

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
MESTRADO ACADÊMICO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE**

CATARINA MARIA CATALDI SABINO DE ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DA IMUNORREATIVIDADE DE APTÂMEROS PROTEICOS
ESPECÍFICOS CONTRA EPÍTOPOS DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES DO
VÍRUS ZIKA**

**Recife
2019**

CATARINA MARIA CATALDI SABINO DE ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DA IMUNORREATIVIDADE DE APTÂMEROS PROTEICOS
ESPECÍFICOS CONTRA EPÍTOPOS DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES
DO VÍRUS ZIKA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Dr. Roberto Dias Lins Neto

Co-orientadora: Dr^a. Isabelle Freire Tabosa Viana

RECIFE

2019

Catálogo na fonte: Biblioteca do Instituto Aggeu Magalhães

A663a Araújo, Catarina Maria Cataldi Sabino de.

Avaliação da imunorreatividade de aptâmeros proteicos específicos contra epítomos de anticorpos neutralizantes do vírus Zika / Catarina Maria Cataldi Sabino de Araújo. - Recife: [s.n.], 2019.

101 p. : il., graf. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2019.

Orientador: Roberto Dias Lins Neto;
coorientadora: Isabelle Freire Tabosa Viana.

1. Zika virus. 2. Diagnóstico. 3. Antígeno. I. Lins Neto, Roberto Dias. II. Viana, Isabelle Freire Tabosa. II. Título.

CDU 578

CATARINA MARIA CATALDI SABINO DE ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DA IMUNORREATIVIDADE DE APTÂMEROS PROTEICOS
ESPECÍFICOS CONTRA EPÍTOPOS DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES DO
VÍRUS ZIKA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências, tendo como banca examinadora:

Aprovado em: 29/10/2019

BANCA EXAMINADORA

Rafael Dhalia

Departamento de Virologia, Instituto Aggeu Magalhães

Carlos Henrique Bezerra da Cruz

King's College London

Roberto Dias Lins Neto

Departamento de Virologia, Instituto Aggeu Magalhães

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente, aquilo que gosto confortavelmente de chamar de Deus. Não sei até que ponto tenho uma fé tradicional, tenho minha própria maneira de acreditar e interpretar certas coisas do mundo ao meu redor, e gosto disso, pois ela é toda minha.

Agradeço principalmente aos meus orientadores, que foram exatamente aquilo que se espera de quem se dispõe a ensinar e criar uma equipe na vida científica. Sempre foi óbvia a minha admiração e respeito pelo que Roberto é como profissional e pessoa. E deixo aqui registrado algumas das frases que me estimularam a continuar nesse caminho: "Catarina, qual o KD?", "Enjoy the process!", "Cadê os resultados fantásticos?". Obrigada por escutar minhas dúvidas.

A pessoa de quem mais precisei nesse mestrado inteiro, sem dúvida, foi Isabelle Viana. Acredito que muito do que progredi nessa caminhada devo aos seus inúmeros ensinamentos. Você é uma cientista que eu tenho como referência e apreciei muito ser orientada por alguém tão competente.

Não posso deixar de dedicar um parágrafo a Bruno Leite, meu irmão científico, que começou comigo e esteve junto a mim sempre que foi possível, nos nossos progressos/percalços/dúvidas/ideias/produtividade. Saiba que você é um cientista de verdade e é alguém de quem eu espero muito, com expectativa mesmo. Eu te quero gigante!

Agradeço também a toda equipe computacional, principalmente a Carlos pelo desenvolvimento dos aptâmeros computacionais que utilizei no meu projeto, além de toda solicitude. Outra pessoa que foi fundamental no meu desenvolvimento, foi Matheus Ferraz, uma pessoa que trago na minha vida além da rotina laboratorial, por me ajudar nos conceitos químicos, além de deixar muito dos meus dias mais leves com o jeitinho somente dele. A Danilo Coêlho por nunca me negar ajuda. Obrigada a todo o pessoal da equipe de Roberto, Madson, Marjorie, Camila, João, Júlio e Fernando, além da equipe IAM. Aos outros companheiros que ganhei ou aprofundei laços nesse período de dois anos, agradeço à Ana Beatriz e Marília como pessoas que me fazem muito bem. Além de agradecer a Daniele Mendes e Otávio Carvalho, pessoas cujas instruções levo a sério.

Agradeço também aqueles que estão comigo pra qualquer coisa na vida, as minhas pessoas prediletas no mundo: mainha (Geonice), painho (Marconde) e meu irmão (Bruno). Vocês são a base que me permite seguir em frente, são aqueles que me enchem de amor e que despertam em mim o mais nobre sentimento de retribuição. Ter vocês é o que há de mais importante, no sentido absoluto da palavra.

Às minhas melhores amigas Elys e Elidianne, a primeira que conseguiu ser presente e companheira ao extremo, mesmo tendo que conciliar um mestrado e uma pós-graduação em SP. A outra em SP, demonstrando que distância nenhuma abala o que seguimos construindo. Eu compartilho toda a felicidade com vocês porque tem gente que é insubstituível e vocês pertencem a esse grupo.

Agradeço à FACEPE pelo fomento e à Fiocruz-PE por toda a infraestrutura. Agradeço aos professores, colegas de turma e de laboratório que influenciaram direta ou indiretamente na minha formação. Agradeço também à equipe de segurança, recepção, esterilização e limpeza do Instituto, que tantas vezes me auxiliaram.

*“Tornamos nosso mundo significativo
pela coragem de nossas perguntas e
pela profundidade de nossas respostas.”*

(Carl Sagan)

ARAÚJO, Catarina Maria Cataldi Sabino de. **Avaliação da Imunorreatividade de Aptâmeros Proteicos Específicos Contra Epítomos de Anticorpos Neutralizantes do Vírus Zika**. 2019. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2019.

RESUMO

O crescimento vertiginoso de casos de microcefalia nos últimos anos, estão diretamente relacionados aos casos infecção pelo vírus Zika (ZIKV). Em dissonância a sua relevância para a saúde pública, estratégias eficientes de diagnóstico, terapia e prevenção encontram-se escassas. Diante desse cenário, somando-se a inesperada transmissão sexual, faz-se fundamental o direcionamento de esforços técnico-científicos para o desenvolvimento de soluções. Uma etapa crítica na elaboração de estratégias diagnóstico-terapêuticas efetivas, inclui a identificação e caracterização de anticorpos neutralizantes de alta afinidade, que podem ser usados no desenvolvimento de testes sensíveis e específicos para reconhecimento do ZIKV no sêmen e, devido a sua capacidade de bloqueio da infecção, servir como componente de uma formulação vacinal. Devido ao custo, dificuldades de produção e seleção desses, uma nova ferramenta biofarmacêutica tornou-se notória: os aptâmeros proteicos, moléculas sintéticas cujas propriedades físico-químicas podem ser moduladas. O atual projeto, utilizou-se de duas estratégias para a construção dos aptâmeros, ambas baseadas no parátipo do anticorpo monoclonal (mAb) 2A10G6 (pan Flavivírus) frente a um epítipo de anticorpo neutralizante da proteína E (alça de fusão), visando a detecção da proteína alvo e bloqueio da infecção viral. A primeira geração não demonstrou o comportamento esperado, apresentando-se insolúvel devido à desestabilização do seu núcleo hidrofóbico. Na segunda plataforma, três aptâmeros foram expressos, purificados e testados através de ensaios de termoforese em microescala (MST). Dois deles apresentaram afinidades na ordem de micromolar e um terceiro em nanomolar. Portanto, é possível inferir que o último é um potencial candidato para o diagnóstico de ZIKV em amostras de sêmen, sendo necessária a validação através de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), podendo também servir para o desenvolvimento de uma plataforma vacinal neutralizante.

Palavras-chave: ZIKV. Imunorreatividade. Aptâmeros.

DeSC: Zika virus. Diagnóstico. Antígeno.

ARAÚJO, Catarina Maria Cataldi Sabino de. **Evaluation of Immunoreactivity of Protein-Specific Aptamers Against Zika Virus Neutralizing Antibody Epitopes.** 2019. Dissertation (Master Degree in Biosciences and Biotechnology)
– Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2019.

ABSTRACT

The vertiginous growth of microcephaly cases in recent years, are directly related to cases of Zika virus infection (ZIKV). In dissonance of their relevance to public health, efficient strategies for diagnosis, therapy and prevention are scarce. Faced with this scenario, adding to the unexpected sexual transmission, it is essential to direct technical and scientific efforts to develop solutions. A critical step in the development of effective diagnostic-therapeutic strategies, includes the identification and characterization of high-affinity neutralizing antibodies, which can be used in the development of sensitive and specific tests for recognition of ZIKV in semen and, due to its ability to block infection, serve as a component of a vaccine formulation. Due to the cost, difficulties of production and selection of these, a new biopharmaceutical tool has become notorious: protein aptamers, synthetic molecules whose physical-chemical properties can be modulated. The current project used two strategies for the construction of aptamers, both based on the monoclonal antibody (mAb) 2A10G6 (pan Flavivirus) against a protein E neutralizing antibody epitope (fusion loop), aiming at the detection of the target protein and blocking viral infection. The first generation did not demonstrate the expected behavior, being insoluble due to the destabilization of its hydrophobic nucleus. On the second platform, three aptamers were expressed, purified and tested using microscale thermophoresis (MST) assays. Two of them showed affinities in the order of micromolar and a third in nanomolar. Therefore, it is possible to infer that the latter is a potential candidate for diagnosis of ZIKV in semen samples, requiring validation through enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), which can also serve to develop a neutralizing vaccination platform.

Key words: ZIKV. Immunoreactivity. Aptamers.

DeSC: Zika Virus. Diagnosis. Antigens.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Organização gênica e zonas de clivagem da poliproteína do ZIKV..... 22
- Figura 2** - Positividade do ZIKV em diferentes fluidos biológicos em função do tempo..... 26
- Figura 3** - Principais parâmetros na escolha dos modelos de simulação molecular 33
- Figura 4** - Proteína E do ZIKV dimérica, destacando-se os 3 domínios..... 37
- Figura 5** - Comparação de sequências da alça de fusão de Flavivírus e identidade da proteína E de ZIKV e DENV-2..... 37
- Figura 6** - Estratégia computacional baseada no parátipo completo do mAb 2A10G6. 47
- Figura 7**- Diagrama esquemático da metodologia computacional utilizada na obtenção dos aptâmeros proteicos de segunda geração..... 48
- Figura 8** - Organização esquemática das quatro proteínas oriundas da remodelagem do parátipo do mAb 2A10G6..... 58
- Figura 9** - Análise da pureza dos vetores comerciais e da identidade dos genes otimizados correspondentes aos aptâmeros produzidos..... 60
- Figura 10** - Verificação da integridade e da identidade das sequências correspondentes à primeira geração do ZIKABlocker..... 61
- Figura 11** - Avaliação da eficiência de expressão e purificação da proteína ZikaBlocker_Linker1..... 62
- Figura 12** - Organização esquemática das quatro proteínas oriundas do transplante do motivo de interação para construção da segunda geração de aptâmeros..... 64
- Figura 13** - Análise da pureza dos vetores comerciais e da identidade dos genes otimizados correspondentes às proteínas: ZikaBlocker3ICH, ZikaBlocker_3AP5, ZikaBlocker_4P01, ZikaBlocker_1J2A..... 66

Figura 14 - Etapas de purificação automatizada do aptâmero ZikaBlocker_3ICH e avaliação da eficiência de expressão e purificação.....	68
Figura 15 - Etapas de purificação automatizada do aptâmero ZikaBlocker_1J2A e avaliação da eficiência de expressão e purificação.....	69
Figura 16 - Etapas de purificação automatizada do aptâmero ZikaBlocker_3AP5 e avaliação da eficiência de expressão e purificação.....	70
Figura 17 - Análise comparativa dos perfis de curva e das constantes de afinidade dos aptâmeros engenheirados.....	72
Figura 18 - Análise comparativa dos perfis de curva e das constantes de afinidade dos aptâmeros ZB_3AP5 em diferentes temperaturas.....	73
Figura 19 - Análise da constante de afinidade do mAb 4G2 frente à proteína do E do ZIKV.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APS	Persulfato de Amônio
C	Capsídeo
CHIKV	Vírus Chikungunya
CZS	Síndrome Congênita do Vírus ZIKA
D	Domínio
CDC	Centro de Prevenção e Controle de Doenças
CO ₂	Gás Carbônico
DENV	Vírus da Dengue
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DO	Densidade Óptica
E	Envelope
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
FBS	Soro Bovino Fetal
GBS	Síndrome de Guillain Barré
IPTG	Isopropil β-D-1 Tiogalactopiranosídeo
JEV	Vírus da Encefalite Japonesa
Kpb	kilopares de base
LB	Luria-Bertani
M	Membrana
mAb	Anticorpo Monoclonal
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MPM	Marcador de peso molecular
MST	Termoforese em Microescala
nAb	Anticorpo Neutralizante
NaCl	Cloreto de Sódio
NS	Não-Estrutural
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	Quadro Aberto de Leitura
pb	Pares de Base
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PDB	Banco de Dados de Proteína
PFU	Unidade Formadora de Placa
PRNT	Teste de Neutralização por Redução de Placa

prM	Pré-Membrana
PROSS	Balcão de Recuperação de Proteínas
RMSD	Desvio Quadrático Médio
RMSF	Flutuação Quadrática Média
RNA	Ácido Ribonucléico
RPM	Rotações por Minuto
RT-LAMP	Transcrição Reversa por Amplificação Isotérmica Mediada por Alça
RT-qPCR	Transcrição Reversa Quantitativa em Cadeira da Polimerase
RU	Unidades do Rosetta
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SNC	Sistema Nervoso Central
SMC	Síndrome de Microcefalia Congênita
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TEBV	Vírus da Encefalite do Carrapato
SOC	Meio Super Ótimo
TAE	Tampão TRIS-Acetato-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
TORCH	Toxoplasma gondii, outros vírus relacionados, rubéola, citomegalovirus e herpes
UTR	Regiões Não-Traduzidas
OMS	Organização Mundial da Saúde
WNV	Vírus do Oeste do Nilo
YFV	Virus da Febre Amarela
ZB	ZikaBlocker
ZIKV	Vírus da ZIKA

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
2.1 O VÍRUS ZIKA.....	21
2.1.1 Organização gênica e estrutural.....	21
2.1.2 Isolamento viral e distribuição geográfica.....	22
2.1.3 Biogênese viral.....	23
2.1.4 Filogenia.....	24
2.1.5 Transmissão e persistência em fluidos biológicos.....	24
2.1.6 Patogênese.....	26
2.1.7 Manifestações clínicas associadas ao ZIKV.....	27
2.1.8 Diagnóstico sorológico e molecular.....	28
2.1.9 Novas plataformas diagnósticas e terapêuticas.....	30
2.2 ENGENHARIA DE PROTEÍNAS.....	31
2.2.1 Simulações computacionais.....	32
2.2.1.2 <i>Campo de força</i>	33
2.2.1.3 <i>Dinâmica molecular</i>	34
2.2.1.4 <i>Engenharia computacional de proteínas</i>	34
2.2.2 Desenho computacional aplicado ao desenvolvimento de aptâmeros neutralizantes do ZIKV.....	35
2.2.2.1 <i>Proteína do envelope: principal região antigênica</i>	36
2.2.2.2 <i>Perfil neutralizante do anticorpo monoclonal 2A10G6</i>	38
2.2.3 Aptâmeros: alternativa para uso de anticorpos.....	39
2.2.4 Aplicação da engenharia de proteínas na produção de aptâmeros proteicos baseados no mAb 2A10G6.....	40

2.2.5 Obtenção experimental dos aptâmeros proteicos através de sistema de expressão procarioto.....	41
2.3 TERMOFORESE EM MICROESCALA.....	42
3 JUSTIFICATIVA.....	44
4 OBJETIVO GERAL.....	45
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
5. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	46
5.1 DESENHO DOS APTÂMEROS PROTEICOS CARREANDO OS RESÍDUOS DO SÍTIO DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO CRÍTICOS PARA INTERAÇÃO ENTRE O mAb 2A10G6 E A PROTEÍNA E DE ZIKA.....	46
5.1.1 Estratégia A.....	46
5.1.2 Estratégia B.....	47
5.2 OBTENÇÃO EXPERIMENTAL DOS APTÂMEROS ENGENHEIRADOS.....	50
5.2.2 Transformação bacteriana por choque térmico.....	50
5.2.3 Preparação de DNA plasmidial em pequena e média escala.....	51
5.2.4 Digestão de DNA por enzimas de restrição.....	51
5.2.5 Eletroforese de DNA em gel de agarose.....	52
5.2.6 Clonagem dos genes codificando para as proteínas desenhadas no vetor de expressão procariótico.....	52
5.2.7 Expressão de proteínas em larga escala em <i>E. coli</i> e purificação por cromatografia de afinidade.....	53
5.2.8 Purificação por exclusão de tamanho e troca de tampão em coluna de gel filtração.....	53
5.2.9 Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	54
5.3 TERMOFORESE EM MICROESCALA PARA AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE PARES MOLECULARES.....	55
5.3.1 Marcação da proteína E com fluoróforo RED-NHS-647 (NanoTemper Technologies).....	55

5.3.2 Obtenção das constantes de afinidade dos aptâmeros de segunda geração frente à proteína E conjugada ao Fluoróforo RED-HS-647.....	56
6. RESULTADOS.....	58
6.1 ESTRATÉGIA A: MODELAGEM DAS REGIÕES HIPERVARIÁVEIS DO mAb 2A10G6.....	58
6.1.1 Clonagens dos genes codificando para as proteínas da estratégia A, expressão e purificação do ZikaBlocker_Linker1.....	59
6.2 ESTRATÉGIA B: TRANSPLANTE DOS RESÍDUOS MAIS CONTRIBUTIVOS PARA A LIGAÇÃO DO mAb 2A10G6 À ALÇA DE FUSÃO PARA PROTEÍNAS SUPORTE.....	63
6.2.1 Confirmação da identidade de sequência dos genes sintéticos em vetor de expressão procariótico.....	64
6.2.2 Expressão e purificação das proteínas ZikaBlocker_3ICH, ZIKABlocker_1J2A e ZikaBlocker_3AP5.....	67
6.3 OBTENÇÃO DAS CONSTANTES DE DISSOCIAÇÃO (KD) DOS APTÂMEROS ZIKABLOCKER_3ICH, ZIKABLOCKER_1J2A, ZIKABLOCKER_3AP5 E mAb 4G2 FRENTE À PROTEÍNA DO ENVELOPE	71
6.3.1 Análise comparativa das constantes de dissociação dos aptâmeros ZikaBlocker_3ICH, ZikaBlocker_1J2A ZikaBlocker_3AP5 frente à proteína E à temperatura ambiente.....	71
6.3.2 Análise comparativa da variação das constantes de dissociação do aptâmero ZikaBlocker_3AP5 quando analisadas à temperatura ambiente (TA) e à 37°C frente à proteína E.....	72
6.3.3 Obtenção da constante de dissociação do mAb 4G2 frente à proteína E.....	73
7 DISCUSSÃO.....	75
8 CONCLUSÃO.....	79
9 PERSPECTIVAS.....	80
REFERÊNCIAS.....	81
ANEXO A - FIGURA 1.....	98

ANEXO B - FIGURA 2.....	99
ANEXO C - FIGURA 3.....	100
ANEXO D - FIGURA 4.....	101

1 INTRODUÇÃO

O primeiro caso de infecção pelo vírus Zika (ZIKV - *Zika virus*, tradução do inglês) no Brasil, foi registrado em abril de 2015 e, desde então, esta pandemia tem sido associada a relatos sem precedentes de distúrbios neurológicos variando desde a síndrome de Guillain-Barré à microcefalia (BARRETO *et al.*, 2016; BRASIL *et al.*, 2016; DICK, 1952; DICK *et al.*, 1952; LIANG *et al.*, 2016; MARTINES, *et al.*, 2016). O mosquito *Aedes aegypti* tem sido descrito como o principal vetor do vírus. Diferentemente de outros Flavivírus, outras formas de transmissão viral tem sido descritas, dentre elas a transmissão vertical e sexual (DAVIDSON *et al.*, 2016; DECKARD *et al.*, 2016; MUSSO, 2019). A severidade clínica associada à infecção por ZIKV combinada à inesperada transmissão vertical e sexual, configuram-se como um desafio para as comunidades médica e científica. Diante deste quadro, o desenvolvimento de estratégias capazes de monitorar e conter a propagação desta infecção viral são uma prioridade de saúde pública.

O genoma de ZIKV contém um único quadro aberto de leitura (ORF - *open reading frame*, tradução do inglês) que codifica para três proteínas estruturais (capsídeo – C, pré-membrana/membrana – prM/M e envelope – E) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (KUNO; CHANG, 2007). As proteínas de superfície, ou do envelope, do vírus são as mais antigênicas e consideradas as melhores candidatas para imunização (SHAWAN *et al.*, 2014), contudo, ainda não há vacinas profiláticas ou terapêuticas disponíveis. Similarmente, não há fármacos ou tratamento antiviral específico para infecções por ZIKV.

Dentre as vacinas em desenvolvimento, pode-se destacar a vacina de vírus inativado purificado (ZPIV - *Zika Virus Purified Inactivated Vaccine* - tradução do inglês), que tem mostrado proteção completa frente ao desafio com as cepas selvagens SPH2015 ou PRVABC59 em camundongos imunocompetentes (LAROCCA *et al.*, 2016) e primatas não-humanos (ABBINK *et al.*, 2016). Além desta, duas vacinas baseadas em DNA também vem demonstrando eficácia, são elas: VRC5283 e VRC5288, que apresentam desenho vacinal semelhante ao que já foi proposto para outros Flavivírus, como o vírus da Encefalite Japonesa (JEV – *Japanese Encephalitis virus*, tradução do inglês) (LEDGERWOOD *et al.*, 2011). A primeira compreende a região prM–E completa da cepa ZIKV H/PF/2013 associada às regiões transmembranares do JEV (DOWD *et al.*, 2016). Ambos os plasmídeos

foram tolerados por camundongos adultos saudáveis, com produção de resposta celular e humoral neutralizante. Nos estudos em primatas não-humanos, a vacina VRC5283 mostrou maior eficácia na indução de resposta imune humoral e celular (GAUDINSKI *et al.*, 2018). Com base nos resultados obtidos, a vacina VRC5283 avançou para a segunda fase de estudo clínico, com desenho do estudo amplo, composto de 140 focos de recrutamento, objetivando a avaliação imunogenicidade, eficácia e segurança da administração do conteúdo vacinal em populações de regiões endêmicas. (DIAMOND *et al.*, 2019).

Contudo, uma vacina capaz de interromper os efeitos imunopatogênicos da infecção por ZIKV, bem como proteger o feto e evitar os efeitos neurológicos, ainda não encontra-se disponível (PIERSON; GRAHAM, 2016). Frente à inexistência de estratégias vacinais comercialmente disponíveis, o diagnóstico inequívoco da infecção por ZIKV permanece como a principal ferramenta de controle da epidemia. Particularmente, diante do fato de que o material genético do vírus permanece no sêmen em altas concentrações (até 10^4 cópias de RNA/mL, até 141 dias pós-infecção) (ABBINK *et al.*, 2016; MANSUY; SUBERBIELLE, *et al.*, 2016b), e foi possível detectar o vírion infectivo por 12 dias em média (e um máximo de 69 dias) pós-infecção (COUNOTTE *et al.*, 2018), o desenvolvimento de vacinas profiláticas ou terapêuticas e de um diagnóstico pré-natal da infecção do ZIKV no homem são essenciais no combate à infecção do feto.

Uma importante etapa para o desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico e antígenos vacinais é a identificação e caracterização de epítomos de anticorpos neutralizantes (nAbs – *neutralizing antibodies*, tradução do inglês) de alta afinidade. Estes anticorpos são fundamentais para a proteção contra infecção por Flavivírus e são considerados correlatos de proteção no contexto de desenvolvimento de vacinas (BELMUSTO-WORN *et al.*, 2005; HEINZ *et al.*, 2007). A proteína E do ZIKV é considerada o alvo antigênico primário dos anticorpos neutralizantes anti-ZIKV descritos até o momento e é dividida em três domínios: um domínio central β -barril (domínio I [DI]) envolvido nas mudanças conformacionais requeridas para entrada viral na célula alvo; um domínio estendido de dimerização (DII), o qual contém a alça de fusão, estrutura envolvida em interações com receptores celulares e contribui para o processo de fusão com a célula hospedeira (FRITZ *et al.*, 2011); e um seguimento semelhante à imunoglobulina (DIII), o qual está envolvido na ligação aos receptores celulares (DAI *et al.*, 2016; MODIS *et al.*, 2003). Os três domínios da

proteína da E compartilham 35%, 51% e 29% de identidade entre ZIKV e DENV, respectivamente (FRITZ *et al.*, 2011). Dados estruturais referentes à estrutura dimérica da proteína E revelam que a maioria dos resíduos acessíveis à ligação de anticorpos estão localizados no domínio DII, particularmente na alça de fusão e regiões vizinhas (STETTLER *et al.*, 2016).

Uma vez que não há relatos de transmissão sexual relacionada a outros Flavivírus (ou da presença destes em sêmen), anticorpos neutralizantes de alta afinidade dirigidos contra a proteína E de ZIKV podem ser usados como insumos em ensaios de detecção viral em sêmen com alta sensibilidade e especificidade. Similarmente, o uso destes anticorpos visando à inibição da replicação viral e consequente neutralização e/ou proteção contra a infecção pode servir como base para uma formulação vacinal.

Como alternativa ao uso de anticorpos inteiros (que tem como principais desvantagens: alto custo de produção, dificuldade na seleção em virtude das múltiplas colônias geradas, necessidade de participação animal e imunogenicidade (BIRCH; RACHER, 2006; JAYASENA, 1999; IRESON; KELLAND, 2006), aptâmeros têm surgido como plataforma biotecnológica para finalidades terapêuticas e de identificação molecular. Estas moléculas podem ser de natureza nucleotídica ou peptídica e, dentre as inúmeras vantagens dos aptâmeros em relação aos anticorpos estão: a possibilidade de otimizar as taxas de afinidade e especificidade e a possibilidade de produção através de expressão heteróloga em procaríotos, reduzindo custos e aumentando a eficiência de produção. Também conhecidos como anticorpos artificiais, essas moléculas são capazes de se ligar especificamente e com alta afinidade, a uma proteína alvo ao nível intracelular. Além disso, a engenharia de proteínas permite ainda o desenvolvimento de moléculas com alta estabilidade termodinâmica, aumentando a vida média das mesmas e facilitando sua manipulação em laboratório.

Neste projeto, postulou-se que aptâmeros proteicos desenvolvidos computacionalmente contra epítomos de anticorpos neutralizantes de ZIKV presentes na proteína E são i) capazes de reconhecer o epítomo alvo na proteína E com alta afinidade, e ii) atuar bloqueando a infecção viral a nível celular e assim interromper a propagação da mesma. Para testar nossa hipótese, nós utilizamos técnicas de engenharia computacional de proteínas para desenvolver aptâmeros proteicos de alta afinidade baseadas no parátomo do anticorpo monoclonal (mAb) 2A10G6 (pan

Flavivírus) frente ao epítipo da alça de fusão da proteína E do ZIKV, através de duas estratégias distintas, aqui denominadas A e B. O produto proteico da estratégia A não apresentou o comportamento esperado, apresentando-se insolúvel, o que impossibilitou a execução das etapas subsequentes. Após a otimização do protocolo, na estratégia B, 4 novos aptâmeros foram desenhados computacionalmente pelo Dr. Carlos Cruz, denominados ZikaBlocker_3ICH (ZB_3ICH), ZikaBlocker_1J2A (ZB_1J2A), ZikaBlocker_3AP5 (ZB_3AP5) e ZikaBlocker_4P0L (ZB_4P0L). As quatro proteínas da nova geração foram submetidas à expressão heteróloga em sistema procarioto e purificadas por cromatografia automatizada. Excetuando-se o ZB_4P0L (em virtude do seu baixo rendimento), os aptâmeros produzidos foram testados quanto à sua reatividade frente ao epítipo específico (alça de fusão) da proteína E via termoforese em microescala. Ambos os aptâmeros ZB_3ICH e ZB_1J2A apresentaram constantes de afinidade na ordem de micromolar, enquanto o ZB_3AP5 na ordem de nanomolar. Este demonstrou ainda afinidade pelo seu epítipo superior à afinidade observada pelo mAb 4G2, um anticorpo pan-flavivírus que reconhece o mesmo epítipo na proteína E e é amplamente utilizado nos estudos em arboviroses. Tendo em vista os dados obtidos, é possível inferir que o ZB_3AP5 é um potencial candidato para o diagnóstico da infecção por ZIKV em amostras biológicas e abrindo perspectivas para o desenho de novos testes diagnósticos e para a construção de uma vacina profilática ou terapêutica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Referencial teórico elaborado de modo a abranger tópicos pertinentes para o entedimento e relevância do trabalho.

