

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM
SAÚDE

Lícyá Samara da Silva Xavier

**Determinação da Especificidade de Proteínas Sintéticas para o Diagnóstico
Sorológico de Zika e Avaliação do Potencial de Neutralização Viral**

Recife

2022

Lícyá Samara da Silva Xavier

Determinação da Especificidade de Proteínas Sintéticas para o Diagnóstico Sorológico de Zika e Avaliação do Potencial de Neutralização Viral

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Dr^o Roberto Dias Lins Neto

Coorientadora: Dr^a Isabelle Freire Tabosa Viana

Recife
2022

**Catálogo na fonte: Biblioteca Luciana Borges Abrantes dos Santos
Instituto Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz**

- X3d Xavier, Licya Samara da Silva.
 Determinação da especificidade de proteínas sintéticas para o diagnóstico sorológico de Zika e avaliação do potencial de neutralização viral / Licya Samara da Silva Xavier. — Recife: [s.n.], 2022.
 76 p. : il., graf., tab. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2022.
 Orientador: Roberto Dias Lins Neto;
 coorientadora: Isabelle Freire Tabosa Viana.o.
 Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências em Saúde.
1. Zika virus. 2. Engenharia de Proteínas. 3. Diagnóstico Diferencial. 4. Anticorpos Neutralizantes. I. Lins Neto, Roberto Dias. II. Viana, Isabelle Freire Tabosa. III. Título.

Lícyá Samara da Silva Xavier

Determinação da Especificidade de Proteínas Sintéticas para o Diagnóstico Sorológico de Zika e Avaliação do Potencial de Neutralização Viral

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 22 de fevereiro de 2022

BANCA EXAMINADORA

Drº Roberto Dias Lins Neto

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Drª Isabelle Freire Tabosa Viana

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Drº Marcos Antônio de Moraes Júnior (Titular Externo)

Universidade Federal de Pernambuco

Drª Tereza Cristina Leal Balbino (Titular Interno)

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Raquel, que sempre me apoiou e incentivou a buscar o crescimento pessoal e profissional, desde quando se dedicou a me ensinar a ler/escrever até os dias de hoje, em que, sem dúvidas, é a pessoa que mais acredita no meu potencial, sendo meu apoio nos momentos mais difíceis. Ao meu irmão, Sávio, agradeço pelo incentivo, pelas conversas e pelo companheirismo de sempre. A minhas irmãs, Rebeca e Sophia, agradeço pelos momentos de brincadeiras e risadas, trazendo sempre alegria aos nossos dias. A vocês, minha família, agradeço o grande apoio e compreensão em todos os momentos.

Ao meu orientador, Dr. Roberto Lins, agradeço por ter me aceito em seu grupo de pesquisa e por todo o apoio durante o processo de elaboração do projeto, período em que se mostrou extremamente solícito e esteve sempre presente acompanhando o andamento da pesquisa. À minha coorientadora, Dr^a. Isabelle Viana, por ter me ensinado todas as técnicas utilizadas no trabalho, por acompanhar os experimentos de perto, me auxiliando na interpretação e revisão dos resultados, sendo, portanto, uma parte fundamental para a execução deste trabalho e, conseqüentemente, para meu desenvolvimento profissional. Agradeço a ambos pelos conselhos e por todo auxílio, mesmo quando precisavam renunciar a um tempo em seus momentos de lazer para fazermos reuniões online. Muito obrigada por terem depositado confiança em mim e em meu trabalho.

À Tayná, Camilla e Bruno, com quem dividi os dias no laboratório durante o período do mestrado, compartilhando os sucessos e insucessos a cada resultado obtido. A eles agradeço também por sempre me auxiliarem na execução dos experimentos realizados neste trabalho e se mostrarem solícitos para discussões sobre o tema. Ao Dr. Danilo Coêlho pelos desenhos computacionais das proteínas produzidas e analisadas neste trabalho, assim como pelo total suporte no esclarecimento de dúvidas que surgiram durante o processo. Agradeço também a todos os integrantes do grupo de pesquisa pelas discussões de artigos e resultados nas nossas reuniões semanais de grupo.

Aos órgãos de fomento: Fundação de amparo à ciência e tecnologia do estado de Pernambuco (FACEPE) e Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), que possibilitaram a execução deste trabalho.

Por fim, meus agradecimentos a todos que participaram, direta ou indiretamente, do desenvolvimento deste trabalho de pesquisa e que certamente contribuíram para meu processo de aprendizado e formação acadêmica.

RESUMO

XAVIER, Lícya Samara da Silva. Determinação da especificidade de proteínas sintéticas para o diagnóstico sorológico de Zika e avaliação do potencial de neutralização viral. 2022. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2022.

Dada a complexidade do diagnóstico diferencial do vírus Zika (*Zika virus* - ZIKV) e a inexistência de propostas terapêuticas eficazes, nosso grupo de pesquisa previamente idealizou e engenheirou *in silico* três proteínas, denominadas VLL-V2, VLL-V3 e VLL-V4, a partir da estrutura do anticorpo monoclonal (*monoclonal antibody* – mAb) ZV-67, direcionado ao domínio DIII da proteína do envelope do ZIKV (E-ZIKV). As proteínas sintéticas foram desenvolvidas de modo a carrear os aminoácidos do mAb fundamentais na interação anticorpo-epítipo. Portanto, a hipótese deste trabalho é de que as proteínas desenvolvidas são capazes de se ligar ao seu alvo com alta afinidade e de neutralizar a infecção viral *in vitro*. Assim, o objetivo deste trabalho foi produzir *in vitro* as proteínas sintéticas e avaliá-las quanto à afinidade de ligação à proteína E-ZIKV e quanto à capacidade de neutralização da infecção viral. As proteínas foram expressas em células de *E. coli*, purificadas por cromatografia de afinidade, avaliadas quanto à interação com E-ZIKV através de termoforese em microescala (MST) e, por fim, o potencial das proteínas em neutralizar o ZIKV foi mensurado por ensaios de microneutralização viral em placa (MN). Além disso, o mAb 4G2 foi também produzido neste trabalho. Foram obtidas concentrações de 237,45 μM , 198,6 μM e 141,4 μM para as proteínas sintéticas VLL-V2, VLL-V3 e VLL-V4, respectivamente. Como resultado da MST, foi observado que a VLL-V2 apresentou a maior afinidade de ligação à E-ZIKV com uma constante de dissociação (K_D) de $7,8 \times 10^{-9}$ M. No ensaio de MN, foi demonstrado que a VLL-V2 foi capaz de neutralizar o ZIKV *in vitro* com uma EC_{50} de 0,04 μM . Logo, dentre as proteínas sintetizadas e testadas *in vitro*, a VLL-V2 apresentou uma maior afinidade de ligação à E-ZIKV, assemelhando-se aos valores apresentados por anticorpos neutralizantes já descritos na literatura. Adicionalmente, a proteína VLL-V2 apresentou potencial de neutralização da infecção por ZIKV *in vitro*.

Palavras-chave: Zika vírus; microcefalia; engenharia de proteínas; diagnóstico diferencial; anticorpos neutralizantes.

ABSTRACT

XAVIER, Lícyá Samara da Silva. Determination of synthetic proteins specificity for the serological diagnosis of Zika and evaluation of viral neutralization potential. 2022. Dissertation (Master in Biosciences and Biotechnology Applied to Health) – Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2022.

Given the complexity of the differential diagnosis of Zika virus (ZIKV) and the lack of effective therapeutic proposals, our research group engineered *in silico* three proteins (VLL-V2, VLL-V3 and VLL-V4) based on the structure of the ZV-67 monoclonal antibody (mAb) directed to DIII domain of ZIKV envelope protein (ZIKV-E). The synthetic proteins were developed in order to carry the essential mAb amino acids for the antibody-epitope interaction. Therefore, the hypothesis of this work is that the developed proteins are able to bind their target with high affinity and to neutralize the viral infection *in vitro*. The objective of this work was to produce *in vitro* the three synthetic proteins and evaluate them for their binding affinity to envelope protein of ZIKV, as well as the capacity to neutralize the viral infection. The proteins were expressed in *E. coli* cells, purified by affinity chromatography, evaluated for interaction with ZIKV-E by microscale thermophoresis (MST) and finally, the proteins ability in neutralize ZIKV infection was measured using plate viral microneutralization assays (MN). 4G2 mAbs were also produced *in vitro* in this work. After protein expression and purification, were obtained concentrations of 237,45 µM, 198,6 µM and 141,4 µM for synthetic proteins VLL-V2, VLL-V3 and VLL-V4, respectively. As a result of MST, it was observed that VLL-V2 had the highest binding affinity to ZIKV-E with a dissociation constant (K_D) of 7.8×10^{-9} M. After microneutralization assays, it was demonstrated that the VLL-V2 protein was able to neutralize ZIKV *in vitro* with an EC_{50} of 0.04 µM. Among the proteins synthesized and tested *in vitro*, the VLL-V2 protein showed a high binding affinity to E protein, similar to the values presented by neutralizing antibodies already described in the literature. Additionally, the VLL-V2 protein also had potencial to neutralize ZIKV infection *in vitro*.

Keywords: Zika virus; microcephaly; protein engineering; differential diagnosis; neutralizing antibodies.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Procedimento para diagnóstico de ZIKV	20
Figura 2 - Estrutura e genoma do ZIKV	24
Figura 3 - Ciclo viral dos flavivírus.....	26
Figura 4 - Estágios de maturação da partícula viral de Zika	27
Figura 5 - Amplificação dependente de anticorpos	31
Figura 6 - Técnica de MST para análise de interações proteicas.....	35
Figura 7 - Desenho esquemático do ELISA para detecção do 4G2	47
Figura 8 - Procedimento realizado para o ensaio de microneutralização em placa ..	49
Quadro 1 - Comprimentos dos plasmídeos de expressão e pesos moleculares previstos para as proteínas sintéticas	51
Figura 9 - Gel de 1% de agarose contendo as bandas referentes aos plasmídeos de expressão das proteínas sintéticas em estudo.....	52
Figura 10 - Cromatogramas e géis de eletroforese referentes às purificações das proteínas sintéticas produzidas	53
Figura 11 - Perfis termoforéticos das interações VLL+ZIKV-E	56
Figura 12 - Resultados obtidos no ELISA para detecção dos mAbs 4G2 produzidos in house.....	58
Figura 13 - Perfil de neutralização de ZIKV por meio da proteína VLL-V2.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Microgramas
µL	Microlitros
ADA	Amplificação dependente de anticorpos
AMP	Ampicilina
BLI	<i>Biolayer interferometry</i>
CR	Complexo replicativo
ddp	Diferença de potencial
DENV	<i>Dengue vírus</i>
DIII-E	Domínio III da proteína do envelope
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
EC50	<i>Half maximal effective concentration</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FcγR	<i>Fc gamma receptor</i>
hSTAT2	<i>Human Signal transducer and activator of transcription 2</i>
IFN-α	Interferon alfa
IFN-γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-2	Interleucina 2
IPTG	Isopropiltiogalactosídeo
JEV	<i>Japanese Encephalitis virus</i>
kb	Kilobases
LR	<i>Lateral ridge</i>
mAb	<i>Monoclonal Antibody</i>
MDA5	<i>Melanoma differentiation-associated protein 5</i>
Meio LB	Meio Luria Bertani
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MPM	Marcador de peso molecular
MST	<i>MicroScale Thermophoresis</i>
nAb	<i>Neutralizing antibody</i>

nm	Nanômetros
nM	Nanomolar
NTPase	Nucleosídeo trifosfatase
ORF	<i>Open Reading frame</i>
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
pb	Pares de bases
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pDNA	DNA plasmidial
PFU	<i>Plaque-forming unit</i>
PRNT	<i>Plaque Reduction Neutralization Test</i>
RE	Retículo endoplasmático
RIG-I	<i>Retinoic acid-inducible gene I</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
rpm	Rotação por minuto
RTPase	RNA trifosfatase
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa quantitativa
S.O.C.	<i>Super Optimal Broth with Catabolic repressor</i>
SCZ	Síndrome congênita do Zika
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SFB	Soro fetal bovino
SFM	<i>Serum free medium</i>
SPR	<i>Surface plasmon resonance</i>
TAE	Tris-Acetato EDTA
TG	Trans-Golgi
TLR3	<i>Toll-like receptor 3</i>
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF-α	<i>Tumour necrosis factor alpha</i>
UTR	<i>Untranslated region</i>
WNV	<i>West Nile vírus</i>
YFV	<i>Yellow Fever virus</i>
ZIKV	<i>Zika virus</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 EPIDEMIOLOGIA E ASPECTOS GERAIS DO ZIKV	16
2.2 CO-CIRCULAÇÃO DE FLAVIVÍRUS NO BRASIL	17
2.3 DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR ZIKV	18
2.4 ESTRUTURA E GENOMA DO ZIKV	20
2.4.1 Proteínas estruturais	21
2.4.2 Proteínas não estruturais (NS)	22
2.5 CICLO VIRAL	24
2.6 RESPOSTA IMUNOLÓGICA À INFECÇÃO POR ZIKV	27
2.7 PECADO ANTIGÊNICO ORIGINAL E AMPLIFICAÇÃO DA INFECÇÃO DEPENDENTE DE ANTICORPOS	30
2.8 PROPOSTAS VACINAIS E TERAPÊUTICAS BASEADAS NO DOMÍNIO III DA PROTEÍNA E.....	32
2.9 PROTEÍNAS VLL AVALIADAS NO ESTUDO	33
2.9.1 Propostas de uso das proteínas VLL como método de diagnóstico e terapia anti-Zika	34
2.10 MÉTODOS PARA ANÁLISE DE INTERAÇÕES ENTRE PROTEÍNAS.....	34
3 JUSTIFICATIVA	36
4 PERGUNTA CONDUTORA	38
5 HIPÓTESE	39
6 OBJETIVOS	40
6.1 OBJETIVO GERAL	40
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
7 MATERIAIS E MÉTODOS	41
7.1 PLASMÍDEO DE EXPRESSÃO	41

7.2 EXPANSÃO DO DNA PLASMIDIAL (pDNA).....	41
7.3 PREPARAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL EM MÉDIA ESCALA (MidiPrep)	42
7.4 ELETROFORESE DO DNA PLASMIDIAL	42
7.5 EXPRESSÃO PROTEICA.....	43
7.6 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	43
7.7 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS.....	44
7.8 CONCENTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO PROTEICA.....	44
7.9 MST PARA AVALIAÇÃO DAS CONSTANTES DE DISSOCIAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS SINTÉTICAS E A PROTEÍNA E	44
7.10 PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS PAN-FLAVIVÍRUS 4G2 (mAb 4G2).....	45
7.11 ELISA PARA DETECÇÃO DO mAb 4G2	46
7.12 CULTIVO DE CÉLULAS VERO	47
7.13 ENSAIOS DE MICRONEUTRALIZAÇÃO.....	47
7.14 ANÁLISE DE DADOS.....	49
8 RESULTADOS	51
8.1 EXPANSÃO DO DNA PLASMIDIAL EM <i>E. coli</i> DH5 α	51
8.2 ELETROFORESE DO pDNA	51
8.3 RENDIMENTO DA EXPRESSÃO PROTEICA EM <i>E. coli</i> BL21.....	52
8.4 CONSTANTES DE DISSOCIAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS SINTÉTICAS E A PROTEÍNA E-ZIKV	55
8.5 PRODUÇÃO DO mAb 4G2 A PARTIR DO CULTIVO DE HIBRIDOMA.....	57
8.6 DESEMPENHO DAS PROTEÍNAS SINTETIZADAS NOS ENSAIOS DE NEUTRALIZAÇÃO VIRAL.....	58
9 DISCUSSÃO	60
10 CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS	64
APÊNDICE A – Artigo referente à dissertação	72

1 INTRODUÇÃO

As arboviroses compreendem as doenças causadas por arbovírus, que são vírus transmitidos por meio de artrópodes hematófagos vetores (MUSSO, 2016). Frequentemente, os arbovírus mantêm seus ciclos em ambientes silvestres (ciclo silvático), mas, com a urbanização crescente e consequente exposição da espécie humana a insetos vetores, esses vírus passaram a infectar populações humanas, estabelecendo, então, ciclos urbanos (DONALISIO et al., 2017; GUTIÉRREZ-BUGALLO et al., 2019). Dentre as arboviroses atualmente importantes para a saúde humana, se encontra um grande grupo de vírus de RNA pertencentes à família *flaviviridae*, gênero *flavivírus*.

Devido às condições ambientais favoráveis para a propagação dos insetos vetores desse grupo de arbovírus, o Brasil se tornou uma região endêmica para três dos flavivírus relevantes para a saúde humana: vírus da Febre Amarela (*Yellow fever virus* - YFV), vírus Dengue (*Dengue virus* - DENV) e vírus Zika (*Zika virus* - ZIKV), amplamente transmitidos no país por insetos do gênero *Aedes*, mais comumente pelo *Aedes aegypti* (MAGALHAES et al., 2020; GUTIÉRREZ-BUGALLO et al., 2019). Durante uma infecção aguda, esses vírus podem provocar sintomas inespecíficos comuns a doenças febris, como por exemplo, febre, cefaleia, fadiga e exantema (ZIMMERMAN et al., 2020). Além da similaridade entre os aspectos clínicos iniciais, os flavivírus são também estruturalmente semelhantes entre si, dificultando a realização de um diagnóstico que seja capaz de diferenciá-los de forma rápida e precisa (HASAN et al., 2018). Adicionalmente, tal semelhança é um fator limitante no desenvolvimento de vacinas e terapias com anticorpos monoclonais (*monoclonal antibodies* – mAbs), pois a escolha de antígenos vacinais não específicos ou mAbs de reação cruzada entre flavivírus diferentes, pode desencadear um fenômeno imunológico conhecido como “amplificação da infecção dependente de anticorpos” (ADA) (CAMPOS et al., 2018).

Dentre os flavivírus atualmente endêmicos no Brasil, o ZIKV se destacou nos últimos anos, pois durante a epidemia no país, ocorrida no ano de 2015, a infecção foi correlacionada pela primeira vez com a microcefalia em neonatos e outras malformações fetais, que hoje são conhecidas como “síndrome congênita do Zika” (SCZ) (ZIMMERMAN et al., 2020). Além disso, por ser neurotrópico, ao infectar indivíduos adultos, o ZIKV pode também desencadear uma série de complicações

neurológicas, como por exemplo, a síndrome de Guillain barré, síndrome de Miller Fisher, neurite óptica, encefalites, entre outras (LI et al., 2016; FERREIRA et al., 2020).

Após o surto epidêmico de Zika no país, houve uma maior preocupação em desenvolver métodos de diagnóstico, terapias e vacinação, porém, até o momento, nenhuma proposta vacinal e terapêutica foi aprovada para uso. Por outro lado, em relação ao diagnóstico da infecção por ZIKV, os métodos utilizados ainda são laboriosos e frequentemente é necessária a utilização de várias metodologias para confirmação diagnóstica, que, ainda assim, está sujeita à reação cruzada com outros flavivírus (SHARP et al., 2019; FELIX et al., 2017).

Um fator importante para o desenvolvimento de métodos diagnósticos, terapêuticos e vacinais é o conhecimento a respeito de anticorpos neutralizantes que se associem às partículas virais com alta afinidade e de forma específica. Diversos anticorpos produzidos em resposta à infecção por ZIKV já foram relatados na literatura, sendo a maioria direcionada às proteínas da superfície viral (ROGERS et al., 2017; ZHAO et al., 2016). A proteína do envelope do ZIKV (E-ZIKV) é frequentemente alvo dos estudos, pois é o principal constituinte da superfície viral, sendo, portanto, a proteína mais antigênica do vírus e o alvo primário de anticorpos neutralizantes (BARDINA et al., 2017). A proteína E é, do ponto de vista estrutural, dividida em 3 domínios (DI, DII e DIII) e está distribuída em homodímeros sobre toda a superfície da partícula viral madura. Já do ponto de vista funcional, ela participa do reconhecimento dos receptores celulares, assim como da fusão do envelope viral com a membrana da célula hospedeira (KOSTYUCHENKO, 2016). No entanto, apesar de gerar uma resposta imunológica robusta, a maioria dos anticorpos a ela direcionados apresentam reatividade cruzada com outros flavivírus (BARBA-SPAETH et al., 2016; DAI et al., 2016; PRIYAMVADA et al., 2016). Por outro lado, já foram identificados anticorpos direcionados ao domínio III da proteína E (DIII-E), que são capazes de se ligar ao ZIKV de forma específica e com alto potencial neutralizante (ZHAO et al., 2016; ROBBIANI et al., 2017).

Nesse contexto, estudos têm sido realizados com o objetivo de desenvolver novas propostas terapêuticas, vacinais e de diagnóstico diferencial entre flavivírus (WANG et al., 2017; YANG et al., 2017; ZHAO et al. 2019). Logo, com o avanço tecnológico da bioquímica estrutural e das análises de interações biomoleculares, uma das abordagens utilizadas para o desenvolvimento dessas propostas é o desenho computacional de novas biomoléculas (ULMER, 1983).

Já foi demonstrado na literatura que o anticorpo ZV-67, direcionado ao epítipo DIII-E do ZIKV apresenta especificidade ao ZIKV e atividade neutralizante da infecção (ZHAO et al., 2016). Diante disso, nosso grupo de pesquisa previamente idealizou e desenhou *in silico* três proteínas sintéticas a partir desse anticorpo. A fim de gerar *in silico* as estruturas das proteínas sintéticas, os aminoácidos essenciais para o estabelecimento da interação entre o anticorpo e o epítipo foram identificados através de ensaios computacionais e transplantados para a estrutura de proteínas carreadoras. Portanto, a hipótese deste trabalho é de que as proteínas sintéticas VLL-V2, VLL-V3 e VLL-V4 carreando parátomos direcionados ao domínio III da proteína do envelope do ZIKV são capazes de se ligar ao seu alvo com alta afinidade e de neutralizar a infecção viral *in vitro*. Para testar essa hipótese, as proteínas sintéticas foram produzidas *in vitro* e avaliadas quanto à capacidade de reconhecer o ZIKV com alta especificidade, assim como de neutralizar a infecção *in vitro*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 EPIDEMIOLOGIA E ASPECTOS GERAIS DO ZIKV

O vírus Zika (*Zika virus* – ZIKV) foi isolado pela primeira vez em 1947 no soro de um macaco rhesus sentinela durante estudos sobre a febre amarela silvestre na floresta de Zika em Uganda, África. No ano seguinte, o vírus foi também isolado em mosquitos *Aedes africanus*, vetor da febre amarela, coletados na mesma região (GUTIÉRREZ-BUGALLO, Gladys et al., 2019; WAGGONER, Jesse J., 2016).

As primeiras evidências sorológicas de infecção por ZIKV em humanos foram observadas em 1952, enquanto o primeiro caso de isolamento viral em humanos ocorreu apenas em 1954 na Nigéria (SIMPSON et al., 1964; SILVA et al., 2020), mas evidências imunológicas demonstram que os casos permaneceram restritos à África e Ásia, sendo possivelmente subnotificados, com apenas 14 casos de infecção em humanos documentados até 2007, ano em que foi relatado o primeiro surto de ZIKV, ocorrido nas Ilhas Yap – Estados Federados da Micronésia (DUFFY et al., 2009; MUSSO et al., 2016; SILVA et al., 2020). Após essa epidemia o vírus reapareceu resultando no segundo surto epidêmico documentado, ocorrido na Polinésia Francesa durante os anos de 2013-2014, período em que a síndrome de Guillain Barré, uma síndrome neurológica de caráter autoimune, foi associada pela primeira vez à infecção por ZIKV (WIKAN et al., 2016; GUTIÉRREZ-BUGALLO et al., 2019). Em seguida, o vírus propagou-se para outras ilhas do pacífico até que, posteriormente, foi introduzido nas Américas (FARIA et al., 2016).

