulation of antigen membrane anchors in chimpanzee adenoviral vectors. *Nature communications*, 9(1), 1-11.
- Lowe, R., Barcellos, C., Brasil, P., Cruz, O. G., Honório, N. A., Kuper, H., & Carvalho, M. S. (2018). The Zika virus epidemic in Brazil: from discovery to future implications. *International journal of environmental research and public health*, 15(1), 96.
- Lu, L. L., Suscovich, T. J., Fortune, S. M., & Alter, G. (2018). Beyond binding: antibody effector functions in infectious diseases. *Nature Reviews Immunology*, 18(1), 46-61.
- Lucas, C. G., Kitoko, J. Z., Ferreira, F. M., Suzart, V. G., Papa, M. P., Coelho, S. V., ... & Bozza, M. T. (2018). Critical role of CD4⁺ T cells and IFN γ signaling in antibody-mediated resistance to Zika virus infection. *Nature communications*, 9(1), 1-12.
- Luo, D., Xu, T., Watson, R. P., Scherer-Becker, D., Sampath, A., Jahnke, W., ... & Lescar, J. (2008). Insights into RNA unwinding and ATP hydrolysis by the flavivirus NS3 protein. *The EMBO journal*, 27(23), 3209-3219.
- Magnani, D. M., Rogers, T. F., Beutler, N., Ricciardi, M. J., Bailey, V. K., Gonzalez-Nieto, L., ... & Watkins, D. I. (2017). Neutralizing human monoclonal antibodies prevent Zika virus infection in macaques. *Science translational medicine*, 9(410).
- Manangeeswaran, M., Ireland, D. D., & Verthelyi, D. (2016). Zika (PRVABC59) infection is associated with T cell infiltration and neurodegeneration in CNS of immunocompetent neonatal C57Bl/6 mice. *PLoS pathogens*, 12(11), e1006004.
- Marchette, N. J., Garcia, R., & Rudnick, A. (1969). Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 18(3), 411-15.
- Martinon, F., Mayor, A., & Tschopp, J. (2009). The inflammasomes: guardians of the body. *Annual review of immunology*, 27, 229-265.

- Mason, P. W., Dalrymple, J. M., Gentry, M. K., McCown, J. M., Hoke, C. H., Burke, D. S., ... & Mason, T. L. (1989). Molecular characterization of a neutralizing domain of the Japanese encephalitis virus structural glycoprotein. *Journal of general virology*, 70(8), 2037-2049.
- McLean, J. E., Wudzinska, A., Datan, E., Quaglino, D., & Zakeri, Z. (2011). Flavivirus NS4A-induced autophagy protects cells against death and enhances virus replication. *Journal of Biological Chemistry*, 286(25), 22147-22159.
- Miller, J. D., van der Most, R. G., Akondy, R. S., Glidewell, J. T., Albott, S., Masopust, D., ... & Ahmed, R. (2008). Human effector and memory CD8+ T cell responses to smallpox and yellow fever vaccines. *Immunity*, 28(5), 710-722.
- Miller, S., Sparacio, S., & Bartenschlager, R. (2006). Subcellular localization and membrane topology of the dengue virus type 2 non-structural protein 4B. *Journal of Biological Chemistry*, 281(13), 8854-8863.
- Miner, J. J., & Diamond, M. S. (2017). Zika virus pathogenesis and tissue tropism. *Cell host & microbe*, 21(2), 134-142.
- Ming, G. L., Tang, H., & Song, H. (2016). Advances in Zika virus research: stem cell models, challenges, and opportunities. *Cell stem cell*, 19(6), 690-702.
- Ministério da Saúde (2021a). Boletim Epidemiológico. Semana Epidemiológica (SE) 51 (29/12/2019 a 29/12/2020).
- Ministério da Saúde (2021b). Boletim Epidemiológico. Semana Epidemiológica (SE) 28 (03/01/2021 a 10/07/2021).
- Moderna TX (2020). Moderna Highlights Opportunity of mRNA Vaccines at its First Vaccines Day. Acesso em 30 de abril de 2021. Disponível em: <<https://investors.modernatx.com/news-releases/news-release-details/moderna-highlights-opportunity-mrna-vaccines-its-first-vaccines>>.
- Modjarrad, K., Lin, L., George, S. L., Stephenson, K. E., Eckels, K. H., De La Barrera, R. A., ... & Michael, N. L. (2018). 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*, 391(10120), 563-571.
- Munjal, A., Khandia, R., Dhama, K., Sachan, S., Karthik, K., Tiwari, R., ... & Joshi, S. K. (2017). Advances in developing therapies to combat Zika virus: current knowledge and future perspectives. *Frontiers in microbiology*, 8, 1469.
- Munoz-Jordán, J. L., Laurent-Rolle, M., Ashour, J., Martínez-Sobrido, L., Ashok, M., Lipkin, W. I., & García-Sastre, A. (2005). Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. *Journal of virology*, 79(13), 8004-8013.
- Muthumani, K., Griffin, B. D., Agarwal, S., Kudchodkar, S. B., Reuschel, E. L., Choi, H., ... & Weiner, D. B. (2016). In vivo protection against ZIKV infection and pathogenesis through passive antibody transfer and active immunisation with a prMEnv DNA vaccine. *npj Vaccines*, 1(1), 1-11.