2.1 O VÍRUS ZIKA

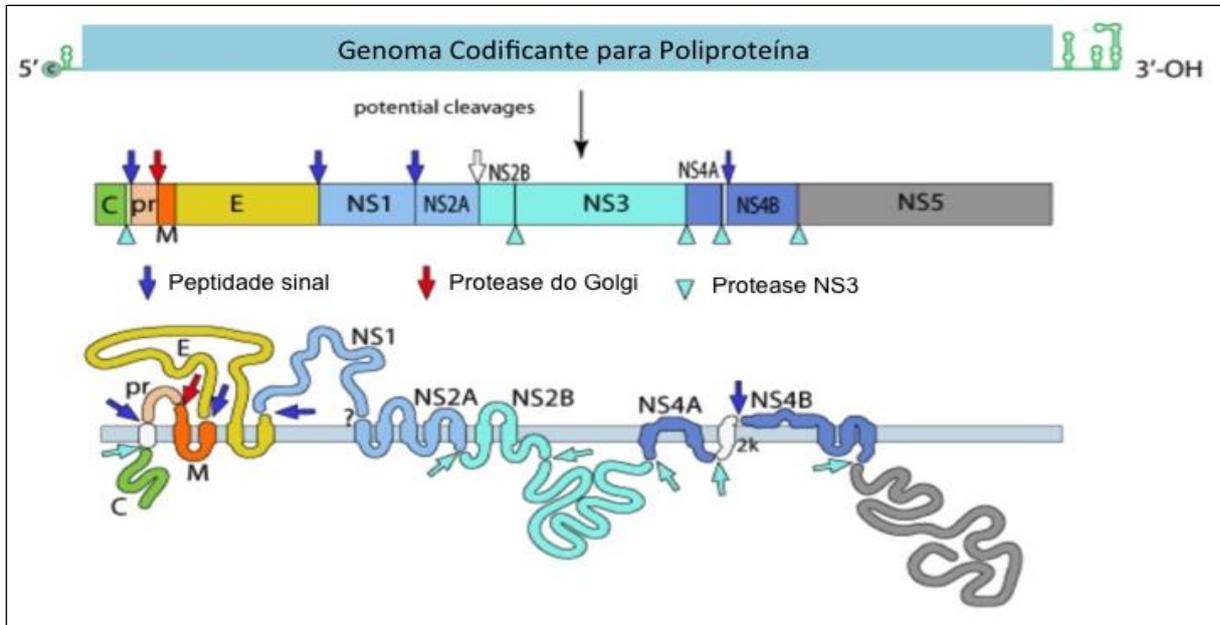
O vírus Zika (ZIKV – *Zika virus*, tradução do inglês) é um arbovírus pertencente ao gênero Flavivírus. Dentre as mais de 80 espécies compreendidas neste gênero pode-se destacar o vírus da Dengue (DENV – *Dengue virus*, tradução do inglês), vírus da Febre Amarela (YFV – *Yellow Fever virus*, tradução do inglês), vírus da Encefalite do Carrapato (TEBV – *Tick-Borne Encephalitis virus*, tradução do inglês), vírus do Oeste do Nilo (WNV – *West-Nile virus*, tradução do inglês) como agentes infecciosos de ampla importância na saúde pública (DICK *et al.*, 1952; HAYES, 2009; KUNO *et al.*, 1998; VASILAKIS; WEAVER, 2017).

2.1.1 Organização gênica e estrutural

Assim como os outros vírions (partículas infectivas de sua progênie) maduros do gênero, o ZIKV possui morfologia icosaédrica e é envelopado. O genoma viral é constituído de RNA (ácido ribonucleico) de fita simples, com aproximadamente 10,7 kpb de extensão e polaridade positiva que codifica para uma poliproteína única, cujo processamento é executado por peptidases virais e do hospedeiro a fim de ter como produto 10 proteínas: três estruturais (capsídeo – C, pré-membrana/membrana – prM/M e envelope – E) e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Figura 1). As proteínas estruturais, como o próprio nome sugere, participam dos processos de morfogênese viral e são relacionadas à entrada do vírus nas células hospedeiras e evasão da resposta imune. As proteínas não-estruturais tem papéis essenciais nos processos enzimáticos, de secreção, patogenicidade, replicação e virulência (KLEMA *et al.*, 2015; KUNO; CHANG, 2007; LINDENBACH; RICE, 2003; SIRONI *et al.*, 2016; WEAVER *et al.*, 2016). As proteínas virais são codificadas na ordem que aparecem no genoma (C-prM-E-NS1-NS2a-NS2b-NS3-NS4-NS5) flanqueadas por regiões 5' e 3' UTR (*untranslated regions*, regiões não

traduzidas, tradução do inglês) (CHAMBERS *et al.*, 1990; LINDENBACH; RICE, 2003).

Figura 1 - Organização gênica e zonas de clivagem da poliproteína do ZIKV.



Fonte: Adaptado de Viral Zone (2015, tradução nossa).

Nota: Imagem ilustrativa do genoma do ZIKV que codifica para a poliproteína do ZIKV e a ordem de codificação das mesmas. Indicados na figura também estão os sítios de corte pelas peptidases viral e do hospedeiro, com os respectivos sinais de reconhecimento para corte.

2.1.2 Isolamento viral e distribuição geográfica

O primeiro isolamento do ZIKV foi feito em soro de macacos-rhesus (*Macaca mulatta*) durante um estudo de monitoramento de febre amarela na Floresta Zika, na Uganda, em 1947 (DICK *et al.*, 1952). Após o isolamento viral, foram notificados casos em diversos países do continente Africano (FAYE *et al.*, 2014) bem como outros países do Sudeste Asiático (SAMPATHKUMAR; SANCHEZ, 2016). No ano seguinte ao primeiro isolamento viral, foi levantada a hipótese acerca da transmissão vetorial por artrópodes, devido ao isolamento do vírus em mosquitos *Aedes africanus*. A consolidação da hipótese do ZIKV como agente etiológico humano, veio através do isolamento viral a partir da amostra de uma paciente nigeriana em 1954 (MACNAMARA, 1954).

O primeiro grande surto de ZIKV ocorreu na ilha Yap, em 2007, onde foi registrado desde a ausência de sintomas a quadros variados de manifestações de caráter autolimitado (LANCIOTTI *et al.*, 2008; LESSLER *et al.*, 2016). O segundo

ocorreu 6 anos após o primeiro, na Polinésia Francesa. Nesse evento, 11,5% da população local (30.000 casos) foi infectada pelo ZIKV, que seguiu com a disseminação para outras ilhas do Pacífico. No primeiro semestre de 2015, casos começaram a ser notificados no continente Americano, na Bahia, Brasil (MUSSO, 2015; ROTH *et al.*, 2014). Segundo registros do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), até a semana epidemiológica 33 do ano de 2019, o Brasil registrou 9.813 casos prováveis (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2019).

2.1.3 Biogênese viral

Na qualidade de parasitas intracelulares obrigatórios, os vírus dependem de todo o aparato biossintético oriundo das células hospedeiras para realizar os processos de replicação e montagem dos novos vírions (NOVOA *et al.*, 2005; NETHERTON *et al.*, 2007; PAUL; BARTENSCHLAGER, 2013).

A primeira etapa no ciclo infeccioso envolve a ligação da proteína E ao receptor celular específico. Múltiplos receptores que promovem sua ligação e entrada nas células já foram descritos, visto que a infecção foi observada em múltiplas linhagens celulares oriundas de diversas espécies hospedeiras (RODENHUIS-ZYBERT *et al.*, 2010). Moléculas como heparan-sulfato e glicosaminoglicanos, amplamente distribuídos em células da linhagem neural, parecem contribuir para a ligação de vários Flavivírus, o que corrobora com a neurovirulência característica do gênero (CHEN *et al.*, 1997). Após entrada nas células hospedeiras mediadas por endocitose, o baixo pH do microambiente vesicular, desencadeia mudanças conformacionais na proteína E, incluindo o rearranjo organizacional de dímero para trímero, e culmina no evento de fusão de membranas (MODIS *et al.*, 2004), desnudamento viral e consequente liberação do genoma viral no citosol (CHU; NG, 2004; GOLLINS; PORTERFIELD, 1985).

No citoplasma, o material genético tem acesso aos complexos de replicação e tradução da célula hospedeira (KOSCHINSKI *et al.*, 2003). Os genomas recém-sintetizados são englobados no retículo endoplasmático (RE), que fornece uma plataforma de tradução e os componentes da membrana para dar origem aos vírions. Estes, em seguida, trafegam em direção às cisternas do complexo de Golgi, onde finalizam sua etapa de maturação, sendo liberados por exocitose (MACKENZIE *et al.*, 1999; MUKHOPADHYAY *et al.*, 2005).

2.1.4 Filogenia

Estudos filogenéticos, demonstraram que o ZIKV possui três linhagens distintas: da África Oriental, da África Ocidental e da Ásia (FAYE *et al.*, 2014). A análise filogenética do vírus isolado na Bahia demonstrou que as cepas circulantes nas Américas são da linhagem Asiática, estreitamente relacionada ao isolado viral do surto da Polinésia Francesa (CAMPOS *et al.*, 2015).

2.1.5 Transmissão e persistência em fluidos biológicos

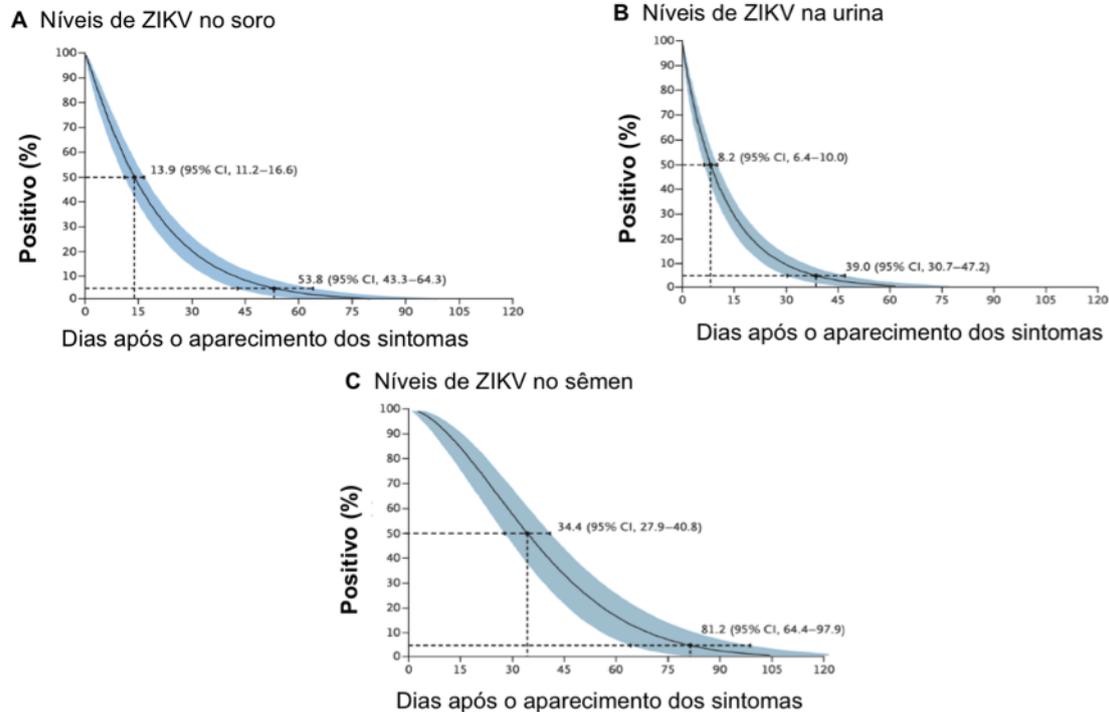
Assim como outros Flavivírus, a forma principal da transmissão do ZIKV se dá através da picada do mosquito vetor. O vírus é quase exclusivamente transmitido pelo *Aedes aegypti*, porém já foi isolado em outras espécies, como *Aedes albopictus*, *Aedes africanus* e *Aedes luteocephalus* (AZAR *et al.*, 2017; DIALLO *et al.*, 2014; GUERBOIS *et al.*, 2016). Qualquer país que possua vetores competentes para o vírus, é passível da ocorrência de surtos infecciosos com esse agente (DUFFY *et al.*, 2009). O vírus se replica no sítio de inoculação e pode se disseminar por via hematogênica (HAYES, 2009). A saliva do mosquito contém moléculas capazes de modular a resposta das células na epiderme no momento do inóculo, contribuindo para o sucesso da infecção nas células epidérmicas (BRIANT *et al.*, 2014; LAZEAR; DIAMOND, 2016).

Embora a via primária da infecção por ZIKV seja através da picada de mosquitos hematófagos previamente infectados (LESSLER *et al.*, 2016), outras vias de infecção vem sendo relatadas, destacando-se a transmissão vertical (DRIGGERS *et al.*, 2016), por transfusão sanguínea (BIERLAIRE *et al.*, 2017) e sexual (MUSSO *et al.*, 2017). Estudos realizados em humanos, primatas não-humanos e ratos, demonstraram a presença prolongada do ZIKV em sítios imunoprivilegiados tais como cérebro (BHATNAGAR *et al.*, 2017; HIRSCH *et al.*, 2017), placenta (BHATNAGAR *et al.*, 2017; YOCKEY *et al.*, 2016), olhos (HIRSCH *et al.*, 2017; HONEIN *et al.*, 2017), testículos (MA *et al.*, 2016), vesículas seminais e próstata, mesmo que não seja mais possível detectar o vírus no sangue (HIRSCH *et al.*, 2017). Dentre os fluidos biológicos, o que recebeu maior visibilidade foi o semên, visto que foi possível detectar altos valores de material genético viral (10^4 moléculas de RNA por ml) por um período de até 140 dias após o início dos sintomas (Figura 2)

(MANSUY, SUBERBIELLE, *et al.*, 2016). Estudos posteriores relatam que os primeiros dados obtidos possam ter superestimado a capacidade infectiva e persistência do ZIKV no sêmen. Segundo Counotte e seus colaboradores, o vírus mantém sua capacidade infectiva por volta de 12 dias (podendo chegar a 69 dias) no período pós-infecção (COUNOTTE *et al.*, 2018).

A presença do ZIKV no sêmen impõe mais um desafio significativo no âmbito da saúde pública, tendo em vista a comprovada teratogenicidade associada ao vírus. Dados da literatura sugerem que mais de 80% das pessoas infectadas são assintomáticas (DUFFY *et al.*, 2009), o que as torna um reservatório potencial (MANSUY, DUTERTRE, *et al.*, 2016). Portanto, as mulheres grávidas que habitam regiões endêmicas para o ZIKV devem se proteger dos mosquitos bem como da possibilidade de intercuro sexual desprotegido com parceiro contaminado. Adicionalmente, os países mais afetados pelo ZIKV têm leis que variam acerca dos direitos sexuais e reprodutivos das mulheres, o que representa mais um desafio quanto ao manejo clínico das pacientes. Novas estratégias eficientes para prevenir a gravidez indesejada e também o fornecimento de acesso fácil à contracepção ou abortos devem ser avaliadas, desde que haja o desenvolvimento de testes laboratoriais e clínicos capazes de identificar com acurácia a infecção viral do feto e o desenvolvimento de anomalias neurológicas. Essa proposta de emergência feita pela OMS (Organização Mundial da Saúde) deve ser apropriada, levando em consideração os aspectos sócio-econômicos, educacionais, sociais, jurídicos e religiosos dominantes nas regiões afetadas (MANSUY, DUTERTRE, *et al.*, 2016; ROA, 2016).

Figura 2 - Positividade do ZIKV em diferentes fluidos biológicos em função do tempo.



Fonte: Adaptada de Paz-Bailey *et al.* (2017, tradução nossa).

Nota: Gráfico comparativo evidenciando a diferença de positividade para ZIKV em diferentes amostras biológicas em função do tempo.

2.1.6 Patogênese

Flavivírus transmitidos por artrópodes podem se replicar nas células dendríticas próximas ao local de inoculação e posteriormente se disseminam pela corrente sanguínea e gânglios linfáticos (HAYES, 2009). Detalhes a cerca dos mecanismos moleculares e outros determinantes essenciais à patogenicidade, como todos os tropismos, modo de entrada, evasão do sistema imune, fatores necessários para a replicação viral, entre outros, permanecem em processo de elucidação (ZHAO *et al.*, 2016). O ZIKV apresenta comportamento intensamente neurotrópico, com particular tropismo por células progenitoras neurais, e em menor grau por células das mesmas linhagens nos demais estágios de desenvolvimento (DANG *et al.*, 2016). Com o advento da infecção viral associada ao microambiente inflamatório, é possível a ocorrência de manifestações associadas a distúrbios na embriogênese cerebral que culminem em microcefalia ou outras anormalidades neurológicas (TANG *et al.*, 2016) geradas possivelmente pela desregulação da progressão normal do ciclo celular e apoptose e interferências na neurogênese celular (GARCEZ *et al.*, 2016; LIANG *et al.*, 2016; TANG *et al.*, 2016).

2.1.7 Manifestações clínicas associadas ao ZIKV

Quando sintomáticos, os quadros infecciosos variam numa ampla gama de sintomas inespecíficos, que podem cursar com início abrupto de febre acompanhado de artralgia, cefaléia, mialgia, dor retro-orbital, conjuntivite, vômito, erupção maculopapular e fadiga (HEANG *et al.*, 2012). Estes, podem também estar relacionados a acometimentos neurológicos graves, incluindo microcefalia e síndrome de Guillain-Barré (GBS – *Guillain-Barré Syndrome*, tradução do inglês), de origem auto-imune que se caracteriza por polineuropatia e paralisia ascendente (CAO-LORMEAU *et al.*, 2016; DEL CARPIO ORANTES, 2018). A Síndrome da Zika Congênita (SZC), por sua vez, abrange gama de alterações morfofuncionais, caracterizada por problemas no desenvolvimento intelectual, deficiências visuais, auditivas e motoras (FRANCA *et al.*, 2016; MARTINES, BHATNAGAR, RAMOS, *et al.*, 2016; MLAKAR *et al.*, 2016). Nesse contexto, também foi relatada a ocorrência de abortos espontâneos e restrição de crescimento intra-uterino por insuficiência placentária (ZHAO *et al.*, 2016). A infecção pelo ZIKV em idades gestacionais tardias foi associada à menor possibilidade de baixo neurodesenvolvimento, microcefalia e perda fetal. Segundo o estudo de coorte de Nielsen-Saines e colaboradores, para cada trimestre avançado na gravidez a infecção promove 46% menos riscos associados ao ZIKV em relação ao trimestre anterior. Contudo, outras alterações, como problemas auditivos e oculares não apresentaram correlações com a idade gestacional. A modulação neuroimune do hospedeiro em resposta a infecção, por sua vez, pode exercer um papel no desenvolvimento da síndrome do espectro autista em lactentes expostos ao vírus (EINSPIELER *et al.*, 2019; NIELSEN-SAINES *et al.*, 2019; VIANNA *et al.*, 2018).

O primeiro estudo que fez a associação entre o surto de microcefalia e a epidemia de ZIKV foi realizado pelo Grupo de Pesquisa sobre a Epidemia de Microcefalia, liderado pela Dra. Celina Turchi. Um grande número de neonatos apresentou anormalidades graves do sistema nervoso central (SNC), tais como disgenesia cerebral e calcificações intracranianas consistentes com quadros de infecção intrauterina (ARAUJO *et al.*, 2018). A associação do desfecho com severas consequências no desenvolvimento do SNC, o relato de uma doença exantemática em mais da metade das mães durante o período gestacional, negatividade para outras infecções congênicas capazes de causar microcefalia e a relação temporal

com a circulação de ZIKV, foram as evidências-chave que corroboraram para a conclusão de que o vírus em questão é o agente etiológico do surto de microcefalia em Pernambuco.

A partir dessa conclusão preliminar, foi possível direcionar os esforços científicos e técnicos para a detecção do vírus em fluidos biológicos e por fim, dar mais robustez à hipótese levantada pelo grupo. Durante a busca por evidências sorológicas que comprovassem que o ZIKV era o agente causal do surto de microcefalia, foi realizada a detecção do ZIKV no líquido amniótico de duas gestantes cujos fetos eram comprovadamente microcêfalos, sugerindo, portanto, que o agente etiológico pode cruzar a barreira placentária (ARAUJO *et al.*, 2016; ARAUJO *et al.*, 2018; HAZIN *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2018). Pertinente com as evidências apuradas, o ZIKV foi incluído como membro da TORCH (Toxoplasma gondii, outros vírus relacionados, rubéola, citomegalovirus (CMV) e herpes), um grupo de patógenos capaz de cruzar a barreira placentária e causar anormalidades fetais (COYNE; LAZEAR, 2016; STEGMANN; CAREY, 2002). O vírus também foi encontrado no cérebro de neonatos, provendo a evidência final para associação do ZIKV com o surto de microcefalia (ARAUJO *et al.*, 2018). Tendo em vista a severidade clínica associada à infecção, a OMS declarou o problema como uma emergência Global de Saúde Pública em 2016 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016). E, no Brasil, o acometimento viral passou a ser notificado nos boletins epidemiológicos através da Portaria nº 204, sendo adicionada à Lista Nacional de Notificação Compulsória de Doenças, Agravos e Eventos de Saúde Pública (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2016).

2.1.8 Diagnóstico sorológico e molecular

Métodos sensíveis e seletivos para a detecção de ZIKV caracterizam um campo emergente, e apesar de todos os esforços dirigidos, até o momento, ainda não foi disponibilizado no mercado um padrão-ouro para seu diagnóstico (PAWLEY *et al.*, 2019). Várias plataformas vem sendo desenvolvidas, algumas baseadas em ácidos nucleicos, como a transcrição reversa e amplificação isotérmica mediada por alça (RT-LAMP - *Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification*, tradução do inglês), transcrição reversa quantitativa em cadeia da polimerase (RT-qPCR - *Reverse transcription polymerase chain reaction*, tradução do inglês), e

outras baseadas em ensaios de quimioluminescência, imunoabsorção enzimática e neutralização (SAFRONETZ *et al.*, 2017; SONG *et al.*, 2016; TIAN *et al.*, 2016).

Durante o período de viremia (média de cinco dias) (FONTAINE *et al.*, 2018), o material genético viral pode ser encontrado no sangue, saliva, urina e outros fluidos corporais do indivíduo logo após o início dos sintomas (FONSECA *et al.*, 2014; LANCIOTTI *et al.*, 2008; MUSSO *et al.*, 2015). Na fase aguda da infecção, é possível fazer o diagnóstico diferencial através de métodos moleculares, como RT-qPCR (KRAEMER *et al.*, 2015). O diagnóstico sorológico também pode ser realizado através da detecção de anticorpos IgM (ou IgG) anti-ZIKV através de ensaios de imuno absorção enzimática (*ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent*, tradução do inglês) e títulos de anticorpos neutralizantes por ensaios de neutralização por redução de placa (PRNT - *Plaque Reduction Neutralization Test*, tradução do inglês) para confirmar a infecção em casos negativos para RT-qPCR. No entanto, a alta reatividade cruzada entre os anticorpos contra ZIKV e outros Flavivírus dificulta a confirmação sorológica da infecção, especialmente quando há exposição prévia a outros integrantes do gênero (DUFFY *et al.*, 2009; LANCIOTTI *et al.*, 2008) .

Os ensaios que são planejados para avaliar a presença de anticorpos detectam ZIKV de forma indireta. Em resposta às infecções, o organismo humano produz imunoglobulina G (IgG) e imunoglobulina M (IgM), que podem ser utilizadas como ferramentas diagnósticas (SAFRONETZ *et al.*, 2017). Em contraste com imunoenaios indiretos, ferramentas de eletroquimioluminescência podem detectar ZIKV ativo, como foi demonstrado em alguns trabalhos (ACHARYA *et al.*, 2016; MINER *et al.*, 2016; PAWLEY *et al.*, 2019). Até o momento, o diagnóstico sorológico precisa de mais de um meio de detecção. Os testes de neutralização por redução de placa (PRNT) são frequentemente realizados para a confirmação da infecção por ZIKV. A técnica baseia-se na interação específica de anticorpos do hospedeiro (soro do paciente) e a presença do vírus. Caso os anticorpos gerados sejam neutralizantes, o vírus será incapaz de formar placas na cultura celular de escolha, resultando numa redução dos danos focais (MAEDA; MAEDA, 2013). Apesar desse ensaio fornecer informações precisas sobre a ocorrência da infecção, a execução de seu protocolo demanda muito tempo, além de alto ônus financeiro associado, não sendo um teste prático para rotinas laboratoriais (PAWLEY *et al.*, 2019).

Dada a sobreposição das regiões endêmicas para DENV e os atuais surtos epidêmicos de ZIKV, há grandes dificuldades no desenvolvimento de testes

diagnósticos diferenciais baseados na sorologia desses pacientes (DASGUPTA *et al.*, 2016). Dada a documentação de rotas não canônicas (não vetorial) de infecção por ZIKV - sendo a transmissão sexual uma das mais importantes (COUNOTTE *et al.*, 2018; DECKARD *et al.*, 2016; FOY *et al.*, 2011; HILLS *et al.*, 2016), é urgente a busca por um candidato diagnóstico com alta sensibilidade para parceiros de mulheres grávidas, bem como casais que pretendem ter filhos e doadores de bancos de sêmen, podendo contribuir significativamente para o planejamento familiar, a saúde fetal e o controle da epidemia por ZIKV.

2.1.9 Novas plataformas diagnósticas e terapêuticas

Diante do quadro deficiente de alternativas terapêuticas disponíveis, tanto no que se refere às vacinas ou tratamentos antivirais, o uso de anticorpos neutralizantes vem ganhando espaço como uma alternativa promissora, tanto no desenvolvimento de plataformas diagnósticas como intervenções profiláticas e terapêuticas para processos infecciosos em curso (PIERSON; DIAMOND, 2008; ROEHRIG *et al.*, 2001). Nas quase quatro décadas de uso de anticorpos monoclonais na clínica, é possível ver diversos avanços. O primeiro anticorpo monoclonal utilizado na clínica com objetivo terapêutico foi o Orthoclone OKT3, usado na prevenção da rejeição de transplante renal, no ano de 1986 (SMITH, 1996). O uso majoritário de anticorpos na clínica tem se voltado para o tratamento de doenças reumatóides, tratamentos oncológicos e doenças autoimunes (BECK *et al.*, 2008). O interesse progressivo e ascendente em produtos biofarmacológicos baseados em anticorpos pode ser atribuído aos inúmeros avanços científicos no entendimento dos processos patológicos ao nível molecular (BILELLO, 2005; ECKER *et al.*, 2015).

Devido a alguns inconvenientes associados ao uso e produção de anticorpos, tais como a necessidade de manuseio animal, considerável ônus financeiro e obstáculos experimentais (por exemplo, baixa tolerância pelo organismo receptor ou baixa imunogenicidade (JAYASENA, 1999)), outra plataforma biotecnológica vem ganhando notória atenção da comunidade científica: os aptâmeros proteicos. Conceito introduzido por Roger Brent, estes são biomoléculas artificiais onde uma sequência específica, geralmente a responsável pelo reconhecimento, é transferida para uma proteína suporte (COLAS *et al.*, 1996). Essas moléculas artificiais

permitem modulação de afinidade, estabilidade, solubilidade, marcação e apresentam baixo peso molecular (que pode auxiliar sua entrada em compartimentos intracelulares inacessíveis aos anticorpos por impedimento estérico), além do custo benefício associado já que pode ser produzida em sistema de expressão procariótico em detrimento aos caros hibridomas (COLOMBO *et al.*, 2015).

Frente às muitas dificuldades encontradas no desenvolvimento de moléculas para diagnóstico com qualidade e desempenho satisfatórios, a engenharia de proteínas vem surgindo como uma plataforma robusta visando à produção de substitutos de anticorpos, como os já citados aptâmeros. Essa plataforma permite uma análise sistêmica das relações estrutura-função da proteína e, baseado nesse entendimento, a possibilidade de sintetizar proteínas com atividades modificadas e/ou propriedades novas, a depender da finalidade para a qual está sendo construída (CARTER, 2011). Devido aos atributos que podem ser agregados às moléculas através da engenharia de proteínas, escolhemos essa plataforma para o desenho racional de aptâmeros candidatos capazes de reconhecer e neutralizar o ZIKV, visando sua aplicação para o possível diagnóstico em amostras de sêmen e para o desenvolvimento de estratégias vacinais.

2.2 ENGENHARIA DE PROTEÍNAS

A engenharia de proteínas é um campo emergente das biociências, onde proteínas podem ser modificadas ou mesmo criadas. Essas modificações são geradas através de alterações na sequência primária de um peptídeo ou proteína no intuito de produzir moléculas mais adequadas aos objetivos propostos (ENGQVIST; RABE, 2019). A função de uma proteína é extensivamente coordenada por sua estrutura (SAMISH *et al.*, 2011). Em reconhecimento aos progressivos avanços no campo da biologia estrutural e sua importância em múltiplos campos da ciência, foi criado em 1971, o Banco de Dados de Proteínas (PDB - *Protein Data Bank*, tradução do inglês) (BERNSTEIN *et al.*, 1977) e estabelecido mundialmente em 2003. Esta plataforma é composta por coordenadas cartesianas que descrevem as posições atômicas de estruturas de proteínas e ácidos nucleicos construídos com base na interpretação dos resultados experimentais de técnicas como cristalografia de Raios-

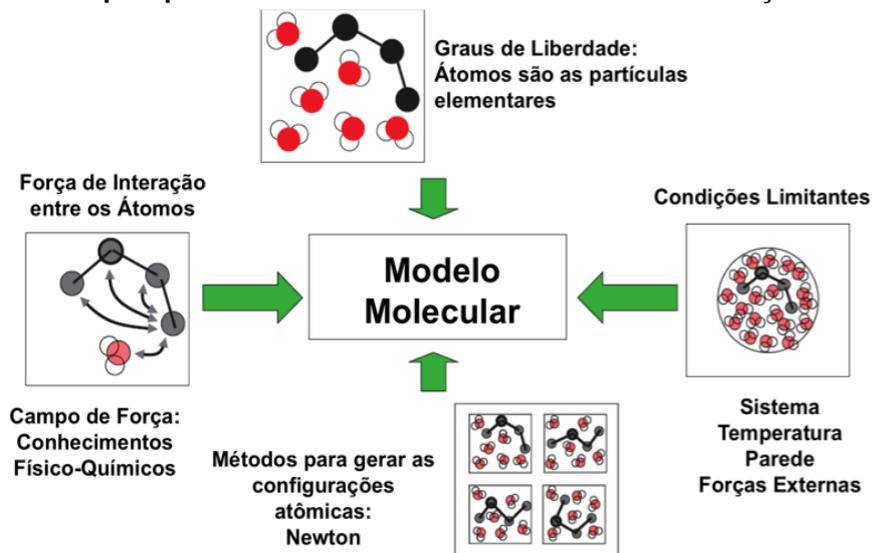
X, criomicroscopia eletrônica e ressonância magnética nuclear (BERMAN *et al.*, 2003).