No continente americano, o vírus foi identificado pela primeira vez em maio de 2015 no Nordeste do Brasil (ZANLUCA et al., 2015). Em novembro do mesmo ano o ministério da saúde do país notificou um aumento no número de casos relatados de microcefalia em neonatos e uma possível correlação com a infecção por ZIKV (SCHULER-FACCINI, 2016). Essa relação foi confirmada após diversas investigações comprovarem a presença do vírus no tecido cerebral de fetos e no líquido amniótico de mães infectadas, assim como por meio de ensaios *in vitro* que demonstraram a capacidade do vírus de infectar células progenitoras neuronais (MLAKAR et al., 2016; CALVET et al., 2016; TANG et al., 2016). No ano seguinte a febre do Zika passou a ser uma doença de notificação compulsória no Brasil e, entre as semanas

epidemiológicas (SE) 1 e 52 do mesmo ano, foram notificados 216.207 casos prováveis de ZIKV (Ministério da saúde, 2018).

A transmissão do ZIKV ocorre majoritariamente através de mosquitos vetores do gênero *Aedes*, assim como por via sexual, transmissão vertical e por transfusão de sangue (HASAN et al., 2018). Clinicamente, na fase aguda da doença os indivíduos infectados podem ser assintomáticos (80% dos casos) ou apresentar sintomas como: febre, cefaleia, fadiga, conjuntivite, exantema maculopapular, mialgia e artralgia (ZIMMERMAN et al., 2020). Tendo em vista que tais sintomas são frequentes em doenças febris, a maior preocupação associada ao ZIKV é referente à síndrome congênita do Zika, que consiste em efeitos teratogênicos que podem decorrer da infecção em gestantes, ocasionando microcefalia e outras malformações em neonatos. Além disso, por ser um vírus neurotrópico, há também uma maior atenção a possíveis complicações clínicas como a síndrome de Guillain Barré, que pode acometer adultos infectados (HASAN et al., 2018; LI et al., 2016).

2.2 CO-CIRCULAÇÃO DE FLAVIVÍRUS NO BRASIL

As condições climáticas, assim como as condições socioeconômicas do Brasil favorecem a alta proliferação de mosquitos *Aedes aegypti*, principais vetores urbanos dos vírus Zika, Dengue e Febre amarela. Conseqüentemente, esses flavivírus co-circulam de forma endêmica no país (DONALISIO et al., 2017; MAGALHAES et al., 2020).

Segundo o ministério da saúde do Brasil, entre 2003 e 2019 foram notificados mais de onze milhões de casos prováveis de DENV e, entre os anos de 2016 e 2019, mais de duzentos mil casos de ZIKV (Ministério da saúde, 2019). Somente no ano de 2021 foram notificados 465.897 casos prováveis de DENV (SE 1-35), como também 4.272 casos de ZIKV (SE 1-31) (Ministério da saúde, 2021). Já o vírus da febre amarela ressurgiu a partir de 2014 em regiões extra-amazônicas. Entre janeiro e maio de 2019 foram confirmados 82 casos de febre amarela em humanos e 48 casos da doença em primatas não humanos (Ministério da saúde, 2019). Dados mais recentes mostram que entre julho de 2020 e janeiro de 2021, foram confirmados 37 casos de febre amarela em macacos em regiões não amazônicas, demonstrando a circulação desse vírus pelo país, porém nenhum caso foi confirmado em humanos no período (Ministério da saúde, 2021).

2.3 DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR ZIKV

A partir de 2016, no Brasil, a doença aguda pelo ZIKV passou a fazer parte da lista nacional de notificação compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública (Ministério da saúde, 2016). Portanto, o diagnóstico preciso de Zika, diferenciando-o de outros flavivírus, é essencial tanto para identificar a realidade epidemiológica da doença, possibilitando o controle, prevenção e previsão de possíveis epidemias, como também para manter os profissionais de saúde atentos às possíveis complicações clínicas associadas à infecção, possibilitando o fornecimento de suporte adequado aos pacientes infectados. (KIKUTI et al., 2018).

O diagnóstico direto de Zika pode ser feito a partir do isolamento viral, imunohistoquímica ou pela reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa quantitativa (RT-qPCR) (MUSSO et al., 2016). Atualmente, a RT-qPCR é considerada o padrão ouro para diagnóstico de Zika, pois é capaz de detectar o RNA viral com alta especificidade e sensibilidade no sangue, urina, líquido cefalorraquidiano ou amniótico, assim, se o teste molecular detectar o RNA viral, o diagnóstico é positivo (WAGGONER et al., 2016; SHARP et al., 2019). No entanto, como esse método é restrito a casos em que há o vírus presente no indivíduo, ou seja, em estágios iniciais da infecção, não é suficiente para diagnosticar infecções em que já não há vírus circulantes, portanto não é recomendada a utilização desse método a partir de 7 dias após o início dos sintomas, nem também para manter a vigilância epidemiológica com dados referentes à indivíduos que foram previamente infectados (Figura 1) (SHARP et al., 2019). Adicionalmente, a RT-qPCR é um método laborioso que exige equipamentos caros e uma equipe treinada para interpretar os resultados, dificultando a acessibilidade desse método em territórios com recursos financeiros e profissionais escassos (SILVA, 2020).

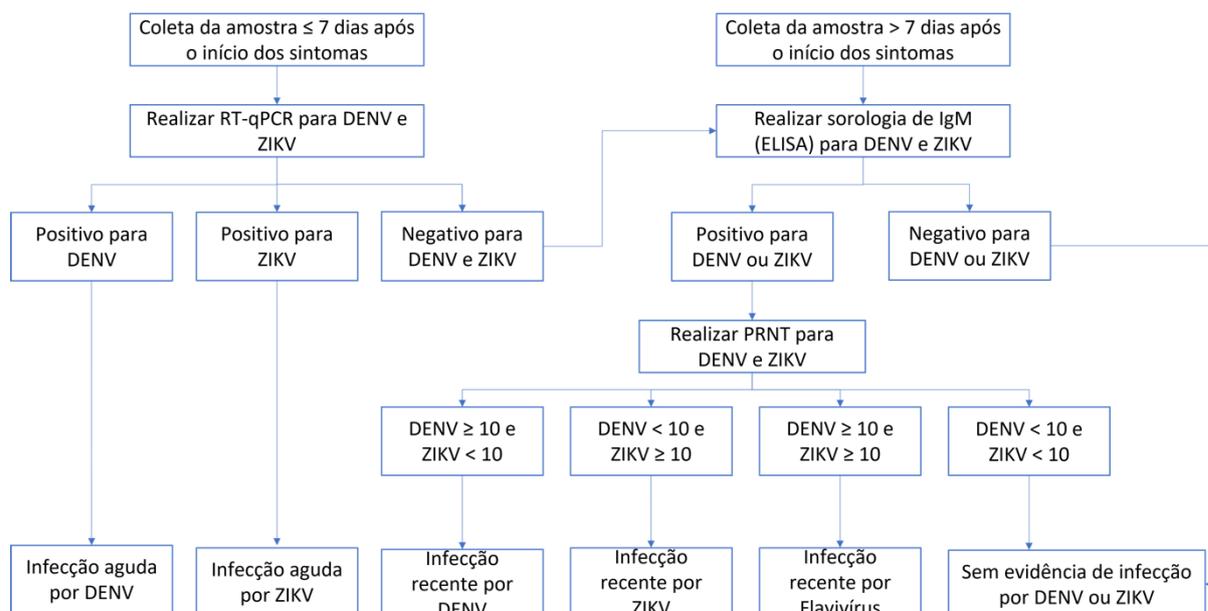
Comumente, o diagnóstico sorológico, que é capaz de detectar a presença de anticorpos no soro de indivíduos previamente infectados, é um método simples utilizado para diagnóstico em estágios mais tardios da doença, se mostrando útil no controle epidemiológico de diferentes doenças infecciosas. Porém, a reatividade cruzada entre os flavivírus é o principal fator limitante do diagnóstico sorológico do ZIKV, principalmente quando se trata de regiões como o Brasil, em que os flavivírus co-circulam de forma endêmica (MUSSO et al., 2016; PRIYAMVADA et al., 2017). Os ensaios sorológicos são utilizados para diagnóstico de Zika em estágios da infecção

em que não é mais recomendada a detecção do RNA viral (aproximadamente 7 dias após o início dos sintomas), como também para confirmação do diagnóstico quando a RT-qPCR for negativa. Por esse motivo, muitos estudos dedicam-se a desenvolver ensaios sorológicos que sejam capazes de diagnosticar diferencialmente os flavivírus co-circulantes no país (BALMASEDA et al., 2017; KIKUTI et al., 2018).

Dentre os ensaios sorológicos hoje utilizados, os ensaios de imunoadsorção enzimática (ELISA) para detecção de IgM e IgG são amplamente difundidos por serem de fácil execução quando comparados a técnicas mais robustas como o diagnóstico molecular (RT-qPCR), ou ainda, aos ensaios de neutralização viral (Teste de neutralização por redução de placas – PRNT). Porém, os testes de ELISA apresentam alta reatividade cruzada, portanto, uma vez que os anticorpos detectados no soro do indivíduo podem não se ligar especificamente ao ZIKV, frequentemente ocorrem falso-positivos em indivíduos previamente expostos a outros flavivírus (MUSSO et al., 2017; FELIX et al., 2017). Assim, o ELISA para detecção de IgM demonstra ser pouco sensível, quando comparado à RT-qPCR, porém mais específico quando comparado ao ELISA para detecção de IgG, principalmente em pacientes previamente expostos ao DENV. No entanto, nenhum dos ensaios de ELISA pode ser utilizado sozinho para confirmação de infecção por ZIKV em regiões em que há alta circulação de flavivírus (KIKUTI et al., 2018) (Figura 1).

Outro ensaio sorológico utilizado no diagnóstico de Zika é o PRNT, que, assim como o ELISA, é amplamente usado para confirmação da infecção por ZIKV nos momentos da infecção em que não é possível a detecção de RNA viral através da RT-qPCR. O PRNT é mais específico que a detecção de anticorpos IgM e IgG por ELISA, porém não é isento de reação cruzada, o que dificulta o diagnóstico preciso (SHARP et al., 2017). Assim, com os métodos atualmente disponíveis o diagnóstico do ZIKV ainda é laborioso e muitas vezes pode ser inconclusivo (Figura 1).

Figura 1 - Procedimento para diagnóstico de ZIKV



Nota: Recomendação de protocolo diagnóstico para Zika e Dengue em indivíduos não gestantes com manifestações clínicas compatíveis com doenças febris. PRNT - Teste de neutralização por redução de placas –Leitura: ≥ 10 : Título da amostra de soro reativo maior ou igual a 10. < 10 : Título da amostra de soro reativo menor que 10. Fonte: Adaptado de SHARP, Tyler M. et al, 2019.

2.4 ESTRUTURA E GENOMA DO ZIKV

O ZIKV pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, assim como o vírus da dengue (do inglês, “*Dengue Virus*” - DENV), vírus da febre amarela (do inglês, “*Yellow Fever Virus*” - YFV), vírus do Nilo Ocidental (do inglês, “*West Nile Virus*” – WNV) e vírus da encefalite japonesa (“*Japanese Encephalitis virus*” – JEV), por exemplo. Do ponto de vista estrutural, o ZIKV é envelopado e esférico, apresentando diâmetro entre 50 e 60 nanômetros com um capsídeo viral em forma icosaédrica encapsulando o genoma viral constituído por uma fita simples de RNA de polaridade positiva (ssRNA+) (BARROWS et al., 2018; HASAN, 2018).

Esse RNA possui aproximadamente 11 kilobases (kb) de comprimento, contendo um único quadro de leitura aberto (*Open Reading frame* - ORF) e duas regiões não codificantes - do inglês, “*untranslated region (UTR)*” -, UTR-3’ e UTR-5’. Assim como em outros flavivírus, o genoma do ZIKV codifica uma poliproteína que é posteriormente processada (clivada e glicosilada) dando origem às 10 proteínas virais: 3 proteínas estruturais (proteína do capsídeo, proteína precursora de Membrana e proteína do envelope) e 7 proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Figura 2A).

A superfície da partícula viral madura é composta por 90 homodímeros de proteína E numa conformação antiparalela e organizados em um padrão “*herringbone*”. Nesse padrão, cada três dímeros adjacentes da proteína E formam uma unidade denominada “raft”, portanto a superfície viral é recoberta por um total de trinta “rafts”. Além disso, os 180 monômeros da proteína E são divididos em 60 unidades de repetição (cada unidade contendo três monômeros) que juntas formam a simetria icosaédrica do vírus (Figura 2B) (KOSTYUCHENKO, 2016).

2.4.1 Proteínas estruturais

A proteína do capsídeo (C) é constituída por aproximadamente 120 aminoácidos que se organizam predominantemente em estruturas secundárias de alfa-hélices, possuindo duas superfícies: uma positivamente carregada e uma hidrofóbica. Ela é responsável pela interação com RNA viral, empacotando-o no processo de formação do nucleocapsídeo viral. (SHANG Zifang et al., 2018; TAN, Ter Yong et al., 2020.)

A proteína precursora de membrana (prM) tem aproximadamente 165 aminoácidos e é encontrada associada à proteína E nas partículas virais imaturas e parcialmente maduras. Essas interações facilitam o dobramento da proteína E no retículo endoplasmático logo após a síntese, portanto, a proteína precursora de membrana atua também como uma chaperona (PIERSON, 2020). Além disso, uma vez que a estrutura de prM recobre a região da alça de fusão da proteína E, essa associação impede a fusão prematura dos virions com a membrana celular da via secretória de Golgi durante o egresso das partículas virais para o meio extracelular (Figura 3).

A glicoproteína do envelope (E) é o principal constituinte da superfície viral, sendo, portanto, o alvo primário de anticorpos neutralizantes (BARDINA et al., 2017). Por possuir sítios de ligação ao receptor celular, é responsável pela interação do virion com os receptores da membrana hospedeira, permitindo a internalização do vírus por endocitose e, por possuir um peptídeo de fusão, promove a fusão do envelope viral com a membrana do endossomo (KOSTYUCHENKO et al., 2016; DAI et al., 2016.). A proteína E é formada por aproximadamente 500 aminoácidos, dos quais 400 resíduos localizados na região N-terminal formam, em uma partícula viral madura, um ectodomínio estrutural predominantemente formado por folhas beta, que pode ser

subdividido em três domínios (D): DI, DII e DIII (Figura 2C) (BARBA-SPAETH et al., 2016). Esse ectodomínio é ligado à membrana viral através dos resíduos da proteína E localizados na região C-terminal, que formam uma estrutura de haste helicoidal e um domínio transmembrana caracterizado por duas alfa-hélices antiparalelas (PIERSON et al., 2020).

O domínio I tem uma estrutura de beta barril e é o domínio central da proteína E, ligando-se ao domínio II e III (Figura 2C). A ligação DI-DII é altamente flexível, enquanto a DI-DIII é rígida em pH neutro. Essa flexibilidade entre os domínios I e II permite uma certa liberdade de movimento das proteínas E na partícula viral madura (KOSTYUCHENKO et al., 2016; HASAN et al., 2018). O domínio II apresenta a alça de fusão altamente hidrofóbica, região conservada entre os flavivírus, que é responsável pela fusão do envelope viral com a membrana hospedeira. Já o DIII é um domínio semelhante a IgG responsável por mediar a ligação do virion aos receptores da célula hospedeira. O DIII é o domínio menos conservado entre flavivírus quando comparado ao DI e DII, portanto frequentemente é alvo em estudos para desenvolvimento de vacinas, diagnóstico e terapias anti-Zika (PRIYAMVADA et al., 2016; SAPPARAPU et al. 2016; ZHAO et al., 2016; WU et al., 2017; ZHAO et al., 2019).

2.4.2 Proteínas não estruturais (NS)

As sete proteínas não-estruturais do ZIKV são componentes fundamentais para o ciclo viral e para a patogênese do vírus uma vez que participam do processo de replicação viral e da evasão do sistema imunológico do hospedeiro. As proteínas não estruturais formam unidades conhecidas como complexos replicativos (CR), localizadas membrana citoplasmática do RE, onde ocorre a replicação do RNA viral (VAN DEN ELSEN et al, 2021).

A proteína NS1 existe como múltiplas formas, podendo estar organizada em homodímeros no interior das células hospedeiras, ao passo que interage com a membrana do retículo endoplasmático e participa da replicação do RNA viral, na superfície celular interagindo com receptores celulares, ou ainda pode ser secretada como hexâmeros para o exterior da célula hospedeira, passando a interagir com proteínas do sistema imune. (POVEDA-CUEVAS et al., 2018; SONG et al, 2016; MULLER et al., 2013)

A proteína NS2A é uma pequena proteína transmembrana com aproximadamente 230 aminoácidos (LEUNG et al., 2008.). Ela está localizada ancorada à membrana do retículo endoplasmático e participa tanto da replicação do RNA de fita simples, como da montagem da partícula viral através do recrutamento do RNA viral, do complexo capsídeo-prM-E e das proteínas NS2B/NS3 (ZHANG et al., 2019; VAN DEN ELSEN et al., 2021; BARNARD et al., 2021).

A proteína NS2B tem aproximadamente 130 aminoácidos e está aderida à membrana do retículo endoplasmático. Do ponto de vista funcional, atua como cofator para o domínio protease da NS3, permitindo o ancoramento dessa proteína no RE e a ativação de sua atividade catalítica (HILGENFELD et al., 2018).

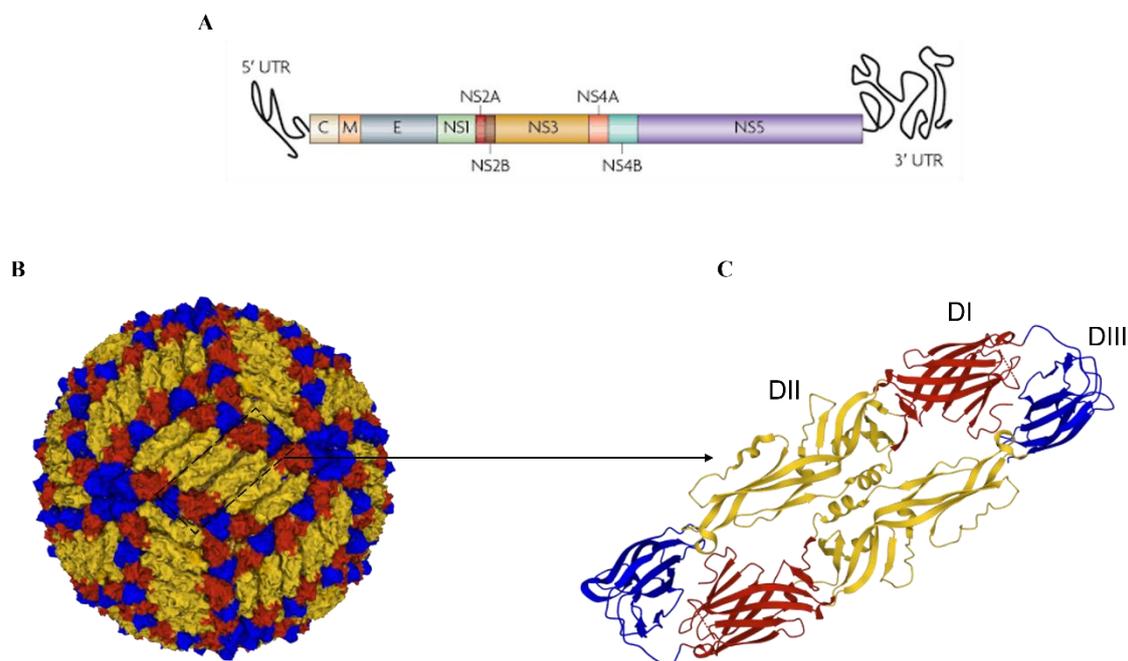
A proteína NS3 é uma proteína de 618 aminoácidos constituída por múltiplos domínios, que são responsáveis pelas atividades de protease, helicase, nucleosídeo trifosfatase (NTPase) e RNA trifosfatase (RTPase) da proteína, tornando-a, portanto, uma enzima multifuncional. Assim, a NS3 participa tanto da síntese do RNA viral, como da clivagem da poliproteína viral (UMAREDDY et al., 2006; HILGENFELD et al., 2018).

As proteínas NS4A e NS4B são proteínas hidrofóbicas de membrana, cujas funções não são totalmente descritas na literatura. A NS4A tem 127 resíduos de aminoácidos e se localiza na membrana do retículo endoplasmático. Estudos sugerem que ela induz as mudanças conformacionais na membrana do RE para a formação do CR, tem função na replicação do RNA viral e, além disso, possui uma sequência sinal para translocação da NS4B para o lúmen do RE (MILLER et al., 2007). A NS4B é a maior proteína de membrana codificada pelos flavivírus, contendo aproximadamente 250 aminoácidos e desempenhando funções na replicação viral e na patogênese do ZIKV através, junto à NS4A, da ação inibitória da neurogênese (MILLER et al., 2006; LIANG et al, 2016.).

A NS5 é a maior e mais conservada proteína expressa pelos flavivírus. Ela é constituída por 900 aminoácidos e participa da replicação do RNA viral sob as funções de metiltransferase e de RNA polimerase dependente de RNA. Além da função na replicação viral, a NS5 atua na evasão do sistema imune através da interação intracelular com o transdutor de sinal e ativador da transcrição 2 humana (*Human Signal transducer and activator of transcription 2* - hSTAT2) e consequente degradação proteassomal dessa proteína através de vias não completamente elucidadas (WANG et al., 2020; GRANT et al., 2016). Apesar de ter função na

replicação do RNA viral, que ocorre no citoplasma da célula hospedeira, durante uma infecção a NS5 do ZIKV pode ser localizada majoritariamente no núcleo da célula. Porém, quando há superexpressão da STAT2, a NS5 é realocada para o citoplasma, encontrando-se ligada à essa proteína celular (WANG et al, 2020).

Figura 2 - Estrutura e genoma do ZIKV



Nota: (A): Representação do RNA viral contendo as duas regiões não traduzidas (5'UTR e 3'UTR) e o quadro de leitura aberto (*open reading frame* - ORF) ilustrando as 10 proteínas codificadas pelo genoma viral (Proteínas estruturais: C - Capsídeo, prM – Pré-membrana, E – Envelope; Proteínas não estruturais: NS1 à NS5). (B): Partícula viral madura do ZIKV (*Protein Data Bank ID* - PDB: 6CO8). (C): Dímero da proteína E com destaque para os domínios: DI (em vermelho), DII (em amarelo) e DIII (em azul). ZIKV: *Zika virus* – Vírus Zika. Fonte: (A)- Freire et al., 2014; (B)- PDB: 6CO8 (C)- PDB: 5JHM.