National Institute for Health (2018). Doenças e condições. Vacinas contra o zika vírus. Acesso em 28 de abril de 2021. Disponível em: <<https://www.niaid.nih.gov/diseases-conditions/zika-vaccines>>

Ngono, A. E., & Shresta, S. (2018). Immune response to dengue and Zika. *Annual review of immunology*, 36, 279-308.

Ngono, A. E., Vizcarra, E. A., Tang, W. W., Sheets, N., Joo, Y., Kim, K., ... & Shresta, S. (2017). Mapping and role of the CD8+ T cell response during primary Zika virus infection in mice. *Cell host & microbe*, 21(1), 35-46.

Ngono, A. E., Young, M. P., Bunz, M., Xu, Z., Hattakam, S., Vizcarra, E., ... & Shresta, S. (2019). CD4+ T cells promote humoral immunity and viral control during Zika virus infection. *PLoS pathogens*, 15(1), e1007474.

Nitsche, C., Zhang, L., Weigel, L. F., Schilz, J., Graf, D., Bartenschlager, R., ... & Klein, C. D. (2017). Peptide–boronic acid inhibitors of flaviviral proteases: medicinal chemistry and structural biology. *Journal of medicinal chemistry*, 60(1), 511-516.

Nowakowski, T. J., Pollen, A. A., Di Lullo, E., Sandoval-Espinosa, C., Bershteyn, M., & Kriegstein, A. R. (2016). Expression analysis highlights AXL as a candidate Zika virus entry receptor in neural stem cells. *Cell stem cell*, 18(5), 591-596.

Offerdahl, D. K., Dorward, D. W., Hansen, B. T., & Bloom, M. E. (2017). Cytoarchitecture of Zika virus infection in human neuroblastoma and *Aedes albopictus* cell lines. *Virology*, 501, 54-62.

Oliveira Melo, A. S., Malinger, G., Ximenes, R., Szejnfeld, P. O., Alves Sampaio, S., & Bispo de Filippis, A. M. (2016a). Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg?. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 47(1), 6-7.

Oliveira, E. R., Gonçalves, A. J., Costa, S. M., Azevedo, A. S., Mantuano-Barradas, M., Nogueira, A. C. M., & Alves, A. M. (2016b). Aspects of T cell-mediated immunity induced in mice by a DNA vaccine based on the dengue-NS1 antigen after challenge by the intracerebral route. *PLoS One*, 11(9), e0163240.

Olson, J. G., & Ksiazek, T. G. (1981). Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 75(3), 389-393.

Organização Mundial da Saúde. Declaração da OMS sobre a primeira reunião do Regulamento Sanitário Internacional (2005) (RSI 2005) Comitê de Emergência sobre o Zika vírus e aumento observado em distúrbios neurológicos e malformações neonatais (2015). Acesso em: 24 de fevereiro de 2021. Disponível em: <[https://www.who.int/news/item/01-02-2016-who-statement-on-the-first-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-\(ihr-2005\)-emergency-committee-on-zika-virus-and-observed-increase-in-neurological-disorders-and-neonatal-malformations](https://www.who.int/news/item/01-02-2016-who-statement-on-the-first-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-(ihr-2005)-emergency-committee-on-zika-virus-and-observed-increase-in-neurological-disorders-and-neonatal-malformations)>.