A engenharia de proteínas pode seguir duas vertentes: mutagênese aleatória e mutagênese dirigida. A primeira, também denominada evolução dirigida, sequências primárias de enzimas (no geral) são submetidas a processos mutagênicos randômicos, onde aquelas que apresentarem o melhor desempenho frente ao substrato selecionado, serão sujeitas a sucessivas etapas de mutagênese com o propósito de selecionar o produto proteico mais aprimorado (MOORE *et al.*, 1997). Como condecoração à relevância das pesquisas efetuadas no ramo, a pesquisadora Francis Arnold foi agraciada com o prêmio Nobel de química em 2018, pela evolução direta de enzimas, e a outra metade do prêmio foi dividida entre George Smith e Gregory Winter pelo desenvolvimento da técnica de *phage display* de peptídeos e anticorpos. Na segunda vertente, as mutações na sequência primária são dirigidas por abordagens *in silico* através de cálculos computacionais guiados por princípios termodinâmicos (GORDON *et al.*, 1999). Dentre as muitas ferramentas disponíveis para a execução dos protocolos de engenharia de proteínas, o desenho computacional de proteínas vem conquistando notória visibilidade devido à capacidade de analisar múltiplas sequências de aminoácidos *in silico* induzindo alterações numa escala que não é possível testar experimentalmente (CHICA, 2015).

2.2.1 Simulações computacionais

Para que a engenharia computacional de proteínas seja utilizada de modo apropriado, é crucial que o modelo computacional escolhido seja representativo para determinado sistema. Para que isso aconteça, quatro parâmetros devem ser observados atentamente: i) quais graus de liberdade (atômicos ou moleculares) são explícitos, considerados nos cálculos do modelo; ii) qual campo de força ou função de energia foi selecionado pra caracterizar a energia baseando-se nos graus de liberdade; iii) amostragem; iv) contribuições externas e condições de contorno do sistema (Figura 3) (VAN GUNSTEREN *et al.*, 2006).

Fig 3 - Principais parâmetros na escolha dos modelos de simulação molecular



Fonte: Adaptada de Van Gunsteren *et al.* (2006, tradução nossa).

Nota: Diagrama esquemático das variáveis e graus de resolução que devem ser levadas em consideração na escolha de um modelo molecular.

2.2.1.2 Campo de Força

Para descrever sistemas biomoleculares com centenas a milhares de átomos, os métodos computacionais apropriados baseiam-se na mecânica molecular clássica (Newtoniana) (CLEAVER; ALLEN, 1991). Neste modelo de aproximação, as moléculas são retradas da seguinte forma: átomos são representados como esferas massivamente carregadas ligadas umas as outras e as ligações químicas por molas como num sistemas massa-mola. Através desse modelo, é possível representar deformações de angulares, estiramento de ligação, movimentos de torção e outros, sendo possível representar o dinamismo de complexos biomoleculares grandes com custo computacional acessível (LEACH, 2001).

Para que os sistemas biomoleculares sejam descritos com precisão, as moléculas presentes nele devem ser regidas por um conjunto de parâmetros definidos que descrevam a energia potencial do sistema. O conjunto de todos os potenciais de interação é denominado campo de força. Os componentes podem ser agrupados em termos ligados, aqueles unidos por ligações covalentes diretamente (diedros próprios e impróprios, ângulos de ligação, estiramento de ligação) (VAN GUNSTEREN *et al.*, 2006) e os termos não ligados (interações de Coulomb e Lennard-Jones), onde a interação se faz entre moléculas diferentes ou em átomos

da mesma molécula mas que distam 4 ou mais ligações covalentes (OOSTENBRINK *et al.*, 2004).

2.2.1.3 Dinâmica molecular

Assim como a estrutura de uma proteína está intrinsecamente associada à sua função (SAMISH *et al.*, 2011), o dinamismo das mesmas, na maioria dos casos, é crucial para que desempenhem seu papel biológico. Na dinâmica molecular, o sistema é representado por uma caixa de simulação, que por sua vez irá conter moléculas da estrutura proteica de interesse e do solvente. Sabendo a energia potencial de cada átomo do sistema, podemos obter a força atuante e por consequência a aceleração. Utilizando algoritmos de integração, as sucessivas configurações do sistema ao longo de um determinado período de tempo de simulação são geradas pela resolução das equações diferenciais de Newton. O resultado é uma trajetória que especifica como a posição e as velocidades das partículas do sistema variam com o tempo. Dessa forma, o valor esperado de uma determinada propriedade do sistema é obtido fazendo-se uma média por toda a trajetória. A dinâmica molecular tornou possível o estudo de biomoléculas no momento de sua ação, possibilitando a adição de complexidade, como inclusão de pares de ligação, transições de conformação, bem como a elucidação das interferências ambientais no comportamento das proteínas (CHILDERS; DAGGETT, 2017).

2.2.1.4 Engenharia computacional de proteínas

O desenho computacional exige um trabalho minucioso, onde todas as etapas são interdependentes, sendo necessário uma excelente escolha/construção de modelo, alinhamento de sequências, avaliação de qualidade dos parâmetros selecionados e refinamento de estruturas (PETREY; HONIG, 2005). Um marco histórico no desenvolvimento racional de proteínas foi advento do Rosetta, um pacote de programas computacionais desenvolvido por David Baker e colaboradores. (ROHL; STRAUSS; MISURA, *et al.*, 2004). Devido ao sucesso obtido nas predições estruturais (objetivo inicial do Rosetta) sua aplicação foi estendida a outros desafios da engenharia computacional proteica como modelagem de alça (ROHL, STRAUSS,

CHIVIAN, *et al.*, 2004), determinação de estrutura incluindo restrições experimentais (BOWERS *et al.*, 2000) e simulações de docking entre proteínas (GRAY *et al.*, 2003).

Os programas desenvolvidos para o desenho computacional, possuem dois componentes fundamentais: uma função de energia e um algoritmo de busca (GORDON *et al.*, 1999). A função empírica de energia do Rosetta é baseada em dados experimentais estruturais e princípios termodinâmicos. O algoritmo de busca, por sua vez, é o método de Monte Carlo com critério de Metrópolis. Resumidamente, as sucessivas conformações da proteína são geradas de forma aleatória. Cada nova conformação é obtida pela modificação da identidade e da configuração das cadeias laterais escolhidas de uma biblioteca de rotâmeros, e modificações nos valores dos ângulos diedros. Aquelas modificações que contribuírem energeticamente para a estabilidade (diminuição de energia livre de Gibbs) do sistema são mantidas e aquelas que conferirem penalidades podem ou não serem mantidas, dependendo do critério de Metrópolis. Segundo o critério, as configurações desfavoráveis possuem uma certa probabilidade de serem aceitas. No caso do Rosetta, essa probabilidade de aceitação aumenta a cada 150 tentativas de inserção de movimentos que conferem penalidade frustrada, até ser aceito e retornar aos estágios iniciais (ROHL, STRAUSS, MISURA, *et al.*, 2004). Muitos avanços na área devem-se aos esforços conjuntos de vários grupos de pesquisa que trabalham no desenvolvimento de bibliotecas de rotâmeros (DUNBRACK, 2002), algoritmos (DESJARLAIS; CLARKE, 1998) e funções de energia que descrevam os sistemas de forma fidedigna (GORDON *et al.*, 1999).

2.2.2 Desenho computacional aplicado ao desenvolvimento de aptâmeros neutralizantes do ZIKV

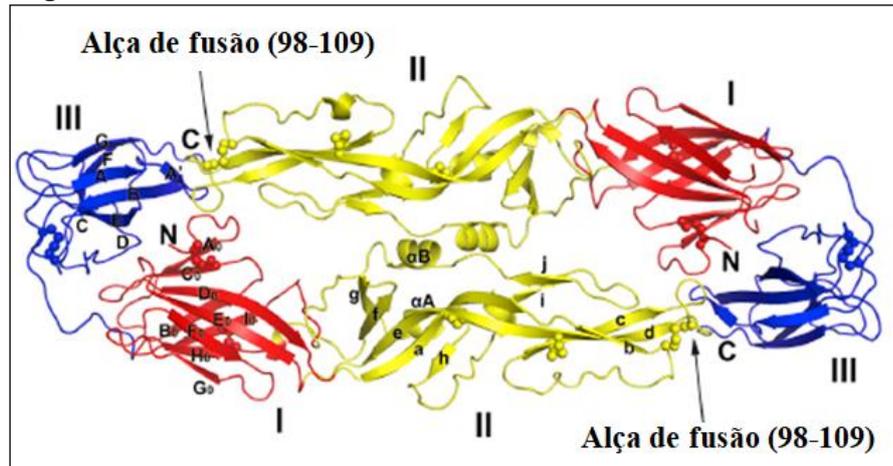
O desenho computacional de proteínas tem sido posto em evidência devido ao seu potencial uso no desenvolvimento de novas plataformas terapêuticas baseadas em proteínas. Visando fins terapêuticos, os anticorpos são as moléculas mais modificadas computacionalmente, através de diferentes estratégias (HILVERT, 2000; XU *et al.*, 2004). Como objetivos gerais no desenvolvimento de plataformas diagnósticas mais eficazes através de engenharia computacional, a modelagem de cadeias laterais de resíduos pode otimizar a especificidade e a afinidade de

anticorpos, bem como contribuir para o desenvolvimento de novas plataformas (CARAVELLA *et al.*, 2010; KURODA *et al.*, 2012) e isso pode ser executado através de: i) otimização dirigida da interação entre o antígeno e o parátipo; ii) reorganização/mutação dos resíduos nas regiões onde o epítipo/parátipo não é encontrado (HE; ZHU, 2015).

2.2.2.1 Proteína do envelope: principal região antigênica

A grande maioria dos anticorpos neutralizantes contra Flavivírus são dirigidos à proteína do Envelope (E), a qual está presente na superfície dos vírions e apresenta papel central na ligação aos receptores celulares e fusão das membranas da partícula viral e da célula hospedeira. Esta proteína possui peso molecular de 53kDa. Sua conformação pré-fusão apresenta-se de forma alongada, rica em folhas beta, organizadas em homodímeros paralelos. No que diz respeito à sua organização espacial, a superfície do vírus consiste em 180 cópias de proteína E, dispostas em arranjo icosaédrico, formado por 60 unidades assimétricas. Cada unidade é formada por 3 proteínas E individuais. Como a proteína E existe na forma dimérica, os dímeros se mantêm paralelos aos seus pares moleculares, e cada conjunto (formado por 3 unidades) se agrupa aos pares para formar o que se assemelha a uma jangada. Desta forma, cada vírion é formado por 30 jangadas na sua superfície (ZHANG *et al.*, 2016). Estudos de cristalografia de raio-X demonstraram que a proteína E é composta por 3 domínios de dimerização distintos, DI, DII e DIII (LINDENBACH; RICE, 2003; MODIS *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2004). Dentre os domínios citados, destacamos o domínio DII, que é formado a partir de duas alças estendidas que se projetam através do domínio DI. Nela ainda foi demonstrada a presença da alça de fusão, essa região interage com as membranas da célula alvo durante a etapa de fusão do ciclo viral (GONCALVEZ *et al.*, 2004). A sequência de aminoácidos que a compõe (formada pelos resíduos 98 ao 111) (Figura 4). apresenta alto grau de similaridade com outros Flavivírus, fato que corrobora a existência de reação cruzada frente a este alvo antigênico (MODIS *et al.*, 2004). Um estudo comparativo mostrou uma conservação de 100% entre diferentes Flavivírus (PRIYAMVADA *et al.*, 2016) (Figura 5).

Figura 4 - Proteína E do ZIKV dimérica destacando-se os 3 domínios.



Fonte: Adaptada de Goncalvez (2004, tradução nossa).

Nota: Diagrama esquemático dos três domínios de organização da proteína do Envelope do ZIKV com destaque para a alça de fusão na extremidade do DII.

Figura 5 - Comparação da sequência da alça de fusão de Flavivírus e identidade da proteína E de ZIKV e DENV-2.

A	
DENV2 Tonga/74:	CKHSMVDRGWGNGCGLFGKGGIVTCAMFTC
ZIKV PRVABC59:	CKRTLVDRGWNGCGLFGKGSIVTCAKFC
JEV 057434:	CKQGFTDRGWGNGCGLFGKGSIDTCAKFC
WNV WN956 D117 3B:	CKQGVVDRGWGNGCGLFGKGSIDTCAKFC
YFV 17D:	CKRTYSDRGWGNGCGLFGKGSIVACAKFTC
YFV Asibi:	CKRTYSDRGWGNGCGLFGKGSIVACAKFTC
	Alça de fusão
B	
Regiões da Proteína E	Identidade de Sequência
EDI	59,1%
EDII	56,6%
EDIII	44,6%
Alça de fusão	100%

Fonte: Adaptada de Priyamvada *et al.* (2016, tradução nossa).

Nota: **A)** Comparação entre as sequências da alça de fusão entre diferentes estirpes virais de Flavivírus. **B)** Análise das identidades dos domínios da proteína E entre ZIKV e DENV-2.

Os mAb capazes de neutralizar os Flavivírus agem em dois momentos: impedindo a ligação da proteína do E ao receptor de superfície celular, não permitindo a entrada do vírus na célula hospedeira, ou prejudicando a dinâmica de rearranjo das proteínas E e bloqueando a fusão do vírus com a membrana lisossomal (MUNJAL *et al.*, 2017). Dentre os muitos anticorpos refenciados até a presente data, alguns apresentaram resposta neutralizante quando desafiados pelo ZIKV. O mAb C10 mostrou capacidade de neutralização cruzada para o ZIKV

(originalmente identificado pós-infecção por DENV). O modo de ligação ao qual o mAb se liga na proteína E é dependente do pH, provando que o anticorpo em questão pode atuar em diferentes rearranjos estruturais da proteína E e, conseqüentemente, em diferentes fases do processo infectivo (porção intradímico, superfície do vírus e bloqueio das estruturas em jangada, comprovados por criomicroscopia eletrônica (ZHANG *et al.*, 2016). Outro mAb que apresentou resposta satisfatória foi o mAb ZIKV-117, o qual atua na interface dímero-dímero através do reconhecimento de um epítipo quaternário da proteína E e prevenindo a reorganização estrutural necessária à fusão (HASAN *et al.*, 2017). Outros anticorpos já foram citados por reconhecer a alça de fusão, como o mAb 4G2 (CRILL; CHANG, 2004), que demonstrou resposta neutralizante diferente a depender do modelo animal selecionado (JOHNSON; ROHRIG, 1999; KAUFMAN *et al.*, 1987).

2.2.2.2 Perfil neutralizante do anticorpo monoclonal 2A10G6

Segundo dados da literatura, o mAb 2A10G6 apresenta um perfil de resposta pan-neutralizante frente aos quatro sorotipos do vírus DENV, a WNV e a YFV *in vitro* e *in vivo*. Na terapia *in vivo*, os ensaios se basearam na infecção de murinos com doses letais e sucessiva administração do anticorpo. Através do modelo apresentado no estudo, foi possível verificar um perfil de neutralização dose-dependente para DENV 1-4, também demonstrando resposta para outros Flavivírus com WNV e YF (DENG *et al.*, 2011). Estudos posteriores realizados pelo mesmo grupo, demonstraram que o anticorpo 2A10G6 tem alta afinidade à proteína E e neutraliza a infecção pelo ZIKV *in vitro* e *in vivo*, indicando alto potencial terapêutico e protetor. A fim de identificar quais os aminoácidos cruciais no sítio de interação, foi caracterizada a estrutura do complexo da proteína E do ZIKV associada ao mAb 2A10G6, revelando que este se liga à extremidade do domínio II em um ângulo perpendicular, incorporando a alça de fusão do ZIKV em um centro hidrofóbico. Nesta interação, participam aminoácidos tanto das cadeias leves como das cadeias pesadas do anticorpo, dentre os quais se destacam: histidina (his) 40, asparagina (asn) 84, tirosina (tyr) 93 e arginina 104 (arg). Destes quatro resíduos, 3 deles interagem fortemente com o triptofano (trp) 101 da alça de fusão, que é o aminoácido principal do domínio no que diz respeito às interações (DAI *et al.*, 2016). Baseado no conhecimento adquirido acerca do perfil neutralizante do mAb 2A10G6,

bem como a descrição de seu parátipo, seu poder neutralizante e potencial uso em intervenções terapêuticas e diagnósticas, duas estratégias computacionais distintas foram elaboradas e executadas para o desenvolvimento dos aptâmeros engenheirados utilizados no desenvolvimento desse trabalho.

2.2.3 Aptâmeros: alternativa para uso de anticorpos

Os aptâmeros proteicos específicos são moléculas computacionalmente desenhadas, onde uma sequência oligopeptídica que possua alta afinidade por um alvo molecular específico, seja ele antigênico ou não, pode ser adicionada a uma proteína suporte (LADNER, 1995). Para atingir tal objetivo, é necessário que a sequência codificante do oligonucleotídeo de interesse seja inserida nos sítios de restrição projetados na sequência codificadora da proteína suporte. A proteína que recebe as sequências deve apresentar algumas características fundamentais como: ser biologicamente neutra, ou seja, não interagir com outras moléculas ou organelas celulares, ser inócua ao sistema imune e não possuir atividades enzimáticas que possam causar danos ao organismo receptor, caso venha a ser utilizada em estudos *in vivo* (CRAWFORD *et al.*, 2003; HOPPE-SEYLER *et al.*, 2004). Como essa plataforma utiliza-se dos atributos da engenharia de proteínas *in silico*, é possível fazer notórias contribuições na estabilidade, aumentando portanto o tempo de meia-vida das proteínas artificiais, modulação da afinidade, como adição de grupos hidrofóbicos visando melhorar a interação com alvos da mesma natureza, além da conjugação com haptenos ou mesmo fluoróforos que facilitem sua detecção (JAYASENA, 1999).

A ação seletiva dos aptâmeros pode ser dirigida frente a um grande número de moléculas, como toxinas, corantes, partículas virais, entre outros agentes patogênicos ou nocivos (JAYASENA, 1999). Dentre os mais importantes campos de aplicação dos aptâmeros proteicos, destaca-se a produção de insumos para medicina terapêutica e diagnóstico (BORGHOUTS *et al.*, 2005; HAN *et al.*, 2010; SKERRA, 2007). Muitos produtos baseados em anticorpos já foram aprovados como biofármacos, voltados principalmente para tratamento de doenças autoimunes e câncer (CARTER, 2006).

2.2.4 Aplicação da engenharia de proteínas na produção de aptâmeros proteicos baseados no mAb 2A10G6

Uma das ferramentas exploradas na modificação de anticorpos ou epítomos, é a busca de proteínas carreadoras para posterior transplante de epítomos (nesse trabalho parátomos), a qual sendo trazida como proposta solução para projetos envolvendo desenho racional de proteínas (BURTON, 2010). No presente trabalho, foram desenvolvidas duas estratégias computacionais na geração de aptâmeros, aqui denominadas como A e B. Na primeira, todos os resíduos do parátomo do mAb 2A10G6 passaram por processos de mutação combinatoria e foram mantidas apenas as mutações que contribuíam para o aumento da afinidade e estabilidade computacional dos aptâmeros. A sequência otimizada do parátomo foi apresentada em 3 estratégias: uma contendo os dois monômeros referentes às subunidades isoladas do mAb 2A10G6, e duas construções correspondendo à ambas subunidades covalentemente ligadas. A estratégia B, por sua vez, foi realizada tendo como base os 4 resíduos do mAb 2A10G6 que mais contribuem para interação com a alça de fusão (DAI *et al.*, 2016). A partir desses dados, buscamos proteínas suporte numa biblioteca de proteínas, previamente triadas para resolução inferior a 2,5 Å, extensão de sequência até 150 resíduos e capazes de serem expressas em sistema procariótico que contivessem resíduos em disposição espacial similar a dos resíduos do alvo selecionado. Desta forma, essas proteínas foram utilizadas como carreadoras para o posterior transplante de motivo, onde foram implantados os aminoácidos identificados no motivo de interação. E logo após essa etapa, a interface de interação do aptâmero foi redesenhada conservando os resíduos do motivo, afim de aumentar a afinidade pelo loop de fusão.

A partir das atividades em desenvolvimento neste projeto, espera-se que os aptâmeros desenvolvidos computacionalmente sejam capazes de reconhecer especificamente antígenos de anticorpos neutralizantes da proteína E de ZIKV e inibir a replicação viral *in vitro*. Esses resultados contribuirão para o entendimento à nível molecular das interações entre os antígenos de anticorpos neutralizantes e os anticorpos sintéticos.

2.2.5 Obtenção experimental dos aptâmeros peptídicos através de sistema de expressão procarioto

Com o advento da tecnologia do DNA recombinante, clonagem e expressão de numerosos genes em diferentes sistemas têm sido explorados com muitos fins biotecnológicos, industriais, além de produção de ferramentas terapêuticas e vacinas para humanos e animais na forma de proteínas recombinantes. A seleção do sistema de expressão adequado depende da produtividade, bioatividade, finalidade e características físico-químicas da proteína de interesse. No que diz respeito aos organismos procariotos, a bactéria gram-negativa *Escherichia coli*, é o principal hospedeiro de escolha, devido à sua versatilidade, alta densidade celular em sistemas induzíveis e excelente crescimento em fontes baratas de carbono (GRASLUND *et al.*, 2008; ROSANO; CECCARELLI, 2014). Nesses mesmos sistemas de expressão recombinante, é possível fazer modificações na proteína de interesse, como produzir mutações, alterar promotores e adicionar etiquetas moleculares (como a cauda de histidinas nas porções N- ou C-terminal). Estes métodos são largamente difundidos e auxiliam na obtenção das proteínas em larga escala, melhoram os processos subsequentes de purificação e podem melhorar a solubilidade das proteínas produzidas (NILSSON *et al.*, 1997; UHLEN *et al.*, 1992; LICHTY *et al.*, 2005; WAUGH, 2005; YOUNG *et al.*, 2012). Após a produção da proteína de interesse no sistema induzível de escolha, a obtenção da biomolécula em estados mais puros é uma etapa fundamental para avaliação da qualidade dos resultados obtidos. Para a purificação de proteínas, é recomendável o uso de ao menos duas etapas, sendo elas baseados em diferentes propriedades (SCOPES, 1993). Para o presente estudo utilizamos cromatografia de afinidade e cromatografia por exclusão de tamanho.

No presente trabalho, todas as proteínas foram submetidas à cromatografia de afinidade por íons metálicos. Fundamentalmente, a técnica consiste na afinidade de ligação através de íons metálicos. O uso dos mesmos se deve à capacidade de alguns metais de transição coordenarem os elétrons das cadeias laterais de alguns aminoácidos como histidina, cisteína e triptofano. Sendo assim, o íon metálico de escolha (níquel) estará conjugado à matriz sólida (coluna de purificação por afinidade), onde outros fatores como o pH (potencial hidrogeniônico), força iônica do

tampão, presença de aditivos, podem influenciar diretamente na eficiência do processo de purificação (SILVA; MOUTA *et al.*, 2003; RAMOS *et al.*, 2004).

O segundo método cromatográfico de escolha, foi a cromatografia por exclusão de tamanho, esse método de separação é realizado baseado-se no peso molecular das proteínas. A coluna cromatográfica é formada por polímeros ajustados de forma a construir uma malha reticulada com poros de diversos tamanhos. Baseada no peso molecular, as proteínas menores farão trajetos mais tortuosos e sendo portanto, retidas na coluna por mais tempo, liberadas em fases mais tardias do processo de purificação (NELSON; COX, 2001).

2.3 TERMOFORESE EM MICROESCALA

O estudo de eventos de ligação entre biomoléculas é uma área emergente e uma das técnicas que vem revolucionando esse campo é a termoforese em microescala (MST - *Microscale Thermophoresis*, tradução do inglês). Esse método vem sendo utilizado nos estudos de monitoramento de eventos de ligação entre pares moleculares e baseia-se no movimento direcional de biomoléculas através de um microgradiente de temperatura, que é detectado por fluorescência (intrínseca ou conjugada à sonda). Esta técnica utiliza volumes mínimos de amostra (ordem de microlitros) e permite a análise de forma precisa de eventos de ligação em virtualmente qualquer biomolécula em solução, independente de tamanho, carga ou qualquer variável intrínseca dos componentes. (JERABEK-WILLEMSEN *et al.*, 2011; ZILLNER *et al.*, 2012).

O valor das constantes de afinidade obtidas através da MST são o produto da aplicação do coeficiente de Soret. Quando determinada amostra sofre um aquecimento local, a energia transferida pro sistema faz com que as moléculas se movam através de um gradiente de temperatura. Corriqueiramente, atribui-se que a termoforese é o resultado de um desequilíbrio local, onde atuam em conjunto com o campo de força do sistema, a mecânica dos flúidos bem como os potenciais partícula-solvente (JERABEK-WILLEMSEN *et al.*, 2011). Cessado o aquecimento, as moléculas entram no estado estacionário, onde a ação contributiva de ambas as forças estarão em equilíbrio e as moléculas estarão distribuídas de modo particular no espaço.

$$c/c_0 = \exp[-S_T^*(T - T_0)]$$

Equação 1.

A concentração relativa (c/c_0 - onde c significa concentração quente - pós ação do laser ou concentração final e c_0 - significando a concentração inicial ou concentração fria) é dependente exclusivamente do coeficiente de Soret e da variação de temperatura ($T-T_0$) imposta pelo laser. As discussões a respeito das bases físicas da teoria termoforética ainda estão em curso, porém há consenso na comunidade científica acerca das contribuições de diversos parâmetros físico-químicos das moléculas como tamanho, hidrofobicidade, carga, etc. Onde podemos ver a correlação matemática desses termos na equação 3.

$$S_T = \frac{A}{kT} \left(-\Delta s_{\text{hyd}}(T) + \frac{\beta \sigma_{\text{eff}}^2}{4\epsilon \epsilon_0 T} \times \lambda_{\text{DH}} \right)$$

Equação 2.

onde A representa a área de superfície da molécula; k a constante de Boltzmann; T a temperatura; σ^2 define a carga efetiva e Δs_{hyd} como a entropia de hidratação da interface entre a molécula-solução. Nessa equação vemos a ação contributiva do λ_{DH} (comprimento de triagem Debye-Hueckel) e da constante dielétrica (ϵ).

Mesmo que o efeito termoforético não tenha sido completamente elucidado até a presente data, sua aplicação na quantificação de interações biomoleculares vem sendo largamente aplicada e isso se deve principalmente à sua sensibilidade à mínimas alterações na interface-molécula solvente. Utilizando uma abordagem de titulação (onde um dos pares de ligação é mantido fixo), é possível obter o valor da constante de afinidade de uma ampla variedade de biomoléculas (BAASKE *et al.*, 2010; JERABEK-WILLEMSSEN *et al.*, 2011; WIENKEN *et al.*, 2010).

3 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista os impactos causados pela epidemia do vírus Zika (ZIKV) na saúde pública, faz-se prioritário o entendimento da patologia associada à infecção bem como o desenvolvimento de medidas intervencionistas, tanto de mérito terapêutico como profilático. Esse projeto avalia a imunorreatividade de proteínas quiméricas artificiais carreadoras de parátomos de anticorpos neutralizantes, na forma de aptâmeros, capazes de reconhecer epítomos estruturais do ZIKV. O conhecimento gerado a partir da execução desse projeto, contribui para o entendimento ao nível molecular das interações entre proteínas do ZIKV e parátomos de anticorpos computacionalmente otimizados, com potencial uso em diagnóstico da infecção por ZIKV durante o período pré-natal e em estratégias vacinais terapêuticas ou profiláticas.

4 OBJETIVO GERAL

Produzir e avaliar a interação de aptâmeros proteicos desenvolvidos computacionalmente contra epítomos de anticorpos neutralizantes do ZIKV.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Produzir os aptâmeros proteicos engenheirados com grau de pureza compatível com as etapas posteriores;
- b) Determinar a afinidade de ligação entre os aptâmeros proteicos desenvolvidos e o epítomo na proteína E do ZIKV correspondente (alça de fusão) através de termoforese em microescala;
- c) Comparar as afinidades obtidas pelos aptâmeros com a de anticorpos monoclonais comerciais frente à alça de fusão da proteína E do ZIKV.

5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

Nessa seção estão descritas todas as metodologias utilizadas na execução desse trabalho.