2.5 CICLO VIRAL

A entrada da partícula viral na célula hospedeira inicia-se com a interação entre o domínio III da proteína do envelope e receptores de membrana, tais como AXL, DC-SIGN, TIM-1, TYRO3 e proteínas do choque térmico (HAMEL et al., 2015; NOWAKOWSKI et al., 2016). Essa interação promove a endocitose da partícula viral mediada por receptor, então o baixo pH no interior do endossomo acarreta mudanças conformacionais na proteína do envelope, promovendo a exposição do loop de fusão localizado no domínio II. A exposição dessa região hidrofóbica permite a fusão entre o envelope viral e a membrana endossomal, levando à interiorização do

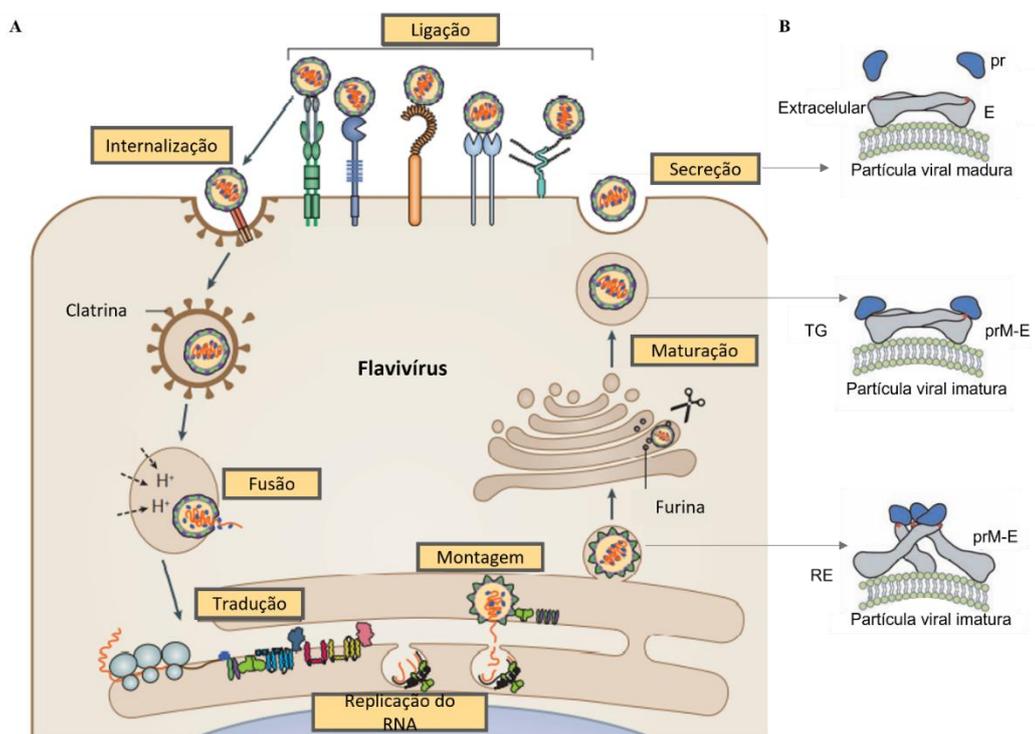
nucleocapsídeo e liberação do RNA viral no citoplasma da célula hospedeira (Figura 3A) (LINDENBACH, 2003; NEUFELDT et al., 2018; PIERSON et al., 2020). Uma vez no interior celular, o RNA de sentido positivo é traduzido pelos ribossomos no retículo endoplasmático em uma poliproteína de aproximadamente 3500 aminoácidos, que é posteriormente clivada por proteases, tanto celulares como virais, e glicosilada por glicosiltransferases da célula hospedeira (HASAN et al., 2018). O processamento dessa poliproteína dá origem a 3 proteínas estruturais (proteína do capsídeo, proteína precursora de Membrana e proteína do envelope), responsáveis pela estrutura da partícula viral, assim como sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5), que desempenham funções tanto na replicação e montagem da partícula viral, como também na evasão do sistema imune (HASAN et al., 2018).

As proteínas, então sintetizadas, participam da replicação do RNA viral de polaridade positiva, por meio da geração de um intermediário de fita simples de RNA de polaridade negativa (BARROWS et al., 2018). Uma vez sintetizados os novos RNA genômicos, as proteínas do capsídeo, que existem como homodímeros localizados na região citosólica do retículo endoplasmático, interagem através de sua superfície altamente positiva com o novo RNA formando o nucleocapsídeo viral, ao passo que interagem através de sua superfície hidrofóbica com a membrana do retículo endoplasmático, na qual estão ancoradas as proteínas prM e E. As proteínas do capsídeo passam, então, a interagir com a região transmembrana dos heterotrímeros prM/E (SHANG et al., 2018; TAN et al., 2020). Esses eventos, seguidos pelo brotamento dessas estruturas no lúmen do retículo endoplasmático, conferem à partícula uma estrutura de nucleocapsídeo envelopado, formando a partícula viral imatura, que tem aproximadamente 60 nm de diâmetro e apresenta um aspecto espiculado devido à presença de 60 trímeros de prM/E em sua superfície (Figuras 3 e 4) (BARROWS et al., 2018).

As partículas virais imaturas são conduzidas, por meio do complexo de golgi, para maturação e liberação no meio extracelular. O processo de maturação viral consiste na excisão do peptídeo pr com a finalidade de tornar a partícula viral infectiva. Esse processo é decorrente do baixo pH na rede Trans-Golgi, que favorece a ocorrência de rearranjos conformacionais nas proteínas prM e E, que passam a formar dímeros, permitindo a clivagem de prM por furinas celulares. Esses eventos resultam na proteína de membrana (M), que é formada por aproximadamente 75 aminoácidos e está presente nas partículas virais maduras, assim como no peptídeo “pr” que,

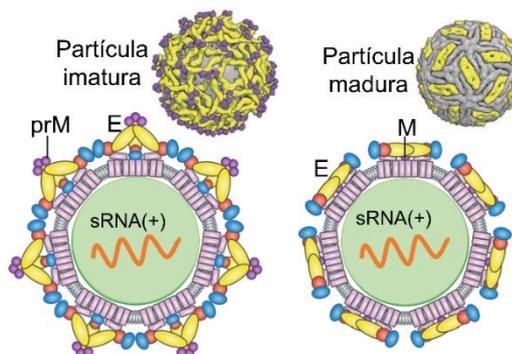
apesar de clivado, para evitar uma fusão viral precoce permanece ligado aos dímeros da proteína E até que as partículas virais maduras sejam liberadas no meio extracelular (SAIZ et al., 2016; HASAN et al., 2018) (Figura 3). Os virions liberados são um pouco menores que as partículas virais imaturas, apresentando um diâmetro de aproximadamente 50 nm e sua superfície, que é formada por 90 dímeros da proteína E, não tem o aspecto espiculado observado nas partículas imaturas (BARROWS et al., 2018) (Figura 4).

Figura 3 - Ciclo viral dos flavivírus



Nota: (A) Representação do ciclo dos flavivírus, iniciando com a ligação da partícula viral com o receptor celular. (B) Desenho esquemático das mudanças conformacionais sofridas pelos trímeros prM/E conforme a maturação viral. RE: Reticulo endoplasmático. TG: Trans-Golgi. Fonte: (A) Adaptado de NEUFELDT et al., 2018; (B) Adaptado de HASAN et al., 2018.

Figura 4 - Estágios de maturação da partícula viral de Zika



Nota: (A): Partícula viral imatura apresentando aspecto espiculado devido à formação de trímeros de proteínas prM e E na superfície viral; (B): Partícula viral madura com aspecto não espiculado devido à clivagem da proteína prM durante a maturação e posterior organização das proteínas M e E em dímeros na superfície viral. Fonte: Adaptado de Pierson et al., 2020.

2.6 RESPOSTA IMUNOLÓGICA À INFECÇÃO POR ZIKV

Estudos mostram que no decorrer da resposta à infecção pelo ZIKV, há aumento da expressão de IFN- α , IFN- γ , receptores de membrana toll like 3 (TLR3), assim como dos receptores citoplasmáticos MDA5 e RIG-I, capazes de ativar a resposta inata a partir do reconhecimento de fitas duplas do RNA viral (HAMEL et al., 2015). Além disso, pode ser observada a ativação e proliferação de células mononucleares no sangue periférico, tais como: células natural killer (NK), linfócitos T e plasmócitos (DUDLEY et al., 2016). Durante uma infecção por ZIKV, os linfócitos T CD4+ apresentam um perfil robusto de resposta Th1, liberando citocinas como IFN- γ , TNF- α e IL-2. Portanto, são essenciais para ativação das células T citotóxicas, assim como para a maturação de células B e dos anticorpos (LIMA et al., 2017; LIANG et al., 2019).

Estudos com outros flavivírus evidenciam que as células T-CD8+ são os principais mediadores da remoção viral nos tecidos do sistema nervoso (REYNOLDS et al., 2018). Portanto, devido ao comportamento neurotrópico do ZIKV, possivelmente os linfócitos T-CD8+ têm participação na prevenção ou diminuição do agravamento das manifestações neurológicas. Tal possibilidade é reforçada por estudos referentes à infecção por ZIKV em modelos animais que mostram, através de ensaios de deleção e transferência adotiva de células, o papel protetivo das células T CD8+ (LIMA et al., 2017; NGONO et al., 2017; REYNOLDS et al., 2018).

Por outro lado, assim como observado em outros flavivírus, a resposta celular estimulada por uma infecção de ZIKV pode ser tanto protetora como patogênica.

Estudos com modelos animais mostram que a resposta celular e infiltração dos linfócitos T no sistema nervoso central podem estar relacionadas com a patogênese e o comprometimento cerebral. Já foi demonstrado que a resposta de células T decorrente de infecções em humanos por flavivírus, como o vírus do Nilo Ocidental e o vírus da Encefalite Japonesa, está associada ao comprometimento do sistema nervoso central (JAMES et al., 2016; REYNOLDS et al., 2018). Além disso, a resposta de células T CD4+ Th17 já foi relacionada à imunopatogênese da dengue hemorrágica (PAGLIARI et al., 2016). Ainda não há consenso a respeito do papel das células T na imunopatogênese e proteção em infecções por ZIKV, porém já foi demonstrado que indivíduos previamente infectados por outros flavivírus, principalmente pelo DENV, frequentemente apresentam um padrão de resposta T-CD8+ composto por células direcionadas à epítomos conservados, uma vez que há o recrutamento das células T de memória. Portanto, infecções prévias por DENV e, conseqüentemente, o desvio de imunodominância das células T podem ter relação com a imunopatogênese do ZIKV (LIMA et al., 2017).

Além da resposta de células T, durante uma infecção viral é induzida uma resposta humoral com produção de anticorpos, que durante uma infecção pelo ZIKV já podem ser identificados no soro entre 2 e 3 dias após o início dos sintomas (PRIYAMVADA et al., 2017). Já foi demonstrado que os principais alvos da resposta imune humoral contra flavivírus estão localizados nas proteínas E, prM e NS1 (ROGERS et al., 2017). Assim, ao longo de uma infecção por ZIKV são produzidos anticorpos neutralizantes (nAbs) e não neutralizantes contra essas estruturas. Dentre os anticorpos produzidos, os nAbs são cruciais para o processo de combate à infecção. A neutralização viral mediada por eles é dependente da quantidade de moléculas de anticorpos ligadas à partícula viral, da afinidade do anticorpo pelo epítomo e da acessibilidade desse epítomo (CAMPOS et al., 2018).

Alguns estudos demonstram que indivíduos previamente infectados por outros flavivírus, quando infectados pelo ZIKV apresentam uma resposta humoral mais robusta, menos específica e, conseqüentemente, com alta reatividade cruzada entre flavivírus. Esse fenômeno é relacionado à reativação de células B de memória direcionadas a epítomos conservados entre os flavivírus. Por outro lado, indivíduos sem infecções prévias por flavivírus apresentam uma resposta menos robusta, porém mais específica para Zika. (PRIYAMVADA et al., 2017; ROGERS et al., 2017).

Uma grande parte dos anticorpos produzidos em resposta à infecção por ZIKV, principalmente em locais com alta co-circulação de flavivírus, são os anticorpos de reação cruzada direcionados ao epítopo da alça de fusão da proteína E (DAI et al., 2016). A alça de fusão é uma região altamente conservada entre os flavivírus e possui difícil acesso na superfície viral, pois é mantida frequentemente “escondida” na interface dos dímeros da proteína E com exposição dependente das mudanças conformacionais das estruturas adjacentes (BARBA-SPAETH et al., 2016; WANG et al., 2019). Portanto, os anticorpos direcionados ao epítopo da alça de fusão, além de apresentarem reatividade cruzada com outros flavivírus são fracamente neutralizantes (ZHAO et al., 2016; SAPARAPPU et al., 2016).

Diferentemente dos anticorpos anti-alça de fusão, outros anticorpos já bem descritos, que são produzidos em resposta à infecção por ZIKV, são altamente neutralizantes e desempenham, portanto, um papel fundamental na resposta humoral. Alguns desses anticorpos, conhecidos como anti-epítomos quaternários, têm como alvo as estruturas conformacionais resultantes da disposição simétrica dos dímeros de proteínas E na superfície viral, sendo assim, esses anticorpos são capazes de reconhecer estruturas presentes apenas em partículas virais maduras intactas (Barba-Spaeth et al., 2016; HASAN et al., 2017).

Além dos anticorpos anti-epítomos quaternários, já se sabe que um dos principais alvos de anticorpos neutralizantes e específicos é o DIII da proteína E. Por ser o domínio menos conservado, quando comparado aos domínios I e II, os anticorpos a ele direcionados apresentam menor reatividade cruzada (PRIYAMVADA et al., 2016; ZHAO et al., 2016). Já foi observado que durante a infecção primária pelo vírus Dengue são produzidas grandes quantidades de anticorpos direcionados aos domínios I e II da proteína E, porém, esses anticorpos apresentam uma atividade neutralizante mais fraca quando comparados aos direcionados ao domínio III, apesar dos últimos estarem presentes em menores quantidades (ZIMMERMAN et al., 2020). Esses anticorpos podem ser direcionados a diferentes epítomos dentro do domínio III como, por exemplo, ao epítopo C-C'loop, “*Lateral ridge*” e folha ABDE (ZHAO et al., 2016). Diversos estudos têm mostrado a capacidade dos anticorpos direcionados ao DIII em neutralizar a infecção por ZIKV *in vivo* e *in vitro*, assim como em diferenciar o ZIKV de outros flavivírus altamente semelhantes (DUDLEY et al., 2016; ZHAO et al., 2016; WANG et al., 2017; ZHAO et al., 2019).

2.7 PECADO ANTIGÊNICO ORIGINAL E AMPLIFICAÇÃO DA INFECÇÃO DEPENDENTE DE ANTICORPOS

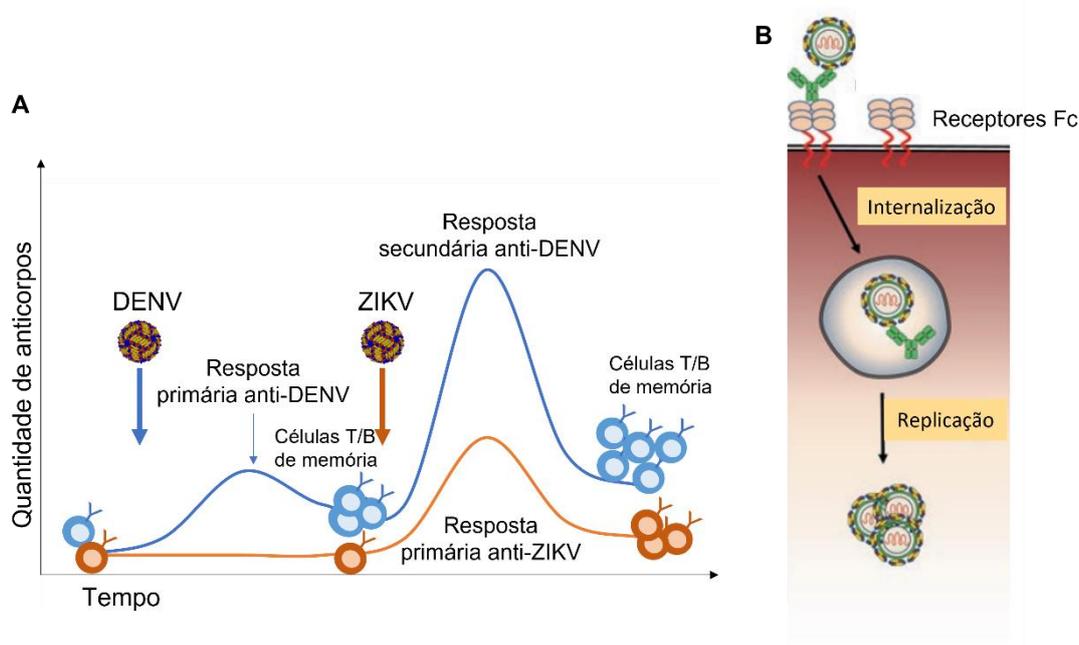
O pecado antigênico original foi descrito pela primeira vez em 1960 por Thomas Francis Jr. (FRANCIS, 1960; VATTI et al., 2017). Esse evento está relacionado à resposta imunológica primária e secundária de um indivíduo à infecção. Define-se como primária a resposta decorrente da primeira exposição a um determinado antígeno, enquanto secundária, o segundo momento em que o indivíduo é exposto ao mesmo antígeno. Em uma segunda exposição o organismo já está adaptado ao antígeno e gera uma resposta imunológica mais rápida e robusta (Figura 5A). No entanto, durante infecções virais, por exemplo, quando dois vírus são semelhantes, porém com epítopos ligeiramente diferentes, o sistema imune pode identificar “erroneamente” esses epítopos como pertencentes ao vírus a que foi previamente exposto (CAMPOS et al., 2018). Conseqüentemente, há ativação preferencial de células de memória já existentes e produção de uma resposta secundária contra o antígeno original em vez da geração de uma resposta primária específica para o novo vírus (Figura 5A) (VATTI et al., 2017; ROGERS et al., 2017). Então, se o novo antígeno for suficientemente diferente do original, a resposta gerada não é efetiva e pode resultar em uma amplificação da infecção dependente de anticorpos (ADA) (VATTI et al., 2017; CAMPOS et al., 2018).

A ADA foi primeiramente descrita por volta de 1970 em infecções *in vitro* por vírus da Dengue. Posteriormente, observou-se que infecções prévias por um sorotipo do DENV poderiam aumentar o risco de complicações clínicas em infecções subsequentes por outro sorotipo. Esse fenômeno envolve anticorpos de reação cruzada não neutralizantes e/ou em quantidades subneutralizantes e células que expressem receptores Fc (FcγR) (DAI et al., 2018; PIERSON et al., 2016). O evento de ADA se inicia com a ligação desses anticorpos à partícula viral. Uma vez ligados, tais anticorpos medeiam a endocitose do vírus na célula hospedeira por meio da endocitose dependente de FcγR, posteriormente, a partícula viral se funde com a membrana endossomal, liberando o RNA no citoplasma e infectando a célula hospedeira (Figura 5B) (LAURETI et al., 2018). Esse processo resulta no aumento quantitativo de partículas virais no hospedeiro e, conseqüentemente, no agravamento clínico da doença (BARDINA et al., 2017; PIERSON et al., 2016).

Apesar de, até o momento, ser documentado apenas um sorotipo do ZIKV, sua semelhança estrutural com os demais vírus da mesma família, tais como DENV, WNV e YFV, favorece o surgimento de anticorpos de reação cruzada quando indivíduos previamente infectados por outros flavivírus são, então, infectados pelo ZIKV. Isso ocorre, pois durante a infecção prévia o indivíduo desenvolve anticorpos específicos contra o vírus e, subsequentemente, origina células B de memória. Numa infecção posterior por vírus estruturalmente semelhantes, as células B de memória remanescentes são recrutadas e passam a secretar anticorpos, que podem, então, desencadear o processo de ADA (ROGERS et al., 2017; BARDINA et al., 2017; LAURETI et al., 2018). Em suma, a ADA ocorre quando anticorpos incapazes de neutralizar a infecção ligam-se à partícula viral facilitando sua entrada e posterior replicação na célula hospedeira.

Esse fenômeno é o principal fator a ser considerado no desenvolvimento de vacinas ou terapias através de anticorpos monoclonais, pois os métodos desenvolvidos devem ser capazes de neutralizar o vírus sem provocar a amplificação da infecção. Tal preocupação é ainda maior em locais, como o Brasil, em que os flavivírus co-circulam de forma endêmica (PRIYAMVADA et al., 2017).

Figura 5 - Amplificação dependente de anticorpos



Nota: (A) Representação do fenômeno ADA. Pode ser observado que numa infecção por Zika posterior à infecção por DENV, houve aumento dos níveis de anticorpos anti-DENV. (B) Internalização do vírus através de anticorpos sub neutralizantes. Fonte: (A) O autor; (B) Adaptado de DAI et al., 2018.

2.8 PROPOSTAS VACINAIS E TERAPÊUTICAS BASEADAS NO DOMÍNIO III DA PROTEÍNA E

Ainda não existem vacinas e drogas antivirais aprovadas para o ZIKV, portanto, a profilaxia consiste em elaborar estratégias para minimizar o contato com o mosquito vetor, enquanto a terapia atualmente empregada visa apenas amenizar os sintomas da doença (SILVA et al., 2020). Nesse contexto, o domínio DIII da proteína E-ZIKV, por ser alvo de anticorpos neutralizantes específicos, vem sendo objeto de estudos que buscam desenvolver tanto vacinas e terapias, como também novas propostas de diagnóstico diferencial (YANG et al., 2017; WANG et al., 2017; ZHAO et al., 2019).

Na busca para desenvolver vacinas contra ZIKV estão incluídos estudos referentes a diversas plataformas vacinais como, por exemplo, as vacinas baseadas em DNA (DOWD et al., 2016), mRNA (PARDI et al., 2017), vetor de adenovírus (HASSAN et al., 2019), vírus inativado (LAROCCA et al., 2016), partículas semelhantes à vírus (VLP) (YANG et al., 2017) e antígenos vacinais a partir das proteínas virais (SLON-CAMPOS et al., 2019). Visto que uma das limitações no desenvolvimento de vacinas para ZIKV é a amplificação da infecção dependente de anticorpo, o domínio III da proteína E é largamente estudado como antígeno nas construções vacinais, pois os anticorpos a ele direcionados demonstram menor reação cruzada com outros flavivírus (LÓPEZ-CAMACHO et al., 2020).

A terapia com anticorpos monoclonais para infecções por ZIKV vem sendo extensamente investigada, como por exemplo, no estudo de WANG e colaboradores em 2017, no qual foi demonstrado que um anticorpo bi-específico desenvolvido a partir de dois mAbs, um direcionado ao epítopo "*lateral ridge*" do domínio DIII (LR-DIII) e o outro direcionado ao domínio DII, pode ser um possível candidato na terapia da infecção pelo vírus Zika (WANG et al., 2017). Já foi demonstrado também que quatro mAbs direcionados aos epítomos conformacionais "C-C' loop-DIII" e LR-DIII se mostraram específicos para ZIKV, apresentando atividade neutralizante da infecção viral *in vitro*. Desses, os dois mAbs que se ligavam ao epítopo LR-DIII, quando transferidos passivamente, ofereceram proteção *in vivo* para camundongos desafiados com doses letais de ZIKV (ZHAO et al., 2016). Adicionalmente, já foi observada a capacidade neutralização de infecção em primatas não humanos por meio da transferência passiva de três anticorpos monoclonais direcionados aos domínios DIII e DII (MAGNANI et al., 2017).

No entanto, além de até o momento nenhuma proposta terapêutica com mAbs ter sido aprovada, a produção de anticorpos monoclonais é um procedimento laborioso quando comparado à expressão proteica em microrganismos, então uma alternativa a esse método é o desenvolvimento de proteínas sintéticas baseadas nos anticorpos monoclonais. Tais proteínas podem ser otimizadas em relação à estabilidade e interação com o epítipo alvo, além de possibilitar a expressão em modelos celulares mais simples, como por exemplo em células procariotas.