Organização Mundial da Saúde. Quinta reunião do Comitê de Emergência nos termos do Regulamento Sanitário Internacional (2005) sobre microcefalia, outras doenças neurológicas e o vírus Zika (2016). Acesso em: 24 de fevereiro de 2021. Disponível em:

<[https://www.who.int/news/item/18-11-2016-fifth-meeting-of-the-emergency-committee-under-the-international-health-regulations-\(2005\)-regarding-microcephaly-other-neurological-disorders-and-zika-virus](https://www.who.int/news/item/18-11-2016-fifth-meeting-of-the-emergency-committee-under-the-international-health-regulations-(2005)-regarding-microcephaly-other-neurological-disorders-and-zika-virus)>.

Pantoja, P., Pérez-Guzmán, E. X., Rodríguez, I. V., White, L. J., González, O., Serrano, C., ... & Sariol, C. A. (2017). Zika virus pathogenesis in Rhesus macaques is unaffected by pre-existing immunity to dengue virus. *Nature communications*, 8(1), 1-13.

Paquin-Proulx, D., Leal, F. E., Silveira, C. G. T., Maestri, A., Brockmeyer, C., Kitchen, S. M., ... & Nixon, D. F. (2017). T-cell responses in individuals infected with Zika virus and in those vaccinated against dengue virus. *Pathogens & immunity*, 2(2), 274.

Pardy, R. D., Rajah, M. M., Condotta, S. A., Taylor, N. G., Sagan, S. M., & Richer, M. J. (2017). Analysis of the T cell response to Zika virus and identification of a novel CD8+ T cell epitope in immunocompetent mice. *PLoS pathogens*, 13(2), e1006184.

Pattnaik, A., Sahoo, B. R., & Pattnaik, A. K. (2020). Current status of zika virus vaccines: Successes and challenges. *Vaccines*, 8(2), 266.

Pedroso, C., Fischer, C., Feldmann, M., Sarno, M., Luz, E., Moreira-Soto, A., ... & Drexler, J. F. (2019). Cross-protection of dengue virus infection against congenital Zika syndrome, Northeastern Brazil. *Emerging infectious diseases*, 25(8), 1485.

Pinto, P., Assis, M. L., Vallochi, A. L., Pacheco, A. R., Lima, L. M., Quaresma, K. R., ... & Alves, A. (2019). T cell responses induced by DNA vaccines based on the DENV2 E and NS1 proteins in mice: importance in protection and immunodominant epitope identification. *Frontiers in immunology*, 10, 1522.

Plourde, A. R., & Bloch, E. M. (2016). A literature review of Zika virus. *Emerging infectious diseases*, 22(7), 1185.

Priyamvada, L., Quicke, K. M., Hudson, W. H., Onlamoon, N., Sewatanon, J., Edupuganti, S., ... & Wrammert, J. (2016). Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(28), 7852-7857.

Reynolds, C. J., Watber, P., Santos, C. N. O., Ribeiro, D. R., Alves, J. C., Fonseca, A. B., ... & Altmann, D. M. (2020). Strong CD4 T cell responses to Zika virus antigens in a cohort of dengue virus immune mothers of congenital Zika virus syndrome infants. *Frontiers in immunology*, 11, 185.

Richner, J. M., Himansu, S., Dowd, K. A., Butler, S. L., Salazar, V., Fox, J. M., ... & Diamond, M. S. (2017). Modified mRNA vaccines protect against Zika virus infection. *Cell*, 168(6), 1114-1125.

Robbiani, D. F., Bozzacco, L., Keeffe, J. R., Khouri, R., Olsen, P. C., Gazumyan, A., ... & Nussenzweig, M. C. (2017). Recurrent potent human neutralizing antibodies to Zika virus in Brazil and Mexico. *Cell*, 169(4), 597-609.

Rodriguez-Barraquer, I., Costa, F., Nascimento, E. J., Nery, N., Castanha, P. M., Sacramento, G. A., ... & Ko, A. I. (2019). Impact of preexisting dengue immunity on Zika virus emergence in a dengue endemic region. *Science*, 363(6427), 607-610.