5.1 DESENHO DOS APTÂMEROS PROTEICOS CARREANDO OS RESÍDUOS DO SÍTIO DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO CRÍTICOS PARA INTERAÇÃO ENTRE O mAb 2A10G6 E A PROTEÍNA E DE ZIKA

As atividades realizadas no projeto tiveram enfoque em duas estratégias distintas aqui denominadas A e B. As construções obtidas tiveram como base os dados cristalográficos da estrutura do mAb 2A10G6 ligado à proteína E do ZIKV (DAI *et al.*, 2016). Todo o trabalho computacional foi executado pelo Dr. Carlos Cruz, colaborador do grupo do Dr. Roberto Lins. A metodologia e a fundamentação descritas referentes a parte computacional, tem como finalidade a clareza das metodologias por ele executadas, para nível de discussão, não sendo portanto, objetivo específico do presente trabalho.

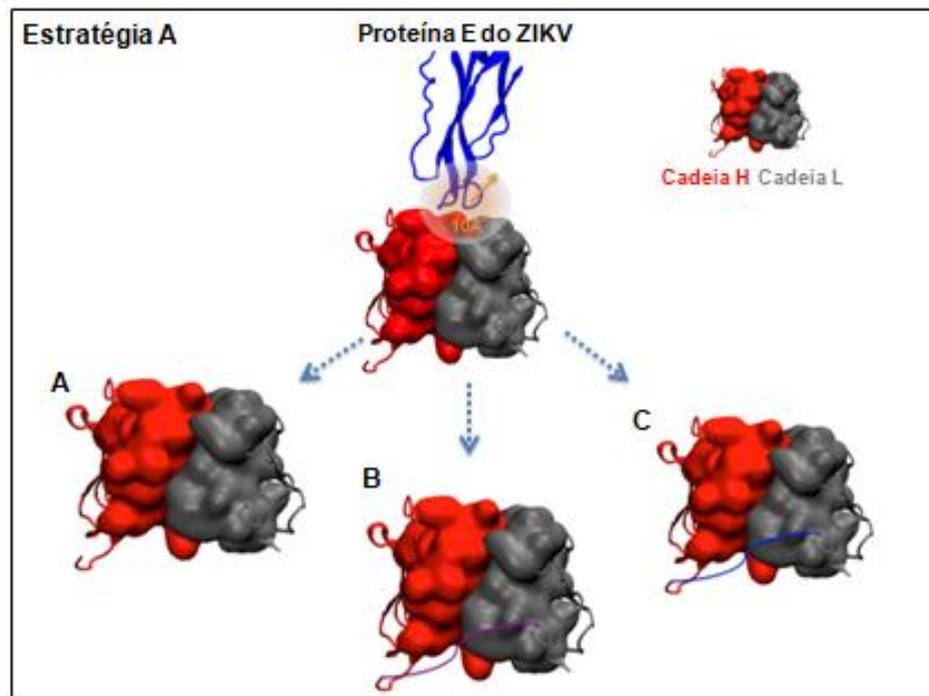
5.1.1 Estratégia A

Para o desenvolvimento da primeira (estratégia A), foram selecionados os domínios H (*High Domain* - cadeia pesada, tradução do inglês) e L (*Light Domain* - cadeia leve, tradução do inglês) da região hipervariável do anticorpo, cujas interfaces H-L e HL-antígeno foram redesenhadas visando aumento da afinidade e estabilidade frente ao antígeno alça de fusão da proteína E. Como produto, obtivemos três estratégias, uma delas corresponde às subunidades H e L remodeladas independentemente (ZikaBlocker_CadeiaLeve e ZikaBlocker_CadeiaPesada, formando um par), e as duas outras correspondentes às subunidades H e L ligadas covalentemente por sequências conectoras distintas (ZIKABlocker_linker1 e ZikaBlocker_linker2) (Figura 6).

O desenho das proteínas quiméricas foi realizado utilizando-se o programa Rosetta versão 3.5. Para a completa engenharia do parátipo redesenhado,

estabeleceu-se um raio de corte de 10 Å ao redor da interface de interação antígeno-anticorpo, perfazendo mutações sucessivas, e mantendo aquelas que contribuíssem para a afinidade do aptâmero e a alça de fusão da proteína E, sem comprometimento estrutural. Para verificar a estabilidade das novas proteínas, realizaram-se 40 ns de simulações por dinâmica molecular através do pacote de simulação GROMACS v. 4.6.7 (PRONK *et al.*, 2013) (Anexo A).

Figura 6 - Estratégia computacional baseada no parâtopo completo do mAb 2A10G6.



Fonte: Adaptado de Cruz (em fase de elaboração*).

Nota: **A)** Aptâmero formado por monômeros independentes reengenheirados **B) e C)** Construção citada em A com a adição de alça conectora (linker 1 - B; Linker 2 - C).

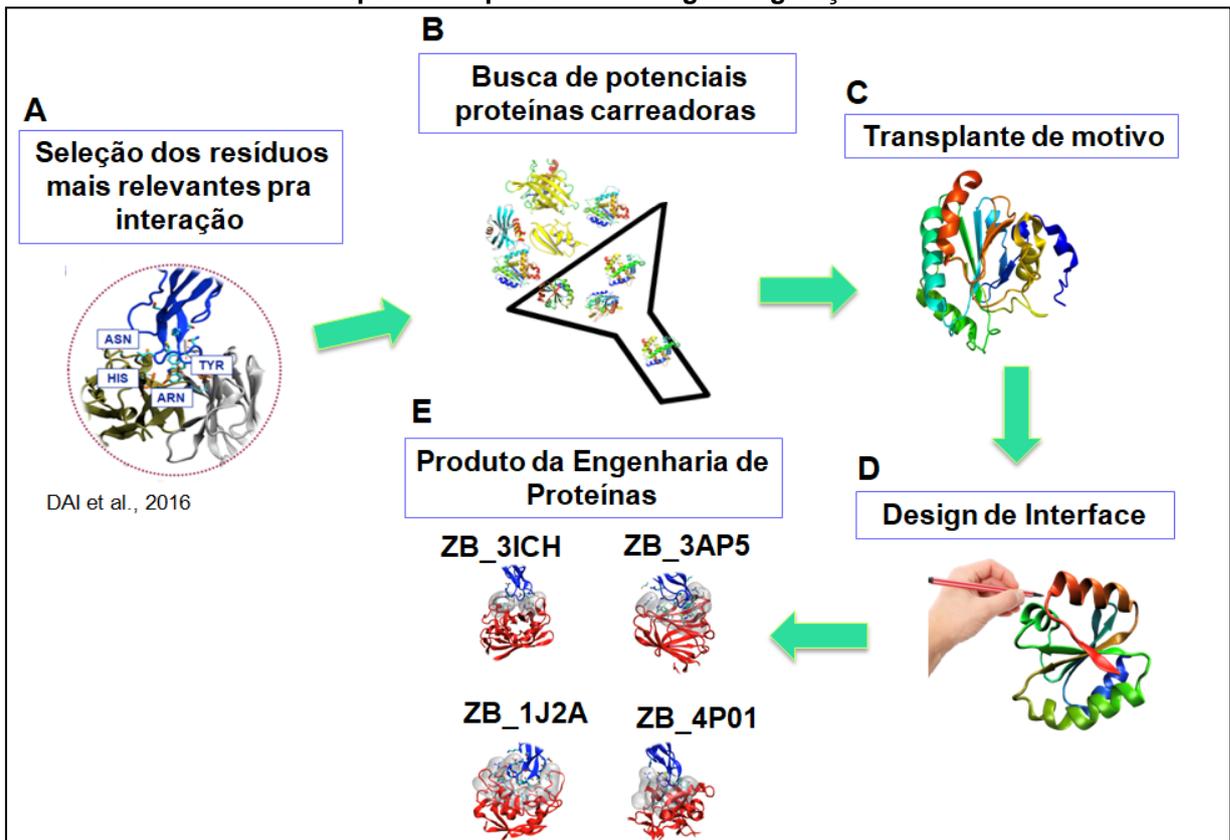
5.1.2 Estratégia B

A estratégia B, por sua vez, foi construída com base nas principais interações anticorpo-antígeno, através da identificação dos resíduos responsáveis pelos contatos majoritários do mAb 2A10G6, e por isso, com maior poder de interação com a proteína E (DAI *et al.*, 2016). De acordo com dados publicados, os aminoácidos responsáveis são: H40, N64 e R104 da cadeia H e Y93 da cadeia L. Em seguida, efetuou-se uma busca por proteínas portando motivos estruturais similares ao do anticorpo a partir de um banco de estruturas provenientes do PBD. Uma vez identificadas essas proteínas similares, a construção dos aptâmeros foi realizada

* O trabalho do autor supracitado encontra-se em fase de elaboração.

através do transplante dos resíduos críticos previamente identificados nessas proteínas carreadoras. Como resultado, 4 novas construções artificiais foram desenhadas: ZIKABlocker_3ICH, ZIKABlocker_1J2A, ZIKABlocker_3AP5 e ZIKABlocker_4P0L. A seguir, destacamos as etapas subsequentes do processo de montagem dos aptâmeros (Figura 7).

Figura 7- Diagrama esquemático da metodologia computacional utilizada na obtenção dos aptâmeros proteicos de segunda geração.



Fonte: Adaptado de Cruz (em fase de elaboração*).

Nota: **A)** Seleção dos resíduos de maior contato entre o mAb 2A10G6 e a proteína E do ZIKV. **B)** Busca de proteína carreadoras (*scaffolds*) que possuíssem motivos estruturais semelhantes (mesma disposição espacial para posterior transplante). **C)** Excisão dos aminoácidos originais das proteínas selecionadas, para substituição (transplante de motivo) pelos resíduos de interesse (aqueles de responsáveis pelo maior número de contatos com a proteína do E do ZIKV). **D)** Otimização de interações entre a superfície da proteína *scaffold* com o antígeno e manutenção da estabilidade do aptâmero peptídico **E)** Os quatro aptâmeros oriundos dessa estratégia de engenharia de proteínas.

Partindo-se de coordenadas de estruturas de proteínas disponíveis no PDB, foi executada uma busca de estruturas de possíveis proteínas capazes de carrear o motivo estrutural desejado. Como critérios de seleção das possíveis candidatas, foram impostas as seguintes restrições: i) estruturas cristalinas de alta resolução da difração por raio-X (<2.5 Å); ii) proteínas conhecidamente expressas em sistema

* O trabalho do autor supracitado encontra-se em fase de elaboração.

procariótico; iii) número de resíduos entre 50 e 200; Uma biblioteca de 900 estruturas de proteínas foi obtida mediante a imposição destes critérios. Em seguida, dentre estas, foram triadas estruturas que possuísem resíduos espacialmente dispostos de maneira similar ao motivo estrutural, permitindo assim o posterior transplante dos resíduos selecionados do parátopo).

Foram identificadas quatro estruturas de proteína com potencial de serem engenheiradas para ligação ao antígeno: i) PDB 3ICH (código de identificação do PDB, que originou o ZB_3ICH, e o mesmo raciocínio foi empregado na nomenclatura dos outros 3 aptâmeros dessa geração). O modelo da proteína foi obtido através de difração de raio-X com resolução de 1.2 Å. É uma isomerase de origem humana (ciclofilina B) e tem como função auxiliar na montagem de proteínas secretórias (KOZLOV *et al.*, 2010); ii) PDB 1J2A, também é uma ciclofilina B, porém de origem bacteriana (*E.coli* - cepa K12), modelo obtido através de difração de raio-X com resolução de 1.8 Å (KONNO *et al.*, 2004); iii) PDB 3AP5, é uma proteína ligadora de açúcar, cujo modelo foi igualmente obtido a partir da interpretação dos dados difração de raio-X com resolução de 1.92 Å, de origem humana (IDEO *et al.*, 2011); e iv) PDB 4P0L, é uma citocina de origem humana, cujo modelo foi obtido por difração de raio-X com resolução de 1.55 Å (GÜNTHER, 2014). Todas as estruturas selecionadas foram minimizadas energeticamente por meio da função de energia do Rosetta Talaris2014.

A primeira etapa do desenho computacional refere-se a substituição dos resíduos do parátopo identificados interagindo com o antígeno (H40, N64 e R104 da cadeia H e Y93 da cadeia L) em posições equivalentes nas proteínas carreadoras selecionadas e descritas acima. Devido a essas mutações pontuais, o passo seguinte é alterar os resíduos na região da vizinhança das mutações pontuais visando aumentar a afinidade entre aptâmero peptídico e antígeno e garantir a estabilidade termodinâmica da nova proteína. As estruturas obtidas foram então inspecionadas visualmente no intuito de verificar a possível presença de resíduos hidrofílicos contidos em bolsões hidrofóbicos (o que pode culminar em colapso da estrutura proteica por enovelamento não apropriado). Adicionalmente, foi analisada a contribuição dos resíduos desenhados na energia de afinidade dos complexos por meio de mutagênese através de escaneamento por alanina (*Alanine scanning*, tradução do inglês). Os resíduos que resultaram em penalidades energéticas foram

revertidos aos resíduos nativos. Caso a variação fosse maior que 0,5 RU (*Rosetta unit* - Unidade de Rosetta, tradução do inglês), a mutação foi ignorada e apenas aceita caso a variação de energia fosse menor que 0,5 RU. A estabilidade estrutural das proteínas desenhadas foram verificadas através de simulações de dinâmica molecular, por um período de 80 ns, através do pacote de simulação GROMACS v. 4.6.7 (PRONK *et al.*, 2013).

5.2 OBTENÇÃO EXPERIMENTAL DO APTÂMEROS ENGENHEIRADOS

Nesta subseção estão descritas todas as etapas experimentais executadas.

5.2.1 Síntese das sequências de DNA codificando para os aptêmeros proteicos correspondentes às estratégias A e B

Todas as sequências de DNA codificando para as proteínas artificiais desenhadas neste trabalho foram otimizadas para eficiente expressão procariótica e sintetizadas comercialmente (GenScript). Enquanto que as sequências de DNA codificando para as proteínas desenhadas na estratégia A (ZIKABlocker_linker1, ZikaBlocker_linker2, ZikaBlocker_CadeiaLeve e ZikaBlocker_CadeiaPesada) foram sintetizadas e clonadas no vetor comercial pUC57 Simples (GenScript), para posterior subclonagem no vetor de expressão procariótico, as sequências de DNA codificando para as proteínas desenhadas na estratégia B (ZB_1J2A, ZB_3AP5, ZB_4P01, ZB_3ICH) foram sintetizadas e clonadas diretamente nos vetores de expressão de interesse (pET-22b e pET 14-b, Novagen).

5.2.2 Transformação bacteriana por choque térmico

Vinte microlitros (20 µL) de bactérias competentes *E. coli* cepa DH5α (Invitrogen) e BL21 (Invitrogen) foram transformadas com 1 µg de DNA correspondente aos plasmídeos otimizados para clonagem e expressão procariótica codificando para as proteínas quiméricas. O procedimento consistiu em incubação das células em gelo por 30 min (minutos), seguido de choque térmico à 42 °C / 2 min, etapa na qual ocorre a entrada do DNA alvo nas células bacterianas, seguido

de 2 min de incubação no gelo. Após o choque térmico, as bactérias foram incubadas à 37 °C / 1h / 225 rpm (rotações por minuto) em meio SOC (*Super Optimal Broth*, caldo super ideal (acrescido de glicose), tradução do inglês), centrifugadas a 5000 rpm / temperatura ambiente e transferidas para placa de cultura contendo meio LB (Luria-Bertani) e ágar, suplementado com 100 µg/mL ampicilina (LB-AMP). As placas foram incubadas à 37 °C / 16h, para a verificação do crescimento das colônias contendo os plasmídeos de interesse.

5.2.3 Preparação de DNA plasmidial em pequena e média escala

Uma colônia bacteriana contendo o DNA plasmidial de interesse foi inoculada em 5 mL (para preparação em pequena escala) ou 50 mL (para preparação em média escala) de meio LB-AMP e incubada à 37 °C / 16 h / 225 rpm. A seguir, o DNA plasmidial alvo foi extraído das células bacterianas e purificado utilizando o kit comercial QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN®) de acordo com as recomendações do fabricante.

5.2.4 Digestão de DNA por enzimas de restrição

O sucesso das etapas de clonagem e a identidade dos fragmentos de DNA clonados nos vetores de expressão foram verificados através de digestão com enzimas de restrição. Nesta etapa, 2 µg de cada construção de DNA foi digerido com 20 unidades de cada enzima de restrição, 1 µL do tampão específico para as enzimas em uso e água MilliQ autoclavada para um volume final de reação de 10 µL. A reação foi incubada à 37 °C / 6 h, seguido por uma etapa de inativação enzimática à 65 °C / 15 min. O tamanho dos fragmentos foi verificado através de eletroforese em gel de 2% agarose (polissacarídeo solúvel em água fervente, que solidifica-se quando resfriado à temperatura ambiente). Para purificação de fragmentos de DNA a partir de gel de agarose foi utilizado o kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN®) de acordo com as recomendações do fabricante.

5.2.5 Eletroforese de DNA em gel de agarose

Nesta etapa, 1 µg de cada DNA foi migrado em gel de 1% agarose preparado em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) suplementado com 12 µL de brometo de etídeo (agente intercalante usado como marcador de ácidos nucléicos). A partir da aplicação de uma corrente elétrica (150 V) ao gel de agarose, o DNA migra em direção ao eletrodo positivo, e a separação das bandas ocorre em função do peso molecular das mesmas. Após a eletroforese, os fragmentos de DNA foram visualizados sob luz ultravioleta (UV) e o peso molecular correspondente determinado através da comparação com marcador de peso molecular apropriado migrado no mesmo gel (1Kb Plus, Invitrogen).

5.2.6 Clonagem dos genes codificando para as proteínas desenhadas no vetor de expressão procariótico

Os vetores comerciais contendo os genes otimizados codificando para as proteínas ZikaBlocker_CadeiaLeve, ZikaBlocker_CadeiaPesada, ZIKABlocker_linker1 e ZikaBlocker_linker2 foram digeridos com as enzimas de restrição NdeI e NcoI (conforme descrito no item 7.5 dessa seção). Do mesmo modo, o vetor de expressão procariótica pRSET A (Invitrogen) foi linearizado utilizando as mesmas enzimas. O vetor linearizado e os fragmentos correspondentes aos genes otimizados foram purificados a partir do gel 1% agarose (conforme descrito no item 7.5 desta seção) e submetidos à reação de ligação. Nesta etapa, cada reação de ligação consistiu em 100 ng (nanogramas) de vetor linearizado, 200 ng de fragmento (correspondente ao respectivo gene otimizado), 400 unidades (1 µL) da enzima T4 DNA Ligase (New England Biolabs), 1 µL de tampão T4 DNA Ligase Buffer (New England Biolabs) concentrado 10 vezes e água para um volume final de reação de 10 µL. A reação de ligação foi incubada à 4 °C / 16 h, seguida de inativação enzimática à 65 °C / 15 min. As reações de ligação foram utilizadas para transformar bactérias competentes da cepa DH5α por choque térmico (conforme descrito no item 5.2.2 desta seção).

5.2.7 Expressão de proteínas em larga escala em *E. coli* e purificação por cromatografia de afinidade

Os plasmídeos de expressão, contendo os genes otimizados, foram utilizados para a transformação de bactérias competentes (cepa BL21D, Invitrogen). As colônias isoladas de cada construção foram inoculadas em meio LB-AMP até atingirem crescimento equivalente à densidade óptica (DO) de 0,5 (4×10^8 células por mL), no comprimento de onda de 600 nm (nanômetros). A expressão das proteínas foi induzida com a adição de 1 mM isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) ao meio de cultura. A cultura foi centrifugada à 4 °C / 5000 rpm /30 min, e as células ressuspendidas em tampão de lise (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl₂, 20 mM imidazol, pH 8.0). As células bacterianas foram lisadas por ultrassonicação em ciclos de 6 pulsos de 30 segundos, com intervalos de 59 segundos no gelo. O extrato proteico total foi centrifugado à 4 °C / 10000 rpm / 30 min e a fração solúvel foi submetida à cromatografia de afinidade automatizada. O extrato proteico total foi aplicado em coluna cromatográfica de 5 mL HisTrap HP, previamente acoplada ao equipamento AKTA 45 Pure. Proteínas bacterianas foram removidas da coluna através de lavagem com 10 volumes de coluna, enquanto a proteína purificada foi eluída (50 mM Tris-HCl pH 7.8, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.05% Tween 20) com 5 volumes de coluna, submetidas a gradiente crescente do tampão de eluição e coletada em frações de 0,5 mL. A quantificação das proteínas purificadas foi realizada por espectroscopia à 280nm utilizando o equipamento Biowave II UV/Visible Spectrophotometer e correção pelo coeficiente de extinção molar.

5.2.8 Purificação por exclusão de tamanho e troca de tampão em coluna de dessalinização

Para atingir um maior grau de pureza, duas das três proteínas purificadas referentes à estratégia B (ZB_3ICH e ZB_3AP5) foram submetidas à purificação por exclusão de tamanho. Nessa metodologia, a amostra é aplicada sob um fluxo constante do tampão (PBS 10X, HyClone, diluído para 1X em água destilada para execução dos ensaios) e a eluição é feita de forma isocrática. A amostra adicionada ao influxo de tampão, constitui a matriz líquida desse processo cromatográfico, que

perpassa pela matriz sólida (fase estacionária) da nossa coluna de escolha (superdex 75 increase 10/300 GL). A malha reticulada (matriz sólida) é composta de dextrano e agarose, que combina as características físico-químicas de ambos os componentes, como estabilidade e baixo nível de interação com as biomoléculas presentes na amostra. Dadas as informações acima, durante a eluição, as amostras percorrerão diferentes trajetórias, onde proteínas de baixo peso molecular, farão trajetórias mais tortuosas na malha reticulada, por conseguinte, ficando mais tempo retidas na coluna e sendo liberadas em fases mais tardias do processo de eluição, em detrimento ao que ocorre com as proteínas de maior peso molecular. A coluna de escolha tem poder de resolver biomoléculas numa faixa de 3000 a 70000 KDa.

A proteína ZB_1J2A apresentou um grau de pureza satisfatório apenas com a purificação por afinidade, mas como os ensaios subsequentes necessitariam de tampão isento ou com baixo teor de imidazol, foi realizada troca de tampão utilizando a coluna Histrap HP 5ml Desalting. Da mesma forma como foi feito na coluna de gel filtração, a amostra foi submetida à uma eluição isocrática, porém dividida em frações de alto e baixo peso molecular, tendo como solvente o tampão selecionado (50 mM Tris-HCl pH 7.8, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.05% Tween 20).

5.2.9 Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida

A acrilamida e a bisacrilamida, quando presentes na mesma solução, formam uma rede polimérica reticulada quando o agente polimerizante, persulfato de amônio (APS, *ammonium persulfate*, tradução do inglês), é adicionado. Este, por sua vez, se decompõe espontaneamente para formar radicais livres. TEMED (N, N, N, N'-tetrametilenodiamina) catalisa a reação de polimerização, promovendo a estabilização dos radicais livres. O tamanho dos poros da malha reticular formada é dependente da razão bisacrilamida/acrilamida e da concentração da acrilamida, e possibilita a separação de proteínas com base em seu peso molecular quando as amostras são submetidas à uma corrente elétrica. Para obter apropriada separação das proteínas em uma solução, um gel de empilhamento é preparado no topo do gel de resolução. O gel de empilhamento tem uma concentração menor de acrilamida, pH mais baixo (6,8), em comparação ao gel de resolução. Isso permite que as proteínas em uma amostra negativamente carregada sejam concentradas em uma

faixa estreita do gel durante os primeiros minutos de eletroforese antes de iniciar sua migração na porção de resolução do gel. As amostras de proteína foram diluídas 1:1 em tampão de amostra (solução: 40% de SDS a 10%, 16% de 1M Tris-HCl pH 6.8, 20% de Glicerol, 4 g de Azul de Bromofenol e 28% de água) e aquecidas à 95 °C por 5 min, para garantir a completa desnaturação das proteínas. A migração das proteínas em gel ocorreu sob amperagem constante (40 mA) por 1 h 30 min. A visualização das bandas foi realizada após imersão do gel em solução de coloração (solução: 10% de ácido acético, 45% de metanol, 5 g de azul de coomassie e 45% mL de água) por 15 minutos e descoloração (solução: 70 mM de ácido acético, 250 mM de metanol e completar para 1L de água). Imagens do gel foram obtidas com o auxílio do fotodocumentador ImageQuant LAS 500 chemiluminescence CCD camera.

5.3 TERMOFORESE EM MICROESCALA PARA AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE PARES MOLECULARES

No intuito de caracterizar a interação entre a proteína do Envelope do Zika e os aptâmeros engenheirados, realizamos os ensaios de termoforese em microescala. A termoforese em microescala leva em consideração alterações no movimento direcional de moléculas em função de um gradiente de temperatura imposto por uma fonte de calor. Essas alterações dependem fortemente de uma ampla variedade de propriedades, como mudanças na camada de solvatação, bem como peso molecular, conformação e carga (LUDWING, 1856).

5.3.1 Marcação da proteína E com fluoróforo RED-NHS-647 (NanoTemper Technologies)

A proteína de escolha para marcação com o fluoróforo foi a proteína do Envelope do ZIKV (Native Antigen), o parceiro de interação para o qual todos os aptâmeros foram construídos. A proteína do E foi conjugada ao fluoróforo RED-NHS-647 (NanoTemper Technologies). A reação de marcação foi realizada segundo as recomendações do fabricante. O corante reativo RED-NHS-647 contém um grupamento químico éster-NHS, que reage eficientemente com aminas primárias

encontradas em lisinas, em geral, acessíveis ao solvente, e portanto, adequadas à marcação. O conjugado proteína-fluoróforo RED-NHS-647 é altamente estável e apresenta excitação de fluorescência e máxima de emissão de aproximadamente 650 nm e 670 nm, respectivamente.

Para execução do protocolo, uma alíquota de 100 µL da proteína de interesse à 20 µM foi acrescida ao corante dissolvido em DMSO e água na proporção 1:1. A mistura foi incubada à temperatura ambiente por 30 min. Durante o período destinado à incubação, procedeu-se com o equilíbrio da coluna com o tampão de escolha (PBS 1X). Decorrido o tempo da incubação, a amostra foi aplicada no centro da coluna, e após entrada completa na resina da coluna, aplicou-se 600 µL do tampão na coluna para a coleta do eluato que contém a proteína marcada. Finalizado o processo de marcação, a quantificação da proteína E marcada foi realizada por espectroscopia à 280 nm utilizando o equipamento Biowave II UV/Visible Spectrophotometer e correção pelo coeficiente de extinção molar.

5.3.2 Obtenção das constantes de afinidade dos aptâmeros de segunda geração frente à proteína E conjugada ao Fluoróforo RED-HS-647

Os ensaios termofóreticos do presente trabalho foram divididos da seguinte forma: i) ensaios realizados à temperatura ambiente para comparação das afinidades entre os 3 aptâmeros testados; ii) análise comparativa do aptâmero de melhor afinidade à temperatura ambiente e à 37°C (para mimetizar condições *in vivo*); iii) ensaios de termoforese do mAb 4G2, que sabidamente se liga à alça de fusão da proteína do envelope, à temperatura ambiente e à 37°C.

O procedimento foi executado da seguinte forma: i) Separação e quantificação de um dos aptâmeros, onde foi feita uma diluição seriada de 16 pontos (1:1), tendo como solvente PBS 1X para os aptâmeros ZB_3ICH e ZB_3AP5 e tampão de termoforese (TrisHCl 50 mM pH 7,8, NaCl 150 mM, MgCl₂ 10 mM) para o ZB_1J2A. As faixas de concentração das curvas foram na faixa de µM a nM para os aptâmeros testados: ZB_3ICH (54,9 µM - 1,68nM), ZB_3AP5 (21,4 µM - 1,3nM) e ZB_1J2A (400 µM - 12,2 nM); ii) Após a diluição seriada, foi adicionada uma concentração constante (50nM) da proteína do envelope do ZIKV marcada em cada tubo que continha o conteúdo do respectivo ponto da curva. A incubação foi feita a

4°C / 30 min; iii) Decorrido o tempo de incubação, amostras foram inseridas nos capilares padrões e para leitura no equipamento Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies). O segundo ensaio do ZB_3AP5 foi executado seguindo as mesmas etapas citadas acima, excetuando-se a incubação, que foi realizada à 37°C na faixa de concentração de 20,5 µM a 0,621 nM. Por fim, o mAb 4G2, da mesma forma que o aptâmero ZB_3AP5, foi submetido a dois ensaios, à temperatura ambiente (1.31 µM - 641 pM) e à 37°C (0,05 µM - 0,153 pM).

Os parâmetros do instrumento foram ajustados para 40% da potência do laser, que corresponde ao valor médio, e a detecção de fluorescência foi configurada para 20%. Todos os resultados foram obtidos em triplicata, por medições independentes. A análise dos dados foi feita utilizando o MO.Affinity Analysis software versão 2.1.3 (NanoTemper Technologies), onde o tempo de leitura selecionado para avaliação da afinidade final de cada proteína foi feito de forma independente, levando em consideração variáveis indicativas de qualidade como amplitude do sinal, desvio padrão, valores das constantes de confiabilidade da afinidades e a razão sinal/ruído. As curvas finais foram geradas no software PRISM GraphPad 7.