2.9 PROTEÍNAS VLL AVALIADAS NO ESTUDO

Com o avanço da biologia molecular e da engenharia genética, hoje é possível realizar modificações nas sequências codificantes de proteínas e expressá-las *in vitro* ou *in vivo* dando origem a proteínas que não existem na natureza. A engenharia de proteínas permite, a partir do conhecimento prévio da estrutura cristalográfica de determinada proteína, racionalizar modificações em sua sequência codificante, conferindo a ela propriedades e funções específicas por meio da alteração estrutural (ULMER, 1983). Para este trabalho, o anticorpo monoclonal ZV-67, direcionado ao domínio DIII da proteína do envelope do ZIKV, descrito em estudos prévios (ZHAO et al., 2016; ZHAO et al., 2019), foi utilizado como ponto de partida para o desenho de proteínas capazes de reconhecer com alta especificidade o ZIKV.

As três construções proteicas denominadas “VLL-V2”, “VLL-V3” e “VLL-V4” foram previamente idealizadas e desenvolvidas *in silico* pelo Dr. Danilo Coêlho, integrante do nosso grupo de pesquisa. O desenho dessas proteínas sintéticas foi idealizado a partir da estrutura do mAb ZV-67, direcionado ao epítipo *Lateral Ridge* no domínio III da proteína E do ZIKV, de modo que elas pudessem carrear os aminoácidos do mAb responsáveis pela interação anticorpo-epítipo (Zhao et al., 2016). Para a obtenção das estruturas finais, os aminoácidos fundamentais para o estabelecimento da ligação do anticorpo ao epítipo foram identificados computacionalmente. Foi observado que tais aminoácidos estavam localizados nas regiões determinantes de complementaridade (CDR) da cadeia leve do mAb ZV-67, portanto, essas regiões foram utilizadas como parátipo para a montagem das proteínas. Após buscas por estruturas capazes de carrear os aminoácidos numa conformação ideal para o estabelecimento da ligação ao epítipo, a proteína de Bence Jones (PDB: 4L1H) foi selecionada. Assim, os aminoácidos foram transplantados para

a proteína carreadora, resultando em 3 estruturas finais: VLL-V2, VLL-V3 e VLL-V4, que serão avaliadas neste estudo.

2.9.1 Propostas de uso das proteínas VLL como método de diagnóstico e terapia anti-Zika

As proteínas sintéticas foram desenvolvidas *in silico* de modo que possam se ligar à partícula viral do ZIKV. Portanto, potenciais propostas de diagnóstico utilizando essas proteínas incluem tanto o diagnóstico de fase aguda, a partir da detecção da partícula do ZIKV no soro de indivíduos infectados, ou ainda a detecção de anticorpos direcionados ao epítopo LR-DIII da proteína E-ZIKV através de ensaios de ELISA de competição, no qual é esperado que as proteínas sintéticas disputem o sítio de ligação ao epítopo com os anticorpos produzidos naturalmente pelo indivíduo infectado (BOSCH et al., 2017). Do ponto de vista terapêutico, as proteínas desenhadas têm potencial de futuramente serem utilizadas em indivíduos durante uma infecção por ZIKV a fim de impedir o agravamento da infecção e a progressão da doença para as complicações clínicas como a síndrome congênita do Zika, síndrome de Guillain Barré, síndrome de Miller Fisher, neurite óptica, dentre outras (LI et al., 2016; LIANG et al., 2016; FERREIRA et al., 2020).

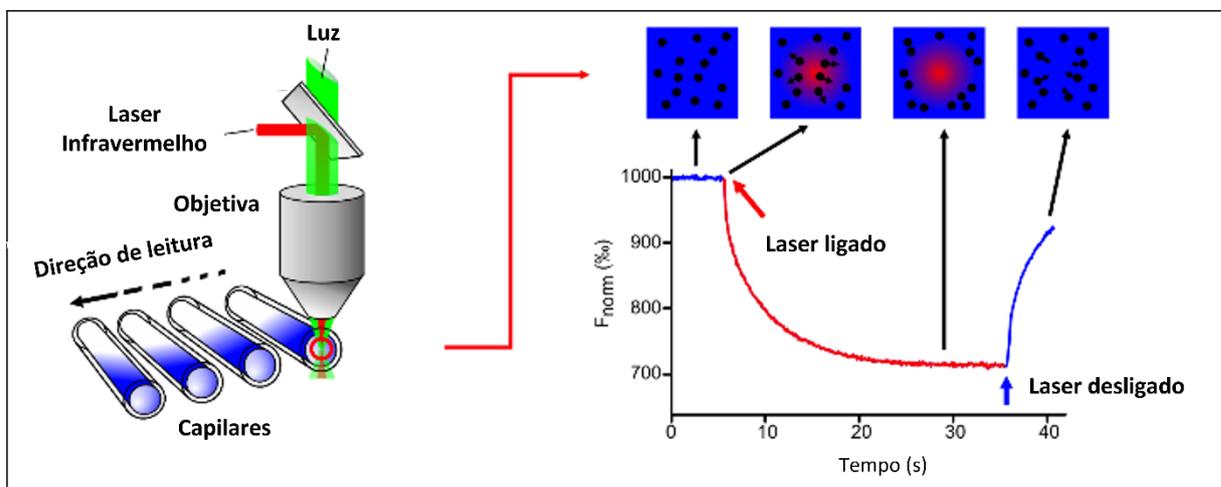
2.10 MÉTODOS PARA ANÁLISE DE INTERAÇÕES ENTRE PROTEÍNAS

A força de interação entre duas moléculas, conhecida como afinidade de ligação, pode ser caracterizada experimentalmente pela constante de dissociação (K_D) entre elas. Em equilíbrio, o K_D está relacionado com as taxas de associação e dissociação dos complexos formados entre as proteínas analisadas, portanto, é uma medida que reflete a possibilidade de uma interação ser formada ou não (KASTRITIS, 2013). De modo geral, o K_D pode ser definido como a concentração da proteína ligante capaz de ocupar 50% dos sítios disponíveis, ou seja, é a concentração na qual 50% das proteínas em solução estão formando complexos.

O K_D entre proteínas pode ser mensurado por técnicas como interferometria em biocamada (*Biolayer interferometry* - BLI), ressonância plasmônica de superfície (*Surface plasmon resonance* - SPR) e termoforese em microescala (*MicroScale Thermophoresis* - MST), por exemplo. A técnica de MST, com a finalidade de quantificar as interações biomoleculares, faz uso da propriedade termoforética das

moléculas, que consiste na migração direcional dessas partículas quando submetidas a um gradiente de temperatura. Essa migração é dependente das características físicas das moléculas. Durante os experimentos de MST, o gradiente de temperatura é induzido através de um laser infravermelho incidido no centro do capilar, sendo possível detectar o movimento das proteínas a partir do monitoramento da fluorescência de uma das proteínas previamente marcada com fluorescência. Assim, quaisquer mudanças provenientes de eventos de ligação, seja no peso, estrutura, carga ou superfície de solvatação das moléculas analisadas modificam o perfil termoforético e, conseqüentemente, podem ser detectadas. Portanto, a MST é uma técnica altamente sensível (Figura 6)(JERABEK-WILLEMSSEN et al, 2014).

Figura 6 - Técnica de MST para análise de interações proteicas



Nota: Representação do ensaio de MST, em que capilares contendo soluções com as proteínas de interesse são submetidos a um gradiente de temperatura induzido através de um laser infravermelho. O movimento das proteínas pode ser detectado, a partir do momento em que o laser é ligado, através do monitoramento da fluorescência (F_{norm}) em função do tempo. Com o desligamento do laser, as proteínas retornam ao centro do capilar, onde anteriormente havia sido incidido o laser provocando o aumento da temperatura. Mudanças provenientes de eventos de ligação no perfil de movimento das proteínas pode, portanto, ser detectado por fluorescência. Fonte: Adaptado de JERABEK-WILLEMSSEN et al., 2014.

3 JUSTIFICATIVA

O diagnóstico diferencial de Zika é de extrema importância tanto para manter o controle epidemiológico, como para o monitoramento das complicações clínicas associadas à infecção. De forma complementar, a terapêutica baseada na neutralização da infecção viral se faz necessária para amenizar a severidade clínica decorrente das infecções, principalmente em mulheres infectadas durante a gestação (KIKUTI et al., 2018). Portanto, faz-se necessário o desenvolvimento de estudos que abordem propostas diagnósticas e terapêuticas (Li et al., 2016; TANG et al., 2016).

Já foi descrito na literatura que um grupo de anticorpos monoclonais direcionados ao epítopo *Lateral Ridge*, localizado no domínio III da proteína E, reconhecem especificamente o ZIKV, neutralizam a infecção *in vitro*, assim como protegem modelos animais submetidos a doses letais do vírus (ZHAO et al, 2016; MAGNANI et al., 2017). Com base nesses estudos, nosso grupo de pesquisa previamente idealizou e engenheirou *in silico* três proteínas, denominadas VLL-V2, VLL-V3 e VLL-V4, a partir da estrutura de um desses anticorpos – mAb ZV-67-, que em estudos prévios demonstra potencial de diagnóstico e neutralização viral (ZHAO et al., 2016). As proteínas sintéticas foram desenvolvidas de modo a carrear os aminoácidos do mAb fundamentais na interação anticorpo-epítopo, portanto, é previsto que elas apresentem capacidade de estabelecer ligação com a partícula do ZIKV, assim como de neutralizar a infecção viral.

Uma das vantagens que as proteínas recombinantes desenvolvidas têm em relação ao uso de mAbs é a possibilidade de expressão em modelos celulares simples, como as células de *E. coli*, tornando o processo de produção mais acessível. Assim, tendo em vista a vantagem supracitada e a alta especificidade esperada para as proteínas desenvolvidas, o uso delas em substituição ao diagnóstico sorológico atualmente empregado, pode ser efetivado através da detecção da proteína E e de partículas do ZIKV em amostras de soro de indivíduos infectados ou ainda, através de imunoenaios enzimáticos competitivos para detecção de anticorpos (BOSCH et al., 2017). Adicionalmente a isso, além do processo de produção laborioso, uma desvantagem da utilização terapêutica dos mAbs já descritos é que eles podem desencadear a amplificação da infecção dependente de anticorpos (ADA), agravando as manifestações clínicas associadas à infecção por ZIKV e impossibilitando seu uso na clínica (BARDINA et al., 2017; ROGERS et al., 2017). Uma vez que as proteínas

sintéticas desenvolvidas não possuem a extremidade Fc presente nos anticorpos - região que se liga aos receptores Fc das células e facilitam a internalização da partícula viral (BARDINA et al., 2017) -, elas não desencadeiam o fenômeno de ADA e, portanto, aparecem como uma alternativa segura ao uso dos mAbs na terapia anti-Zika.

4 PERGUNTA CONDUTORA

As proteínas sintéticas VLL-V2, VLL-V3 e VLL-V4 carreando parátomos direcionados ao domínio III da proteína do envelope do ZIKV são capazes de se ligar ao seu alvo com alta afinidade e de neutralizar a infecção viral *in vitro*?

5 HIPÓTESE

As proteínas sintéticas VLL-V2, VLL-V3 e VLL-V4 carreando parátomos direcionados ao domínio III da proteína do envelope do ZIKV são capazes de se ligar ao seu alvo com alta afinidade e de neutralizar a infecção viral *in vitro*.

6 OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GERAL

Produzir e avaliar as proteínas sintéticas VLL-V2, VLL-V3 e VLL-V4 carreando parátomos direcionados ao domínio III da proteína do envelope do ZIKV quanto à capacidade de se ligar ao seu alvo com alta afinidade, assim como de neutralizar a infecção viral *in vitro*.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir as proteínas sintéticas VLL-V2, VLL-V3 e VLL-V4;
- Determinar as constantes de dissociação (K_D) entre cada uma das proteínas sintéticas e a proteína E-ZIKV;
- Avaliar o potencial das proteínas sintéticas que apresentarem as maiores afinidades pela proteína E-ZIKV em neutralizar a infecção *in vitro* pelo ZIKV;

7 MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 PLASMÍDEO DE EXPRESSÃO

As sequências referentes às proteínas computacionalmente engenheiradas foram desenhadas fusionadas a uma sequência cauda de 6 histidinas (6XHIS-Tag) na extremidade C-terminal, para posterior purificação por cromatografia de afinidade. As sequências foram previamente otimizadas para expressão *in vitro* em *E. coli* e foram conduzidas para síntese comercial (GenScript®). O vetor utilizado para construção dos plasmídeos de expressão foi o pET-14b, que carrega um gene de resistência à ampicilina e possui um promotor T7, ou seja, utiliza a RNA polimerase do fago T7 para sua transcrição. O processo de desenho e edição plasmidial *in silico* foi realizado pela Dr^a. Isabelle Viana através do *software A plasmidEditor (ApE®)*. Posteriormente, informações a respeito das características físico-químicas, tais como peso molecular e coeficiente de extinção molar das proteínas foram previstas a partir da análise das sequências primárias por meio da ferramenta de análise “ProtParam” disponibilizado no servidor ExPASy (disponível em: <https://web.expasy.org/protparam/>).

7.2 EXPANSÃO DO DNA PLASMIDIAL (pDNA)

As construções plasmidiais comerciais foram recebidas solubilizadas em papel filtro, contendo aproximadamente 4 µg de cada pDNA. Inicialmente, os plasmídeos foram diluídos em 200 µL de água livre de RNase para uso na etapa posterior. Em seguida, 20 µL de células competentes de *E. coli* DH5α (MAX Efficiency™ DH5α Competent Cells, Invitrogen™) foram transformadas com 0,2 µg de cada um dos pDNAs contendo as sequências codificantes para as três proteínas engenheiradas computacionalmente. As transformações foram realizadas por choque térmico através de incubação em gelo por 30 minutos (min), seguida por incubação a 42 °C por 2 min e novamente em gelo/ 2 min. Após a transformação, foram adicionados 500 µL de meio S.O.C (Invitrogen™) (2% de triptona; 0,5% de extrato de levedura; 10 mM de NaCl; 2,5 mM de KCl; 10 mM de MgCl₂; 10 mM de MgSO₄ e 20 mM de glicose) ao tubo contendo as bactérias, que foram ,então, incubadas por 1h à 37 °C e 225 rpm. Após incubação, o conteúdo foi centrifugado (5000 x g; 5 min; 23 °C) e o sedimento inoculado em placa de cultura contendo meio Ágar Luria Bertani (ágar LB),

suplementado com 50 µg/mL de ampicilina (Cayman Chemical™) para crescimento das colônias a 37 °C por 16h.

7.3 PREPARAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL EM MÉDIA ESCALA (MidiPrep)

Uma única colônia de bactérias DH5α contendo o plasmídeo de interesse foi inoculada em 100 mL de meio líquido Luria Bertani (LB) (Invitrogen™) suplementado com 50 µg/mL de ampicilina (Cayman Chemical™) e incubadas à 37 °C, 225 rpm por 16h. A extração e purificação do DNA plasmidial foram realizadas utilizando kit comercial (*QIAGEN Plasmid Midi Kit*, QIAgen®) segundo as instruções disponibilizadas no protocolo do fabricante.

7.4 ELETROFORESE DO DNA PLASMIDIAL

Para avaliar o sucesso da expansão e purificação plasmidial, assim como a integridade das moléculas de pDNA, os plasmídeos foram submetidos à corrida eletroforética em gel de 1% de agarose, sob uma diferença de potencial (ddp) elétrico fixa. O gel de eletroforese foi produzido a partir da adição de 1g de agarose à 100 mL de tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE 1X), então, com a finalidade de dissolver o conteúdo de agarose, a solução foi aquecida. Antes do resfriamento total e consequente solidificação do gel, foram adicionados 10 µL do corante fluorescente de DNA GelRed (Sigma-Aldrich™). As amostras de DNA e o marcador de peso molecular (MPM) 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™) foram diluídos em tampão de corrida eletroforética de DNA BlueJuice® (Invitrogen™) da seguinte forma: 8 µL de amostra ou MPM foram diluídos em 2 µL de tampão. As amostras e o marcador diluídos foram adicionados ao gel solidificado. Em seguida, foi dado início à corrida eletroforética a partir da aplicação de uma ddp constante de 100 V, permitindo a migração das moléculas de DNA na matriz do gel. A migração dos DNA plasmidiais na matriz de agarose pôde ser observada a partir de marcações resultantes (bandas) no gel após a finalização da corrida, através do fotodocumentador ImageQuant LAS 500 com filtro SYBR®/GelStar®.

7.5 EXPRESSÃO PROTEICA

Para a expressão *in vitro* de cada uma das proteínas sintéticas, 20 µL de células competentes de *E. coli* BL21(DE3) pLysS One Shot® (Invitrogen™) foram transformadas com 1 µg de cada plasmídeo de expressão referentes às proteínas VLL-V2, VLL-V3 e VLL-V4. As transformações e o plaqueamento das bactérias transformadas foram realizados conforme já descrito no tópico 7.2 deste trabalho. Após crescimento em placa, uma colônia única da cepa transformada foi inoculada em 50 mL de meio LB líquido (Invitrogen™) suplementado com 50 µg/mL de ampicilina (Cayman Chemical™) e conduzida para crescimento por 16h à 37 °C e 225 rpm. No dia seguinte da expressão, foi retirado o volume necessário do pré-inóculo a fim de expandir o crescimento celular para 1 litro de meio LB suplementado com ampicilina (50 µg/mL) apresentando uma densidade óptica inicial, no comprimento de onda de 600 nm (DO_{600nm}), de 0,15. A cultura permaneceu em crescimento (37 °C; 225 rpm) até atingir uma OD_{600nm} entre 0,5 e 0,8, então, foi adicionado isopropiltiogalactosídeo (IPTG) a uma concentração final de 1 mM, assim, a cultura foi conduzida para crescimento por 16h à 22 °C e 225 rpm.

7.6 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

As culturas de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS expressando cada uma das proteínas sintéticas foram centrifugadas (7.000 x g; 30 min; 4°C) e após descarte do sobrenadante, cada sedimento bacteriano foi ressuspensionado com 50 mL de tampão de ligação (50 mM de Tris-HCl, 300 mM de NaCl, 20 mM de Imidazol, pH: 8.0), acrescido de inibidor de protease (Roche®) na concentração final de 1X.

A suspensão bacteriana resultante foi submetida à sonicação (6 pulsos de 30 segundos e amplitude de 40%, com intervalo de 60 segundos entre pulsos) e centrifugação (10.000 x g; 30 min; 4 °C). O sobrenadante resultante da centrifugação foi purificado utilizando o cromatógrafo ÄKTA™ Pure 25M (Cytiva®) por cromatografia de afinidade em coluna de íons metálicos imobilizados (HisTrap™ HP), especificamente, resina de íons de níquel (Ni^{2+}) funcionalizada, que são capazes de se ligar com alta afinidade ao grupamento imidazol presente na cadeia lateral do aminoácido histidina. A eluição das proteínas foi realizada por gradiente de concentração de imidazol.

7.7 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS

As eletroforeses foram realizadas em gel de 17,5% acrilamida (SIGMA®). As amostras proteicas foram diluídas (1:1) no tampão de corrida para proteínas Laemmli 2X (400 mM Glicina, 50mM Tris e 3,5mM SDS) e, em seguida, aquecidas à 95 °C por 5 min. Foram aplicados 10 µL de cada amostra diluída por poço do gel e, para controle da corrida, foram utilizados 10 µL do marcador de peso molecular BenchMark™ Protein Ladder para as corridas eletroforéticas. As proteínas migraram no gel submetidas à uma corrente elétrica constante de 40 mA. Ao final da corrida, o gel foi imerso em solução corante azul de coomassie (10% de ácido acético, 45% de metanol, 0,5% de azul de coomassie) e após coloração, para posterior visualização das bandas, foi descorado com solução composta por ácido acético glacial 7%, metanol 25% e água 68%. As imagens do gel foram capturadas através do fotodocumentador ImageQuant LAS 500 chemiluminescence CCD câmera.

7.8 CONCENTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO PROTEICA

As frações eluídas foram concentradas mediante centrifugação (3.260 x g; 20 min; 23 °C) em tubos com filtro de 3 kDa (Amicon® Ultra centrifugal filter), até que foram obtidos volumes de aproximadamente 1 mL das amostras já concentradas. As proteínas foram quantificadas por meio de espectrofotometria à 280 nm com uso do equipamento Nanodrop™ OneC, de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, os valores de concentração foram ajustados a partir dos coeficientes de extinção molar de cada uma das proteínas com uso da fórmula: $A = \epsilon \cdot C \cdot l$, onde, “A” é o valor obtido da absorbância à 280 nm, “ ϵ ” trata-se do coeficiente de extinção molar da proteína, “C” representa a concentração da proteína (em unidade molar) e “l” é o caminho óptico percorrido em centímetros.

7.9 MST PARA AVALIAÇÃO DAS CONSTANTES DE DISSOCIAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS SINTÉTICAS E A PROTEÍNA E

Para os ensaios de MST, foi feita uma curva de diluição com dezesseis pontos para cada proteína. No primeiro ponto da diluição, foram utilizados 20 µL de cada

proteína purificada na concentração máxima obtida¹, subsequentemente, uma diluição seriada de ordem 2 em tampão PBS acrescido de 0,05% Tween-20 foi executada para os demais pontos. Foram adicionados em cada ponto da diluição 10 µL (100 nM) da proteína E-ZIKV, previamente marcada por meio do kit de marcação RED fluorescent dye NT-647-NHS (NanoTemper Technologies®). Os tubos contendo a diluição foram incubados protegidos da luz por 30 min à temperatura ambiente (T.A.) e, posteriormente, foi iniciado o ensaio de MST. As amostras foram transferidas para os capilares padrão do ensaio (*Standard Treated Capillary K002*) e a leitura foi realizada pelo equipamento NanoTemper Monolith NT.115. Os ensaios foram executados na temperatura aproximada de 20 °C com a configuração da potência de excitação do LED vermelho em 40% e a potência do MST na configuração média. Os experimentos foram realizados em triplicata, com construção de três curvas de diluição e leituras independentes, para cada uma das proteínas analisadas.

7.10 PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS PAN-FLAVIVÍRUS 4G2 (mAb 4G2)

Com a finalidade de produzir anticorpos pan-flavivírus 4G2 para uso nos experimentos de microneutralização viral, células de hibridoma da linhagem D1-4G2-4-15 (ATCC HB-112) foram cultivadas em meio Hybridoma-SFM complete DPM (GIBCO®) suplementado com 1% de Penicilina/Estreptomicina (GIBCO®) e 0,1% de Anfotericina B (GIBCO®). O cultivo do hibridoma foi realizado em frascos para cultura celular T-75 e T-175 (CELLSTAR®). Ao final do cultivo celular, as células foram centrifugadas (130 x g; 7 min; T.A.), os sobrenadantes contendo os anticorpos foram coletados e, posteriormente, purificados.