- Rossi, S. L., Tesh, R. B., Azar, S. R., Muruato, A. E., Hanley, K. A., Auguste, A. J., ... & Weaver, S. C. (2016). Characterization of a novel murine model to study Zika virus. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 94(6), 1362.
- Rossignol, E. D., Peters, K. N., Connor, J. H., & Bullitt, E. (2017). Zika virus induced cellular remodelling. *Cellular microbiology*, 19(8), e12740.
- Sabin, A. B., & Schlesinger, R. W. (1945). Production of immunity to dengue with virus modified by propagation in mice. *Science*, 101(2634), 640-642.
- Samal, K. C., Sahoo, J. P., Yadav, N. S., & Pradhan, P. (2021). ZyCoV-D: World's First Needle-Free DNA Vaccine's Emergency Approval in India. *Biotica Research Today*, 3(8), 714-716.
- Sapparapu, G., Fernandez, E., Kose, N., Cao, B., Fox, J. M., Bombardi, R. G., ... & Crowe, J. E. (2016). Neutralizing human antibodies prevent Zika virus replication and fetal disease in mice. *Nature*, 540(7633), 443-447.
- Scherwitzl, I., Mongkolsapaja, J., & Screaton, G. (2017). Recent advances in human flavivirus vaccines. *Current opinion in virology*, 23, 95-101.
- Schlesinger, J. J., Brandriss, M. W., & Walsh, E. E. (1985). Protection against 17D yellow fever encephalitis in mice by passive transfer of monoclonal antibodies to the nonstructural glycoprotein gp48 and by active immunization with gp48. *The Journal of Immunology*, 135(4), 2805-2809.
- Schlesinger, J. J., Brandriss, M. W., Cropp, C. B., & Monath, T. P. (1986). Protection against yellow fever in monkeys by immunization with yellow fever virus nonstructural protein NS1. *Journal of virology*, 60(3), 1153-1155.
- Schlesinger, J. J., Foltzer, M., & Chapman, S. (1993). The Fc portion of antibody to yellow fever virus NS1 is a determinant of protection against YF encephalitis in mice. *Virology*, 192(1), 132-141.
- Schneider, W. M., Chevillotte, M. D., & Rice, C. M. (2014). Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annual review of immunology*, 32, 513-545.
- Schouest, B., Grifoni, A., Pham, J., Mateus, J., Sydney, J., Brien, J. D., ... & Weiskopf, D. (2021). Pre-existing T cell memory against Zika virus. *Journal of Virology*, 95(12), e00132-21.
- Schrauf, S., Tschismarov, R., Tauber, E., & Ramsauer, K. (2020). Current efforts in the development of vaccines for the prevention of Zika and Chikungunya virus infections. *Frontiers in immunology*, 11, 592.
- Shang, Z., Song, H., Shi, Y., Qi, J., & Gao, G. F. (2018). Crystal structure of the capsid protein from Zika virus. *Journal of molecular biology*, 430(7), 948-962.
- Sheets, RL, Stein, J., Manetz, TS, Duffy, C., Nason, M., Andrews, C., ... & Gomez, PL (2006). A biodistribuição de vacinas de plasmídeo de DNA contra HIV-1, Ebola, Síndrome Respiratória Aguda Grave ou vírus do Nilo Ocidental é semelhante, sem integração, apesar de

- estruturas de plasmídeo diferentes ou inserções de genes. *Toxicological Sciences*, 91 (2), 610-619.
- Silva, N. M., Santos, N. C., & Martins, I. C. (2020). Dengue and Zika viruses: Epidemiological history, potential therapies, and promising vaccines. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 5(4), 150.
- Simmonds, P., Becher, P., Collett, M. S., Gould, E. A., Heinz, F. X., Meyers, G., ... & Bukh, J. (2011). Family flaviviridae. *Virus Taxonomy: Ninth report of the International Committee on taxonomy of viruses*. Elsevier Science, 1003-20.
- Sirohi, D., & Kuhn, R. J. (2017). Zika virus structure, maturation, and receptors. *The Journal of infectious diseases*, 216(suppl_10), S935-S944.
- Smith, M. R., Bugada, L. F., & Wen, F. (2020). Rapid microsphere- assisted peptide screening (MAPS) of promiscuous MHCII- binding peptides in Zika virus envelope protein. *AICHE Journal*, 66(3), e16697.
- Song, B. H., Yun, S. I., Woolley, M., & Lee, Y. M. (2017). Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. *Journal of neuroimmunology*, 308, 50-64.
- Stephenson, K. E., Tan, C. S., Walsh, S. R., Hale, A., Ansel, J. L., Kanjilal, D. G., ... & Barouch, D. H. (2020). 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*, 20(9), 1061-1070.
- Stettler, K., Beltramello, M., Espinosa, D. A., Graham, V., Cassotta, A., Bianchi, S., ... & Corti, D. (2016). Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. *Science*, 353(6301), 823-826.
- Sumathy, K., Kulkarni, B., Gondu, R. K., Ponnuru, S. K., Bonguram, N., Eligeti, R., ... & Ella, K. M. (2017). Protective efficacy of Zika vaccine in AG129 mouse model. *Scientific reports*, 7(1), 1-9.
- Swanstrom, J. A., Plante, J. A., Plante, K. S., Young, E. F., McGowan, E., Gallichotte, E. N., ... & Baric, R. S. (2016). Dengue virus envelope dimer epitope monoclonal antibodies isolated from dengue patients are protective against Zika virus. *MBio*, 7(4), e01123-16.
- Swarbrick, C. M., Basavannacharya, C., Chan, K. W., Chan, S. A., Singh, D., Wei, N., ... & Vasudevan, S. G. (2017). NS3 helicase from dengue virus specifically recognizes viral RNA sequence to ensure optimal replication. *Nucleic acids research*, 45(22), 12904-12920.
- Tan, T. Y., Fibriansah, G., & Lok, S. M. (2020). Capsid protein is central to the birth of flavivirus particles. *PLoS Pathogens*, 16(5), e1008542.
- Tebas, P., Roberts, C. C., Muthumani, K., Reuschel, E. L., Kudchodkar, S. B., Zaidi, F. I., ... & Maslow, J. N. (2017). Safety and immunogenicity of an anti-Zika virus DNA vaccine— preliminary report. *New England Journal of Medicine*.