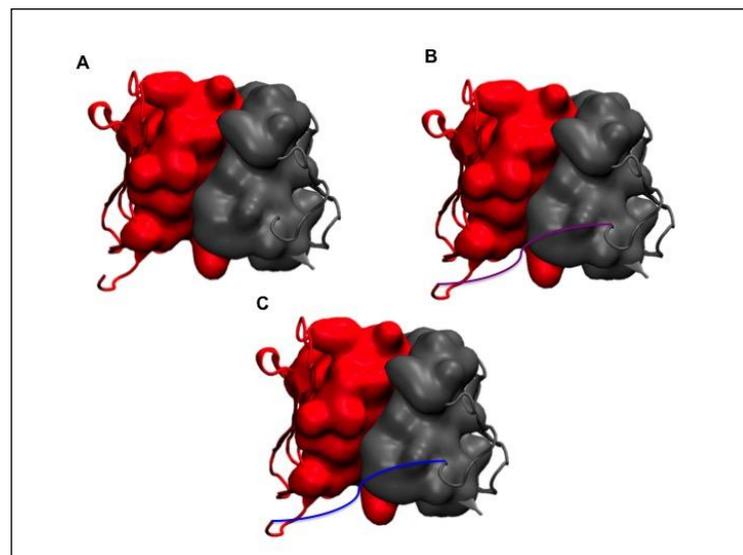
6 RESULTADOS

Os resultados estão divididos em dois momentos: o primeiro referente à modelagem das regiões hipervariáveis do mAb 4A10G6, nomeada de estratégia A e a segunda relativa a estratégia B, onde foi realizado o transplante dos resíduos mais contributivos para a ligação do mAb 4A10G6 à alça de fusão para proteínas suporte.

6.1 ESTRATÉGIA A: MODELAGEM DAS REGIÕES HIPERVARIÁVEIS DO mAb 2A10G6

Como produto da plataforma computacional desenvolvida pelo Dr. Carlos Cruz para a geração dos aptâmeros baseados no parátipo do mAb 2A10G6, 4 proteínas foram desenhadas: ZikaBlocker_CadeiaLeve e ZikaBlocker_CadeiaPesada, ZIKABlocker_linker1, ZikaBlocker_linker2. A organização esquemática da estratégia pode ser visualizada abaixo (Figura 8). Para avaliar a estabilidade e dinâmica estrutural dos aptâmeros, realizaram-se simulações de dinâmica molecular por meio do pacote de software GROMACS v. 4.6.7 (Anexo A)

Figura 8 - Organização esquemática das quatro proteínas oriundas da remodelagem do parátipo do mAb 2A10G6.



Fonte: Adaptado de Cruz (em fase de elaboração*).

Nota: **A)** Representação das duas subunidades independentes (H – em vermelho e L – em cinza). **B)** Representação das duas subunidades unidas pela sequência conectora 1 (linker 1 – em roxo). **C)** Representação das duas subunidades unidas pela sequência conectora 2 (linker 2 – em azul).

* O trabalho do autor supracitado encontra-se em fase de elaboração.

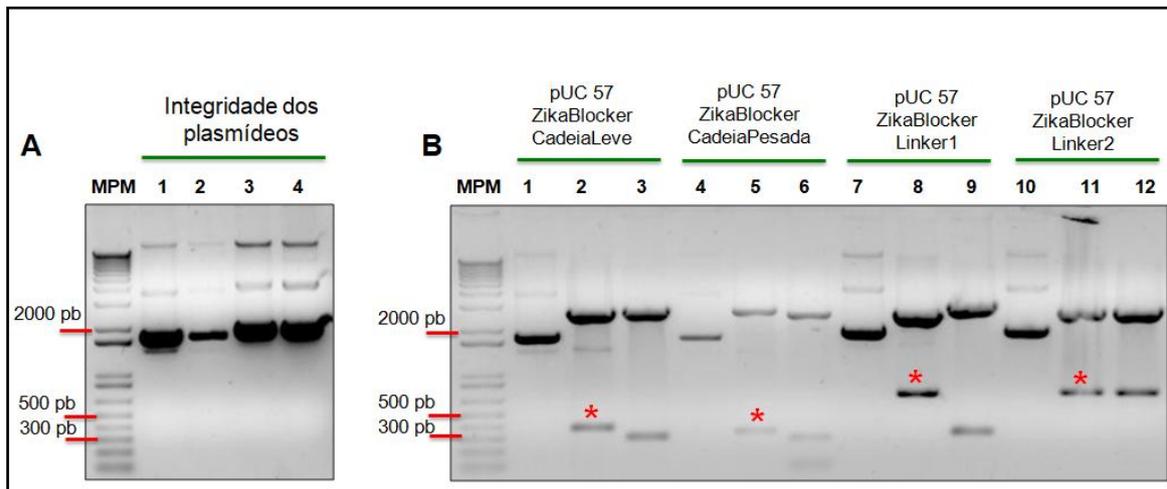
6.1.1 Clonagem dos genes codificando para as proteínas da estratégia A em sistema de expressão procariótico

As sequências de DNA codificando para as proteínas ZIKABlocker_linker1 (705 pares de base (pb)), ZikaBlocker_linker2 (711 pb), ZikaBlocker_CadeiaLeve (372 pb) e ZikaBlocker_CadeiaPesada (336 pb) foram sintetizadas comercialmente e inseridas no vetor comercial pUC57 simples (2710 pb, GenScript). Os vetores comerciais foram eluídos em água MilliQ autoclavada por 16h em agitador orbital sob rotação constante à 4°C e quantificados por espectrofotometria. A pureza das amostras e o tamanho dos vetores comerciais foram verificados por eletroforese em gel de agarose a 1%. A análise da migração eletroforética das amostras de DNA e comparação com o marcador de peso molecular mostrou que todos os vetores comerciais apresentavam uma banda única e dentro do tamanho esperado (Figura 10-A).

Após a confirmação dos pesos moleculares dos vetores comerciais, estes foram utilizados para transformar bactérias *E. coli* da cepa DH5 α , onde os plasmídeos contendo o gene de interesse e a marca de resistência ao antibiótico ampicilina foram inseridos através de choque térmico nas células bacterianas. Sendo assim, apenas as bactérias transformadas contendo os plasmídeos de interesse foram selecionadas através do crescimento em placas de cultura contendo meio LB-AMP, já que adquiriram resistência ao antibiótico. Para confirmar a identidade dos genes sintéticos (inseridos nos vetores comerciais), preparações de DNA em pequena escala foram realizadas seguidas de uma etapa de clivagem por enzimas de restrição em pontos específicos da sequência do vetor. O software de edição de plasmídeos APE, utilizado para identificar sítios de enzimas de restrição situados dentro e fora da sequência dos genes de interesse. Todos os quatro vetores foram digeridos com as enzimas NdeI e NcoI, cujos sítios de restrição localizam-se fora da sequência dos genes alvo e são, portanto, aqui denominadas digestões comuns. Enquanto que as enzimas NdeI e KpnI foram utilizadas para digerir o vetor pUC57+ZikaBlocker_CadeiraLeve, e NdeI e RsrII para os vetores pUC57+ZikaBlocker_CadeiaPesada, pUC57+ZikaBlocker_Linker1 e pUC57+ZikaBlocker_Linker2. Visto que o sítio de restrição destas enzimas localiza-se no interior da sequência dos genes alvo, estas são aqui denominadas digestões

específicas. A identidade dos genes codificantes para as proteínas de interesse foi confirmada através da migração dos produtos das digestões em gel de 1% agarose (Figura 9).

Figura 9 - Análise da pureza dos vetores comerciais e da identidade dos genes otimizados correspondentes aos aptâmeros construídos.



Fonte: A autora.

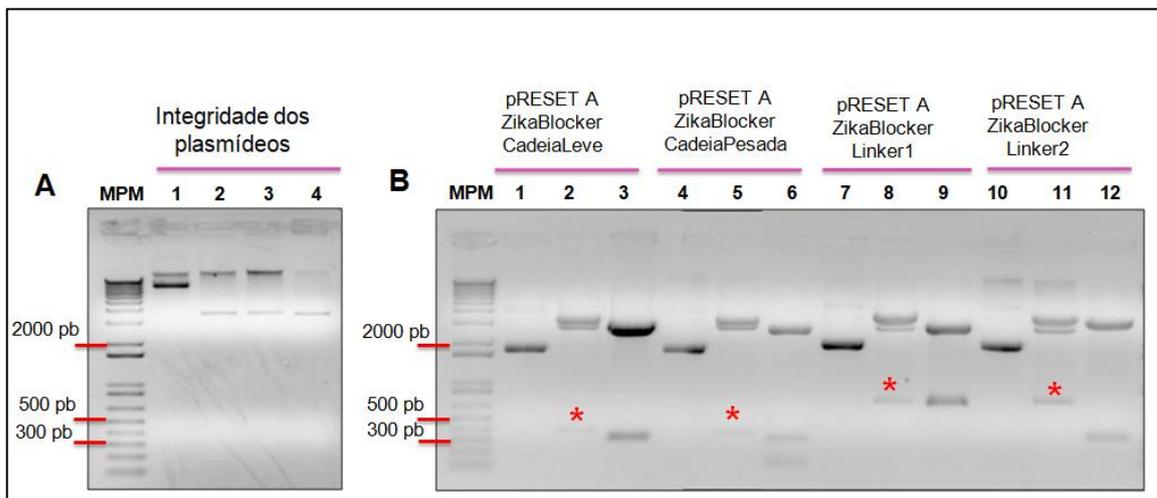
Nota: A) Análise da pureza dos vetores comerciais contendo os genes otimizados. Nesta etapa, 1 µg de DNA foi migrado em gel 1% agarose e as bandas apresentaram os tamanhos esperados: pUC57+ZikaBlocker_CadeiaPesada (3.082 pb), pUC57+ZikaBlocker_CadeiaLeve (3046 pb), pUC57+ZikaBlocker_linker1 (3.415 pb), pUC57+ZikaBlocker_linker2 (3421 pb). **B)** Análise da identidade dos genes otimizados após digestão dos vetores comerciais com as enzimas de restrição NheI e NcoI (digestão comum, posições 2, 5, 8 e 11) e com as enzimas de restrição NdeI e KpnI (para pUC57+ZikaBlocker_CadeiaLeve, posição 6) e NdeI e RsrII (para as construções pUC57+ZikaBlocker_CadeiaPesada, pUC57+ZikaBlocker_Linker1, pUC57+ZikaBlocker_Linker2, posição 3, 9 e 12 respectivamente). Os fragmentos liberados pelas digestões comuns correspondem aos genes otimizados (destacados com *) a serem subclonados em vetor de expressão e apresentaram os pesos moleculares esperados de 372 pb (para ZikaBlocker_CadeiaPesada), 336 pb (para ZikaBlocker_CadeiaLeve), 705 pb (para ZikaBlocker_Linker1) e 711 pb (para ZikaBlocker_Linker2). As linhas 1, 4, 7 e 10 correspondem aos vetores comerciais não digeridos. O marcador de peso molecular (MPM) utilizado em ambos os géis foi o 1Kb Plus Ladder (Invitrogen).

A análise da migração eletroforética dos produtos das digestões e comparação com o marcador de peso molecular mostrou que todos os vetores comerciais liberaram fragmentos dos tamanhos esperados, confirmado assim, a identidade dos genes sintéticos.

Uma vez confirmada a identidade dos genes sintéticos, as enzimas previamente selecionadas para a etapa de digestão comum foram utilizadas para digerir os vetores comerciais. Os fragmentos liberados foram purificados e subclonados no vetor de expressão procariótica pRSET A através de ligação em presença da enzima T4 DNA Ligase. A utilização do vetor pRSET A foi escolhida por

este permitir a expressão da proteína de interesse com uma cauda de 6 histidinas em sua porção N-terminal, o que facilita a purificação da mesma. A ligação foi confirmada através de provas de digestão utilizando enzimas de restrição com especificidade para sítios dentro (digestão específica) e fora (digestão comum) dos genes alvo, e posterior migração dos produtos das ligações em gel de 1% agarose (Figura 10). A análise da migração eletroforética dos produtos das digestões e comparação com o marcador de peso molecular mostrou que todas as construções de DNA liberaram fragmentos de tamanhos esperados, confirmado assim, o sucesso da subclonagem.

Figura 10 - Verificação da integridade e da identidade das sequências correspondentes à primeira geração do ZIKABlocker.



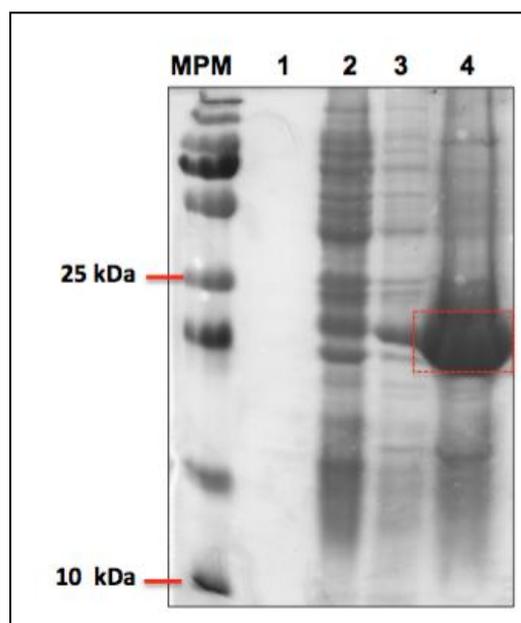
Fonte: A autora

Nota: **A)** Confirmação da subclonagem dos genes otimizados correspondentes às proteínas ZikaBlocker_CadeiaPesada, ZikaBlocker_CadeiaLeve ZIKABlocker_linker1 e ZikaBlocker_linker2 no vetor de expressão pRSET A. **B)** Confirmação da subclonagem dos genes otimizados no vetor pRSET A após digestão dos vetores resultantes com as enzimas de restrição NheI e NcoI (digestão comum, posição 2 e 5, 8 e 11) e com as enzimas de restrição NdeI e RsrII (para pRSET A+ ZikaBlocker_Cadeiapesada, posição 3), NdeI e KpnI (para pRSET A+ ZikaBlocker_Cadeialeve, posição 6) e NdeI e PstI (para pRSET A+ ZIKABlocker_linker1 e pRSET A+ZikaBlocker_linker2, posição 9 e 12). Os fragmentos liberados pelas digestões comuns correspondem aos genes otimizados (destacados com *) subclonados e apresentaram os pesos moleculares esperados: 372 pb (para ZikaBlocker_CadeiaPesada), 336 pb (para ZikaBlocker_CadeiaLeve), 705 pb (para ZikaBlocker_Linker1), 711 pb (para ZikaBlocker_Linker2). As linhas 1, 4, 7 e 10 correspondem às construções não digeridas. O marcador de peso molecular (MPM) utilizado foi o 1Kb Plus Ladder (Invitrogen).

Após confirmação da subclonagem, preparações em média escala dos plasmídeos de expressão contendo o gene otimizado foram realizadas e utilizadas para a transformação de bactérias competentes *E. coli* (cepa BL21) visando à expressão da proteína *in vitro*. A primeira proteína produzida foi a

ZikaBlocker_Link1. Para tal, colônias únicas de bactérias contendo o plasmídeo de expressão pRSET A + ZikaBlocker_Link1 foram inoculadas em meio de cultura, e a expressão proteica induzida por 4 h. Ao final da etapa de expressão, o extrato proteico total foi submetido à uma etapa de cromatografia de afinidade para purificação da proteína recombinante de interesse. Primeiramente, a proteína ZikaBlocker_Link1 foi purificada manualmente utilizando coluna de níquel previamente equilibrada. O produto final, juntamente com alíquotas feitas durante a etapa de purificação, foram analisados através de eletroforese de proteínas em gel de poliácridamida (Figura 12). A análise do gel revela que a proteína ZikaBlocker_Link1 encontra-se na fração insolúvel (destacado com um * na Figura 11).

Figura 11 - Avaliação da eficiência de expressão e purificação da proteína ZikaBlocker_Link1



Fonte: A autora.

Nota: Amostras correspondentes à fração insolúvel (1- *pellet*) e eluatos (2,3,4) foram migradas em gel de 12% acrilamida e são mostradas na figura. A proteína ZikaBlocker_Link1 se apresentou apenas na fração insolúvel. O marcador de peso molecular (MPM) utilizado foi o Protein Ladder Unstained (10-250 kDa New England Biolabs).

A insolubilidade do aptâmero ZB_linker1 deveu-se à inclusão errônea de um resíduo hidrofílico dentro do core hidrofóbico da proteína, impossibilitando o dobramento adequado da mesma e resultando em desestabilização da estrutura, com conseqüente desenovelamento quando produzida *in vitro*. Outro fator que pode

ter contribuído de forma negativa à estabilidade da proteína foi a modelagem da alça conectora. Como todas os aptâmeros dessa plataforma foram gerados através dos mesmos parâmetros computacionais e, por conseguinte, apresentariam o mesmo comportamento, demos seguimento à estratégia B.

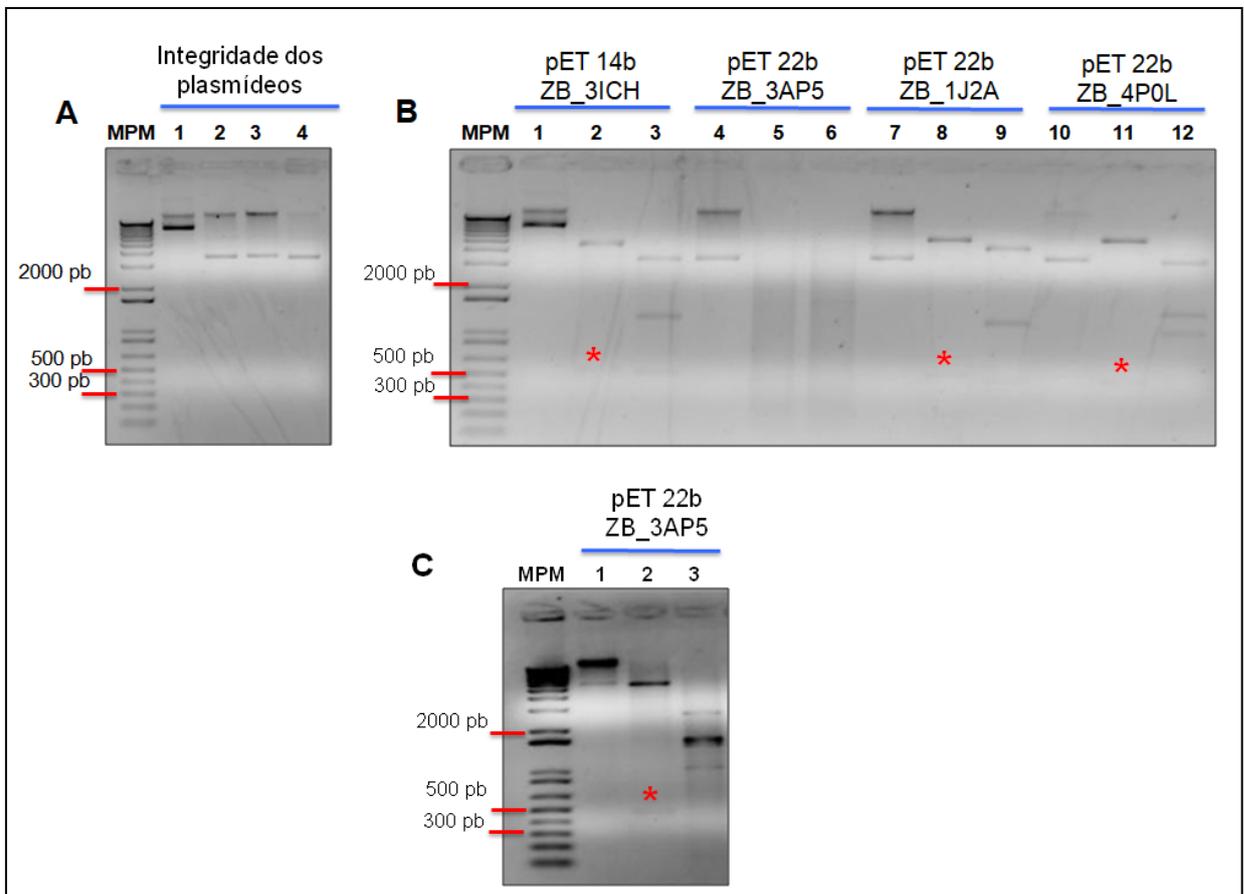
6.2 ESTRATÉGIA B: TRANSPLANTE DOS RESÍDUOS MAIS CONTRIBUTIVOS PARA A LIGAÇÃO DO mAb 2A10G6 À ALÇA DE FUSÃO PARA PROTEÍNAS SUPORTE

No intuito de aumentar a possibilidade de sucesso dessa nova geração de aptâmeros, foi montada uma biblioteca de mais de 3,000 proteínas ancoradoras sabidamente solúveis e já expressas em plataforma procariótica, onde fosse possível fazer o enxerto dos motivos críticos de interação (definidos como os resíduos H40, N64 e R104 da cadeia H e Y93 da cadeia L (DAI *et al.*, 2016). Após o transplante dos resíduos correspondentes ao parátipo do mAb 2A10G6 para as possíveis proteínas carreadoras e a seleção das melhores construções, a interface de interação das proteínas desenhadas com o respectivo sítio de ligação no antígeno foi remodelada. Utilizando como critério de seleção a energia de ligação ao antígeno, 4 aptâmeros foram desenhados pelo Dr. Carlos Cruz, são eles: ZikaBlocker_3ICH, ZikaBlocker_3AP5, ZikaBlocker_4P0L e ZikaBlocker_1J2A (Figura 12). O nome após a terminologia geral ZikaBlocker (ZB), corresponde ao respectivo identificador da proteína molde no PDB.

De acordo com os dados de energia obtidos (calculados através da diferença de energia livre entre o complexo e os pares moleculares isolados após relaxamento), é possível obter uma constante de afinidade teórica, através da equação de Arrhenius, onde obtivemos os seguintes resultados: ZB_3ICH ($KD_{\text{teórico}}$: 17 nM); ii) ZB_3AP5 ($KD_{\text{teórico}}$: 0,0078 nM) iii) ZB_1J2A ($KD_{\text{teórico}}$: 1,4 fM); iv) ZB_4P0L ($KD_{\text{teórico}}$: 0,27 fM). Para avaliar a estabilidade e dinâmica estrutural dos aptâmeros, realizaram-se simulações de dinâmica molecular por meio do pacote de software GROMACS v. 4.6.7 (Anexos B, C e D).

Assim como foi executado na primeira geração de aptâmeros, foram feitas digestões comuns, utilizando enzimas que cortam fora do gene de interesse, e específicas, utilizando enzimas que cortam dentro do gene de interesse e do vetor (Figura 13). Ambos os vetores possuem cauda de 6 histidinas, que está inserida na ORF codificante de cada proteína, para facilitar sua posterior purificação por cromatografia de afinidade em resina de níquel. A análise da migração eletroforética dos produtos das digestões e comparação com o marcador de peso molecular mostraram que todas as construções de DNA liberaram fragmentos de tamanhos esperados, possibilitando o prosseguimento para transformação por choque térmico em cepa de BL21D, como descrito no item 5.8 da seção anterior, para produção das proteínas de interesse em larga escala.

Figura 13 - Análise da pureza dos vetores comerciais e da identidade dos genes otimizados correspondentes às proteínas: ZikaBlocker3ICH, ZikaBlocker_3AP5, ZikaBlocker_4P0L, ZikaBlocker_1J2A.



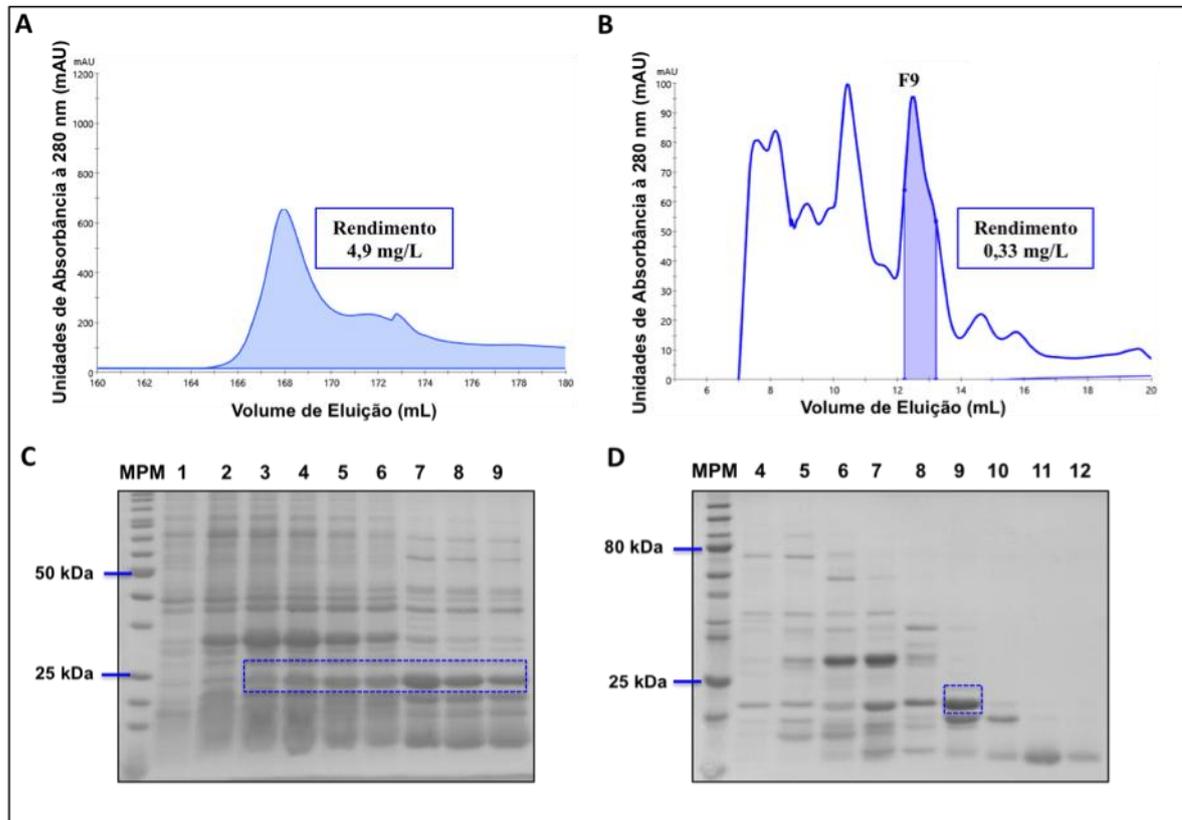
Fonte: A autora.

Nota: **A)** Análise da pureza dos vetores comerciais contendo os genes otimizados. Nesta etapa, 1 µg de DNA foi migrados em gel 1% agarose e as bandas apresentaram os tamanhos esperados: pET 14b+ZikaBlocker_3ICH (5206 pb), pET 22b+ZikaBlocker_3AP5 (5826 pb), pET 22b+ZikaBlocker_4P0L (5799 pb) e pET 22b+ZikaBlocker_1J2A (5871 pb) **B)** Análise da identidade dos genes otimizados após digestão dos vetores comerciais com as enzimas de restrição NdeI e XhoI para pET 22b e NdeI e BamHI para pET 14b (digestão comum, posições 2, 5, 8 e 11) e com as enzimas de restrição NruI e EcoRI (para pET14b+ZikaBlocker_3ICH, posição 3) e PstI e PvuII (para a construções pET 22b+ZikaBlocker_3AP5), PvuII e EcoRV (para pET 22b+ZikaBlocker_4P0L) e MluI e EcoRV (para pET 22b+ZikaBlocker_1J2A) ocupando as posições 6, 9 e 12 respectivamente. **C)** Re-análise da identidade das sequências da construção pET 22b+ZikaBlocker_3AP5. Seguindo a mesma ordem estabelecidas nas imagens anteriores. Os fragmentos liberados pelas digestões comuns correspondem aos genes otimizados (destacados com *) todos apresentando o tamanho de banda esperado: ZikaBlocker_3ICH (546 pb), ZikaBlocker_3AP5 (462 pb), ZikaBlocker_4P0L (435 pb) e ZikaBlocker_1J2A (507 pb). O marcador de peso molecular (MPM) utilizado em ambos os géis foi o 1Kb Plus Ladder (Invitrogen).

6.2.2 Expressão e purificação das proteínas ZikaBlocker_3ICH, ZikaBlocker_1J2A ZikaBlocker_3AP5

Finalizada a etapa verificação da identidade das sequências sintéticas, foi feita a indução da expressão das proteínas ZB_3ICH, ZB_1J2A e ZB_3AP5 em larga escala, conforme descrito no item 7.8 dos procedimentos metodológicos. Obtidos os extratos proteicos, estes foram submetidos à uma etapa de cromatografia de afinidade automatizada em coluna de níquel. Após a purificação de afinidade as proteínas ZB_3ICH, ZB_1J2A e ZB_3AP5 apresentaram os respectivos rendimentos: 4,9 mg/L, 36,6 mg/L e 5,475 mg/L. Os cromatogramas são exibidos nas figuras 12, 13, e 14 respectivamente, na parte A de cada uma delas. Para os aptâmeros ZB_3ICH e ZB_3AP5, foi necessária uma segunda etapa de purificação. Sendo assim, o produto de purificação da cromatografia de afinidade foi aplicado em uma segunda coluna, a de filtração por exclusão de tamanho, e o cromatograma dessas está representado nas figuras 14 e 16 B respectivamente e os rendimentos obtidos foram: 0,33 mg/L (ZB_3ICH) e 0,173 mg/L (ZB_3AP5). No que diz respeito à proteína ZB_1J2A, a segunda etapa cromatográfica foi apenas para efetuar a troca de tampão, o rendimento final foi de 6,48 mg/L. Todas as frações correspondentes aos picos de eluição de todas as purificações automatizadas, bem como a troca de tampão, foram migradas em gel de poliacrilamida. As imagens representativas dos géis encontram-se nas figuras 14, 15 e 16, nas letras C, D e E. As proteínas apresentaram o peso molecular esperado de 22,29 kDa, 19,29 kDa, 18,09 kDa para os ZB_3ICH, ZB_1J2A e ZB_3AP5, respectivamente. Outros parâmetros, como rendimento de cada etapa dos processos cromatográficos, bem como estados oligoméricos das proteínas, estão representados e identificados em suas figuras correspondentes.