Os sobrenadantes contendo os mAbs 4G2 foram diluídos (1:2) em tampão de ligação (0.15 M NaCl, 20mM Na₂HPO₄, pH 7.0) e purificados por cromatografia de afinidade manual utilizando resina de agarose com proteína A/G imobilizada (ThermoScientific®). Os mAbs 4G2 foram eluídos da coluna a partir da adição do tampão de eluição (0.1 M Glicina, pH 3.0) e coletados em tubos contendo 100 µL de tampão de neutralização (Tris-HCl, 1M pH 8.5) para cada 1 mL de fração eluída. Após purificação, todas as frações eluídas foram quantificadas por espectrofotometria no

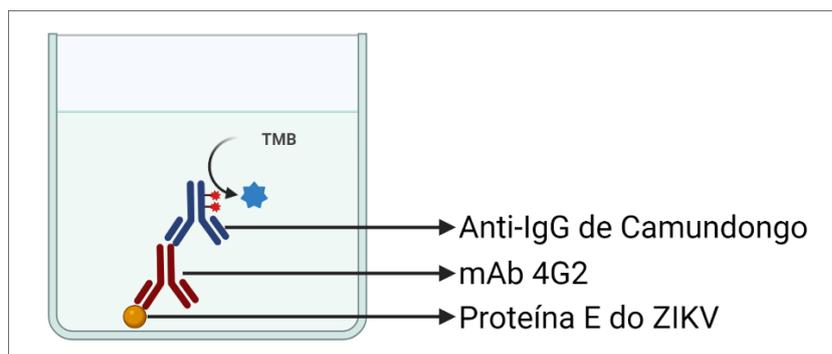
¹ VLL-V2: 237,45 µM; VLL-V3: 198,6 µM; VLL-V4: 141,4 µM.

comprimento de onda de 280 nm com uso do espectrofotômetro NanoDrop™ OneC (ThermoScientific™) e, posteriormente, armazenadas à - 20 °C para uso.

7.11 ELISA PARA DETECÇÃO DO mAb 4G2

Para confirmar a presença de anticorpos 4G2 nas frações eluídas, foi realizado um ELISA indireto. Inicialmente, um micograma/mililitro (1 µg/mL) da proteína E comercial do ZIKV (cepa: Suriname) (ZIKVSU-ENV, NativeAntigen®) diluída em tampão Carbonato/Bicarbonato (0,2 M; pH 9,4) foi fixada em placa de ELISA de 96 poços (Costar® Assay Plate, CORNING) e incubada em câmara úmida à 4 °C por 16h. Após período de incubação, foram adicionados 150µL/poço de tampão de bloqueio (5% Blotting-Grade Blocker, BIO-RAD em 1X PBS, 0,1% Tween-20) e a placa foi incubada por 1h/ T.A. Para dar início ao ensaio, foi utilizado 1 µg/mL de diferentes frações eluídas nas purificações dos anticorpos 4G2 produzidos *in house* no volume final de 50 µL/ poço. A placa foi incubada por 2h/T.A. Posteriormente, o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (SIGMA®) foi diluído em tampão de bloqueio (1:2.500) e utilizado como anticorpo secundário no volume final de 50µL/poço (Figura 7). Após incubação por 1h/ T.A., foram adicionados 50 µL/poço de tetrametilbenzidina (KPL, TMB Sera care®) e, após 30 min, houve a adição de 50 µL/poço de HCl 1N para inativação enzimática. Como controle positivo da reação, foi utilizado 1 µg/mL do mAb 4G2 comercial (NativeAntigen®) no volume final de 50 µL/ para estabelecer ligação com a proteína E fixada na placa. Como controle negativo da reação, os poços sensibilizados com a proteína E do ZIKV não receberam adição do mAb 4G2, sendo adicionado, portanto, apenas 50 µL/ poço do tampão de bloqueio. Como anticorpo secundário em ambos os controles também foi utilizado o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (SIGMA®) diluído em tampão de bloqueio (1:2.500). Cada poço da placa foi realizado em triplicata e a leitura da absorbância foi feita por espectrofotometria à 450 nm.

Figura 7 - Desenho esquemático do ELISA para detecção do 4G2



Nota: mAb: Anticorpo monoclonal; TMB: Tetrametilbenzidina; ZIKV: Zika vírus. **Fonte:** A autora. Criado em *BioRender.com*

7.12 CULTIVO DE CÉLULAS VERO

As células Vero foram cultivadas em meio “*Dulbecco’s Modified Eagle Medium*” (DMEM) (SIGMA®), suplementado com 10% de SFB (GIBCO®), 1% de penicilina/estreptomicina (GIBCO®) e 0,1% de Anfotericina B (GIBCO®). As células foram mantidas em frascos para cultura celular (CELLSTAR®) e acondicionadas em estufa, constantemente sob a temperatura de 37 °C e concentração de CO₂ em 5%.

7.13 ENSAIOS DE MICRONEUTRALIZAÇÃO

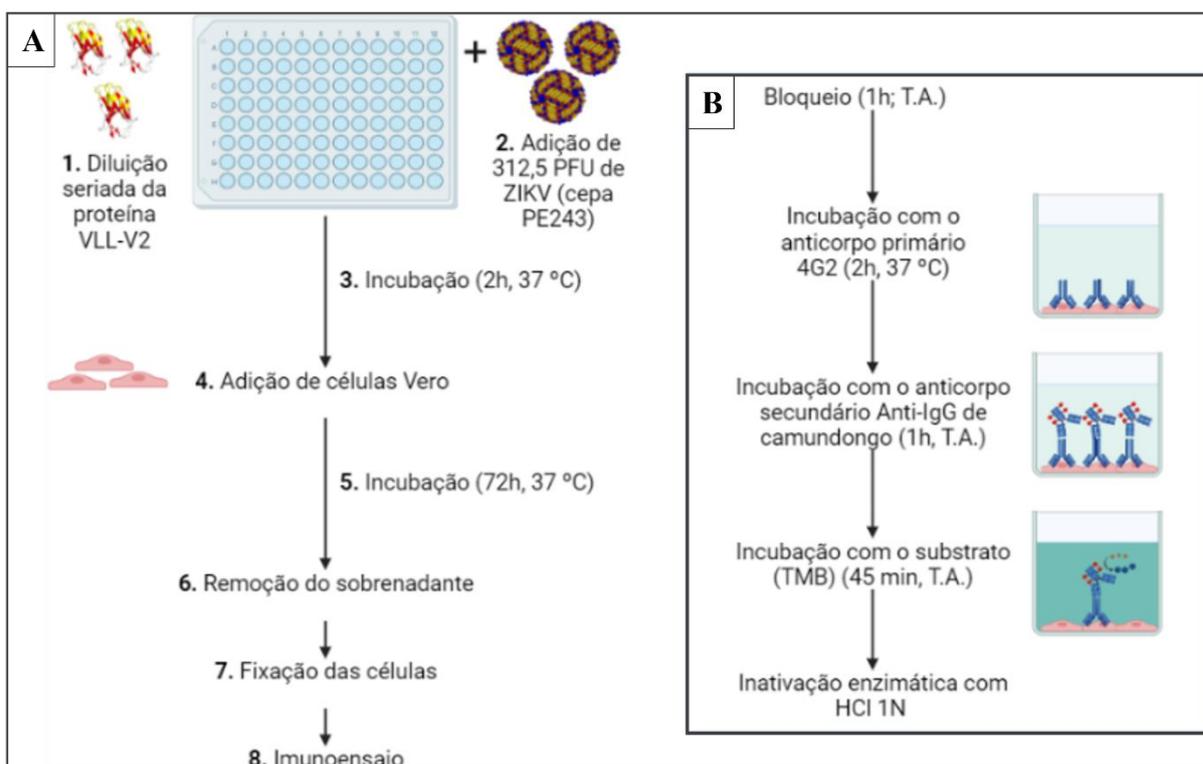
Tendo em vista que nos ensaios de MST a proteína sintética VLL-V2 apresentou a maior afinidade de ligação pela proteína E-ZIKV, indicando um maior potencial de neutralização viral, optou-se por realizar a microneutralização viral em placa apenas com essa proteína.

Em uma placa de cultura de 96 poços, foi realizada uma curva de diluição com 24 pontos da proteína VLL-V2. No primeiro ponto, referente à maior concentração da curva, foram utilizados 50 µL da proteína não diluída (237,45 µM), então, para os demais pontos, foi aplicada uma diluição seriada de ordem 2, utilizando o meio de cultura DMEM como solução de diluição. Cada ponto da curva foi realizado em triplicata. A posteriori, foram adicionados 50 µL por poço do vírus Zika pertencente à linhagem asiática (cepa PE243) na concentração de 312,5 PFU/poço, então, com o objetivo de permitir a ligação entre as proteínas sintéticas e as partículas virais, a placa foi incubada à 37 °C por 2h. Após incubação, foram adicionados 100 µL de meio DMEM contendo 80.000 células Vero em suspensão em cada poço. Assim, a placa

foi incubada à 37 °C durante 72h (Figura 8A) com a finalidade de, ao final do período de incubação, verificar a ocorrência ou ausência de infecção por ZIKV nas células Vero. Como controle positivo da placa foram utilizadas as mesmas concentrações de vírus e células e, como controle negativo, foram adicionadas somente as células Vero em meio DMEM. Adicionalmente à placa teste, uma placa controle contendo apenas a diluição proteica e as células Vero foi feita com a finalidade de verificar uma eventual ocorrência de reações inespecíficas entre anticorpos utilizados no ensaio e a proteína, assim como para observar a citotoxicidade.

Para leitura das placas, as células foram fixadas com 200 µL/poço de acetona 80% por 1h para realização do imunoenensaio enzimático. Logo, as reações inespecíficas foram bloqueadas com adição de 300 µL/poço de solução de bloqueio (5% Blotting-Grade Blocker, BIO-RAD), seguido por incubação das placas por 1h/ T.A. Após a etapa de bloqueio, foram adicionados 0,682 µg/µL do anticorpo primário pan-flavivírus 4G2 (produzidos *in house* a partir do cultivo do hibridoma D1-4G2-4-15 (ATCC HB-112)) em cada poço e, assim, as placas foram conduzidas para incubação à 37 °C durante 2h. Como anticorpo secundário, foram utilizados 100 µL/poço do anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (SIGMA®) diluído (1:2.500) em tampão de bloqueio, seguido de incubação por 1h. A leitura da absorbância foi feita através de espectrofotometria à 450 nm após a revelação com 100 µL/poço de TMB (Sera care®) e inativação enzimática com adição de 100 µL/poço de HCl 1N (Figura 8A e B).

Figura 8 - Procedimento realizado para o ensaio de microneutralização em placa



Nota: (A): Visão geral do ensaio de microneutralização do ZIKV em placa realizado com a proteína VLL-V2. (B): Detalhamento do imunoensaio enzimático realizado (etapa 8 da figura). PFU: *Plaque-forming unit* – unidade formadora de placa. T.A.: Temperatura ambiente. TMB: Tetrametilbenzidina. Fonte: A autora. Criado em *BioRender.com*

7.14 ANÁLISE DE DADOS

As constantes de dissociação foram calculadas através da lei de ação das massas utilizando software NanoTemper MO. Affinity Analysis v2.3 nos tempos de 1,5 segundos, 15 segundos e 10 segundos para o VLL-V2, VLL-V3 e VLL-V4, respectivamente. Para visualização dos dados em gráficos, todos os dados experimentais brutos obtidos no software de análise foram submetidos à regressão não-linear e plotados em gráficos utilizando o GraphPad Prism 7.

A partir dos dados obtidos nos ensaios de microneutralização em placa, foi determinada a concentração de eficiência (EC_{50}) do VLL-V2. Logo, a EC_{50} do VLL-V2 foi determinada a partir da regressão não linear das porcentagens de neutralização da infecção viral referentes a cada uma das concentrações testadas. As porcentagens de neutralização, por sua vez, foram determinadas a partir da leitura da absorbância das placas no comprimento de onda de 450 nm. Para isso, a média do controle

positivo de cada placa foi utilizada como medida da infecção máxima possível na placa correspondente.

8 RESULTADOS

8.1 EXPANSÃO DO DNA PLASMIDIAL EM *E. coli* DH5 α

Os Comprimentos totais, em pares de bases, dos plasmídeos de expressão após inserção dos genes codificantes de cada uma das proteínas no vetor pET-14b foram de aproximadamente 5.000 pares de bases (pb). Após a análise das sequências primárias de cada uma das proteínas, foram obtidos os pesos moleculares de 12,96 kDa, 12,93 kDa e 12,74 kDa para as proteínas VLL-V2, VLL-V3 e VLL-V4 respectivamente (Quadro 1).

Quadro 1 - Comprimentos dos plasmídeos de expressão e pesos moleculares previstos para as proteínas sintéticas

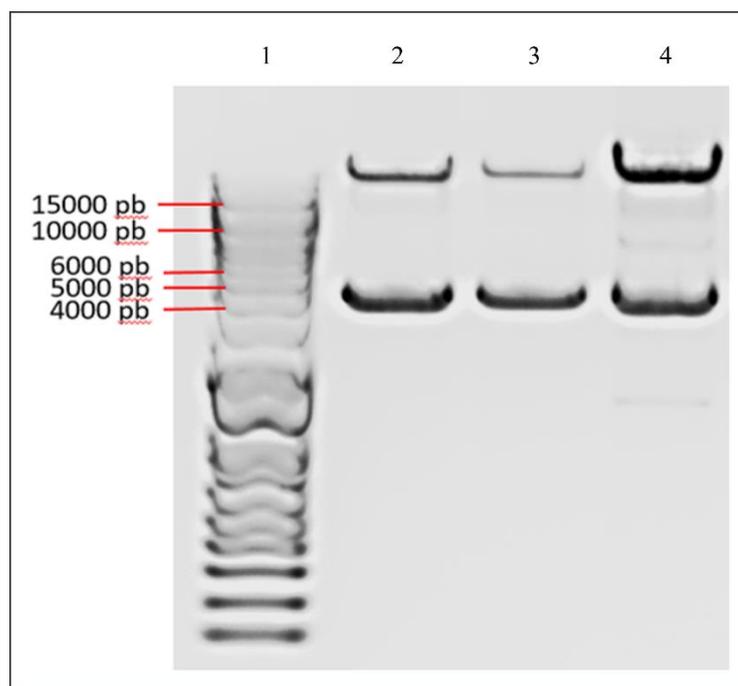
Proteína	Comprimento do pDNA em pares de bases (pb)	Peso molecular da proteína (kDa)
pET-14b + VLL-V2	4.962 pb	12,96 kDa
pET-14b + VLL-V3	4.962 pb	12,93 kDa
pET-14b + VLL-V4	4.962 pb	12,74 kDa

Fonte: A autora.

8.2 ELETROFORESE DO pDNA

Após a corrida eletroforética com as amostras dos pDNAs, foram observadas bandas correspondentes aos tamanhos esperados para os plasmídeos (aproximadamente 5.000 pares de bases). Para cada plasmídeo foram observadas duas bandas no gel, indicando que as moléculas de DNA presentes nas amostras encontram-se em diferentes estados de compactação. Além disso, entre as duas bandas supracitadas, para cada plasmídeo podem ser observados rastros da corrida eletroforética na matriz do gel (Figura 9).

Figura 9 - Gel de 1% de agarose contendo as bandas referentes aos plasmídeos de expressão das proteínas sintéticas em estudo.

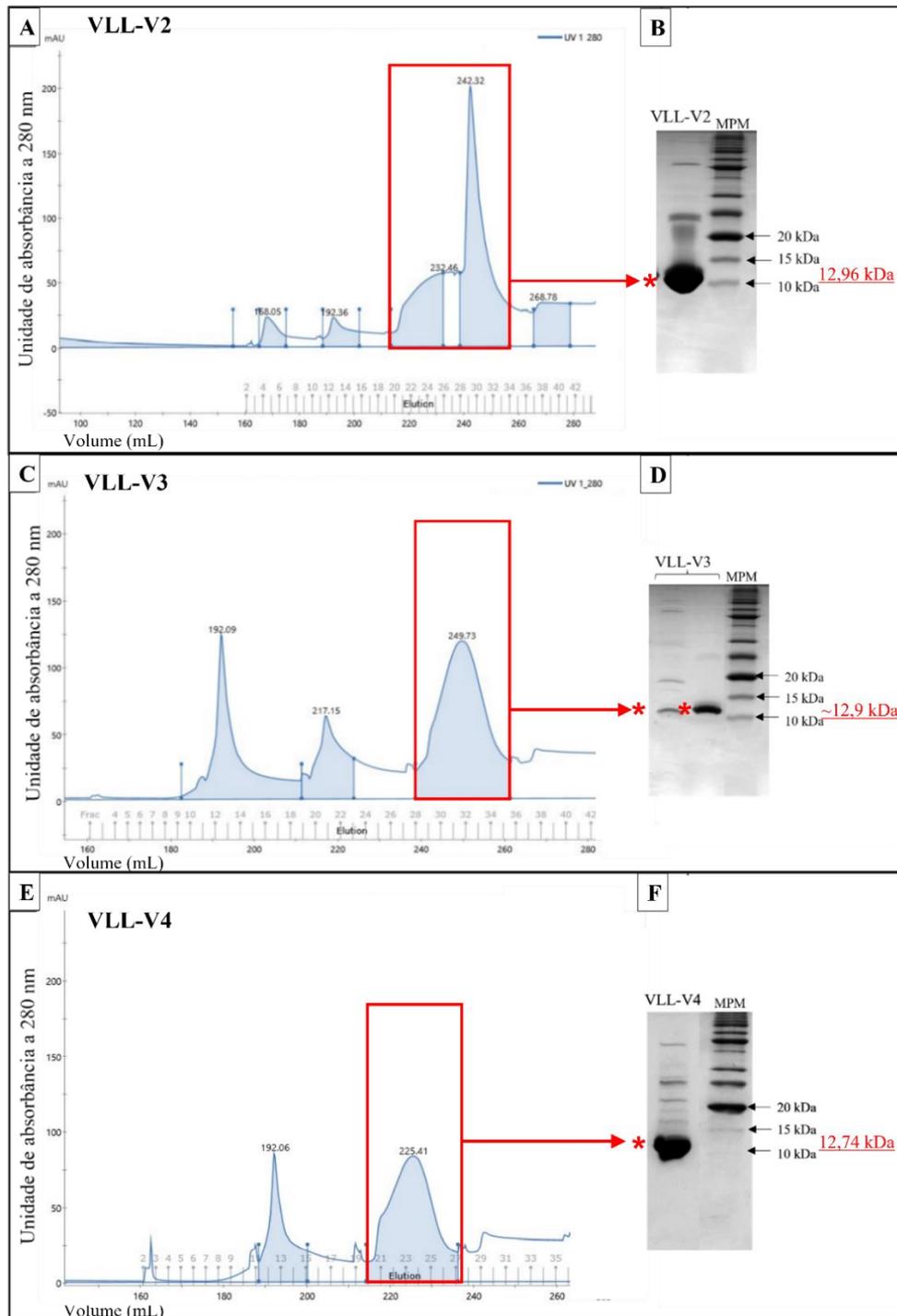


Nota: 1: Marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™); 2: pET-14b + VLL-V2; 3: pET-14b + VLL-V3; 4: pET-14b + VLL-V4. Para todos os plasmídeos avaliados, há a presença de uma banda entre 4.000 e 5.000 pb, assim como uma banda acima de 15.000 pb, possivelmente devido à presença de diferentes estados de enovelamento do DNA plasmidial. pb: Pares de bases. **Fonte:** A autora. Imagem capturada em fotodocumentador ImageQuant LAS 500 chemiluminescence CCD câmera.

8.3 RENDIMENTO DA EXPRESSÃO PROTEICA EM *E. coli* BL21

Após as purificações proteicas realizadas por cromatografia de afinidade, os cromatogramas resultantes foram caracterizados por picos. Para cada fração eluída em que houve aumento da absorbância, indicando a presença de proteínas em solução, foram realizadas eletroforeses de proteínas a fim de verificar os pesos moleculares correspondentes às proteínas e a eficácia da purificação. A partir da observação dos pesos moleculares encontrados, demonstramos que a proteína VLL-V2 foi purificada no pico referente às frações eluídas 21 a 33 (Fig. 10A), a VLL-V3 foi eluída nas frações 28 a 35 (Fig. 10C) e a VLL-V4 nas frações 21 a 25 (Fig. 10E).

Figura 10 - Cromatogramas e géis de eletroforese referentes às purificações das proteínas sintéticas produzidas



Nota: (A, C e E) As regiões sombreadas dos cromatogramas representam os picos de absorvância detectados à 280 nm. Os picos em que as proteínas de interesse foram eluídas estão destacados em retângulos vermelhos. (B, D e F) Géis de eletroforese (SDS-PAGE). Asterisco em vermelho: Bandas referentes às proteínas sintéticas purificadas (entre 10 kDa e 15 kDa). Os pesos moleculares esperados para cada proteína sintética encontram-se em fonte vermelha sublinhada. Fonte: A autora.

Como mencionado anteriormente, para todas as cromatografias executadas neste trabalho, a etapa de eluição foi realizada por gradiente de concentração de imidazol.

Tendo em vista que aminoácidos positivamente carregados são capazes de estabelecer ligações com a coluna cromatográfica utilizada, outras proteínas - além das proteínas sintéticas - que sejam produzidas pelas células bacterianas podem também se associar à coluna, porém essa associação é mais fraca quando comparada à associação entre as proteínas sintéticas e a coluna, uma vez que essas possuem uma sequência de seis histidinas *in tandem*. Portanto, no início do processo da eluição, quando as concentrações de imidazol são mais baixas, as proteínas fracamente ligadas à coluna cromatográfica são eluídas. Em seguida, conforme a concentração do imidazol aumenta durante o processo de eluição, as proteínas mais fortemente ligadas à coluna cromatográfica se desassociam e são, por fim, eluídas. Esse fenômeno pode ser visualizado nos cromatogramas das proteínas VLL-V2, VLL-V3 e VLL-V4, nos quais os últimos picos de absorvância (destacados em retângulos vermelhos) correspondem às proteínas-alvo marcadas com a cauda de seis histidinas, sinalizando que a eluição ocorreu em maiores concentrações de imidazol. Enquanto isso, os demais picos de absorvância que podem ser visualizados nos cromatogramas não apresentaram, quando submetidos à eletroforese em gel, os pesos moleculares esperados para as proteínas em desenvolvimento, indicando que representam outras proteínas em suspensão.

A eletroforese em gel de acrilamida foi realizada para avaliar se os pesos moleculares aproximados das proteínas produzidas e purificadas eram condizentes com os pesos previstos. Para todos os géis apresentados, é possível observar bandas de proteínas com peso molecular entre 10 e 15 kDa, correspondendo aos pesos esperados para as proteínas estudadas, demonstrando, portanto, sucesso na expressão e purificação proteica (Figura 10 B, D e F). As proteínas foram, então, concentradas para uso nos ensaios de MST e de microneutralização viral realizados posteriormente. Vale ressaltar que os resultados apresentados da corrida eletroforética para o VLL-V2 e VLL-V4 (Figura 10 B e F) são referentes às proteínas já concentradas, no entanto, para o VLL-V3 (Figura 10 D), os resultados mostrados correspondem a alíquotas das frações não concentradas.

Após a concentração e quantificação das frações eluídas contendo as proteínas de interesse, os rendimentos obtidos foram de 3,07 gramas de proteína por litro (g/ L) de cultura de *E. coli* (237,45 μ M) para a proteína VLL-V2; 2,6 g/ L (198,6 μ M) para VLL-V3 e 1,8 g/ L (141,4 μ M) para VLL-V4 (Tabela 1). Portanto, o maior rendimento de expressão observado foi na síntese da proteína VLL-V2.

