



**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**PRODUÇÃO DA PROTEÍNA DO ENVELOPE DO ZIKA VÍRUS MODIFICADA  
PARA FORMAÇÃO DE DÍMEROS.**

**MARCOS ANTONIO AMORIM SANTOS JUNIOR**

**Salvador – Bahia**

**2021**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

**INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**PRODUÇÃO DA PROTEÍNA DO ENVELOPE DO ZIKA VÍRUS MODIFICADA  
PARA FORMAÇÃO DE DÍMEROS.**

**MARCOS ANTONIO AMORIM SANTOS JUNIOR**

Orientadora: Dra. Maria Fernanda Rios Grassi

Co-orientador: Dr. Carlos Gustavo Regis da Silva

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa como requisito para a obtenção do título de Mestre.

**Salvador – Bahia**

**2021**

"PRODUÇÃO DA PROTEÍNA DO ENVELOPE DO ZIKA VÍRUS MODIFICADA PARA FORMAÇÃO DE DÍMEROS".

MARCOS ANTONIO AMORIM SANTOS JUNIOR

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 05 de fevereiro de 2021.

COMISSÃO EXAMINADORA

*Thamires Quadros Froes*

---

Dra. Thamires Quadros Froes  
Pesquisadora  
USP



---

Dr. Humberto Fonseca de Freitas  
Pesquisador  
UFBA

*Luciano Kalabric Silva*

---

Dr. Luciano Kalabric Silva  
Pesquisador  
IGM/FIOCRUZ

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB)  
Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior – Brasil (CAPES)-  
Código de Financiamento 001

Dedico este trabalho para o amor de minha vida, para a pessoa que mais acredita em mim, que mais me incentiva e me apoia, para a pessoa que sempre está a disposição para me ajudar, para  
minha mãe.

Eu te amo, mainha!

## AGRADECIMENTOS

A Deus por essa conquista em minha carreira, por me dar saúde mental e física e por não me deixar enfraquecer na minha trajetória;

À minha querida Mãe, Martha Rejane, por todo o amor, carinho, incentivo e apoio durante toda a minha vida;

Aos meus irmãos, Bruno e Matheus, pela irmandade, incentivo e por acreditar em mim;

À toda a minha família que sempre me mandam boas energias e pensamentos positivos. Minha avó, meu avô, tios, tias, primos e primas;

A todos os meus amigos, por me ouvir, me aconselhar, por me ajudar a distrair nos momentos difíceis e principalmente por estarem sempre ao meu lado;

À Alessandra Ribeiro, minha namorada, por me incentivar e apoiar, pela paciência comigo nos momentos difíceis e principalmente pelo carinho e cuidado comigo;

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa do Instituto Gonçalo Moniz por viabilizar o curso com excelência;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pela concessão da bolsa de estudo;

À Dra. Maria Fernanda Rios Grassi, minha orientadora, pela oportunidade que me foi dada e pela confiança em mim depositada;

Ao Dr. Carlos Gustavo Regis da Silva pela coorientação no mestrado, por todos os ensinamentos e por me acompanhar e incentivar durante toda a minha trajetória na ciência;

Ao Dr. Geraldo Gileno de Sá Oliveira pela colaboração durante todo o meu trabalho;

A todos os alunos grupo de pesquisa GGSO que estiveram presentes comigo nos melhores e piores momentos. Especialmente para meus amigos Paula Dantas, Fernanda Lessa, Pamela Santana, Aisla Mércia e Rodrigo Moura;

Ao LASP por me acolher como um membro do laboratório que tanto respeito e admiro;

À técnica de laboratório Elivani Sacramento (Livinha) por sempre estar disponível a ajudar e instruir nos experimentos;

À Marcela Tosta por todo apoio que me foi dado e principalmente pela amizade que levarei para sempre;

Ao técnico de laboratório Sérgio Vasconcelos por todo o cuidado e atenção com os materiais no setor de esterilização;

Aos colegas do LAPEM por todas as conversas amistosas e pelo companheirismo;

À Biblioteca de Ciências Biomédicas Eurydice Pires de Sant'Anna do Instituto Gonçalo Moniz – IGM/FIOCRUZ, em especial à Ana Maria Fiscina Vaz Sampaio, pelo suporte com formatação e orientação para versão final deste trabalho;

A todos funcionários do Instituto Gonçalo Moniz por toda atenção e cuidado quando solicitei algum serviço ou informação.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas  
ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma  
humana”