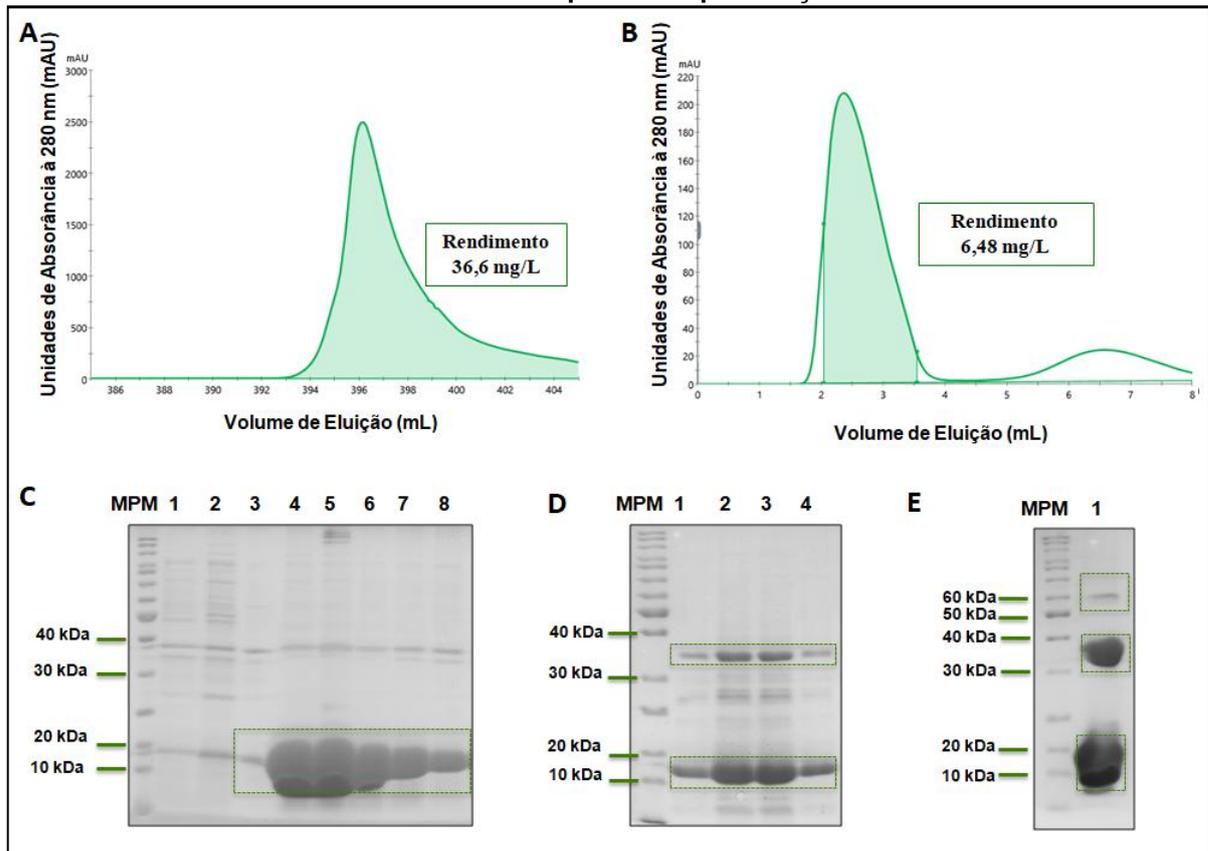
Figura 14 - Etapas de purificação automatizada do aptâmero ZikaBlocker_3ICH e avaliação da eficiência de expressão e purificação.



Fonte: A autora.

Nota: **A)** O cromatograma A refere-se à etapa de cromatografia de afinidade, onde exibe unidades de absorvância (mAU) à 280 nm *versus* volume de eluição (em mL). A área do gráfico hachurada corresponde às frações de eluição da proteína de interesse (rendimento de 4,9 mg/L). O procedimento foi feito utilizando o equipamento AKTA Pure e coluna histrap HP 5 ml. **B)** O segundo cromatograma foi plotado nas mesmas unidades que o primeiro, sendo agora referente à cromatografia por exclusão de tamanho, que foi realizada em sucessão à etapa de purificação por afinidade. O procedimento foi feito utilizando o equipamento AKTA Pure e coluna superdex 75 increase 10/300 GL. A área do gráfico hachurada corresponde à fração de eluição que contém a proteína interesse (rendimento de 0,33 mg/L) baseada no peso molecular. **C e D)** Amostras correspondentes aos eluatos da purificação automatizada por afinidade (C) e por exclusão de tamanho (D) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida. As caixas em destaque em azul correspondem ao aptâmero ZikaBlocker_3ICH (22,29 kDa), que apresentou o peso molecular esperado. Na parte superior dos géis, há uma identificação nominal e numérica, onde MPM corresponde ao marcador de peso molecular utilizado o Protein Ladder Unstained (10-250 kDa, New England Biolabs) e os números são referentes as frações de eluição das purificações que foram aplicadas no gel.

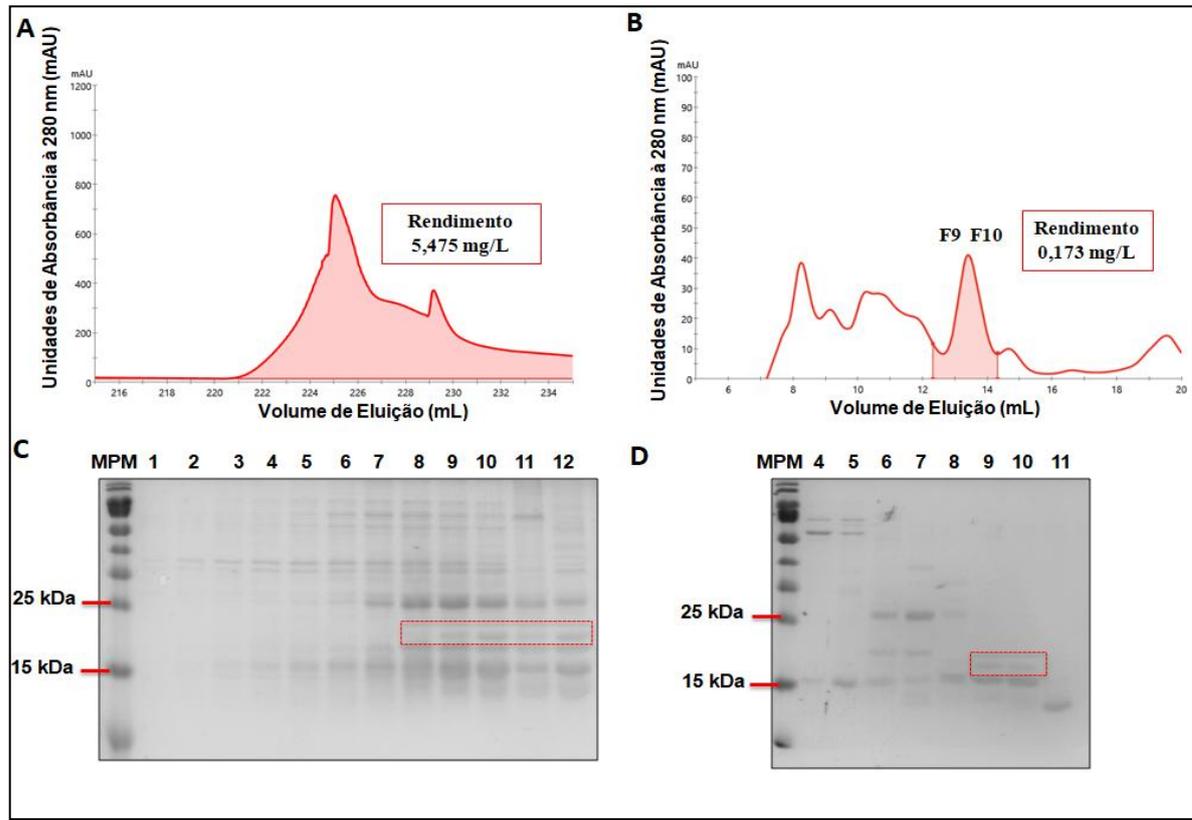
Figura 15 - Etapas de purificação automatizada do aptâmero ZikaBlocker_1J2A e avaliação da eficiência de expressão e purificação.



Fonte: A autora.

Nota: **A)** O cromatograma A refere-se à etapa de cromatografia de afinidade, onde exibe unidades de absorbância (mAU) à 280 nm *versus* volume de eluição (em mL). A área do gráfico hachurada corresponde às frações de eluição da proteína de interesse (rendimento 36,6 mg/L). O procedimento foi feito utilizando o equipamento AKTA Pure e coluna Histrap HP 5 ml. **B)** O segundo cromatograma foi plotado nas mesmas unidades que o primeiro, sendo agora referente à uma etapa de troca de tampão que foi realizada em sucessão à etapa de purificação por afinidade. O procedimento foi feito utilizando o equipamento AKTA Pure e coluna Histrap HP 5ml desalting. A área do gráfico hachurada corresponde à fração de eluição que contém a proteína de interesse (rendimento de 6,48 mg/L). **C e D)** Amostras correspondentes aos eluatos da purificação automatizada por afinidade (C) e por exclusão de tamanho (D) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida. As caixas em destaque em verde correspondem ao aptâmero ZikaBlocker_1J2A (19,29 kDa), que apresentou o peso molecular esperado. **E)** Amostra concentrada submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida. Na imagem do gel é possível observar a presença de três diferentes formas oligoméricas do aptâmero (monômero, dímero e trímero). Na parte superior dos três géis há uma identificação nominal e numérica, onde MPM corresponde ao marcador de peso molecular utilizado, o PageRuler Unstained Protein Ladder (ThermoFisher) e os números são referentes as frações de eluição das purificações que foram aplicadas no gel.

Figura 16 - Etapas de purificação automatizada do aptâmero ZikaBlocker_3AP5 e avaliação da eficiência de expressão e purificação.



Fonte: A autora.

Nota: A) O cromatograma A refere-se à etapa de cromatografia de afinidade, onde exibe unidades de absorbância (mAU) à 280 nm *versus* volume de eluição (mL). A área do gráfico hachurada corresponde as frações de eluição da proteína de interesse (rendimento: 5,475 mg/L). O procedimento foi feito utilizando o equipamento AKTA Pure e coluna Histrap HP 5 ml. **B)** O segundo cromatograma foi plotado nas mesmas unidades que o primeiro, sendo agora referente cromatografia por exclusão de tamanho, que foi realizado em sucessão ao etapa de purificação por afinidade. O procedimento foi feito utilizando o equipamento AKTA Pure e coluna Superdex increase 10/300 GL. A área do gráfico hachurada corresponde a fração de eluição que contém a proteína interesse (rendimento: 0,173 mg/L) baseada no peso molecular. **C e D)** Amostras correspondentes aos eluatos da purificação automatizada por afinidade (C) e por exclusão de tamanho (D) foram submetidas a eletroforese em gel. As caixas em destaque em azul correspondem ao aptâmero ZikaBlocker_3AP5 (18,08 kDa) que apresentou o peso molecular esperado. Na parte superior dos géis é possível verificar uma identificação nominal e numérica, onde MPM corresponde a marcador de peso molecular utilizado o PageRuler Unstained Protein Ladder (ThermoFisher).

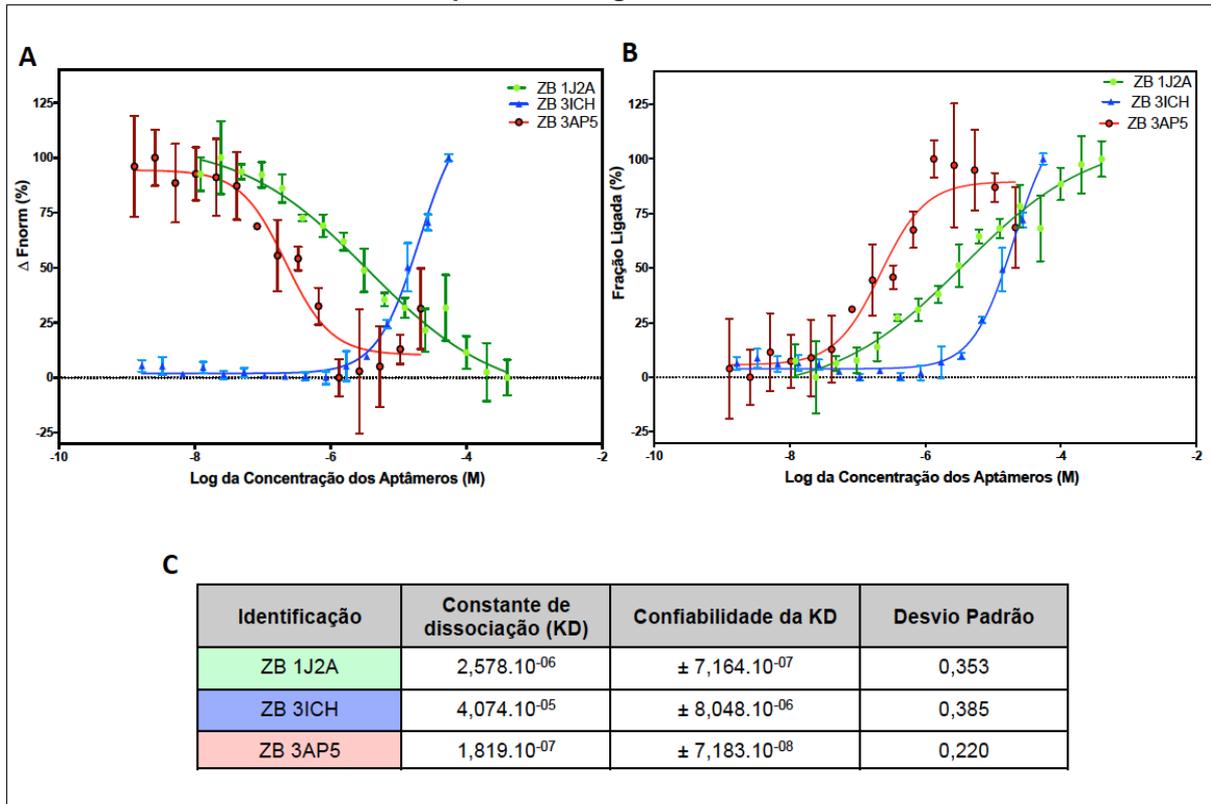
6.3 OBTENÇÃO DAS CONSTANTES DE DISSOCIAÇÃO (KD) DOS APTÂMEROS ZIKABLOCKER_3ICH, ZIKABLOCKER_1J2A, ZIKABLOCKER_3AP5 E mAb 4G2 FRENTE À PROTEÍNA DO ENVELOPE

Concluídos os processos de obtenção e purificação dos aptâmeros, procedemos com os ensaios de termoforese utilizando a metodologia descrita no item 5.3.2. Aqui, a ênfase será nas pequenas modificações executadas em cada sub-item, variando de acordo com o objetivo proposto.

6.3.1 Análise comparativa das constantes de dissociação dos aptâmeros ZikaBlocker_3ICH, ZikaBlocker_1J2A ZikaBlocker_3AP5 frente à proteína E à temperatura ambiente

Os três experimentos aqui demonstrados foram executados à temperatura ambiente. A concentração da proteína E de ZIKV marcada com foi mantida constante (50 nM), conforme descrito no item 7.11. A faixa de concentração utilizada para cada proteína foi: ZB_3ICH (54,9 μM - 0,00168 μM), ZB_1J2A (400 μM - 0.0122 μM), ZB_3AP5 (21,4 μM - 0,013 μM). As curvas dos aptâmeros frente ao seu alvo estão representadas de duas formas diferentes: em função da variação de fluorescência normalizada (em A) e em função das frações ligadas em porcentagem (em B). As constantes de afinidade obtidas para os aptâmeros ZB_3ICH, ZB_1J2A e ZB_3AP5 à temperatura ambiente foram respectivamente: $4,074 \cdot 10^{-05} \pm 8,048 \cdot 10^{-06}$, $2,578 \cdot 10^{-06} \pm 7,164 \cdot 10^{-07}$ e $1,819 \cdot 10^{-07} \pm 7,183 \cdot 10^{-08}$ (item C, figura 17) Segundo os resultados adquiridos, o aptâmero que apresentou o melhor desempenho foi o ZB_3AP5.

Figura 17 - Análise comparativa dos perfis de curva e das constantes de afinidade dos aptâmeros engenheirados.



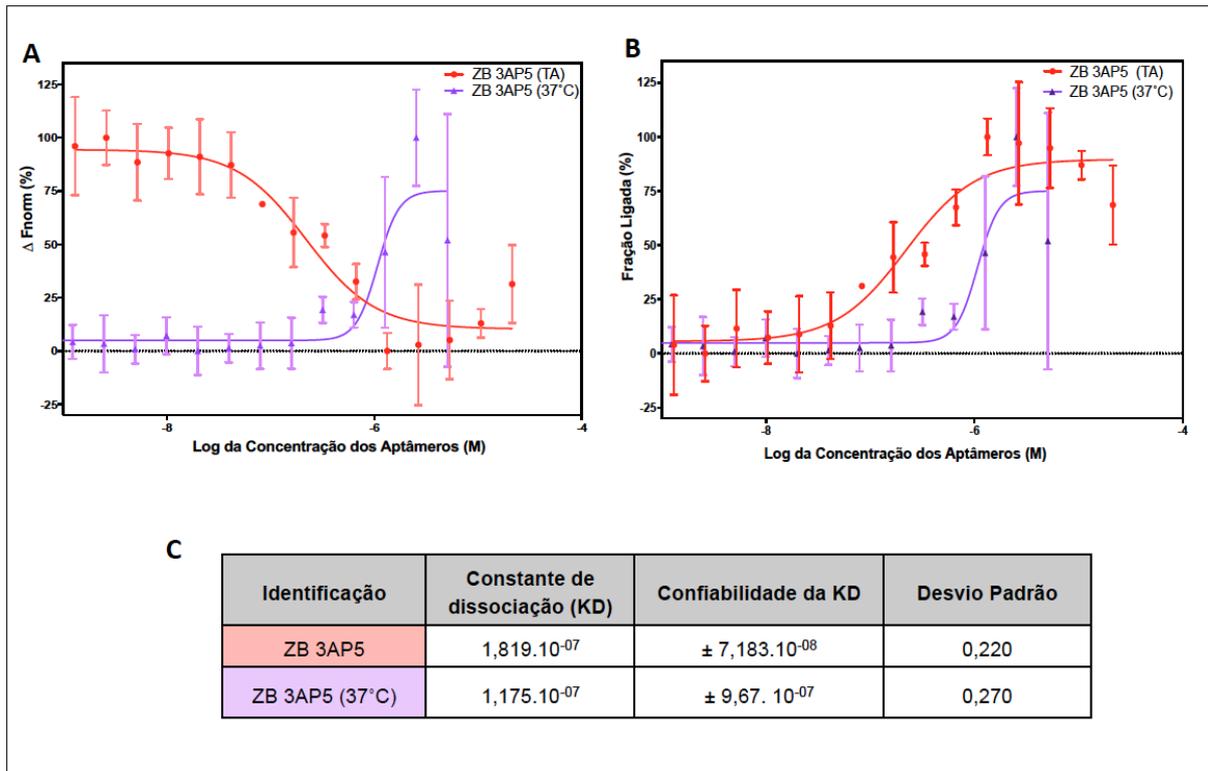
Fonte: A autora.

Nota: A) Comparação das curvas dos aptâmeros ZB_3ICH (azul), ZB_1J2A (verde) e ZB_3AP5 (vermelho) dadas pelo logaritmo da variação da concentração no eixo x em função da variação da fluorescência normalizada no eixo y dos respectivos aptâmeros. B) Representação dada pelo logaritmo da variação da concentração dos aptâmeros no eixo x dadas em função das frações ligadas em porcentagem. C) Tabela comparativa das constantes de dissociação obtidas. A proteína E marcada foi utilizada numa concentração constante de 50nM e os aptâmeros nas respectivas faixas: ZB_3ICH (54,9 μ M - 0,00168 μ M), ZB_1J2A (400 μ M - 0,0122 μ M), ZB_3AP5 (21,4 μ M - 0,013 μ M). Todos experimentos foram lidos em curvas de 16 pontos em triplicata no Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies). As barras de erro representam o desvio padrão.

6.3.2 Análise comparativa da variação das constantes de dissociação do aptâmero ZikaBlocker_3AP5 quando analisadas à temperatura ambiente (TA) e à 37°C frente à proteína E

Visando um conhecimento mais aprofundado acerca do aptâmero ZB_3AP5, aquele que apresentou melhor valor de constante de dissociação e por conseguinte, se liga de forma mais eficiente à proteína o envelope (tendo possivelmente um maior potencial diagnóstico e neutralizante), foi feito mais uma termoforese, agora à 37°C, visando a comparação do efeito temperatura na interação do aptâmero com a alça de fusão da proteína E (Figura 18).

Figura 18. Análise comparativa dos perfis de curva e das constantes de afinidade dos aptâmeros ZB_3AP5 em diferentes temperaturas.



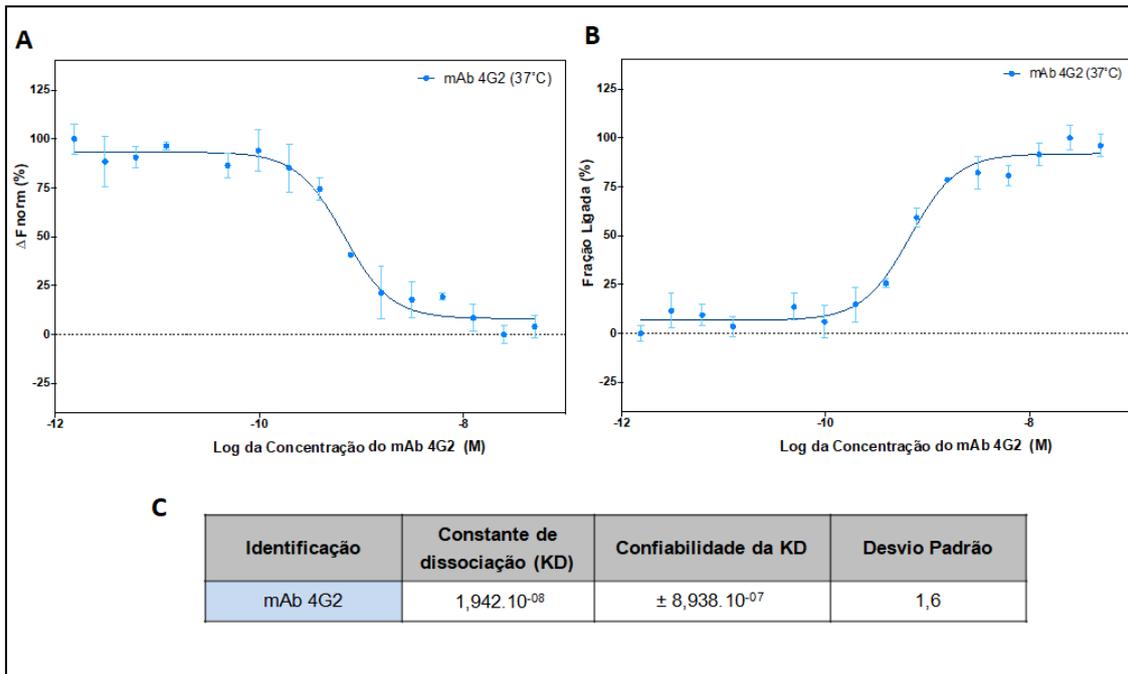
Fonte: A autora.

Nota: A) Comparação das curvas do aptâmero ZB_3AP5 TA (temperatura ambiente) em vermelho e ZB_3AP5 37°C em roxo, o resultado das curvas foi dado pelo logaritmo da variação da concentração no eixo x em função da variação da fluorescência normalizada no eixo y do respectivo aptâmero. B) Representação dada pelo logaritmo da variação da concentração aptâmero no eixo x dada em função das frações ligadas em porcentagem. C) Tabela comparativa das constantes de dissociação obtidas. A proteína E marcada foi utilizada na concentração constante de 50nM e os aptâmeros nas respectivas faixas: ZB_3AP5 TA (21,4 μ M - 0,013 μ M) e ZB_3AP5 (20 μ M - 0,000621 μ M). Todos experimentos foram lidos em curvas de 16 pontos em triplicata no Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies) as barras de erro representam o desvio padrão.

6.3.3 Obtenção da constante de dissociação do mAb 4G2 frente à proteína E

Em ausência do mAb 2A10G6, que foi o anticorpo referência para construção dos aptâmeros, utilizamos outro anticorpo monoclonal que sabidamente se liga à alça de fusão da proteína do Envelope do ZIKV (RAJAMANONMANI *et al.*, 2009). Similarmente ao realizado para o aptâmero ZB_3AP5, executamos dois ensaios à diferentes temperaturas, à 37°C o mAb 4G2 apresentou uma KD: $1,942 \cdot 10^{-08} \pm 8,938 \cdot 10^{-07}$ M (Figura 19), mas não apresentou ligação à 23°C (dados não mostrados).

Figura 19 - Análise da constante de afinidade do mAb 4G2 frente à proteína do Envelope de ZIKV.



Fonte: A autora.

Nota: **A)** Curva termoforética obtida logarítmo da variação da concentração do mAb no eixo x em função da variação da fluorescência normalizada. **B)** Representação dada pelo logarítmo da variação da concentração aptâmero no eixo x dada em função das frações ligadas em porcentagem. **C)** Tabela contendo a constante de afinidade, a confiabilidade da constante e o desvio padrão. A proteína do Envelope marcada foi utilizada numa concentração constante de 50nM e mAb 4G2 na faixa de $0.05 \mu\text{M} - 1,53 \cdot 10^{-6} \mu\text{M}$. Todos experimentos foram lidos em curvas de 16 pontos em triplicata no Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies) as barras de erro representam o desvio padrão.

7 DISCUSSÃO

Como produto de milhões de anos de evolução dirigida por pressão seletiva, a natureza desenvolveu uma extensa gama de proteínas com afinidades e especificidades variadas. Os mAbs são uma classe de moléculas com alta capacidade de ligação e por isso, tornaram-se ferramentas interessantes para aplicações terapêuticas e diagnósticas (DIMITROV; MARKS, 2009; SUZUKI *et al.*, 2015). Apesar dos muitos exemplos bem sucedidos, os anticorpos apresentam diversas desvantagens, como o seu alto peso molecular que leva a uma diminuição da sua difusão tecidual e o seu alto valor agregado. Além disso, podem desempenhar funções efetoras indesejadas, como indução de processos alérgicos (desenvolvimento de anticorpos humanos anti-camundongos (TJANDRA *et al.*, 1990)), causando uma diminuição do seu efeito terapêutico. Com o desenvolvimento de tecnologias de produção de anticorpos em organismos transgênicos e exibição de fagos, foi possível produzir versões quiméricas e humanizadas de anticorpos, trazendo vantagens como a elevação da meia-vida sérica e a redução significativa da imunogenicidade (LONBERG, 2008; WINTER; MILSTEIN, 1991). Adicionalmente, avanços nos métodos experimentais de obtenção de estruturas tridimensionais de proteínas juntamente com utilização de métodos computacionais de simulação molecular, revolucionaram a engenharia de anticorpos (BURLEY *et al.*, 2018; BURLEY, 2019; WESTBROOK). Dessa forma, tornou-se menos laborioso o processo de triagem dos sítios de interação intermoleculares, através de ferramentas capazes de gerar modificações na interface de interação, com a alteração de resíduos possivelmente prejudiciais à ligação/estabilidade individual ou do complexo. Além disso, possibilitou a realização de modificações na polaridade e análise de potenciais sítios de associação não totalmente explorados, viabilizando a geração de candidatos promissores que devem ser posteriormente submetidos à ensaios de validação (ADOLF-BRYFOGLE *et al.*, 2018; STROHL, 2018) como foram executados no presente projeto.

O mAb 2A10G6, utilizado como referência no desenho dos aptâmeros desse trabalho, demonstra perfil de resposta pan-neutralizante frente aos quatro sorotipos do vírus DENV, a WNV e a YFV *in vitro* e *in vivo* com caráter dose-dependente (DENG *et al.*, 2011). Esse mesmo anticorpo, demonstrou resposta satisfatória frente a desafio letal em ensaios *in vivo* contra o ZIKV. Um ensaio de cinética de interação

entre o mAb 2A10G6 e ZIKV foi realizado pelo mesmo grupo de pesquisa via ressonância plasmônica de superfície (SPR - *Superfície Plasmon Resonance*, tradução do inglês), onde constatou-se uma alta afinidade (KD: 2,7 nM) (DAI *et al.*, 2016).