- Tebas, P., Yang, S., Boyer, J. D., Reuschel, E. L., Patel, A., Christensen-Quick, A., ... & Humeau, L. M. (2021). Safety and immunogenicity of INO-4800 DNA vaccine against SARS-CoV-2: A preliminary report of an open-label, Phase 1 clinical trial. *EClinicalMedicine*, *31*, 100689.
- Throsby, M., Geuijen, C., Goudsmit, J., Bakker, A. Q., Korimbocus, J., Kramer, R. A., ... & de Kruif, J. (2006). Isolation and characterization of human monoclonal antibodies from individuals infected with West Nile Virus. *Journal of virology*, *80*(14), 6982-6992.
- van der Most, R. G., Murali-Krishna, K., Ahmed, R., & Strauss, J. H. (2000). Chimeric yellow fever/dengue virus as a candidate dengue vaccine: quantitation of the dengue virus-specific CD8 T-cell response. *Journal of Virology*, *74*(17), 8094-8101.
- Van Gessel, Y., Klade, C. S., Putnak, R., Formica, A., Krasaesub, S., Spruth, M., ... & Dewasthaly, S. (2011). Correlation of protection against Japanese encephalitis virus and JE vaccine (IXIARO®) induced neutralizing antibody titers. *Vaccine*, *29*(35), 5925-5931.
- Van Rompay, K. K., Coffey, L. L., Kapoor, T., Gazumyan, A., Keesler, R. I., Jurado, A., ... & Robbiani, D. F. (2020). A combination of two human monoclonal antibodies limits fetal damage by Zika virus in macaques. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *117*(14), 7981-7989.
- Vogt, M. R., Moesker, B., Goudsmit, J., Jongeneelen, M., Austin, S. K., Oliphant, T., ... & Diamond, M. S. (2009). Human monoclonal antibodies against West Nile virus induced by natural infection neutralize at a postattachment step. *Journal of virology*, *83*(13), 6494-6507.
- Volpina, O. M., Volkova, T. D., Koroev, D. O., Ivanov, V. T., Ozherelkov, S. V., Khoretonenko, M. V., ... & Timofeev, A. V. (2005). A synthetic peptide based on the NS1 non-structural protein of tick-borne encephalitis virus induces a protective immune response against fatal encephalitis in an experimental animal model. *Virus research*, *112*(1-2), 95-99.
- Vratskikh, O., Stiasny, K., Zlatkovic, J., Tsouchnikas, G., Jarmer, J., Karrer, U., ... & Heinz, F. X. (2013). Dissection of antibody specificities induced by yellow fever vaccination. *PLoS pathogens*, *9*(6), e1003458.
- Wallis, J., Shenton, D. P., & Carlisle, R. C. (2019). Novel approaches for the design, delivery and administration of vaccine technologies. *Clinical & Experimental Immunology*, *196*(2), 189-204.
- Wang, B., Thurmond, S., Hai, R., & Song, J. (2018). Structure and function of Zika virus NS5 protein: perspectives for drug design. *Cellular and molecular life sciences*, *75*(10), 1723-1736.
- Wang, J., Bardelli, M., Espinosa, D. A., Pedotti, M., Ng, T. S., Bianchi, S., ... & Corti, D. (2017c). A human bi-specific antibody against Zika virus with high therapeutic potential. *Cell*, *171*(1), 229-241.
- Wang, Q., Yan, J., & Gao, G. F. (2017b). Monoclonal antibodies against Zika virus: therapeutics and their implications for vaccine design. *Journal of virology*, *91*(20), e01049-17.