*Carl Jung*

SANTOS JUNIOR, Marcos Antonio Amorim. Produção da proteína do envelope do ZIKA vírus modificada para formação de dímeros. 2021. 51 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2021.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** O vírus Zika emergiu na América Latina em 2015 e se somou a outras arboviroses como um problema de saúde pública no Brasil, principalmente na região nordeste. Os métodos de diagnóstico ainda possuem limitações e são poucos acessíveis a população. Além disso, não há vacinas. A proteína E é o principal alvo de anticorpos neutralizantes e há evidências que sua produção na conformação nativa em forma de dímeros, que é a forma encontrada nas partículas virais, é importante para produção de anticorpos neutralizantes. Métodos cujo antígenos são partículas virais, como Mac-Elisa e testes de neutralização, são mais específicos quando comparados com métodos sorológicos onde se utiliza a proteína recombinante selvagem. Além disso, a utilização da proteína recombinante com sequência selvagem, em forma de monômero, estimulam uma baixa produção de anticorpos neutralizantes se comparada a imunizações com partículas virais. **OBJETIVO:** Produzir a proteína do Envelope modificada para formação de dímeros e na forma selvagem do vírus Zika otimizando condições de expressão de proteína, determinar rendimento da produção e determinar a identidade da proteína purificada por western blot. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Nesse trabalho, realizamos duas modificações em aminoácidos da proteína E para aumentar sua atração eletrostática, aumentando assim a possibilidade de formação de dímeros. Para isso, baculovírus recombinantes contendo os genes da proteína E selvagem e modificada para formação de dímero foram utilizados para infectar células de inseto High Five. **RESULTADOS:** Ambas as proteínas foram produzidas em sua forma solúvel, porém a maior parte ficou retida nas células não alcançando a sua conformação nativa. Os maiores rendimento para a produção da proteína foi alcançado quando a proteína retida nas células foi solubilizada com ureia 8M, tanto para a proteína modificada para formação de dímeros (2.3 mg/L) quanto para proteína selvagem (1.73 mg/L) quando comparadas com o rendimento das proteínas na forma solúvel (1.2 mg/L e 0.68 mg/L, respectivamente). A modificação dos aminoácidos para formação de dímeros não interferiu no rendimento da expressão proteica, uma vez que não houve grande diferença na produção das proteínas recombinantes na sua forma de monômero (selvagem) ou modificada para formar dímeros. **CONCLUSÕES:** Foi

realizada a produção da proteína do envelope modificada e selvagem e determinado os seus rendimentos. Estudos adicionais são necessários para avaliar se as proteínas produzidas possuem sua conformação nativa e se as modificações favorecem a formação de dímeros.

**Palavras-Chave:** Zika Vírus, Proteína do envelope, Dímero, Proteína Recombinante.

SANTOS JUNIOR, Marcos Antonio Amorim. Production of the modified ZIKA virus envelope protein for dimer formation. 2021. 51 f. Dissertation (Master in Biotechnology in Health and Investigative Medicine) - Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, 2021.

## **ABSTRACT**

**INTRODUCTION:** The Zika virus emerged in Latin America in 2015 and added to other arboviruses as a public health problem in Brazil, especially in the northeast region. Diagnostic methods still have limitations and are barely accessible to the population. In addition, there are no vaccines. Protein E is the main target of neutralizing antibodies and there is evidence that its production in the native conformation in the form of dimers, which is the form found in viral particles, is important to produce neutralizing antibodies. Methods whose antigens are viral particles, such as Mac-Elisa and neutralization tests, are more specific when compared to serological methods where the wild recombinant protein is used. In addition, the use of the recombinant protein with wild sequence, in monomer form, stimulates a low production of neutralizing antibodies when compared to immunizations with viral particles. **AIMS:** To produce the envelope protein modified for the formation of dimers and in the wild form of the Zika virus, to optimize the conditions of protein expression, determining production yield and determine the purified protein identity by western blot. **MATERIALS AND METHODS:** In this work, we performed modifications in two amino acid of protein E to increase its electrostatic attraction, increasing the possibility of dimers formation. For this, recombinant baculoviruses containing the genes of the wild-type and modified protein for dimer formation were used to infect High Five insect cells. **RESULTS:** Both proteins were produced in their soluble form, but most of them were produced in the cells, not getting their native conformation. The highest yield for protein production was achieved when the protein retained in the cells was solubilized with 8M of urea, both for the modified protein for formation of dimers (2.3 mg/L) and for wild protein (1.73 mg/L) when compared with the yield of proteins in soluble form (1.2 mg/L and 0.68 mg/L, respectively). The modification of amino acids to form dimers did not interfere in the yield of protein expression, since there was no big difference in the production of recombinant proteins in their wild form or modified to form dimers. **CONCLUSIONS:** The modified and wild envelope protein was produced, and yields were determined. Additional studies are needed to assess whether the proteins produced have their native conformation and whether the modifications induce the formation of dimers.