Todos os aptâmeros de segunda geração construídos nesse trabalho possuíam afinidades teóricas superiores ao mAb 2A10G6, porém, quando avaliadas experimentalmente via MST, todas demonstraram afinidade de pelo menos 2 ordens de grandeza inferiores. Apesar de não termos obtido uma correlação exata entre os valores de ligação teóricos calculados a partir da ΔG (variação da energia livre), é possível fazer uma análise de tendência de afinidade. Os resultados teóricos apresentam um caráter ascendente: ZB_3ICH (KD_{teórico}: 17 nM) < ZB_3AP5 (KD_{teórico}: 0,0078 nM) < ZB_1J2A (KD_{teórico}: 1,4 fM) < ZB_4P01 (KD_{teórico}: 0,27 fM), os dados experimentais entretando, não respeitaram totalmente a ordem pré-estabelecida: ZB_3ICH ($4,074 \cdot 10^{-05} \pm 8,048 \cdot 10^{-06}$) < ZB_3AP5 ($1,819 \cdot 10^{-07} \pm 7,183 \cdot 10^{-08}$) < ZB_1J2A ($2,578 \cdot 10^{-06} \pm 7,164 \cdot 10^{-07}$). Nesse contexto, o fator que pode justificar a afinidade superior do ZB_3AP5 em detrimento do ZB_1J2A, é que o segundo apresenta-se em mais de um estado oligomérico (monômero, dímero e trímero), o que pode induzir alterações na sua constante de afinidade, devido à diminuição dos sítios de ligação disponíveis.

Apesar da comprovada eficiência no reconhecimento na alça de fusão pelos aptâmeros engenheirados, selecionamos aquele que apresentou maior afinidade para análise comparativa das afinidades em função da temperatura do ensaio. As constantes de afinidade obtidas nos ensaios de MST, mostraram que o aptâmero ZB_3AP5 possui uma afinidade superior em uma ordem de grandeza quando comparado a ele mesmo, variando apenas a temperatura (23°C) KD: $1,819 \cdot 10^{-07} \pm 7,183 \cdot 10^{-08}$ > (37°C) KD: $1,175 \cdot 10^{-06} \pm 9,67 \cdot 10^{-07}$. A alteração da afinidade em função da temperatura, também foi verificada para o mAb 4G2, o anticorpo escolhido por similarmente se ligar à alça de fusão, em substituição ao mAb de referência 2A10G6. A temperatura ambiente, o mAb 4G2 não apresentou ligação ao alvo, enquanto que apresentou uma KD: $1,942 \cdot 10^{-08} \pm 8,938 \cdot 10^{-07}$ à temperatura fisiológica.

Resultados consistentes com os anteriormente demonstrados, sugerem que a temperatura fisiológica induz diversas alterações na dinâmica conformacional da

proteína E de diferentes Flavivírus como ZIKV, WNV e todos os sorotipos de DENV (FIBRIANSAH *et al.*, 2015; GOO *et al.*, 2017; KOSTYUCHENKO *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2018; LIM *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2017), o que justifica a alteração das afinidades, visto que devido a essas modificações conformacionais, as regiões dos epítomos, bem como sua conformação, podem estar sujeitas à alterações de exposição, como relatado em estudos anteriores com outros arbovírus (ZHANG *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2013).

Embora as técnicas de engenharia de proteínas tenham fornecido muitos produtos úteis para aplicações industriais e biomédicas, a identificação de sequências, bem como a garantia de que as modificações executadas exibirão as atividades desejadas, continuam sendo um desafio. Isso se deve em parte ao conhecimento ainda insipiente das propriedades que determinam o dobramento e a dinâmica das proteínas (CHICA, 2015). Assim como as técnicas experimentais não são privadas de erros, os métodos computacionais possuem limitações (ROMO; GROSSFIELD, 2014). Duas falhas conhecidas e relatadas na literatura em relação ao uso do pacote de software do Rosetta são: 1) inserção errônea de aminoácidos polares no núcleo hidrofóbico e 2) criação de sítios pouco acessíveis ao solvente ricos em alanina (TINBERG; KHARE, 2017).

Como foi demonstrado experimentalmente, o ZikaBlocker_Linker1 apresentou-se insolúvel e durante a triagem computacional posterior, foi possível verificar a inserção de um aminoácido hidrofílico dentro núcleo hidrofóbico da proteína, fazendo com que a mesma não adquirisse sua conformação final de forma estável, o que inviabilizou o prosseguimento com essa estratégia.

A maioria das proteínas descritas na natureza apresentam-se apenas parcialmente estáveis (MAGLIERY, 2015), e quando submetidas à modificações ambientais (como por exemplo, expressão em organismo heterólogo) podem apresentar problemas como agregação e dobramento ineficiente. Podendo, portanto, com baixos rendimentos e má funcionalidade, o mesmo vale para proteínas engenheiradas (GOLDENZWEIG *et al.*, 2016). Entre os aptâmeros de segunda geração, o ZB_4P0L foi o único cuja execução dos ensaios foi inviabilizada, devido ao seu baixo rendimento. A principal dificuldade na obtenção experimental desses aptâmeros, foi a grande quantidade de precipitação apresentada pelos aptâmeros de segunda geração. Na tentativa de elucidar qual a justificativa associada a agregação

dos aptâmeros, identificamos a presença de cisteínas com cadeias laterais voltadas pra superfície no ZB_3AP5 e ZB_3ICH, o que provavelmente induz a formação de pontes dissulfeto entre os aptâmeros, promovendo então a agregação observada (FAN *et al.*, 2015). O ZB_1J2A entretanto, não possui cisteínas, e sua oligomerização, bem como agregação pode estar associadas ao seu potencial de superfície eletrostática, como demonstrado em estudos de agregação de proteínas (GALM *et al.*, 2017; PINDRUS *et al.*, 2017).

Baseado nos resultados obtidos nesse trabalho, é importante triar as melhorias que podem ser realizadas, como exclusão de sítios que propiciem dimerização (como cisteínas na superfície ou superfície de potencial eletrostático que favoreçam a agregação), uso de funções energia que com alta correspondência experimental, além de alterações nas sequências que possam favorecer o rendimento dos aptâmeros sem comprometer sua funcionalidade.

8 CONCLUSÕES

- a) A estimativa da energia de ligação serve como guia para estimar uma tendência de afinidade entre os aptâmeros gerados;
- b) Os aptâmeros peptídicos específicos gerados computacionalmente pela estratégia B são eficientes no reconhecimento da alça de fusão da proteína E do ZIKV com as respectivas constantes de afinidade à temperatura ambiente: $4,074 \cdot 10^{-05} \pm 8,048 \cdot 10^{-06}$ (ZB_3ICH), $2,578 \cdot 10^{-06} \pm 7,164 \cdot 10^{-07}$ (ZB_1J2A), $1,819 \cdot 10^{-07} \pm 7,183 \cdot 10^{-08}$ (ZB_3AP5);
- c) A temperatura interfere na interação do ZB_3AP5 com a alça de fusão da proteína E, provavelmente devido a modificações conformacionais na apresentação do epítipo, diminuindo a afinidade do ZB_3AP5 em uma ordem de grandeza quando compara-se a afinidade a temperatura ambiente ($1,819 \cdot 10^{-07} \pm 7,183 \cdot 10^{-08}$) e à 37°C ($1,175 \cdot 10^{-06} \pm 9,67 \cdot 10^{-07}$).

9 PERSPECTIVAS

- a) Ensaio de PRNT para avaliar a capacidade de bloqueio da infecção do ZB_3AP5 contra o ZIKV e outros Flavivírus;
- b) Realização de ensaios de ELISA utilizando o ZB_3AP5 no reconhecimento do ZIKV em amostras clínicas.

REFERÊNCIAS

- ABBINK, P. *et al.* Protective efficacy of multiple vaccine platforms against Zika virus challenge in rhesus monkeys. **Science**, New York, v. 353, p. 1129-1132, 2016.
- ACHARYA, D. *et al.* An ultrasensitive electrogenerated chemiluminescence-based immunoassay for specific detection of Zika virus. **Sci. Rep.**, London, v. 6, p. 32227, Aug 24 2016.
- ADOLF-BRYFOGLE, J. *et al.* RosettaAntibodyDesign (RAbD): A general framework for computational antibody design. **PLoS Comput. Biol.**, San Francisco, v. 14, p. e100612, 2018.
- ARAÚJO, T. V. B. de *et al.* Association between Zika virus infection and microcephaly in Brazil, January to May, 2016: preliminary report of a case-control study. **Lancet Infect Dis.**, New York, v. 16, p. 1356-1363, 2016.
- ARAÚJO, T. V. B. de *et al.* Association between microcephaly, Zika virus infection, and other risk factors in Brazil: final report of a case-control study. **Lancet Infect Dis.**, New York v. 18, p. 328-336, Mar 2018.
- AZAR, S. R. *et al.* Differential Vector Competency of Aedes albopictus Populations from the Americas for Zika Virus. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 97, p. 330-339, 2017.
- BAASKE, P. *et al.* Optical thermophoresis for quantifying the buffer dependence of aptamer binding. **Angew Chem. Int. Ed. Engl.**, New York, v. 49, p. 2238-2241, Mar 15 2010.
- BARRETO, M. L. *et al.* Zika virus and microcephaly in Brazil: a scientific agenda. **Lancet**, London, v. 387, p. 919-921, 2016.
- BECK, A. *et al.* Trends in glycosylation, glycoanalysis and glycoengineering of therapeutic antibodies and Fc-fusion proteins. **Curr. Pharm. Biotechnol.**, Hilversum, v. 9, n. 6, p. 482-501, Dec 2008.
- BELMUSTO-WORN, V. E. *et al.* Randomized, double-blind, phase III, pivotal field trial of the comparative immunogenicity, safety, and tolerability of two yellow fever 17D vaccines (Arlvax and YF-VAX) in healthy infants and children in Peru. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 72, p. 189-197, 2005.
- BERMAN, H.; HENRICK, K.; NAKAMURA, H. Announcing the worldwide Protein Data Bank. **Nat. Struct. Biol.**, New York, v. 10, p. 980, Dec 2003.

BERNSTEIN, F. C. *et al.* The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. **J. Mol. Biol.**, London, v. 112, p. 535-542, 1977.

BHATNAGAR, J. *et al.* Zika Virus RNA Replication and Persistence in Brain and Placental Tissue. **Emerg. Infect Dis.**, Atlanta, v. 23, p. 405-414, 2017.

BIERLAIRE, D. *et al.* Zika virus and blood transfusion: the experience of French Polynesia. **Transfusion**, Arlington, v. 57, p. 729-733, 2017.

BILELLO, J. A. The agony and ecstasy of "OMIC" technologies in drug development. **Curr. Mol. Med.**, Hilversum, v. 5, p. 39-52, 2005.

BIRCH, J. R.; RACHER, A. J. Antibody production. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, Amsterdam, v. 58, p. 671-685, 2006.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, v. 50 n. 22, 2017. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/setembro/11/BE-arbovirose-22.pdf> Acesso em: 12 out 2019.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, v. 48 n. 2, 2017. Disponível em: http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/janeiro/12/2017_001%20-%20Dengue%20SE51_publicacao.pdf Acesso em: 19 ago 2019.

BORGHOUTS, C.; KUNZ, C.; GRONER, B. Peptide aptamers: recent developments for cancer therapy. **Expert Opin. Biol. Ther.**, London, v. 5, p. 783-797, 2005.

BOWERS, P. M.; STRAUSS, C. E.; BAKER, D. De novo protein structure determination using sparse NMR data. **J. Biomol. N.M.R.**, Leiden, v. 18, n. 4, p. 311-318, 2000.

BRASIL, P. *et al.* Zika Virus Outbreak in Rio de Janeiro, Brazil: Clinical Characterization, Epidemiological and Virological Aspects. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, San Francisco. 10, p. e0004636, 2016.

BRIANT, L. *et al.* Role of skin immune cells on the host susceptibility to mosquito-borne viruses. **Virology**, New York, v. 464-465, p. 26-32, 2014.

BURLEY, S. K. *et al.* RCSB Protein Data Bank: Sustaining a living digital data resource that enables breakthroughs in scientific research and biomedical education. **Protein Sci.**, New York, v. 27, p. 316-330, 2018.

BURTON, D. R. Scaffolding to build a rational vaccine design strategy. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v. 107, p. 17859-1760, 2010.

- CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 21, p. 1885-1886, 2015.
- CAO-LORMEAU, V. M. *et al.* Guillain-Barre Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. **Lancet**, London, v. 387, p. 1531-1539, 2016.
- CARAVELLA, J. A. *et al.* Structure-Guided Design of Antibodies. **Curr. Comput. Aided Drug. Des.**, Sharjah, v. 6, p. 128-138, 2010.
- CARTER, P. J. Potent antibody therapeutics by design. **Nat. Rev. Immunol.**, London, v. 6, p. 343-357, 2006.
- CARTER, P. J. Introduction to current and future protein therapeutics: a protein engineering perspective. **Exp. Cell Res.**, New York, v. 317, p. 1261-1269, 2011.
- CHAMBERS, T. J. *et al.* Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v. 44, p. 649-688, 1990.
- CHEN, Y. *et al.* Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. **Nat. Med.**, New York, v. 3, p. 866-871, 1997.
- CHICA, R. A. Protein engineering in the 21st century. **Protein Sci.**, New York, v. 24, p. 431-433, 2015.
- CHILDERS, M. C.; DAGGETT, V. Insights from molecular dynamics simulations for computational protein design. **Mol. Syst. Des. Eng.**, Cambridge, v. 2, p. 9-33, 2017.
- CHU, J. J.; NG, M. L. Infectious entry of West Nile virus occurs through a clathrin-mediated endocytic pathway. **J. Virol.**, Washington, v. 78, p. 10543-10555, 2004.
- CLEAVER, D. J.; ALLEN, M. P. Computer simulations of the elastic properties of liquid crystals. **Phys. Rev. A.**, New York, v. 43, p. 1918-1931, 1991.
- COLAS, P. *et al.* Genetic selection of peptide aptamers that recognize and inhibit cyclin-dependent kinase 2. **Nature**, London, v. 380, p. 548-550, 1996.
- COLOMBO, M. *et al.* Peptide aptamers: The versatile role of specific protein function inhibitors in plant biotechnology. **J. Integr. Plant. Biol.**, Victoria, v. 57, p. 892-901, 2015.
- COUNOTTE, M. J. *et al.* Sexual transmission of Zika virus and other flaviviruses: A living systematic review. **PLoS Med.**, San Francisco, v. 15, p. e1002611, 2018.

COYNE, C. B.; LAZEAR, H. M. Zika virus - reigniting the TORCH. **Nat. Rev. Microbiol.**, London, v. 14, p. 707-715, 2016.

CRAWFORD, M.; WOODMAN, R.; KO FERRIGNO, P. Peptide aptamers: tools for biology and drug discovery. **Brief Funct. Genomic Proteomic**, London, v. 2, p. 72-79, 2003.

CRILL, W. D.; CHANG, G. J. Localization and characterization of flavivirus envelope glycoprotein cross-reactive epitopes. **J. Virol.**, Baltimore, v. 78, p. 13975-13986, 2004.

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

DANG, J. *et al.* Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3. **Cell Stem Cell**, Cambridge, v. 19, p. 258-265, 2016.

DASGUPTA, S. *et al.* Patterns in Zika Virus Testing and Infection, by Report of Symptoms and Pregnancy Status - United States, January 3-March 5, 2016. **M.M.W.R. Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, Atlanta, v. 65, p. 395-9, 2016.

DAVIDSON, A. *et al.* Suspected Female-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus - New York City, 2016. **M.M.W.R. Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, Atlanta, v. 65, p. 716-717, 2016.

DECKARD, D. T. *et al.* Male-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus--Texas, January 2016. **M.M.W.R. Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, Atlanta, v. 65, p. 372-374, 2016.

DEL CARPIO ORANTES, L. Guillain-Barre syndrome associated with zika virus infection in the Americas: A bibliometric study. **Neurologia**, Barcelona, 2018.

DENG, Y. Q. *et al.* A broadly flavivirus cross-neutralizing monoclonal antibody that recognizes a novel epitope within the fusion loop of E protein. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, p. e16059, 2011.

DESJARLAIS, J. R.; CLARKE, N. D. Computer search algorithms in protein modification and design. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, London, v. 8, p. 471-475, 1998.

DIALLO, D. *et al.* Zika virus emergence in mosquitoes in southeastern Senegal, 2011. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, p. e109442, 2014.

- DIAMOND, M. S.; LEDGERWOOD, J. E.; PIERSON, T. C. Zika Virus Vaccine Development: Progress in the Face of New Challenges. **Annu. Rev. Med.**, Palo Alto v. 70, p. 121-135, 2019.
- DICK, G. W. Zika virus. II. Pathogenicity and physical properties. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 46, p. 521-534, 1952.
- DICK, G. W.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 46, p. 509-520, 1952.
- DIMITROV, D. S.; MARKS, J. D. Therapeutic antibodies: current state and future trends--is a paradigm change coming soon? **Methods Mol. Biol.**, Clifton, v. 525, p. 1-527, 2009.
- DOWD, K. A. *et al.* Rapid development of a DNA vaccine for Zika virus. **Science**, New York, v. 354, p. 237-240, 2016.
- DRIGGERS, R. W. *et al.* Zika Virus Infection with Prolonged Maternal Viremia and Fetal Brain Abnormalities. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 374, p. 2142-2151, 2016.
- DUFFY, M. R. *et al.* Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 360, n. 24, p. 2536-2543, 2009.
- DUNBRACK, R. L., JR. Rotamer libraries in the 21st century. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, London, v. 12, p. 431-440, 2002.
- ECKER, D. M.; JONES, S. D.; LEVINE, H. L. The therapeutic monoclonal antibody market. **M.Ab.s**, Austin, v. 7, p. 9-14, 2015.
- EINSPIELER, C. *et al.* Association of Infants Exposed to Prenatal Zika Virus Infection With Their Clinical, Neurologic, and Developmental Status Evaluated via the General Movement Assessment Tool. **J.A.M.A. Netw. Open.**, Chicago, v. 2, p. e187235, 2019.
- ENGQVIST, M. K. M.; RABE, K. S. Applications of Protein Engineering and Directed Evolution in Plant Research. **Plant. Physiol.**, Lancaster, v. 179, p. 907-917, 2019.
- FAN, X. *et al.* Evidence of Highly Conserved beta-Crystallin Disulfidome that Can be Mimicked by In Vitro Oxidation in Age-related Human Cataract and Glutathione Depleted Mouse Lens. **Mol. Cell. Proteomics**, Bethesda, v. 14, p. 3211-3223, 2015.
- FAYE, O. *et al.* Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20(th) century. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, San Francisco, v. 8, p. e2636, 2014.

FIBRIANSAH, G. *et al.* A highly potent human antibody neutralizes dengue virus serotype 3 by binding across three surface proteins. **Nat. Commun.**, London, v. 6, p. 6341, 2015.

FONSECA, K. *et al.* First case of Zika virus infection in a returning Canadian traveler. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 91, p. 1035-1038, 2014.

FONTAINE, A. *et al.* Duration of Zika Viremia in Serum. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 67, p. 1143-1144, 2018.

FOY, B. D. *et al.* Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 17, n. 5, p. 880-882, May 2011.

FRANCA, G. V. *et al.* Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first 1501 livebirths with complete investigation. **Lancet**, London, v. 388, p. 891-897, 2016.

FRITZ, R. *et al.* The unique transmembrane hairpin of flavivirus fusion protein E is essential for membrane fusion. **J. Virol.**, Baltimore, v. 85, p. 4377-4385, 2011.

GALM, L.; AMRHEIN, S.; HUBBUCH, J. Predictive approach for protein aggregation: Correlation of protein surface characteristics and conformational flexibility to protein aggregation propensity. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v. 114, p. 1170-1183, 2017.

GARCEZ, P. P. *et al.* Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. **Science**, New York, v. 352, p. 816-818, 2016.

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

GOLDENZWEIG, A. *et al.* Automated Structure- and Sequence-Based Design of Proteins for High Bacterial Expression and Stability. **Mol. Cell**, Cambridge, v. 63, p. 337-346, 2016.

GOLLINS, S. W.; PORTERFIELD, J. S. Flavivirus infection enhancement in macrophages: an electron microscopic study of viral cellular entry. **J. Gen. Virol.**, London, v. 66, p. 1969-1982, 1985.

GONCALVEZ, A. P.; PURCELL, R. H.; LAI, C. J. Epitope determinants of a chimpanzee Fab antibody that efficiently cross-neutralizes dengue type 1 and type 2 viruses map to inside and in close proximity to fusion loop of the dengue type 2 virus envelope glycoprotein. **J. Virol.**, Baltimore, v. 78, p. 12919-12928, 2004.

GOO, L. *et al.* A single mutation in the envelope protein modulates flavivirus antigenicity, stability, and pathogenesis. **PLoS Pathog.**, San Francisco, v. 13, p. e1006178, 2017.

GORDON, D. B.; MARSHALL, S. A.; MAYO, S. L. Energy functions for protein design. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, London, v. 9, p. 509-513, 1999.

GRASLUND, S. *et al.* Protein production and purification. **Nat. Methods**, New York, v. 5, p. 135-146, 2008.

GRAY, J. J. *et al.* Protein-protein docking with simultaneous optimization of rigid-body displacement and side-chain conformations. **J. Mol. Biol.**, Amsterdam v. 331, p. 281-299, 2003.

GUERBOIS, M. *et al.* Outbreak of Zika Virus Infection, Chiapas State, Mexico, 2015, and First Confirmed Transmission by *Aedes aegypti* Mosquitoes in the Americas. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 214, p. 1349-1356, 2016.

HAN, K.; LIANG, Z.; ZHOU, N. Design strategies for aptamer-based biosensors. **Sensors (Basel)**, Basel, v. 10, p. 4541-4557, 2010.

HASAN, S. S. *et al.* A human antibody against Zika virus crosslinks the E protein to prevent infection. **Nat. Commun.**, London, v. 8, p. 14722, 2017.

HAYES, E. B. Zika virus outside Africa. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 15, p. 1347-1350, 2009.

HAZIN, A. N. *et al.* Computed Tomographic Findings in Microcephaly Associated with Zika Virus. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 374, p. 2193-2195, 2016.

HE, L.; ZHU, J. Computational tools for epitope vaccine design and evaluation. **Curr. Opin. Virol.**, Amsterdam, v. 11, p. 103-112, 2015.

HEANG, V. *et al.* Zika virus infection, Cambodia, 2010. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 18, p. 349-351, 2012.

HEINZ, F. X. *et al.* Field effectiveness of vaccination against tick-borne encephalitis. **Vaccine**, Amsterdam, v. 25, p. 7559-75567, 2007.

HILLS, S. L. *et al.* Transmission of Zika Virus Through Sexual Contact with Travelers to Areas of Ongoing Transmission - Continental United States, 2016. **M.M.W.R. Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, Atlanta, v. 65, p. 215-216, 2016.

HILVERT, D. Critical analysis of antibody catalysis. **Annu. Rev. Biochem.**, Palo Alto, v. 69, p. 751-793, 2000.

HIRSCH, A. J. *et al.* Zika Virus infection of rhesus macaques leads to viral persistence in multiple tissues. **PLoS Pathog.**, San Francisco v. 13, p. e1006219, 2017.

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

HOPPE-SEYLER, F. *et al.* Peptide aptamers: specific inhibitors of protein function. **Curr. Mol. Med.**, Hilversum, v. 4, p. 529-538, 2004.

IDEO, H. *et al.* Galectin-8-N-domain recognition mechanism for sialylated and sulfated glycans. **J. Biol. Chem.**, Baltimore. 286, p. 11346-11355, 2011.

IRESON, C. R.; KELLAND, L. R. Discovery and development of anticancer aptamers. **Mol. Cancer. Ther.**, Philadelphia, v. 5, p. 2957-2962, 2006.

JAYASENA, S. D. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. **Clin. Chem.**, Baltimore, v. 45, p. 1628-16250, 1999.

JERABEK-WILLEMSEN, M. *et al.* Molecular interaction studies using microscale thermophoresis. **Assay Drug. Dev. Technol.**, Larchmont, v. 9, p. 342-353, 2011.

JOHNSON, A. J.; ROEHRIG, J. T. New mouse model for dengue virus vaccine testing. **J. Virol.**, Baltimore, v. 73, p. 783-786, 1999.

KAUFMAN, B. M. *et al.* Monoclonal antibodies against dengue 2 virus E-glycoprotein protect mice against lethal dengue infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 36, p. 427-434, 1987.

KLEMA, V. J.; PADMANABHAN, R.; CHOI, K. H. Flaviviral Replication Complex: Coordination between RNA Synthesis and 5'-RNA Capping. **Viruses**, Basel, v. 7, p. 4640-4656, 2015.

KONNO, M. *et al.* Escherichia coli cyclophilin B binds a highly distorted form of trans-prolyl peptide isomer. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v. 271, p. 3794-3803, 2004.

KOSCHINSKI, A.; WENGLER, G.; REPP, H. The membrane proteins of flaviviruses form ion-permeable pores in the target membrane after fusion: identification of the pores and analysis of their possible role in virus infection. **J. Gen. Virol.**, London, v. 84, p. 1711-1721, 2003.

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

KOZLOV, G. *et al.* Structural basis of cyclophilin B binding by the calnexin/calreticulin P-domain. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 285, p. 35551-35557, 2010.

KRAEMER, M. U. *et al.* The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. **Elife**, Cambridge, v. 4, p. e08347, 2015.

KUNO, G.; CHANG, G. J. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. **Arch. Virol.**, Wien, v. 152, p. 687-696, 2007.

KUNO, G. *et al.* Phylogeny of the genus *Flavivirus*. **J. Virol.**, Baltimore, v. 72, p. 73-83, 1998.

KURODA, D. *et al.* Computer-aided antibody design. **Protein Eng. Des. Sel.**, Oxford, v. 25, p. 507-521, 2012.

LADNER, R. C. Constrained peptides as binding entities. **Trends Biotechnol.**, Amsterdam, v. 13, p. 426-430, 1995.

LANCIOTTI, R. S. *et al.* Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 14, p. 1232-1239, 2008.

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

LAZEAR, H. M.; DIAMOND, M. S. Zika Virus: New Clinical Syndromes and Its Emergence in the Western Hemisphere. **J. Virol.**, Baltimore, v. 90, p. 4864-4875, 2016.

LEDGERWOOD, J. E. *et al.* A West Nile virus DNA vaccine utilizing a modified promoter induces neutralizing antibody in younger and older healthy adults in a phase I clinical trial. **J. Infect. Dis.**, Chicago v. 203, p. 1396-1404, 2011.

LESSLER, J. *et al.* Assessing the global threat from Zika virus. **Science**, New York, v. 353, p. aaf8160, 2016.

LI, J. *et al.* Structural and Functional Characterization of a Cross-Reactive Dengue Virus Neutralizing Antibody that Recognizes a Cryptic Epitope. **Structure**, London, v. 26, p. 51-59 e4, 2018.

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

LICHTY, J. J. et al. Comparison of affinity tags for protein purification. **Protein. Expr. Purif.**, San Diego, v. 41, p. 98-105, 2005.

LIM, X. X. et al. Conformational changes in intact dengue virus reveal serotype-specific expansion. **Nat. Commun.**, London, v. 8, p. 14339, 2017.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. **Adv. Virus. Res.**, New York, v. 59, p. 23-61, 2003.

LONBERG, N. Fully human antibodies from transgenic mouse and phage display platforms. **Curr. Opin. Immunol.**, London, v. 20, p. 450-459, 2008.

MA, W. et al. Zika Virus Causes Testis Damage and Leads to Male Infertility in Mice. **Cell**, Cambridge, v. 167, p. 1511-1524 e10, 2016.

MACKENZIE, J. M.; JONES, M. K.; WESTAWAY, E. G. Markers for trans-Golgi membranes and the intermediate compartment localize to induced membranes with distinct replication functions in flavivirus-infected cells. **J. Virol.**, Baltimore, v. 73, p. 9555-9567, 1999.

MACNAMARA, F. N. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 48, p. 139-145, 1954.

MAEDA, A.; MAEDA, J. Review of diagnostic plaque reduction neutralization tests for flavivirus infection. **Vet. J.**, London, v. 195, p. 33-40, 2013.

MAGLIERY, T. J. Protein stability: computation, sequence statistics, and new experimental methods. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, London, v. 33, p. 161-168, 2015.

MANSUY, J. M. et al. Zika virus: high infectious viral load in semen, a new sexually transmitted pathogen? **Lancet Infect Dis.**, New York, v. 16, p. 405, 2016.

MANSUY, J. M. et al. Zika virus in semen and spermatozoa. **Lancet Infect Dis.**, New York, v. 16, p. 1106-1107, 2016.

MARTINES, R. B. et al. Pathology of congenital Zika syndrome in Brazil: a case series. **Lancet**, London, v. 388, p. 898-904, 2016.

MARTINES, R. B. *et al.* Notes from the Field: Evidence of Zika Virus Infection in Brain and Placental Tissues from Two Congenitally Infected Newborns and Two Fetal Losses - Brazil, 2015. **M.M.W.R. Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, Atlanta, v. 65, p. 159-160, 2016.

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

MLAKAR, J. *et al.* Zika Virus Associated with Microcephaly. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 374, p. 951-958, 2016.

MODIS, Y. *et al.* A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v. 100, p. 6986-6991, 2003.