- Wang, S., Hong, S., Deng, Y. Q., Ye, Q., Zhao, L. Z., Zhang, F. C., ... & Xu, Z. (2017a). Transfer of convalescent serum to pregnant mice prevents Zika virus infection and microcephaly in offspring. *Cell research*, 27(1), 158-160.
- Weinbren, M. P., & Williams, M. C. (1958). Zika virus: further isolations in the Zika area, and some studies on the strains isolated. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 52(3), 263-268.
- Wen, J., Tang, W. W., Sheets, N., Ellison, J., Sette, A., Kim, K., & Shresta, S. (2017). Identification of Zika virus epitopes reveals immunodominant and protective roles for dengue virus cross-reactive CD8+ T cells. *Nature microbiology*, 2(6), 1-11.
- White, M. K., Wollebo, H. S., David Beckham, J., Tyler, K. L., & Khalili, K. (2016). Zika virus: An emergent neuropathological agent. *Annals of neurology*, 80(4), 479-489.
- Williams, J. A. (2013). Vector design for improved DNA vaccine efficacy, safety and production. *Vaccines*, 1(3), 225-249.
- Winkler, C. W., Myers, L. M., Woods, T. A., Messer, R. J., Carmody, A. B., McNally, K. L., ... & Peterson, K. E. (2017). Adaptive immune responses to Zika virus are important for controlling virus infection and preventing infection in brain and testes. *The Journal of Immunology*, 198(9), 3526-3535.
- Wolff, J. A., Ludtke, J. J., Acsadi, G., Williams, P., & Jani, A. (1992). Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Human molecular genetics*, 1(6), 363-369.
- Wu, Y., Liu, Q., Zhou, J., Xie, W., Chen, C., Wang, Z., ... & Cui, J. (2017). Zika virus evades interferon-mediated antiviral response through the co-operation of multiple nonstructural proteins in vitro. *Cell discovery*, 3(1), 1-14.
- Xia, H., Luo, H., Shan, C., Muruato, A. E., Nunes, B. T., Medeiros, D. B., ... & Shi, P. Y. (2018). An evolutionary NS1 mutation enhances Zika virus evasion of host interferon induction. *Nature communications*, 9(1), 1-13.
- Yacoub, S., Mongkolsapaya, J., & Screaton, G. (2013). The pathogenesis of dengue. *Current opinion in infectious diseases*, 26(3), 284-289.
- Young, G., Bohning, K. J., Zahralban-Steele, M., Hather, G., Tadepalli, S., Mickey, K., ... & Dean, H. J. (2020). Complete protection in macaques conferred by purified inactivated Zika vaccine: defining a correlate of protection. *Scientific reports*, 10(1), 1-9.
- Zanluca, C., Melo, V. C. A. D., Mosimann, A. L. P., Santos, G. I. V. D., Santos, C. N. D. D., & Luz, K. (2015). First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(4), 569-572.
- Zhan, Y., Deng, Y., Huang, B., Song, Q., Wang, W., Yang, Y., ... & Tan, W. (2019). Humoral and cellular immunity against both ZIKV and poxvirus is elicited by a two-dose regimen using DNA and non-replicating vaccinia virus-based vaccine candidates. *Vaccine*, 37(15), 2122-2130.

Zhang, X., Xie, X., Xia, H., Zou, J., Huang, L., Popov, V. L., ... & Shi, P. Y. (2019). Zika virus NS2A-mediated virion assembly. *MBio*, *10*(5), e02375-19.

Zhao, H., Fernandez, E., Dowd, K. A., Speer, S. D., Platt, D. J., Gorman, M. J., ... & Fremont, D. H. (2016). Structural basis of Zika virus-specific antibody protection. *Cell*, *166*(4), 1016-1027.

Zheng, Y., Liu, Q., Wu, Y., Ma, L., Zhang, Z., Liu, T., ... & Cui, J. (2018). Zika virus elicits inflammation to evade antiviral response by cleaving cGAS via NS 1- caspase- 1 axis. *The EMBO journal*, *37*(18), e99347.