Tabela 1 - Rendimento da expressão proteica

Proteína	Frações concentradas	Rendimento (gramas/ Litro)
VLL-V2	21 - 33	3,07 g/ L
VLL-V3	28 - 35	2,6 g/ L
VLL-V4	21 - 25	1,8 g/ L

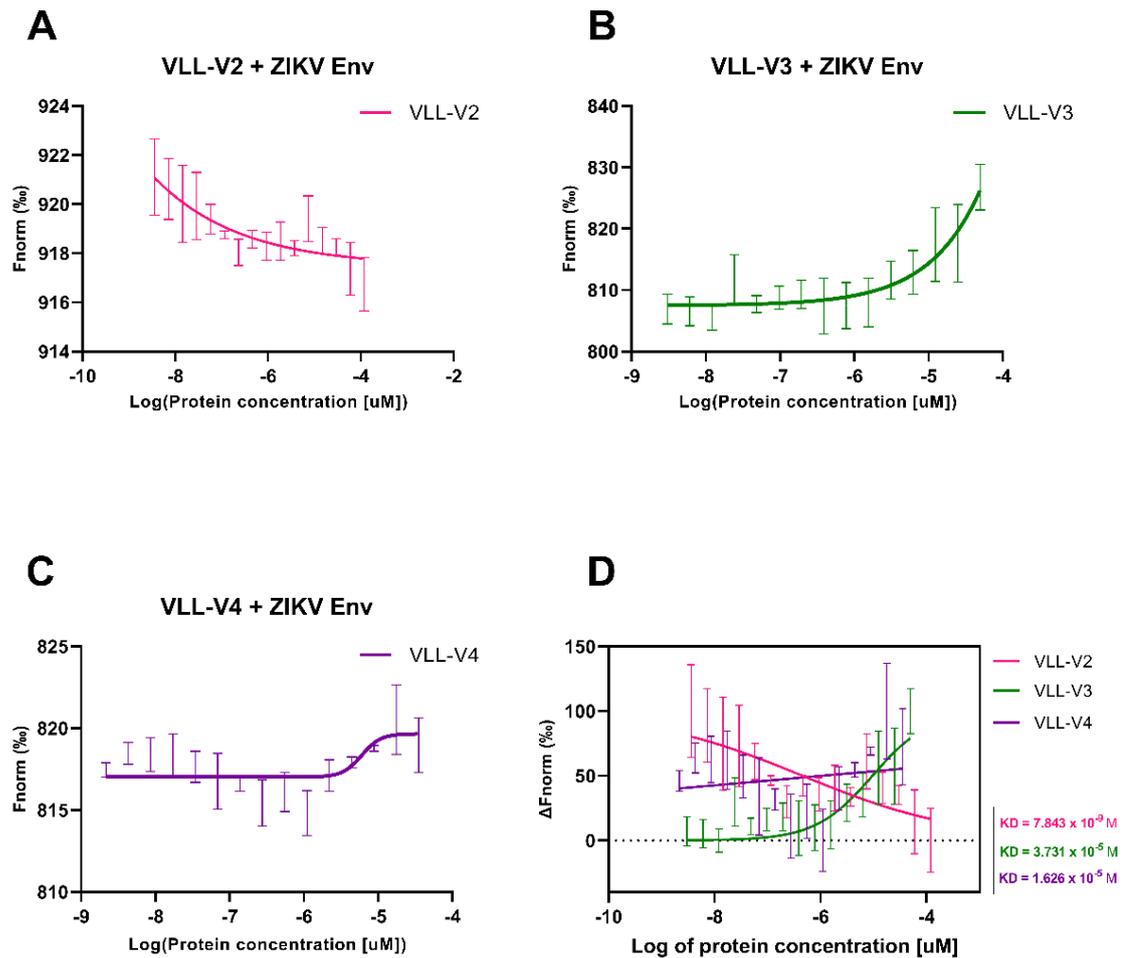
Nota: As frações eluídas da cromatografia que foram utilizadas para concentrar as proteínas são mostradas na segunda coluna. Dentre as concentrações obtidas, o maior rendimento foi relacionado à proteína VLL-V2 com produção de 3,07 gramas de proteína por litro de cultura de *E.coli*. Fonte: A autora.

8.4 CONSTANTES DE DISSOCIAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS SINTÉTICAS E A PROTEÍNA E-ZIKV

Como previsto na hipótese deste trabalho, as proteínas sintéticas desenvolvidas foram capazes de estabelecer ligação com a proteína E do ZIKV. Após análise, foi demonstrado que a constante de dissociação entre a proteína E-ZIKV e as proteínas desenvolvidas foram de $7,8 \times 10^{-9}$ M para a VLL-V2, de $3,7 \times 10^{-5}$ M para a VLL-V3 e por fim, para a VLL-V4 foi de $1,6 \times 10^{-5}$ M. (Figura 11 e Tabela 2). Dentre esses resultados, a proteína VLL-V2 se destaca, pois atingiu uma constante de dissociação de 7,8 nM, enquanto as outras moléculas apresentaram constantes com valores em micromolar. As concentrações finais das proteínas nos pontos analisados foram de: 118,7 μ M a $3,62 \times 10^{-3}$ μ M para o VLL-V2; 49,7 μ M a 3×10^{-3} μ M para o VLL-V3 e 35,4 μ M a $2,16 \times 10^{-3}$ μ M para o VLL-V4.

A partir dos resultados obtidos na MST, optou-se por dar seguimento aos experimentos somente com a proteína VLL-V2, pois, dentre as proteínas testadas, ela apresentou a maior afinidade de ligação à proteína E do ZIKV, sendo, portanto, um indicativo de maior capacidade de neutralização viral.

Figura 11 - Perfis termoforéticos das interações VLL+ZIKV-E



Nota: (A, B, C) Curvas termoforéticas referentes à interação entre VLLs e a proteína do E do ZIKV marcada com fluorescência (D) As três curvas de A, B e C, normalizadas e plotadas em uma só representação gráfica. Fnorm: Representa a fluorescência normalizada, que é calculada a partir da razão entre as fluorescências nos momentos experimentais finais e iniciais de cada ponto. ΔF_{norm} : Indica a variação da fluorescência normalizada para cada proteína testada. Log(Protein concentration [μM]): Log das concentrações em micromolar das proteínas sintéticas em cada ponto da diluição. Os segmentos verticais no decorrer do gráfico indicam os desvios padrão entre as três réplicas experimentais. Fonte: A autora. Figuras produzidas a partir do GraphPad Prism v7.

Tabela 2 - Dados experimentais obtidos por MST

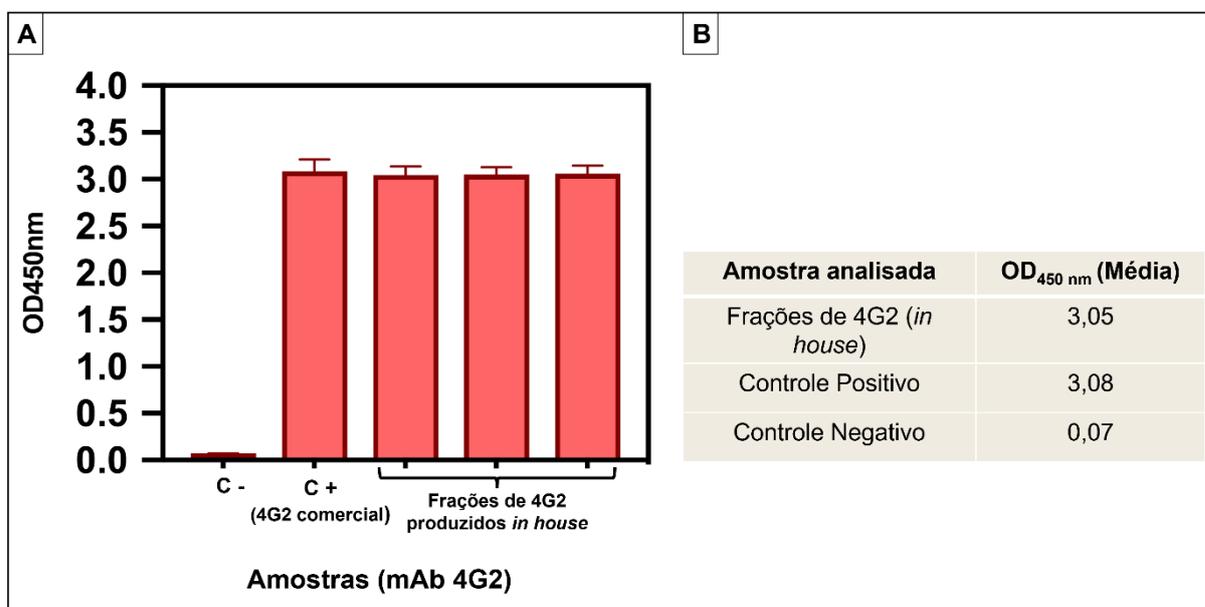
Dados mensurados na MST	VLL-V2 + ZIKV-E	VLL-V3 + ZIKV-E	VLL-V4 + ZIKV-E
Concentração da Proteína E marcada com fluorescência	100 nM	100 nM	100 nM
Faixa de concentração do ligante	119 μ M – 3,6E-3 μ M	49,7 μ M – 3E-3 μ M	35,4 μ M – 2,16E-3 μ M
K_D	7,8E-09 (\pm 1,6E-08) M	3,7E-05 (\pm 2,3E-05) M	1,6E-05 (\pm 3,6E-05) M
Desvio padrão da regressão	0,6 ΔF_{norm} (‰)	1,9 ΔF_{norm} (‰)	1,3 ΔF_{norm} (‰)
χ^2	0,5	0,3	1,6
Relação sinal-ruído	4,4	18	3,5

Fonte: A autora.

8.5 PRODUÇÃO DO mAb 4G2 A PARTIR DO CULTIVO DE HIBRIDOMA

Os mAbs 4G2 são anticorpos que se ligam ao *loop* de fusão da proteína E, região conservada entre flavivírus, logo, reconhecem as partículas virais desses vírus, sendo, portanto, anticorpos pan-flavivírus. Por essa razão, os mAbs 4G2 são essenciais para os ensaios de microneutralização viral em placa realizados neste e nos demais trabalhos do nosso grupo de pesquisa e, por esse motivo, foram produzidos *in house*. Após a purificação desses mAbs e a realização do ELISA para confirmação da capacidade de ligação à proteína E, foi observado que os anticorpos produzidos *in house* apresentaram a OD_{450nm} média semelhante à do controle positivo, indicando que os anticorpos produzidos se ligam à proteína E do ZIKV com afinidade semelhante à dos anticorpos comerciais. Portanto, pode-se concluir que houve sucesso na expressão laboratorial desses anticorpos. Após quantificação das frações eluídas, a fração com maior concentração do mAb 4G2 (0,682 μ g/ μ L) foi selecionada para utilização nos experimentos de microneutralização em placa, enquanto as frações restantes foram armazenadas à -20 °C.

Figura 12 - Resultados obtidos no ELISA para detecção dos mAbs 4G2 produzidos *in house*



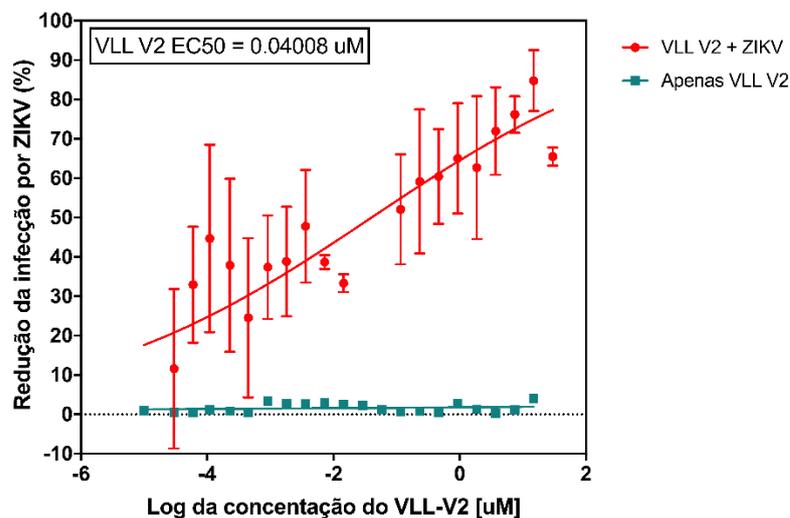
Nota: (A) Densidades ópticas na leitura da absorvância à 450 nm (OD_{450nm}) resultantes do ELISA para detecção de 4G2. A proteína E do ZIKV foi fixada na placa e os resultados mostram que as frações dos anticorpos 4G2 produzidos *in house* obtiveram a OD_{450nm} média semelhante à do 4G2 comercial, indicando que os anticorpos produzidos *in house* se ligam à E-ZIKV de forma semelhante ao 4G2 comercial. (B) Média da OD_{450nm} das três frações do 4G2 (*in house*) testadas e dos controles. C -: Controle negativo (E-ZIKV e anticorpo anti-IgG de camundongo). C +: Controle positivo (E-ZIKV, 4G2 comercial e anticorpo anti-IgG de camundongo). Fonte: (A) A autora através do *software* GraphPad Prism v7. (B) A autora.

8.6 DESEMPENHO DAS PROTEÍNAS SINTETIZADAS NOS ENSAIOS DE NEUTRALIZAÇÃO VIRAL

Os dados resultantes do ensaio de microneutralização viral realizado com uma curva de diluição da proteína VLL-V2 estão plotados no gráfico apresentado na figura 13 (curva em vermelho), onde cada ponto representa a porcentagem de redução da infecção viral acarretada por cada uma das concentrações testadas da VLL-V2 em relação ao controle positivo. Pode ser observado que nos pontos referentes às maiores concentrações de VLL-V2 há uma maior redução da infecção viral, indicando uma menor detecção de partículas virais nesses pontos e, portanto, uma maior neutralização viral. A concentração máxima de VLL-V2 utilizada na análise foi de 29,7 μ M, representado pelo último ponto da curva. Os dados referentes à placa controle, que continha apenas a diluição da VLL-V2 e as células Vero, estão plotados na curva em azul na figura 13 e representam a porcentagem de detecção de partículas virais, assumindo o controle positivo como 100%. Tendo em vista que o aumento de

detecção de partículas virais na placa controle – onde o ZIKV está ausente - indicaria a ocorrência de reações inespecíficas ou de eventuais contaminações, podemos observar na curva referente à placa controle que não houve reação inespecífica aparente entre a proteína VLL-V2 e os anticorpos do ensaio (Figura 13).

Figura 13 - Perfil de neutralização de ZIKV por meio da proteína VLL-V2



Nota: A porcentagem de redução da infecção por ZIKV *in vitro* quando incubada com VLL-V2 pode ser observada na curva em vermelho. Cada ponto da curva representa uma concentração da proteína que foi incubada com 312,5 PFU do ZIKV e com células Vero (concentração máxima de VLL-V2 na curva: 29,7 µM). Os segmentos verticais no gráfico representam os desvios padrão entre as três réplicas de cada ponto. A partir da curva teste, foi possível calcular a concentração de eficiência (EC₅₀) da proteína VLL-V2 para neutralização viral. A curva em azul representam a OD_{450nm} da placa controle. ZIKV: *Zika vírus*. Fonte: A autora.

A EC₅₀ é uma métrica bastante utilizada na farmacologia em ensaios de efeitos biológicos e se refere à concentração de um composto qualquer que induza metade (50%) do efeito máximo esperado. Neste trabalho a EC₅₀ representa a concentração da proteína para qual 50% de inibição da infecção foi observada. Com os dados obtidos no ensaio de microneutralização em placa, foi calculado que a proteína VLL-V2 foi capaz de neutralizar a infecção por ZIKV *in vitro* com uma concentração de eficiência (EC₅₀) de aproximadamente 0.04 µM.

9 DISCUSSÃO

Devido à co-circulação de flavivírus no país, faz-se necessário o desenvolvimento de propostas de diagnóstico diferencial, assim como de terapias seguras, que não acarretem uma amplificação da infecção dependente de anticorpos, fenômeno comum entre os flavivírus (PRIYAMVADA et al., 2017). Portanto, na busca por estratégias diagnósticas e terapêuticas para o ZIKV, o principal fator a ser considerado é a reatividade cruzada com outros vírus da mesma família, principalmente com o DENV, e as possíveis consequências dessa inespecificidade (ROGERS et al., 2017; CAMPOS et al., 2018). Nesse contexto, três proteínas previamente idealizadas, direcionadas ao epítipo específico LR-DIII foram, neste trabalho, desenvolvidas *in vitro*.

A síntese de proteínas recombinantes é de grande importância no âmbito da pesquisa científica e pode ser realizada em diferentes tipos celulares ou organismos. As proteínas sintéticas desenvolvidas no trabalho não apresentam necessidade de modificações pós-traducionais, sendo possível, portanto, sua expressão em células procariotas. Cepas de *E. coli* são os microrganismos mais tradicionalmente utilizados para a síntese de proteínas recombinantes, pois apresentam rápido crescimento e tolerância a diferentes meios de cultivo. Apesar de serem amplamente utilizadas na expressão de genes heterólogos, é comum que ocorram problemas na produção dessas proteínas, como por exemplo, agregação proteica no interior das células e morte celular devido a citotoxicidade das proteínas expressas (ROSANO et al., 2019; BHATWA et al., 2021). Além disso, uma vez que o gasto energético celular é direcionado para a expressão do gene heterólogo, podem ocorrer modificações nos parâmetros fisiológicos da célula, como supressão de vias celulares importantes e diminuição da taxa de crescimento celular, reduzindo o rendimento proteico final (TEROL et al., 2021). Atualmente existem diferentes cepas de *E. coli* modificadas geneticamente a fim de melhorar a expressão das proteínas heterólogas. Dentre elas, as células competentes de *E. coli* BL21 StarTM (DE3) pLysS, empregadas no estudo, são amplamente utilizadas para a expressão de proteínas a partir de genes inseridos em vetores pET (GOPAL et al., 2013), pois além de não possuir as proteases *lon* e *ompT*, evitando a degradação proteica, a cepa apresenta o gene para a RNA polimerase do fago T7, ao passo que impede a expressão precoce das proteínas de interesse por meio da inibição da expressão basal da RNA polimerase através da

lisozima T7, aumentando, portanto, o rendimento proteico e contornando problemas como a toxicidade e a redução da produção proteica por morte ou fadiga celular (KAUR et al., 2018). Adicionalmente, o IPTG é adicionado na fase exponencial do crescimento celular (OD_{600nm} entre 0,5 e 0,8) para dar início à expressão das proteínas sintéticas heterólogas, garantindo o aumento rendimento proteico final.

Já foi relatado na literatura que durante o processo de purificação proteica por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados, algumas proteínas nativas das células hospedeiras podem ser co-purificadas com as proteínas heterólogas de interesse (LINGG et al., 2020; BOLANOS-GARCIA et al., 2006). Tendo em vista que a coluna cromatográfica é formada por uma resina funcionalizada de íons de Níquel, proteínas com aminoácidos carregados positivamente (arginina, lisina, histidina) em sua superfície podem se ligar à resina, porém, de modo geral, estabelecem interações mais fracas quando comparadas à interação entre a resina e a cauda de seis histidinas *in tandem*. Além disso, no caso da expressão heteróloga ser realizada em células de *E. coli*, parte dos contaminantes relatados durante as purificações são proteínas responsivas ao estresse, que apresentam sítios nativos de ligação a metais (LINGG et al., 2020.; BOLANOS-GARCIA et al., 2006). Portanto, por essa razão, nos géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) podem ser observadas bandas com pesos moleculares distintos além das bandas referentes às proteínas sintéticas marcadas com a cauda de seis histidinas (Figura 10 B, D e F).

Uma vez que a síntese proteica ocorreu com sucesso (Figura 10 e Tabela 1) as proteínas desenvolvidas foram testadas quanto à interação com a proteína do envelope do ZIKV. A afinidade de ligação encontrada para a proteína VLL-V2 (K_D : 7,8 nM) foi semelhante ao resultado encontrado por ZHAO e colaboradores (2016) para o mAb ZV-67, anticorpo no qual as proteínas VLL foram baseadas. Esses autores demonstraram, através de ensaios de BLI, que o mAb ZV-67 foi capaz de se ligar ao domínio III recombinante com uma constante de dissociação de $8,8 \pm 1,7$ nM (ZHAO et al., 2016).

Além do ZV-67, outros anticorpos monoclonais direcionados ao mesmo epítopo (LR-DIII) demonstraram afinidades de ligação semelhantes às encontradas no presente estudo, como, por exemplo, o mAb ZKA190 apresentou K_D de 9,3 nM através de ensaios de BLI com a proteína E recombinante, assim como o mAb ZIKV-116 que, também utilizando BLI apresentou K_D de 1,15 nM e 2,24 nM ao interagir com o domínio

DIII recombinante nos pHs 7,4 e 5,5, respectivamente (WANG et al., 2017; ZHAO et al., 2019).

Em estudos prévios foi observado ainda que, para o mAb ZIKV-116, quando a proteína recombinante DIII utilizada nas análises pertence à cepa africana MR-766 há uma diminuição considerável da afinidade do anticorpo ZIKV-116 ($K_D = 121$ nM). Isso acontece, pois a cepa MR-766 possui um ácido aspártico na posição 393 da proteína, enquanto a maioria das cepas asiáticas, para qual foi observado o menor valor de K_D , possui um ácido glutâmico na mesma posição, portanto, possivelmente a cadeia lateral mais curta do ácido aspártico pode ser incapaz de formar ligações de hidrogênio fortes com o anticorpo (ZHAO et al, 2019). Por outro lado, o mAb ZV-67 se mostrou capaz de neutralizar tanto cepas da linhagem asiática, como da linhagem africana independentemente do aminoácido localizado na posição 393 (ZHAO et al., 2016).

Como demonstrado nos nossos resultados, a proteína VLL-V2 foi capaz de neutralizar a infecção por ZIKV *in vitro* com uma EC_{50} de aproximadamente 0.04 μ M. Estudos prévios demonstram que anticorpos monoclonais direcionados ao mesmo epítipo que as proteínas aqui testadas foram capazes de neutralizar infecções por ZIKV em ensaios *in vitro*, através de técnicas como PRNT e teste de neutralização por redução de foco (FRNT), além de neutralizar a infecção *in vivo*, fornecendo proteção a modelos animais infectados com doses letais de ZIKV (ZHAO et al., 2016; WANG et al., 2016; WANG et al., 2017). Além dos mAbs direcionados ao LR-DIII do ZIKV, anticorpos monoclonais direcionados a esse epítipo em outros flavivírus também já demonstraram potencial de neutralização viral (NYBAKKEN, et al., 2005.; DAI et al., 2018).

10 CONCLUSÕES

Todas as proteínas previamente desenvolvidas *in silico* foram sintetizadas com sucesso em células procarióticas e avaliadas quanto à interação com a proteína E do ZIKV. A proteína sintética VLL-V2 apresentou uma maior afinidade de ligação à proteína E quando comparada às proteínas VLL-V3 e VLL-V4, se assemelhando às afinidades apresentadas por anticorpos neutralizantes já descritos na literatura. Em ensaios *in vitro*, foi evidenciado que a proteína VLL-V2 apresentou também atividade neutralizante da infecção para a cepa PE243 do ZIKV. Em suma, pudemos observar que a VLL-V2, uma das proteínas aqui desenvolvidas, apresenta alta afinidade de ligação à proteína do envelope do ZIKV, assim como potencial de neutralização da infecção viral *in vitro*. Portanto, tendo em vista os resultados obtidos, a proteína sintética VLL-V2 apresenta-se como alternativa no desenvolvimento de novas propostas de diagnóstico e terapias anti-Zika, sendo necessário o desenvolvimento de estudos adicionais para avaliá-la quanto à especificidade ao ZIKV e à capacidade de neutralização viral *in vitro* e *in vivo*.