MODIS, Y. *et al.* Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature**, London, v. 427, p. 313-319, 2004.

MOORE, J. C. *et al.* Strategies for the in vitro evolution of protein function: enzyme evolution by random recombination of improved sequences. **J. Mol. Biol.**, Amsterdam, v. 272, p. 336-347, 1997.

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nat. Rev. Microbiol.**, London, v. 3, p. 13-22, 2005.

MUNJAL, A. *et al.* Advances in Developing Therapies to Combat Zika Virus: Current Knowledge and Future Perspectives. **Front. Microbiol.**, Lausanne, v. 8, p. 1469, 2017.

MUSSO, D. Zika Virus Transmission from French Polynesia to Brazil. **Emerg. Infect Dis.**, Atlanta, v. 21, p. 1887, 2015.

MUSSO, D. Infections in French Polynesia. **New Microbes New Infect**, Hoboken, v. 27, p. 27-28, 2019.

MUSSO, D. *et al.* Detection of Zika virus RNA in semen of asymptomatic blood donors. **Clin. Microbiol. Infect**, Paris, v. 23, p. 1001 e1-1001 e3, 2017.

MUSSO, D. *et al.* Detection of Zika virus in saliva. **J. Clin. Virol.**, Amsterdam, v. 68, p. 53-55, 2015.

NETHERTON, C. *et al.* A guide to viral inclusions, membrane rearrangements, factories, and viroplasm produced during virus replication. **Adv. Virus Res.**, New York, v. 70, p. 101-182, 2007.

NIELSEN-SAINES, K. *et al.* Delayed childhood neurodevelopment and neurosensory alterations in the second year of life in a prospective cohort of ZIKV-exposed children. **Nat. Med.**, New York, v. 25, p. 1213-1217, 2019.

NILSSON, J. *et al.* Affinity fusion strategies for detection, purification, and immobilization of recombinant proteins. **Protein Expr. Purif.**, Orlando, v. 11, p. 1-16, 1997.

NOVOA, R. R. *et al.* Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis. **Biol. Cell.**, Ivry sur Seine France, v. 97, p. 147-172, 2005.

OOSTENBRINK, C. *et al.* A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: the GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. **J. Comput. Chem.**, New York, v. 25, p. 1656-1676, 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Director-General Summarizes the Outcome of Emergency Committee Regarding clusters of microcephaly and Guillain-Barré syndrome.** Geneva: OMS: 2016. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2016/emergency-committee-zikamicrocephaly/en/> Acesso em: 10 jul 2019.

PAUL, D.; BARTENSCHLAGER, R. Architecture and biogenesis of plus-strand RNA virus replication factories. **World J. Virol.**, Hong Kong, v. 2, p. 32-48, 2013.

PAWLEY, D. C. *et al.* Highly Sensitive and Selective Direct Detection of Zika Virus Particles in Human Bodily Fluids for Accurate Early Diagnosis of Infection. **A.C.S. Omega**, Washington, D.C., v. 4, p. 6808-6818, 2019.

PAZ-BAILEY, G. *et al.* Persistence of Zika Virus in Body Fluids - Final Report. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.379, p. 1234-1243. 2017.

PETREY, D.; HONIG, B. Protein structure prediction: inroads to biology. **Mol. Cell**, Cambridge, v. 20, p. 811-819, 2005.

PIERSON, T. C.; DIAMOND, M. S. Molecular mechanisms of antibody-mediated neutralisation of flavivirus infection. **Expert Rev. Mol. Med.**, Cambridge, v. 10, p. e12, 2008.

PIERSON, T. C.; GRAHAM, B. S. Zika Virus: Immunity and Vaccine Development. **Cell**, Cambridge, v. 167, p. 625-631, 2016.

PINDRUS, M. A. *et al.* Effect of Aggregation on the Hydrodynamic Properties of Bovine Serum Albumin. **Pharm. Res.**, Stuttgart, v. 34, p. 2250-2259, 2017.

- PRIYAMVADA, L. *et al.* Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, D.C., v. 113, p. 7852-7857, 2016.
- PRONK, S. *et al.* GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. **Bioinformatics**, Oxford, v. 29, p. 845-854, 2013.
- RAJAMANONMANI, R. *et al.* On a mouse monoclonal antibody that neutralizes all four dengue virus serotypes. **J. Gen. Virol.**, London, v. 90, p. 799-809, 2009.
- RAMOS, C. R. *et al.* A high-copy T7 Escherichia coli expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Braz J. Med. Biol. Res.**, São Paulo, v. 37, p. 1103-1109, 2004.
- ROA, M. Zika virus outbreak: reproductive health and rights in Latin America. **Lancet**, London, v. 387, p. 843, 2016.
- RODENHUIS-ZYBERT, I. A.; WILSCHUT, J.; SMIT, J. M. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. **Cell Mol. Life Sci.**, Basel, v. 67, p. 2773-2786, 2010.
- ROEHRIG, J. T. *et al.* Antibody prophylaxis and therapy for flavivirus encephalitis infections. **Ann. N Y. Acad. Sci.**, New York, v. 951, p. 286-297, 2001.
- ROHL, C. A. *et al.* Modeling structurally variable regions in homologous proteins with rosetta. **Proteins**, New York, v. 55, p. 656-677, 2004.
- ROHL, C. A. *et al.* Protein structure prediction using Rosetta. **Methods Enzymol.**, New York, v. 383, p. 66-93, 2004.
- ROMO, T. D.; GROSSFIELD, A. Unknown unknowns: the challenge of systematic and statistical error in molecular dynamics simulations. **Biophys J.**, Cambridge, v. 106, p. 1553-1554, 2014.
- ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. **Front. Microbiol.**, Lausanne, v. 5, p. 172, 2014.
- ROTH, A. *et al.* Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections - an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012-2014. **Euro Surveill.**, Saint-Maurice, v. 19, n. 41, 2014.
- SAFRONETZ, D. *et al.* Evaluation of 5 Commercially Available Zika Virus Immunoassays. **Emerg. Infect Dis.**, Atlanta, v. 23, p. 1577-1580, 2017.

SAMISH, I. *et al.* Theoretical and computational protein design. **Annu. Rev. Phys. Chem.**, Palo Alto, v. 62, p. 129-149, 2011.

SAMPATHKUMAR, P.; SANCHEZ, J. L. Zika Virus in the Americas: A Review for Clinicians. **Mayo Clin. Proc.**, Rochester, v. 91, p. 514-521, 2016.

SHAWAN, M. M. A. K. *et al.* In Silico Modeling and Immunoinformatics Probing Disclose the Epitope Based Peptide Vaccine Against Zika Virus Envelope Glycoprotein. **Indian Journal of Pharmaceutical and Biological Research**, v. 2, n. 4, p. 44-57, 2014.

SIRONI, M. *et al.* Nonstructural Proteins Are Preferential Positive Selection Targets in Zika Virus and Related Flaviviruses. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, San Francisco, v. 10, p. e0004978, 2016.

SILVA E MOUTA, S., JR. *et al.* Simple immunoaffinity method to purify recombinant hepatitis B surface antigen secreted by transfected mammalian cells. **J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed Life Sci.**, Amsterdam, v. 787, p. 303-311, 2003.

SKERRA, A. Alternative non-antibody scaffolds for molecular recognition. **Curr. Opin. Biotechnol.**, London, v. 18, p. 295-304, 2007.

SMITH, S. L. Ten years of Orthoclone OKT3 (muromonab-CD3): a review. **J. Transpl. Coord.**, Copenhagen, v. 6, p. 109-119, 1996.

SONG, J. *et al.* Instrument-Free Point-of-Care Molecular Detection of Zika Virus. **Anal. Chem.**, Washington, v. 88, p. 7289-7294, 2016.

SOUZA, W. V. *et al.* Microcephaly epidemic related to the Zika virus and living conditions in Recife, Northeast Brazil. **B.M.C. Public. Health.**, London, v. 18, p. 130, 2018.

STEGMANN, B. J.; CAREY, J. C. TORCH Infections. Toxoplasmosis, Other (syphilis, varicella-zoster, parvovirus B19), Rubella, Cytomegalovirus (CMV), and Herpes infections. **Curr. Womens Health. Rep.**, Philadelphia, v. 2, p. 253-258, 2002.

STETTLER, K. *et al.* Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. **Science**, New York, v. 353, p. 823-826, 2016.

STROHL, W. R. Current progress in innovative engineered antibodies. **Protein Cell**, Heidelberg, v. 9, p. 86-120, 2018.

SUZUKI, M.; KATO, C.; KATO, A. Therapeutic antibodies: their mechanisms of action and the pathological findings they induce in toxicity studies. **J. Toxicol. Pathol.**, Tóquio, v. 28, p. 133-139, 2015.

TANG, H. *et al.* Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. **Cell Stem Cell**, Cambridge, v. 18, p. 587-590, 2016.

TIAN, B. *et al.* Attomolar Zika virus oligonucleotide detection based on loop-mediated isothermal amplification and AC susceptometry. **Biosens. Bioelectron.**, Barking, v. 86, p. 420-425, 2016.

TINBERG, C. E.; KHARE, S. D. Computational Design of Ligand Binding Proteins. **Methods Mol. Biol.**, Clifton, v. 1529, p. 363-373, 2017.

TJANDRA, J. J. *et al.* Development of human anti-murine antibody (HAMA) response in patients. **Immunol. Cell Biol.** Adelaide, v.68, p. 367-376, 1990.

UHLEN, M. *et al.* Fusion proteins in biotechnology. **Curr. Opin. Biotechnol.**, London, v. 3, p. 363-369, 1992.

VAN GUNSTEREN, W. F. *et al.* Biomolecular modeling: Goals, problems, perspectives. **Angew Chem. Int. Ed. Engl.**, Weinheim, v. 45, p. 4064-4092, 2006.

VASILAKIS, N.; WEAVER, S. C. Flavivirus transmission focusing on Zika. **Curr. Opin. Virol.**, Amsterdam, v. 22, p. 30-35, 2017.

VIANNA, P. *et al.* Zika Virus as a Possible Risk Factor for Autism Spectrum Disorder: Neuroimmunological Aspects. **Neuroimmunomodulation**, Basel, v. 25, p. 320-327, 2018.

VIRAL ZONE. **Zikavirus**. 2015. Disponível em: https://viralzone.expasy.org/24?outline=all_by_species Acesso em: 20 de Ago de 2018.

WAUGH, D. S. Making the most of affinity tags. **Trends Biotechnol.**, Amsterdam, v. 23, p. 316-320, 2005.

WEAVER, S. C. *et al.* Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. **Antiviral Res.**, Amsterdam, v. 130, p. 69-80, 2016.

WESTBROOK, J. D.; BURLEY, S. K. How Structural Biologists and the Protein Data Bank Contributed to Recent FDA New Drug Approvals. **Structure**, London, v. 27, p. 211-217, 2019.

WIENKEN, C. J. *et al.* Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis. **Nat. Commun.**, London, v. 1, p. 100, 2010.

WINTER, G.; MILSTEIN, C. Man-made antibodies. **Nature**, London, v. 349, p. 293-299, 1991.

WU, Y. *et al.* Neutralization of Zika virus by germline-like human monoclonal antibodies targeting cryptic epitopes on envelope domain III. **Emerg. Microbes Infect.**, New York, v. 6, p. e89, 2017.

XU, Y.; YAMAMOTO, N.; JANDA, K. D. Catalytic antibodies: hapten design strategies and screening methods. **Bioorg. Med. Chem.**, Oxford, v. 12, p. 5247-5268, 2004.

YOCKEY, L. J. *et al.* Vaginal Exposure to Zika Virus during Pregnancy Leads to Fetal Brain Infection. **Cell**, Cambridge, v. 166, p. 1247-1256 e4, 2016.

YOUNG, C. L.; BRITTON, Z. T.; ROBINSON, A. S. Recombinant protein expression and purification: a comprehensive review of affinity tags and microbial applications. **Biotechnol J.**, Weinheim, v. 7, p. 620-634, 2012.

ZHANG, S. *et al.* Neutralization mechanism of a highly potent antibody against Zika virus. **Nat. Commun.**, London, v. 7, p. 13679, 2016.

ZHANG, X. *et al.* Cryo-EM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, New York, v. 20, p. 105-110, 2013.

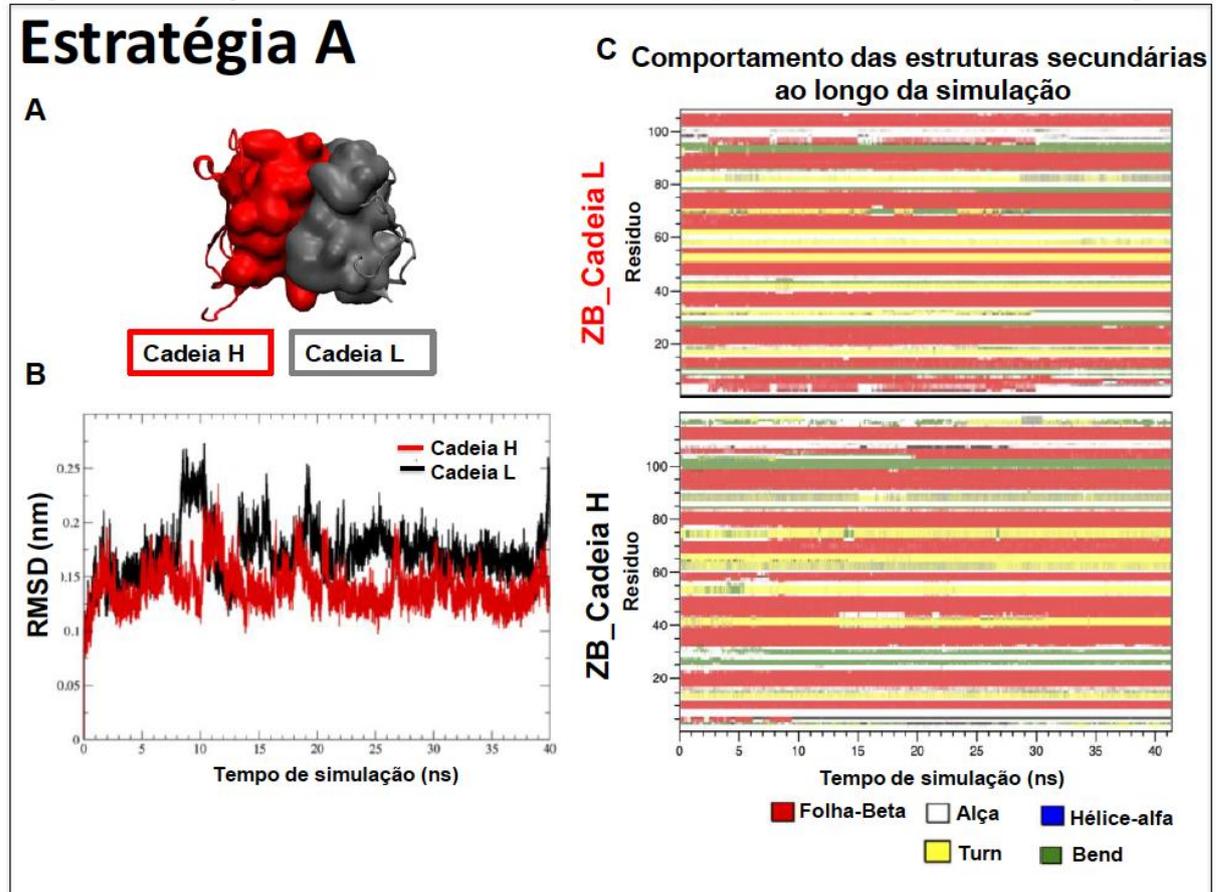
ZHANG, Y. *et al.* Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein. **Structure**, London, v. 12, p. 1607-1618, 2004.

ZHAO, H. *et al.* Structural Basis of Zika Virus-Specific Antibody Protection. **Cell**, Cambridge, v. 166, p. 1016-1027, 2016.

ZILLNER, K. *et al.* Microscale thermophoresis as a sensitive method to quantify protein: nucleic acid interactions in solution. **Methods Mol. Biol.**, Clifton, v. 815, p. 241-252, 2012.

ANEXO A - FIGURA 1

Figura 1 - Avaliação estrutural das cadeias H e L dos aptâmeros da referentes à estratégia A



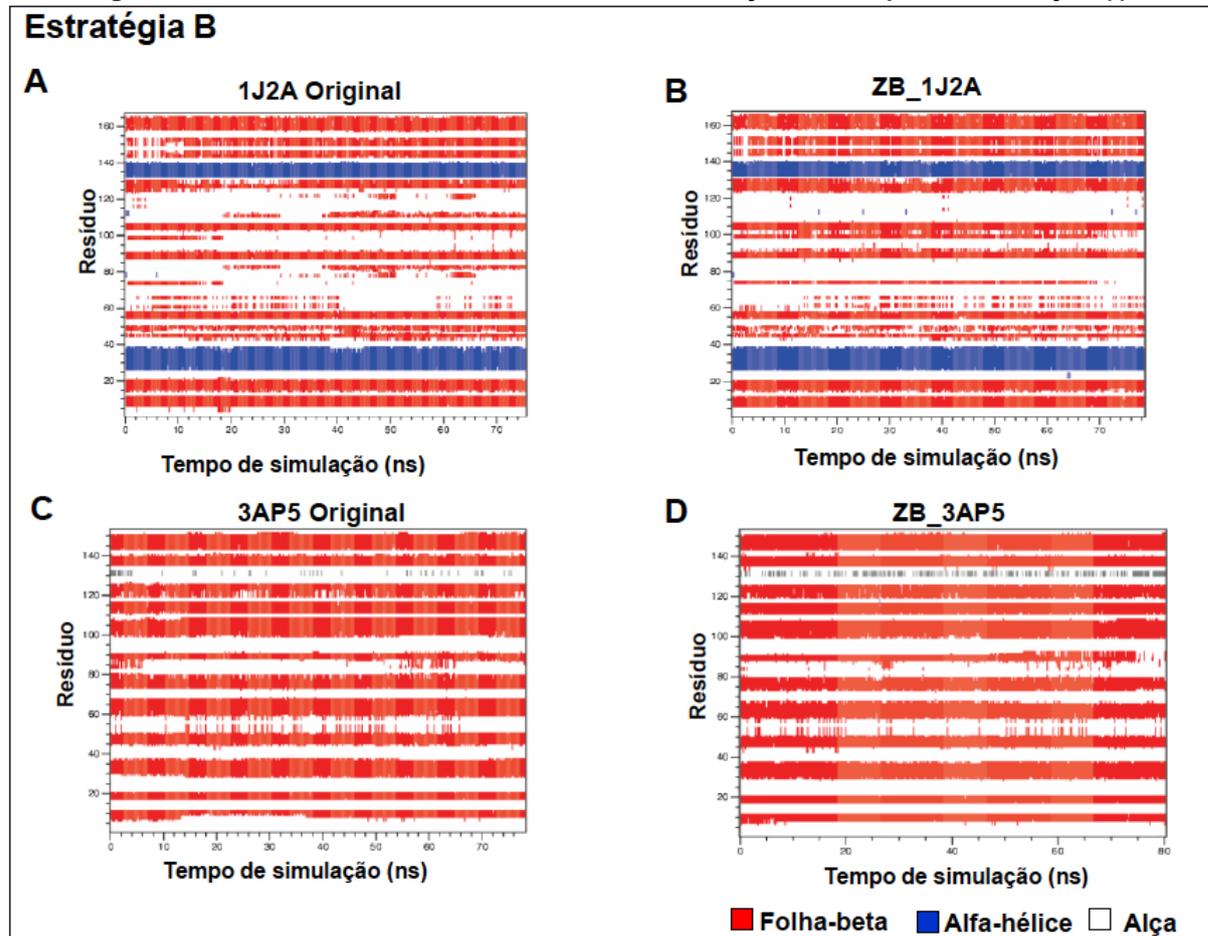
Fonte: Adaptado de Cruz (em fase de elaboração*).

Nota: O RMSD (*root mean square deviation*, desvio quadrático médio, tradução do inglês) é a medida da diferença geométrica entre um ou mais estruturas em comparação com uma estrutura de referência **A)** Esquema ilustrativo das cadeias engenheiradas. **B)** RMSD¹ dos átomos do do backbone da proteína desenhada em função do tempo. **C)** Comportamento das estruturas secundárias ao longo da simulação, onde constata-se manutenção estrutural.

* O trabalho do autor supracitado encontra-se em fase de elaboração.

ANEXO B - FIGURA 2

Figura 2 - Conteúdo de estrutura secundária em função do tempo de simulação (I)



Fonte: Adaptado de Cruz (em fase de elaboração*).

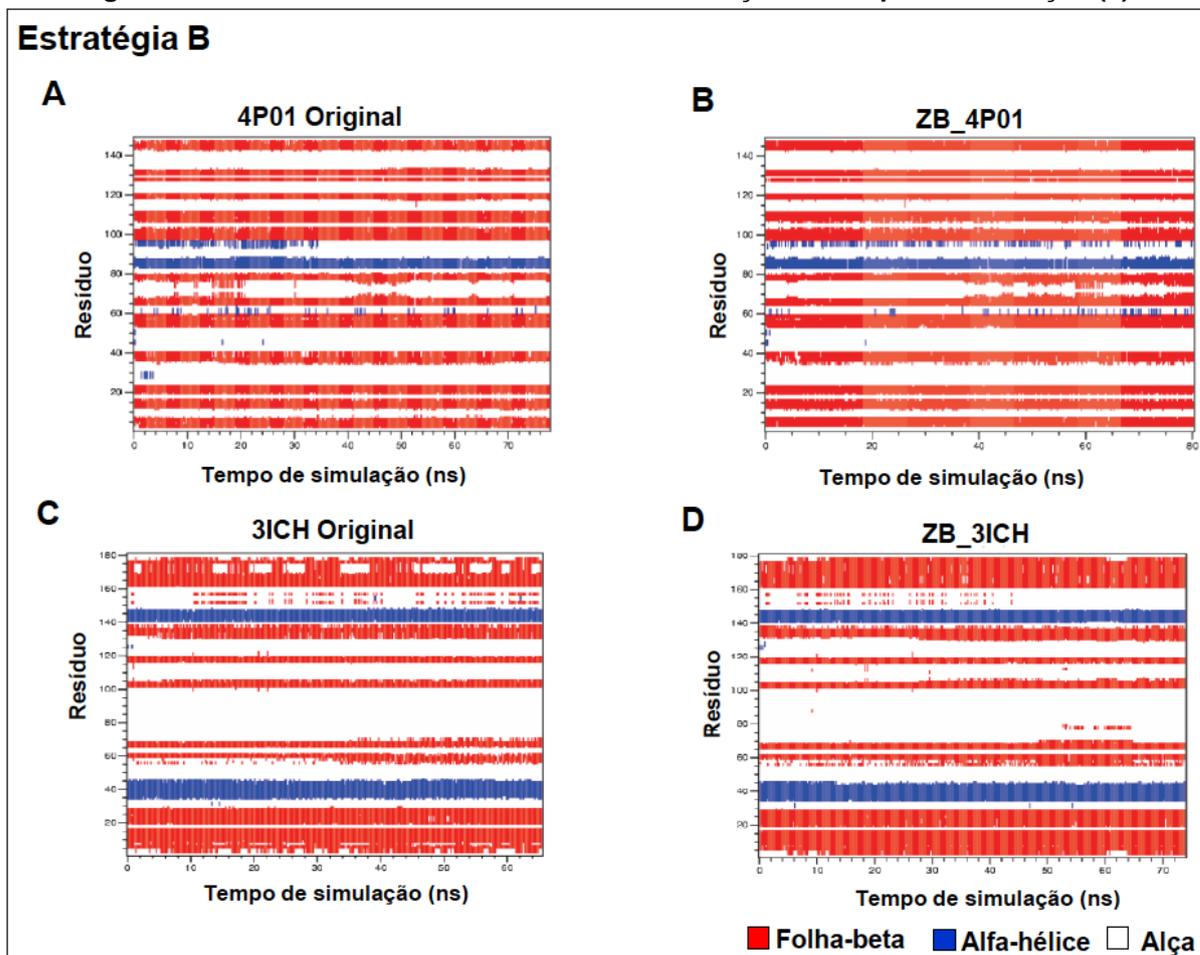
Nota: **A) e B)** Comparação do comportamento das estruturas secundárias da proteína 1J2A e do aptâmero ZB_1J2A ao longo da simulação, onde constata-se manutenção estrutural.

C) e D) Comparação do comportamento das estruturas secundárias da proteína 3AP5 e do aptâmero ZB_1J2A ao longo da simulação, onde constata-se manutenção estrutural. O padrão de cores representa vermelho para as folhas- β , azul α -hélice e branco regiões não estruturadas (alça).

* O trabalho do autor supracitado encontra-se em fase de elaboração.

ANEXO C - FIGURA 3

Figura 3 - Conteúdo de estrutura secundária em função do tempo de simulação (II)



Fonte: Adaptado de Cruz (em fase de elaboração*).

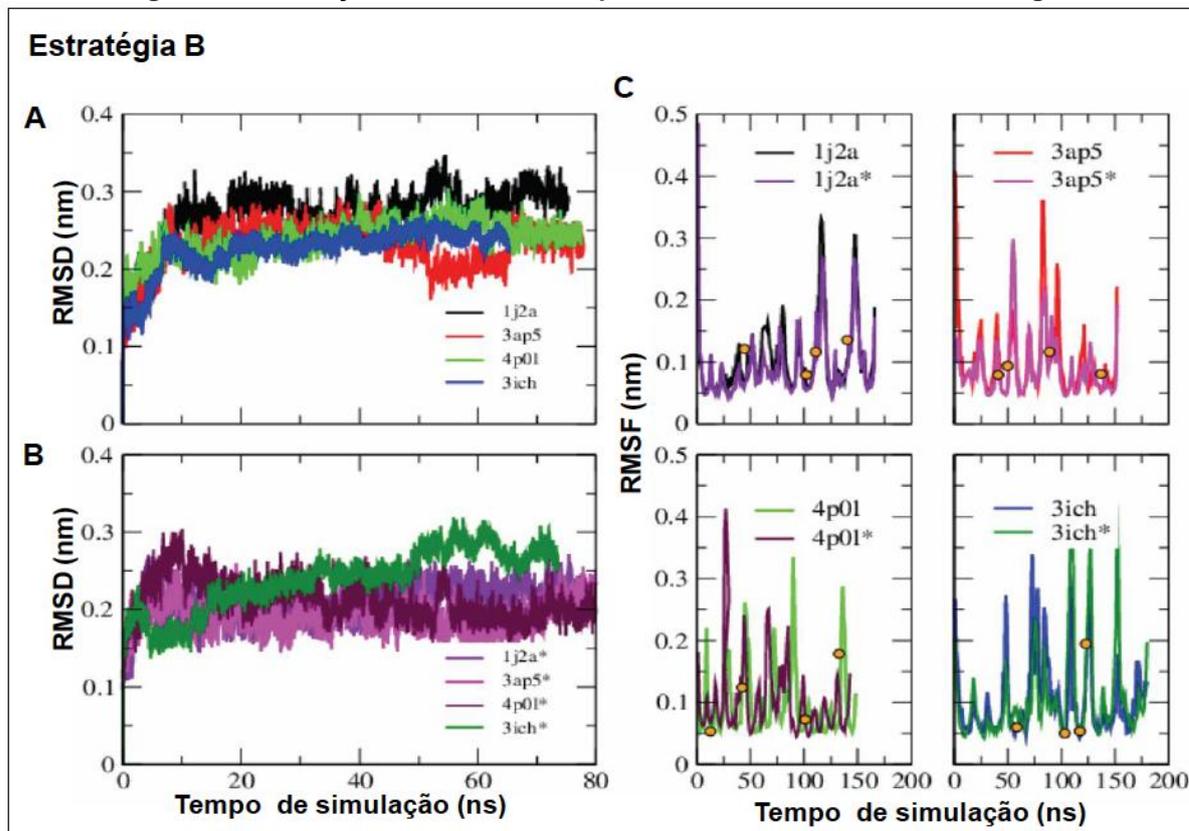
Nota: **A) e B)** Comparação do comportamento das estruturas secundárias da proteína 4P01 e do aptâmero ZB_4P01 ao longo da simulação, onde constata-se manutenção estrutural.

C) e D) Comparação do comportamento das estruturas secundárias da proteína 3ICH e do aptâmero ZB_3ICH ao longo da simulação, onde constata-se manutenção estrutural. O padrão de cores representa vermelho para as folhas- β , azul α -hélice e branco regiões não estruturadas (alça).

* O trabalho do autor supracitado encontra-se em fase de elaboração.

ANEXO D - FIGURA 4

Figura 4 - Avaliação estrutural dos aptâmeros dos referentes à estratégia B



Fonte: Adaptado de Cruz (em fase de elaboração*).

Nota: RMSF² - (*root mean square fluctuation*, flutuação quadrática média, tradução do inglês) é a medida da diferença geométrica da flutuação entre um ou mais estruturas em comparação com uma estrutura de referência. **A)** RMSD dos átomos do backbone das proteínas utilizadas como suporte (scaffolds) em função do tempo. **B)** RMSD dos átomos do backbone dos aptâmeros desenhados em função do tempo. **C)** RMSF² em função do tempo. Comportamento das estruturas secundárias ao longo da simulação. A partir desse resultado é possível inferir que a presença dos resíduos transplantados não prejudica a estabilidade da proteína.

* O trabalho do autor supracitado encontra-se em fase de elaboração.