**Keywords:** Zika Virus, Envelope protein, Dimer, Recombinant protein.

## LISTA DE FIGURAS

**FIGURA 1** - Estrutura de um dímero da proteína do envelope do Zika vírus.  
22

**FIGURA 2** - Esquema representando as construções dos DNAs de interesse.  
28

**FIGURA 3** - *Dot blot* do ensaio de otimização para E<sub>D</sub> e E<sub>M</sub> 36

**FIGURA 4** - *SDS-PAGE* de amostra de sedimento celular de ensaio de otimização para produção das proteínas E<sub>D</sub> e E<sub>M</sub>. 37

**FIGURA 5** - *SDS-PAGE* da produção e purificação de proteína E<sub>D</sub> e E<sub>M</sub>  
38

**TABELA 1** - Rendimento de produção das proteínas E<sub>D</sub> e E<sub>M</sub>  
39

**FIGURA 6** - Análise por Western blot das proteínas E<sub>D</sub> e E<sub>M</sub>  
40

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>%</b>	Símbolo de porcentagem
<b>°C</b>	Símbolo de Grau Celsius
<b>μL</b>	Microlitro
<b>4G2</b>	Anticorpo anti proteína do envelope de <i>Flavivirus</i>
<b>BCIP</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
<b>BSA</b>	Albumina de soro bovino
<b>C</b>	Proteína do capsídeo
<b>CHIKV</b>	Chikungunya vírus
<b>D.O.</b>	Densidade ótica
<b>DENV</b>	Dengue vírus
<b>DI</b>	Domínio 1 da proteína do envelope
<b>DII</b>	Domínio 2 da proteína do envelope
<b>DIII</b>	Domínio 3 da proteína do envelope
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>E</b>	Proteína do envelope
<b>E<sub>D</sub></b>	Proteína do envelope dimérica
<b>E<sub>D</sub>SD</b>	Proteína do envelope dimérica a partir do sedimento
<b>E<sub>D</sub>SN</b>	Proteína do envelope dimérica a partir do sobrenadante
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>eGFP</b>	Proteína verde fluorescente
<b>ELISA</b>	Do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> ou ensaio de imunoabsorção enzimática
<b>E<sub>M</sub></b>	Proteína do envelope monomérica

<b>EMSD</b>	Proteína do envelope monomérica a partir do sedimento
<b>EMSN</b>	Proteína do envelope monomérica a partir do sobrenadante
<b>GP64</b>	Glicoproteína 64
<b>HCl</b>	Ácido clorídrico
<b>HTLV</b>	Vírus T-Linfotrófico Humano
<b>IL-10</b>	Interleucina 10
<b>IL-7</b>	Interleucina 7
<b>KD</b>	Kilodalton
<b>L</b>	Litro
<b>LPS</b>	Lipossacarídeo
<b>M</b>	Molar
<b>M</b>	Proteína de membrana
<b>MAC-ELISA</b>	Do inglês <i>IgM antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay</i> ou ensaio de imunoabsorção enzimática de captura de anticorpo IgM
<b>mg/L</b>	Miligrama por litro
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MOI</b>	Do inglês “ <i>Multiplicity of infection</i> ” ou multiplicidade de infecção
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sódio
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>NS1</b>	Proteína não estrutural 1
<b>NS2A</b>	Proteína não estrutural 2A
<b>NS2B</b>	Proteína não estrutural 2B
<b>NS3</b>	Proteína não estrutural 3
<b>NS4A</b>	Proteína não estrutural 4A

<b>NS4B</b>	Proteína não estrutural 4B
<b>NS5</b>	Proteína não estrutural 5
<b>NTB</b>	Nitro azul de terazólio
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salino
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico de uma solução
<b>PRNT</b>	Teste de neutralização por redução de placas
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RPM</b>	Rotações por minuto
<b>RT-PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa
<b>SBF</b>	Soro bovino fetal
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>TBS</b>	Solução salina tamponada com tris
<b>TBS-T</b>	Solução salina tamponada com tri contendo tween
<b>TBST-L</b>	Solução salina tamponada com tris contendo tween e leite desnatado
<b>TCID50</b>	Do inglês “ <i>tissue culture infective dose</i> ” ou dose capaz de infectar 50% da cultura de tecidos
<b>TEMED</b>	Tetrametiletilenodiamina
<b>TOI</b>	Do inglês “ <i>Time of infection</i> ” ou tempo de infecção
<b>Tris</b>	Hidróximetil aminometano
<b>ZIKV</b>	Zika vírus
<b>µg/mL</b>	Micrograma por mililitro