REFERÊNCIAS

BARBA-SPAETH, Giovanna et al. Structural basis of potent Zika–dengue virus antibody cross-neutralization. **Nature**, v. 536, n. 7614, p. 48-53, 2016.

BARDINA, Susana V. et al. Enhancement of Zika virus pathogenesis by preexisting antinflavivirus immunity. **Science**, v. 356, n. 6334, p. 175-180, 2017.

BARNARD, Trisha R. et al. Molecular Determinants of Flavivirus Virion Assembly. **Trends in Biochemical Sciences**, 2021.

BARROWS, Nicholas J. et al. Biochemistry and molecular biology of flaviviruses. **Chemical reviews**, v. 118, n. 8, p. 4448-4482, 2018.

BHATWA, Arshpreet et al. Challenges associated with the formation of recombinant protein inclusion bodies in Escherichia coli and strategies to address them for industrial applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, p. 65, 2021.

BOLANOS-GARCIA, Victor Martin; DAVIES, Owen Richard. Structural analysis and classification of native proteins from E. coli commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1760, n. 9, p. 1304-1313, 2006.

BOSCH, Irene et al. Rapid antigen tests for dengue virus serotypes and Zika virus in patient serum. **Science translational medicine**, v. 9, n. 409, p. eaan1589, 2017.

CALVET, Guilherme et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **The Lancet infectious diseases**, v. 16, n. 6, p. 653-660, 2016.

CAMPOS, Jose Luis Slon; MONGKOLSAPAYA, Juthathip; SCREATON, Gavin R. The immune response against flaviviruses. **Nature immunology**, v. 19, n. 11, p. 1189-1198, 2018.

DAI, Lianpan et al. Structures of the Zika virus envelope protein and its complex with a flavivirus broadly protective antibody. **Cell host & microbe**, v. 19, n. 5, p. 696-704, 2016.

DAI, Lianpan et al. Zika virus envelope protein and antibody complexes. **Virus protein and nucleoprotein complexes**, p. 147-168, 2018.

DONALISIO, Maria Rita; FREITAS, André Ricardo Ribas; ZUBEN, Andrea Paula Bruno Von. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Revista de saude publica**, v. 51, p. 30, 2017.

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

DUDLEY, Dawn M. et al. A rhesus macaque model of Asian-lineage Zika virus infection. **Nature communications**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2016.

DUFFY, Mark R. et al. Zika virus outbreak on Yap Island, federated states of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536-2543, 2009.

DUGGAN, Sean. Caplacizumab: first global approval. **Drugs**, v. 78, n. 15, p. 1639-1642, 2018.

FARIA, Nuno Rodrigues et al. Zika virus in the Americas: early epidemiological and genetic findings. **Science**, v. 352, n. 6283, p. 345-349, 2016.

FELIX, Alvina Clara et al. Cross reactivity of commercial anti-dengue immunoassays in patients with acute Zika virus infection. **Journal of medical virology**, v. 89, n. 8, p. 1477-1479, 2017.

FERREIRA, Maria Lúcia Brito et al. Neurological disease in adults with Zika and chikungunya virus infection in Northeast Brazil: a prospective observational study. **The Lancet Neurology**, v. 19, n. 10, p. 826-839, 2020.

FRANCIS, Thomas. On the doctrine of original antigenic sin. **Proceedings of the American Philosophical Society**, v. 104, n. 6, p. 572-578, 1960.

GOPAL, Gopal Jee; KUMAR, Awanish. Strategies for the production of recombinant protein in Escherichia coli. **The protein journal**, v. 32, n. 6, p. 419-425, 2013.

GRANT, Alesha et al. Zika virus targets human STAT2 to inhibit type I interferon signaling. **Cell host & microbe**, v. 19, n. 6, p. 882-890, 2016.

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

HAMEL, Rodolphe et al. Biology of Zika virus infection in human skin cells. **Journal of virology**, v. 89, n. 17, p. 8880-8896, 2015.

HAMERS-CASTERMAN, C. T. S. G. et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. **Nature**, v. 363, n. 6428, p. 446-448, 1993.

HARMSSEN, M. M.; DE HAARD, H. J. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 77, n. 1, p. 13-22, 2007.

HASAN, S. Saif et al. A human antibody against Zika virus crosslinks the E protein to prevent infection. **Nature communications**, v. 8, n. 1, p. 1-6, 2017.

HASAN, S. Saif et al. Structural biology of Zika virus and other flaviviruses. **Nature structural & molecular biology**, v. 25, n. 1, p. 13-20, 2018.

HASSAN, Ahmed O. et al. A gorilla adenovirus-based vaccine against Zika virus induces durable immunity and confers protection in pregnancy. **Cell reports**, v. 28, n. 10, p. 2634-2646. e4, 2019.

HERRADA, Carlos A. et al. Advances in diagnostic methods for Zika virus infection. **Journal of medical devices**, v. 12, n. 4, 2018.

HILGENFELD, Rolf; LEI, Jian; ZHANG, Linlin. The Structure of the Zika Virus Protease, NS2B/NS3 pro. **Dengue and Zika: Control and Antiviral Treatment Strategies**, p. 131-145, 2018.

JAMES, Eddie A. et al. Neuroinvasive West Nile infection elicits elevated and atypically polarized T cell responses that promote a pathogenic outcome. **PLoS pathogens**, v. 12, n. 1, p. e1005375, 2016.

JERABEK-WILLEMSEN, Moran et al. MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond. **Journal of Molecular Structure**, v. 1077, p. 101-113, 2014.

KASTRITIS, Panagiotis L.; BONVIN, Alexandre MJJ. On the binding affinity of macromolecular interactions: daring to ask why proteins interact. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 10, n. 79, p. 20120835, 2013.

KAUR, Jashandeep; KUMAR, Arbind; KAUR, Jagdeep. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 803-822, 2018.

KIKUTI, Mariana et al. Diagnostic performance of commercial IgM and IgG enzyme-linked immunoassays (ELISAs) for diagnosis of Zika virus infection. **Virology journal**, v. 15, n. 1, p. 1-7, 2018.

KOSTYUCHENKO, Victor A. et al. Structure of the thermally stable Zika virus. **Nature**, v. 533, n. 7603, p. 425-428, 2016.

LAROCCA, Rafael A. et al. Vaccine protection against Zika virus from Brazil. **Nature**, v. 536, n. 7617, p. 474-478, 2016.

LAURETI, Mathilde et al. Flavivirus receptors: diversity, identity, and cell entry. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 2180, 2018.

LEUNG, Jason Y. et al. Role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly. **Journal of virology**, v. 82, n. 10, p. 4731-4741, 2008.

LI, Hongda et al. The neurobiology of Zika virus. *Neuron*, v. 92, n. 5, p. 949-958, 2016.

LIANG, Huabin et al. ZIKV infection induces robust Th1-like Tfh cell and long-term protective antibody responses in immunocompetent mice. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 1-16, 2019.

LIANG, Qiming et al. Zika virus NS4A and NS4B proteins deregulate Akt-mTOR signaling in human fetal neural stem cells to inhibit neurogenesis and induce autophagy. **Cell stem cell**, v. 19, n. 5, p. 663-671, 2016.

LIMA, Noemia S. et al. T cell immunity and Zika virus vaccine development. **Trends in immunology**, v. 38, n. 8, p. 594-605, 2017.

LINDENBACH, Brett D. et al. Molecular biology of flaviviruses. **Advances in virus research**, v. 59, p. 23-62, 2003.

LINGG, Nico et al. Proteomics analysis of host cell proteins after immobilized metal affinity chromatography: Influence of ligand and metal ions. **Journal of Chromatography A**, v. 1633, p. 461649, 2020.

LÓPEZ-CAMACHO, César et al. Immunogenicity and efficacy of Zika virus envelope domain III in DNA, protein, and ChAdOx1 adenoviral-vectored vaccines. **Vaccines**, v. 8, n. 2, p. 307, 2020.

MAGALHAES, Tereza et al. The endless challenges of arboviral diseases in Brazil. 2020.

MAGNANI, Diogo M. et al. Neutralizing human monoclonal antibodies prevent Zika virus infection in macaques. **Science translational medicine**, v. 9, n. 410, 2017.

MILLER, Sven et al. The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 12, p. 8873-8882, 2007.

MILLER, Sven; SPARACIO, Sandra; BARTENSCHLAGER, Ralf. Subcellular localization and membrane topology of the dengue virus type 2 non-structural protein 4B. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 13, p. 8854-8863, 2006.

Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento de Febre Amarela Brasil 2019 **Boletim epidemiológico** informe nº 18 | 9 JUNHO 2019. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>

Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos pelo mosquito Aedes (dengue, chikungunya e zika) semanas epidemiológicas 1 a 35, 2021. **Boletim epidemiológico**. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>

Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 43 de 2018. **Boletim epidemiológico**. Volume 49 Nº 2 - 2018. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>

Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação epidemiológica da febre amarela – Monitoramento 2020/2021 **Boletim epidemiológico** Volume 52 | Nº 4 | Fev. 2021. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>

Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância em saúde no Brasil 2003|2019: da criação da Secretaria de Vigilância em Saúde aos dias atuais. **Bol Epidemiol** [Internet]. 2019 set [data da citação]; 50(n.esp.):1-154. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>

MLAKAR, Jernej et al. Zika virus associated with microcephaly. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 10, p. 951-958, 2016.

MULLER, David A.; YOUNG, Paul R. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. **Antiviral research**, v. 98, n. 2, p. 192-208, 2013.

MUSSO, Didier; GUBLER, Duane J. Zika virus. **Clinical microbiology reviews**, v. 29, n. 3, p. 487-524, 2016.

NEUFELDT, Christopher J. et al. Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 125-142, 2018.

NGONO, Annie Elong et al. Mapping and role of the CD8+ T cell response during primary Zika virus infection in mice. **Cell host & microbe**, v. 21, n. 1, p. 35-46, 2017.

NOWAKOWSKI, Tomasz J. et al. Expression analysis highlights AXL as a candidate Zika virus entry receptor in neural stem cells. **Cell stem cell**, v. 18, n. 5, p. 591-596, 2016.

NYBAKKEN, Grant E. et al. Structural basis of West Nile virus neutralization by a therapeutic antibody. **Nature**, v. 437, n. 7059, p. 764-769, 2005.

PAGLIARI, Carla et al. Human kidney damage in fatal dengue hemorrhagic fever results of glomeruli injury mainly induced by IL17. **Journal of Clinical Virology**, v. 75, p. 16-20, 2016.

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

PIERSON, Theodore C.; DIAMOND, Michael S. The continued threat of emerging flaviviruses. **Nature microbiology**, v. 5, n. 6, p. 796-812, 2020.

PIERSON, Theodore C.; GRAHAM, Barney S. Zika virus: immunity and vaccine development. **Cell**, v. 167, n. 3, p. 625-631, 2016.

POVEDA-CUEVAS, Sergio A.; ETCHEBEST, Catherine; BARROSO DA SILVA, Fernando L. Insights into the ZIKV NS1 Virology from Different Strains through a Fine Analysis of Physicochemical Properties. **ACS omega**, v. 3, n. 11, p. 16212-16229, 2018.

PRIYAMVADA, Lalita et al. Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 28, p. 7852-7857, 2016.

PRIYAMVADA, Lalita et al. Humoral immune responses against Zika virus infection and the importance of preexisting flavivirus immunity. **The Journal of infectious diseases**, v. 216, n. suppl_10, p. S906-S911, 2017.

REYNOLDS, C. J. et al. T cell immunity to Zika virus targets immunodominant epitopes that show cross-reactivity with other Flaviviruses. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2018.

ROBBIANI, Davide F. et al. Recurrent potent human neutralizing antibodies to Zika virus in Brazil and Mexico. **Cell**, v. 169, n. 4, p. 597-609. e11, 2017.

ROGERS, Thomas F. et al. Zika virus activates de novo and cross-reactive memory B cell responses in dengue-experienced donors. **Science immunology**, v. 2, n. 14, 2017.

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

SAIZ, Juan-Carlos et al. Zika virus: the latest newcomer. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 496, 2016.

SAPPARAPU, Gopal et al. Neutralizing human antibodies prevent Zika virus replication and fetal disease in mice. **Nature**, v. 540, n. 7633, p. 443-447, 2016.

SCHULER-FACCINI, Lavinia et al. Possible association between Zika virus infection and microcephaly—Brazil, 2015. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 3, p. 59-62, 2016.

SHANG, Zifang et al. Crystal structure of the capsid protein from Zika virus. **Journal of molecular biology**, v. 430, n. 7, p. 948-962, 2018.

SHARP, Tyler M. et al. Dengue and Zika virus diagnostic testing for patients with a clinically compatible illness and risk for infection with both viruses. **MMWR Recommendations and Reports**, v. 68, n. 1, p. 1, 2019.

SILVA, Nelly M.; SANTOS, Nuno C.; MARTINS, Ivo C. Dengue and Zika viruses: Epidemiological history, potential therapies, and promising vaccines. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 5, n. 4, p. 150, 2020.

SILVA, Severino Jefferson Ribeiro da; PARDEE, Keith; PENA, Lindomar. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the diagnosis of Zika virus: a review. **Viruses**, v. 12, n. 1, p. 19, 2020.

SIMPSON, David IH et al. Zika virus infection in man. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 4, p. 335-8, 1964.

SLON-CAMPOS, Jose Luis et al. A protective Zika virus E-dimer-based subunit vaccine engineered to abrogate antibody-dependent enhancement of dengue infection. **Nature immunology**, v. 20, n. 10, p. 1291-1298, 2019.

SONG, Hao et al. Zika virus NS1 structure reveals diversity of electrostatic surfaces among flaviviruses. **Nature structural & molecular biology**, v. 23, n. 5, p. 456-458, 2016.

TAN, Ter Yong et al. Capsid protein structure in Zika virus reveals the flavivirus assembly process. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2020.

TANG, Hengli et al. Zika virus infects human cortical neural progenitors and attenuates their growth. **Cell stem cell**, v. 18, n. 5, p. 587-590, 2016.

TEROL, Gema Lozano et al. Impact of the expression system on recombinant protein production in Escherichia coli BL21. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 2021.

ULMER, Kevin M. Protein engineering. **Science**, v. 219, n. 4585, p. 666-671, 1983.

UMAREDDY, Indira et al. Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. **Journal of general virology**, v. 87, n. 9, p. 2605-2614, 2006.

VAN DEN ELSEN, Kaïn; QUEK, Jun Ping; LUO, Dahai. Molecular Insights into the Flavivirus Replication Complex. **Viruses**, v. 13, n. 6, p. 956, 2021.

VATTI, Anup et al. Original antigenic sin: a comprehensive review. **Journal of autoimmunity**, v. 83, p. 12-21, 2017.

WAGGONER, Jesse J.; PINSKY, Benjamin A. Zika virus: diagnostics for an emerging pandemic threat. **Journal of clinical microbiology**, v. 54, n. 4, p. 860-867, 2016.

WANG, Boxiao et al. Structural basis for STAT2 suppression by flavivirus NS5. **Nature structural & molecular biology**, v. 27, n. 10, p. 875-885, 2020.

WANG, Jiaqi et al. A human bi-specific antibody against Zika virus with high therapeutic potential. **Cell**, v. 171, n. 1, p. 229-241. e15, 2017.

WANG, Lin et al. Structural basis for neutralization and protection by a Zika virus-specific human antibody. **Cell reports**, v. 26, n. 12, p. 3360-3368. e5, 2019.

WANG, Qihui et al. Molecular determinants of human neutralizing antibodies isolated from a patient infected with Zika virus. **Science translational medicine**, v. 8, n. 369, p. 369ra179-369ra179, 2016.

WIKAN, Nitwara; SMITH, Duncan R. Zika virus: history of a newly emerging arbovirus. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 7, p. e119-e126, 2016.

WU, Yanling et al. Neutralization of Zika virus by germline-like human monoclonal antibodies targeting cryptic epitopes on envelope domain III. **Emerging microbes & infections**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2017.

YANG, Ming et al. Virus-like particles that display Zika virus envelope protein domain III induce potent neutralizing immune responses in mice. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017.

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

ZHANG, Xianwen et al. Zika virus NS2A-mediated virion assembly. **MBio**, v. 10, n. 5, p. e02375-19, 2019.

ZHAO, Haiyan et al. Mechanism of differential Zika and dengue virus neutralization by a public antibody lineage targeting the DIII lateral ridge. **Journal of Experimental Medicine**, v. 217, n. 2, 2020.

ZHAO, Haiyan et al. Structural basis of Zika virus-specific antibody protection. *Cell*, v. 166, n. 4, p. 1016-1027, 2016.

ZIMMERMAN, Matthew G.; WRAMMERT, Jens; SUTHAR, Mehul S. Cross-reactive antibodies during Zika virus infection: protection, pathogenesis, and placental seeding. **Cell host & microbe**, v. 27, n. 1, p. 14-24, 2020.

APÊNDICE A – Artigo referente à dissertação

DETERMINAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DE PROTEÍNAS SINTÉTICAS PARA O DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE ZIKA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE NEUTRALIZAÇÃO VIRAL

Determination of synthetic proteins specificity for the serological diagnosis of Zika and evaluation of viral neutralization potential

Lícyá Samara da Silva Xavier¹; Danilo Fernandes Coêlho^{1,2}; Tayná Evily de Lima¹; Wenny Camilla dos Santos Adan^{1,2}; Isabelle Freire Tabosa Viana¹; Roberto Dias Lins Neto^{1,2}

¹Departamento de virologia, Instituto Aggeu Magalhães, Fiocruz Pernambuco

²Departamento de química fundamental, Universidade Federal de Pernambuco

ABSTRACT

Introduction: Given the complexity of the differential diagnosis of Zika virus (ZIKV) and the lack of effective therapeutic proposals, our research group engineered *in silico* three proteins (VLL-V2, VLL-V3 and VLL-V4) based on the structure of the ZV-67 monoclonal antibody (mAb) directed to DIII domain of ZIKV envelope protein (ZIKV-E), that is the first and main antigenic target during an infection. Synthetic proteins were developed in order to carry the essential mAb amino acids for the antibody-epitope interaction. Therefore, the hypothesis of this work is that the developed proteins are able to bind their target with high affinity and to neutralize the viral infection *in vitro*.

Objective: To produce *in vitro* the three synthetic proteins and evaluate them for their binding affinity to envelope protein of ZIKV, as well as the capacity to neutralize the viral infection. **Methods:** The proteins were expressed in *Escherichia coli* cells, purified by affinity chromatography, evaluated for interaction with ZIKV-E by microscale thermophoresis (MST) and finally, the proteins ability in neutralize ZIKV infection was measured using plate viral microneutralization assays (MN). **Results:** After protein expression and purification, were obtained concentrations of 237,45 µM, 198,6 µM and 141,4 µM for synthetic proteins VLL-V2, VLL-V3 and VLL-V4, respectively. As a result of MST, it was observed that VLL-V2 had the highest binding affinity to ZIKV-E with a

dissociation constant (KD) of 7.8×10^{-9} M, followed by VLL-V4 (KD = 1.6×10^{-5} M) and VLL-V3 (KD = 3.7×10^{-5} M). 4G2 mAbs, essential for performing MN assays, were successfully produced. Considering that VLL-V2 presented the best experimental result in MST, it was decided to perform the MN assays with only this protein. After microneutralization assays, it was demonstrated that the VLL-V2 protein was able to neutralize ZIKV *in vitro* with an EC50 of 0.04 μ M. **Conclusions:** Among the proteins synthesized and tested *in vitro*, the VLL-V2 protein showed a high binding affinity to E protein, similar to the values presented by neutralizing antibodies already described in the literature. Additionally, the VLL-V2 protein also had potential to neutralize ZIKV infection *in vitro*.

Keywords: Zika. Microcephaly. Diagnosis. Neutralization. Protein engineering. Binding affinity.

1 INTRODUÇÃO

O vírus Zika (*Zika virus* - ZIKV), descoberto em 1947 na floresta de Zika/Uganda, é pertencente à família *flaviviridae* e gênero flavivírus. Estruturalmente, os flavivírus são vírus esféricos, envelopados e apresentam um capsídeo proteico em forma icosaédrica. O genoma viral é constituído por uma fita simples de RNA de polaridade positiva (ssRNA+) que codifica três proteínas estruturais (C, prM e E) e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). As proteínas estruturais têm função na formação da partícula viral, enquanto as proteínas não estruturais participam da replicação do RNA viral, da patogenicidade do vírus e da evasão do sistema imune do hospedeiro (HASAN et al., 2018). Tendo em vista que os flavivírus são estruturalmente semelhantes entre si e desenvolvem infecções clinicamente parecidas, o diagnóstico diferencial de Zika ainda é laborioso. Adicionalmente, não há estratégias terapêuticas disponíveis contra a infecção (SILVA et al., 2020).

A transmissão do vírus Zika ocorre majoritariamente através de mosquitos vetores do gênero *Aedes*, assim como por via sexual, transmissão vertical e por transfusão de sangue (HASAN et al., 2018). Clinicamente, na fase aguda da doença os indivíduos infectados podem ser assintomáticos (80% dos casos) ou apresentar comuns a doenças febris. A maior preocupação associada ao ZIKV é referente à síndrome congênita do Zika (SCZ), que consiste em efeitos teratogênicos que podem decorrer da infecção em gestantes, ocasionando microcefalia e outras malformações em neonatos.

Portanto, tendo em vista a ausência de propostas aprovadas para o diagnóstico preciso e para terapias anti-ZIKV, nosso grupo de pesquisa previamente idealizou e engenheirou *in silico* três proteínas, denominadas VLL-V2, VLL-V3 e VLL-V4, a partir da estrutura do anticorpo monoclonal (*monoclonal antibody* – mAb) ZV-67, direcionado ao domínio DIII da proteína do envelope do ZIKV (E-ZIKV), proteína essa que é o primeiro e principal alvo antigênico durante uma infecção. As proteínas sintéticas foram desenvolvidas *in silico* de modo a carrear os aminoácidos do mAb fundamentais na interação anticorpo-epítipo, apresentando, portanto, potencial de ligação à partícula viral do ZIKV. Logo, a hipótese deste trabalho é de que as proteínas desenvolvidas são capazes de se ligar ao seu alvo com alta afinidade e de neutralizar a infecção viral *in vitro*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 EXPANSÃO E PURIFICAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL (pDNA)

20 µL de células competentes de *E.coli* DH5α foram transformadas com 0,2 µg de cada um dos pDNAs contendo as sequências codificantes para as três proteínas engenheiradas computacionalmente. As transformações foram realizadas por choque térmico através de incubação em gelo por 30 minutos (min), seguida por incubação a 42 °C por 2 min e novamente em gelo/ 2 min. Após a transformação, foram adicionados 500 µL de meio S.O.C ao tubo contendo as bactérias, que foram, então, incubadas por 1h a 37 °C e 225 rpm. Após incubação, o conteúdo foi centrifugado (5000 x g; 5 min; 23 °C) e o sedimento inoculado em placa de cultura contendo meio ágar Luria Bertani, suplementado com 50 µg/mL de ampicilina (ágar LB-AMP) para crescimento das colônias a 37 °C por 16h.

Posteriormente, uma única colônia de bactérias DH5α contendo o plasmídeo de interesse foi inoculada em 100 mL de meio líquido Luria Bertani (LB) (Invitrogen™) suplementado com ampicilina (50 µg/mL) e incubadas à 37 °C, 225 rpm por 16h. A extração e purificação do DNA plasmidial foram realizadas utilizando kit comercial (*QIAGEN Plasmid Midi Kit*, QIAGEN®).

2.2 EXPRESSÃO PROTEICA

Para a expressão *in vitro* de cada uma das proteínas sintéticas, 20 µL de células competentes de *E. coli* BL21(D3) pLysS foram transformadas com 1 µg de cada plasmídeo de expressão referentes às proteínas VLL-V2, VLL-V3 e VLL-V4. As

transformações e o plaqueamento das bactérias transformadas foram realizados conforme já descrito anteriormente neste trabalho. Após crescimento em placa, uma colônia única da cepa transformada foi inoculada em 50 mL de meio LB líquido (Invitrogen™) suplementado com ampicilina (50 µg/mL) e, em seguida, conduzida para crescimento à 37 °C/ 225 rpm/16 h. Após incubação, a cultura foi expandida para 1 litro de meio LB-AMP e permaneceu em crescimento (37 °C; 225 rpm) até atingir uma OD_{600nm} entre 0,5 e 0,8. Então, foi adicionado isopropiltiogalactosídeo (IPTG) a uma concentração final de 1 mM e a cultura foi conduzida para crescimento à 22 °C/ 225 rpm/ 16h.

2.3 PURIFICAÇÃO E ELETROFORESE DE PROTEÍNAS

As culturas de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS expressando cada uma das proteínas sintéticas foram centrifugadas (7000 x g; 30 min; 4°C) e após descarte do sobrenadante, o sedimento bacteriano foi ressuspenso com 50 mL de tampão de ligação (50 mM de Tris-HCl, 300 mM de NaCl, 20 mM de Imidazol, pH: 8.0), acrescido de inibidor de protease (Roche®) na concentração final de 1X. A suspensão bacteriana foi, então, submetida à sonicação (6 pulsos de 30 segundos e amplitude de 40%, com intervalo de 60 segundos entre pulsos) e centrifugação (10000 x g; 30 min; 4 °C). O sobrenadante resultante da centrifugação foi purificado utilizando o cromatógrafo ÄKTA™ Pure por cromatografia de afinidade em coluna de íons metálicos imobilizados (HisTrap™ HP). A eluição das proteínas foi realizada por gradiente de concentração de imidazol.

As eletroforeses foram realizadas em gel de 17,5% acrilamida. As amostras proteicas foram diluídas (1:1) no tampão de corrida para proteínas Laemmli 2X (400 mM Glicina, 50mM Tris e 3,5mM SDS) e, em seguida, aquecidas à 95 °C por 5 min. Foram aplicados 10 µL de cada amostra diluída por poço do gel e, para controle da corrida, foram utilizados 10 µL do marcador de peso molecular (BenchMark™ Protein Ladder). As proteínas migraram no gel submetidas à uma corrente elétrica constante de 40 mA. As imagens do gel foram capturadas através do fotodocumentador ImageQuant LAS 500 chemiluminescence CCD câmera.

2.4 MST PARA AVALIAÇÃO DAS CONSTANTES DE DISSOCIAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS SINTÉTICAS E A PROTEÍNA e

Para os ensaios de MST, foi feita uma curva de diluição com 16 pontos para cada proteína. No primeiro ponto da diluição foram utilizados 20 μ L de cada proteína purificada na concentração máxima obtida (VLL-V2: 237,45 μ M; VLL-V3: 198,6 μ M; VLL-V4: 141,4 μ M), subsequentemente, uma diluição seriada de ordem 2 em tampão PBS acrescido de 0,05% Tween-20 foi executada para os demais pontos. Foram adicionados em cada ponto da diluição 10 μ L da proteína do envelope do ZIKV, previamente marcada por meio do kit de marcação RED fluorescent dye NT-647-NHS (NanoTemper Technologies), na concentração final de 100 nM. Os ensaios foram executados na temperatura aproximada de 20 °C com a configuração da potência de excitação do LED vermelho em 40% e a potência do MST na configuração média. Os experimentos foram realizados em triplicata, com construção de três curvas de diluição e leituras independentes, para cada uma das proteínas analisadas.

2.5 CULTIVO CELULAR

As células Vero foram cultivadas em meio “*Dulbecco’s Modified Eagle Medium*” (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina e 0,1% de Anfotericina B. As células foram mantidas em frascos para cultura celular (CELLSTAR®) e acondicionadas em estufa, constantemente sob a temperatura de 37 °C e concentração de CO₂ em 5%.

2.6 ENSAIOS DE MICRONEUTRALIZAÇÃO

Em uma placa de cultura de 96 poços, foi realizada uma curva de diluição de 24 pontos da proteína VLL-V2. No primeiro ponto, referente à maior concentração da curva, foram utilizados 50 μ L da proteína não diluída (237,45 μ M), então, para os 23 pontos seguintes, foi aplicada uma diluição seriada de ordem 2, utilizando o meio de cultura DMEM como solução de diluição. Cada ponto da curva foi realizado em triplicata. A posteriori, foram adicionados 50 μ L por poço do ZIKV pertencente à linhagem asiática (cepa PE243) na concentração de 312,5 PFU/poço, então a placa foi incubada à 37 °C por 2h. Após incubação, foram adicionados 100 μ L de meio DMEM contendo 80.000 células Vero em suspensão em cada poço. Assim, a placa foi incubada à 37 °C durante 72h. Como controle positivo da placa foram utilizadas as mesmas concentrações de vírus e células e, como controle negativo, foram

adicionadas somente as células Vero em meio DMEM. Adicionalmente à placa teste, uma placa controle contendo apenas a diluição proteica e as células Vero foi performada com a finalidade de verificar uma eventual ocorrência de reações inespecíficas entre anticorpos utilizados no ensaio e a proteína.

Para leitura das placas, as células foram fixadas com 200 μ L/poço de acetona 80% por 1h para realização do imunoensaio enzimático. Logo, as reações inespecíficas foram bloqueadas com adição de 300 μ L/poço de solução de bloqueio (5% Blotting-Grade Blocker, BIO-RAD), seguido por incubação das placas por 1h/ T.A.. Após a etapa de bloqueio, foi adicionado 0,682 μ g/ μ L do anticorpo primário pan-flavivírus 4G2 (produzidos *in house* a partir do cultivo do hibridoma D1-4G2-4-15 (ATCC HB-112)) em cada poço e, assim, as placas foram conduzidas para incubação à 37 °C durante 2h. Como anticorpo secundário, foram utilizados 100 μ L/poço do anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase na diluição 1:2.500 (SIGMA®), seguido de incubação por 1h. A leitura da absorbância foi feita através de espectrofotometria à 450 nm após a revelação com 100 μ L/poço de tetrametilbenzidina (KPL, TMB Sera care®) e inativação enzimática com adição de 100 μ L/poço de HCl 1N.

3 RESULTADOS

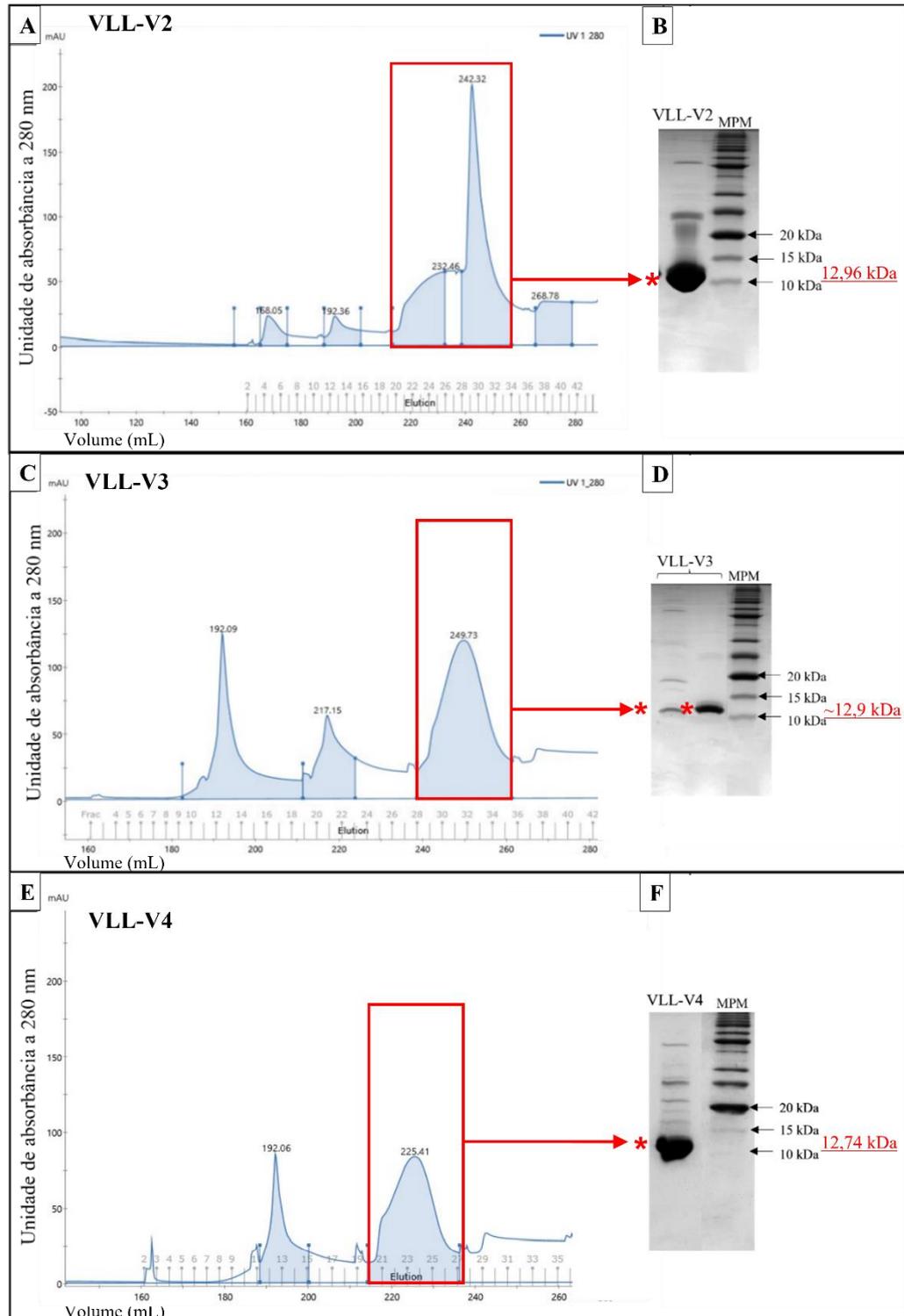
Os Comprimentos totais, em pares de bases, dos plasmídeos de expressão após inserção dos genes codificantes de cada uma das proteínas no vetor pET-14b foram de aproximadamente 5.000 pares de bases (pb). Após a análise das sequências primárias de cada uma das proteínas, foram obtidos os pesos moleculares de 12,96 kDa, 12,93 kDa e 12,74 kDa para as proteínas VLL-V2, VLL-V3 e VLL-V4 respectivamente.

Após as sínteses e purificações proteicas, os cromatogramas resultantes foram caracterizados por picos na leitura da absorbância à 280 nm (medidos em unidades de absorbância – mAU -) (Fig. 1 A, C e E). Para cada fração eluída em que houve aumento da absorbância, indicando a presença de proteínas em solução, foram realizadas eletroforeses de proteínas a fim de verificar os pesos moleculares correspondentes às proteínas sintéticas desenvolvidas e a eficácia da purificação.

Como resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida, é possível observar bandas de proteínas com peso molecular entre 10 e 15 kDa (Fig. 1 B, D e F), correspondendo aos pesos esperados para as proteínas estudadas, demonstrando, portanto, sucesso na expressão e purificação proteica. Após a concentração e

quantificação das frações eluídas contendo as proteínas de interesse, foram obtidos os rendimentos de 3,07 gramas de proteína por litro (g/ L) de cultura de *E. coli* (237,45 μ M) para a proteína VLL-V2; 2,6 g/ L (198,6 μ M) para VLL-V3 e 1,8 g/ L (141,4 μ M) para VLL-V4. Portanto, o maior rendimento de expressão observado foi na síntese da proteína VLL-V2.

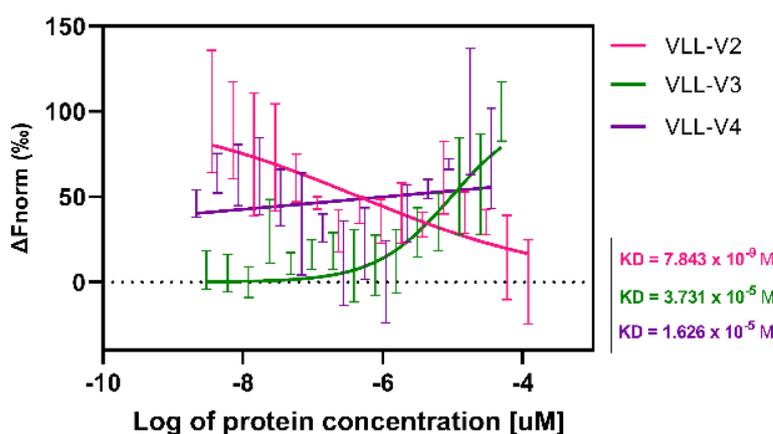
Fig. 1 Cromatogramas e géis de eletroforese referentes às purificações das proteínas sintéticas produzidas



Nota: A, C e E) As regiões sombreadas dos cromatogramas representam os picos de absorbância detectados à 280 nm. Os picos em que as proteínas de interesse foram eluídas estão destacados em retângulos vermelhos. (B, D e F) Géis de eletroforese (SDS-PAGE). Asterisco em vermelho: Bandas referentes às proteínas sintéticas purificadas (entre 10 kDa e 15 kDa). Os pesos moleculares esperados para cada proteína sintética encontram-se em fonte vermelha sublinhada. Fonte: A autora.

Após a avaliação do potencial de interação das proteínas sintéticas com a proteína E do ZIKV por ensaios de MST, foi observado que as proteínas desenvolvidas foram capazes de estabelecer ligação com a proteína E do ZIKV. Dentre elas, a proteína VLL-V2 apresentou a maior afinidade de ligação à proteína E-ZIKV (K_D : 7,8 nM) quando comparada com as proteínas VLL-V3 (K_D : $3,7 \times 10^{-5}$ M) e VLL-V4 (K_D : $1,6 \times 10^{-5}$ M) (Fig. 2).

Fig. 2 Perfis termoforéticos das interações VLL+ZIKV-E

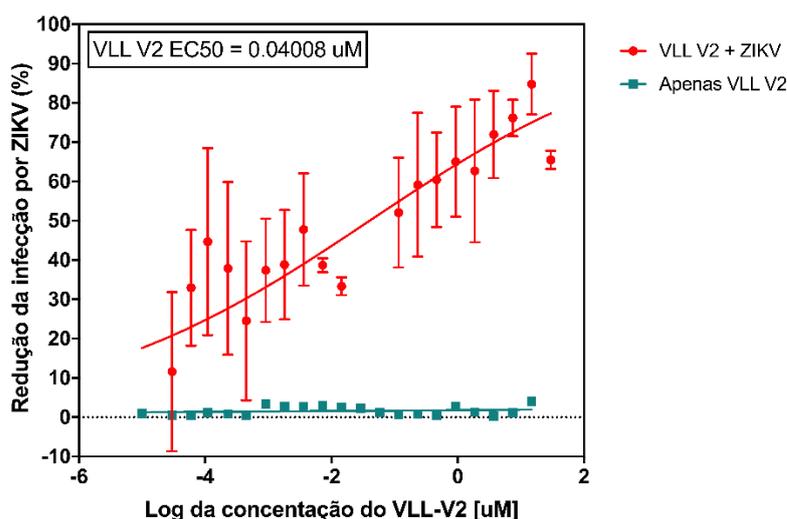


Nota: Curvas termoforéticas referentes à interação entre VLLs e a proteína do E do ZIKV marcada com fluorescência, normalizadas e plotadas em uma só representação gráfica. ΔF_{norm} : Indica a variação da fluorescência normalizada para cada proteína testada. $\text{Log}(\text{Protein concentration } [\mu\text{M}])$: Log das concentrações em micromolar das proteínas sintéticas em cada ponto da diluição. Os segmentos verticais no decorrer do gráfico indicam os desvios padrão entre as três réplicas experimentais. Fonte: A autora. Figuras produzidas a partir do GraphPad Prism v7

A partir dos resultados obtidos na MST, optou-se por dar seguimento aos experimentos somente com a proteína VLL-V2, pois, dentre as proteínas testadas, ela apresentou a maior afinidade de ligação à proteína E do ZIKV, sendo, portanto, um indicativo de maior capacidade de neutralização viral. Os dados resultantes do ensaio de microneutralização viral realizado com uma curva de diluição da proteína VLL-V2 estão plotados no gráfico apresentado na fig. 3 (curva em vermelho), onde cada ponto representa a porcentagem de redução da infecção viral acarretada por cada uma das concentrações testadas da VLL-V2 em relação ao controle positivo. Os dados referentes à placa controle, que continha apenas a diluição da VLL-V2 e as células Vero, estão plotados na curva em azul (Fig. 3) e representam a porcentagem de detecção de partículas virais, assumindo o controle positivo como 100%. Tendo em

vista que o aumento de detecção de partículas virais na placa controle – onde o ZIKV está ausente - indicaria a ocorrência de reações inespecíficas ou de eventuais contaminações, podemos observar na curva referente à placa controle que não houve reação inespecífica aparente entre a proteína VLL-V2 e os anticorpos do ensaio (Fig. 3). Com os dados obtidos no ensaio de microneutralização em placa, foi calculado que a proteína VLL-V2 foi capaz de neutralizar a infecção por ZIKV *in vitro* com uma concentração de eficiência (EC₅₀) de aproximadamente 0.04 µM.

Fig. 3 Perfil de neutralização de ZIKV por meio da proteína VLL-V2



Nota: A porcentagem de redução da infecção por ZIKV *in vitro* quando incubada com VLL-V2 pode ser observada na curva em vermelho. Cada ponto da curva representa uma concentração da proteína que foi incubada com 312,5 PFU do ZIKV e com células Vero (concentração máxima de VLL-V2 na curva: 29,7 µM). Os segmentos verticais no gráfico representam os desvios padrão entre as três réplicas de cada ponto. A partir da curva teste, foi possível calcular a concentração de eficiência (EC₅₀) da proteína VLL-V2 para neutralização viral. A curva em azul representam a OD_{450nm} da placa controle. ZIKV: *Zika vírus*. Fonte: A autora.

4 DISCUSSÃO

Devido à co-circulação de flavivírus no país, faz-se necessário o desenvolvimento de propostas de diagnóstico diferencial, assim como de terapias seguras, que não acarretem uma amplificação da infecção dependente de anticorpos, fenômeno comum entre os flavivírus (PRIYAMVADA et al., 2017). Portanto, na busca por estratégias diagnósticas e terapêuticas para o ZIKV, o principal fator a ser considerado é a reatividade cruzada com outros vírus da mesma família, principalmente com o DENV, e as possíveis consequências dessa inespecificidade (ROGERS et al., 2017; CAMPOS et al., 2018). Nesse contexto, três proteínas previamente idealizadas,

direcionadas ao epítopo específico LR-DIII foram, neste trabalho, desenvolvidas *in vitro*.

Cepas de *E. coli* são os microrganismos mais tradicionalmente utilizados para a síntese de proteínas recombinantes, pois apresentam rápido crescimento e tolerância a diferentes meios de cultivo. Apesar de serem amplamente utilizadas na expressão de genes heterólogos, é comum que ocorram problemas na produção dessas proteínas, como por exemplo, agregação proteica no interior das células e morte celular devido a citotoxicidade das proteínas expressas (ROSANO et al., 2019; BHATWA et al., 2021). Além disso, uma vez que o gasto energético celular é direcionado para a expressão do gene heterólogo, podem ocorrer modificações nos parâmetros fisiológicos da célula, como supressão de vias celulares importantes e diminuição da taxa de crescimento celular, reduzindo o rendimento proteico final (TEROL et al., 2021). Atualmente existem diferentes cepas de *E. coli* modificadas geneticamente a fim de melhorar a expressão das proteínas heterólogas. Dentre elas, as células competentes de *E. coli* BL21 Star™ (DE3) pLysS, empregadas no estudo, são amplamente utilizadas para a expressão de proteínas a partir de genes inseridos em vetores pET (GOPAL et al., 2013), pois aumentam o rendimento proteico, contornando problemas como a toxicidade e a redução da produção proteica por morte ou fadiga celular (KAUR et al., 2018). Adicionalmente, o IPTG é adicionado na fase exponencial do crescimento celular (OD_{600nm} entre 0,5 e 0,8) para dar início à expressão das proteínas sintéticas heterólogas, garantindo o aumento rendimento proteico final. Tendo em vista que a síntese proteica ocorreu com sucesso (Fig. 1), as proteínas foram testadas quanto à interação com a proteína E do ZIKV.

A afinidade de ligação encontrada para a proteína VLL-V2 (K_D : 7,8 nM) foi semelhante ao resultado encontrado por ZHAO e colaboradores (2016) para o mAb ZV-67, anticorpo no qual as proteínas VLL foram baseadas. Esses autores demonstraram que o mAb ZV-67 foi capaz de se ligar ao domínio III da proteína E com uma constante de dissociação de $8,8 \pm 1,7$ nM (ZHAO et al., 2016). Além do ZV-67, outros mAbs direcionados ao mesmo epítopo (LR-DIII) demonstraram afinidades de ligação semelhantes às encontradas no presente estudo, como, por exemplo, o mAb ZKA190 que apresentou um K_D de 9,3 nM em ensaios com a proteína E recombinante, assim como o mAb ZIKV-116 que apresentou um K_D de 1,15 nM e 2,24 nM ao interagir com o domínio DIII recombinante nos pHs 7,4 e 5,5, respectivamente (WANG et al., 2017; ZHAO et al., 2019).

Adicionalmente, como demonstrado nos nossos resultados, a proteína VLL-V2 foi capaz de neutralizar a infecção por ZIKV *in vitro* com uma EC₅₀ de aproximadamente 0.04 µM. Estudos prévios demonstram que anticorpos monoclonais direcionados ao mesmo epítipo que as proteínas aqui testadas foram capazes de neutralizar infecções por ZIKV em ensaios *in vitro* e *in vivo* (ZHAO et al., 2016; WANG et al., 2016; WANG et al., 2017)

5 CONCLUSÕES

Todas as proteínas previamente desenvolvidas *in silico* foram sintetizadas com sucesso em células procarióticas e avaliadas quanto à interação com a proteína E do ZIKV. A proteína sintética VLL-V2 apresentou uma maior afinidade de ligação à proteína E quando comparada às proteínas VLL-V3 e VLL-V4, se assemelhando às afinidades apresentadas por anticorpos neutralizantes já descritos na literatura. Em ensaios *in vitro*, foi evidenciado que a proteína VLL-V2 apresentou também atividade neutralizante da infecção para a cepa PE243 do ZIKV. Em suma, pudemos observar que a VLL-V2, uma das proteínas aqui desenvolvidas, apresenta alta afinidade de ligação à proteína do envelope do ZIKV, assim como potencial de neutralização da infecção viral *in vitro*. Portanto, tendo em vista os resultados obtidos, a proteína sintética VLL-V2 apresenta-se como alternativa no desenvolvimento de novas propostas de diagnóstico e terapias anti-Zika, sendo necessário o desenvolvimento de estudos adicionais para avaliá-la quanto à especificidade ao ZIKV e à capacidade de neutralização viral *in vitro* e *in vivo*.