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1	ARBOVÍRUS NO BRASIL.....	20
2.2	ZIKA VÍRUS.....	20
2.3	GENOMA DO ZIKV E SÍNTESE DA PROTEÍNA E.....	21
2.4	DIAGNÓSTICO.....	23
2.5	CANDIDATOS A VACINA.....	24
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	26
3.1	OBJETIVO GERAL.....	26
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
<b>4.</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	27
4.1	CONSTRUÇÃO DO DNA QUE CODIFICA PROTEÍNA E MODIFICADA PARA FORMAÇÃO DE DÍMERO (E <sub>D</sub> ) E PROTEÍNA E SELVAGEM (E <sub>M</sub> ).....	27
4.2	TRANSPOSIÇÃO DE INSERTO PARA BACMÍDEO.....	28
4.3	PURIFICAÇÃO DE BACMÍDEO.....	29
4.4	OBTENÇÃO DE ESTOQUE VIRAL.....	29
4.5	TITULAÇÃO DE ESTOQUE VIRAL.....	30
4.6	AMPLIFICAÇÃO DE ESTOQUE VIRAL.....	30
4.7	ENSAIO DE OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO PROTEÍNA RECOMBINANTE..	31
4.8	DOT BLOT.....	31
4.9	SDS-PAGE.....	32
4.10	EXPRESSÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	33
4.11	SOLUBILIZAÇÃO DE SEDIMENTO CELULAR.....	33

4.12	PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	33
4.12.1	<i>Purificação de Amostras do Sobrenadante.....</i>	34
4.12.2	<i>Purificação de Amostras do Sedimento.....</i>	34
4.13	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTEICA.....	34
4.14	WESTERN BLOT.....	35
5.	<b>RESULTADOS.....</b>	36
6.	<b>DISCUSSÃO.....</b>	41
7.	<b>CONCLUSÕES.....</b>	45
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	46
	<b>ANEXO I - Mapa do plasmídeo pFastBacDual.....</b>	53

## 1. INTRODUÇÃO

A febre Zika é uma doença viral causada por Zika vírus (ZIKV) do gênero *Flavivirus* que foi isolado inicialmente de macacos na África (DICK, 1952). Durante décadas, a febre Zika apresentou-se como doença esporádica na África e na Ásia, porém, a partir de 2007 começaram a surgir surtos em diversos países e, em 2015, a doença emergiu nas Américas. No Brasil, o surto da febre Zika coincidiu com aumento dos casos de síndrome de Guillan-Barré e síndrome congênita, principalmente casos de microcefalia (ARAÚJO *et al.*, 2016). O ZIKV, Dengue (DENV) e Chikungunya (CHIKV) são transmitidos pelo mesmo vetor e constituem um grave problema de saúde pública. Juntos, esses arbovírus foram responsáveis por 2.696 infecções (confirmadas) entre fevereiro e junho de 2015 em 12 distritos sanitários de Salvador (CARDOSO *et al.*, 2015).

A incidência de casos de infecção por arbovírus tem aumentado em 2020 no Brasil. Entre janeiro e julho de 2020 foram reportados 874.093 casos de dengue, 48.316 casos de Chikungunya e 4.666 de zika (BRASIL, 2020). Na Bahia, houve um maior aumento no número de casos, com 82.251 casos de Dengue, 3.721 casos de Zika e 28.293 casos de Chikungunya, esta última, por exemplo, teve um aumento de 383,22% comparado ao mesmo período em 2019 (BRASIL, 2020). Um estudo realizado por Kasprzykowski e colaboradores (2020), através da análise de banco de dados de sequências gênicas do ZIKV isoladas a partir de amostras brasileiras, demonstrou que em 2015 a linhagem que emergiu no país foi a asiática com 42,8% da cepa de Camboja e 57,2% da cepa da Micronésia. Em 2016, 2017 e 2018, a cepa Camboja foi a mais frequente entre as amostras sequenciadas, presente em mais de 90% das amostras. Entretanto, em 2019 o perfil detectado nas amostras foi diferente, 89,2% das amostras sequenciadas foram positivas para a cepa da micronésia, 5,4% da cepa de Camboja e 5,4% foram caracterizadas como da linhagem africana, isoladas de diferentes hospedeiros, do mosquito *Aedes albopictus* (Alencar *et al.*, 2020) e de macaco da espécie *Alouatta guariba* (ALMEIDA *et al.*, 2020).

O aumento da incidência de casos de arboviroses, mudança na prevalência das cepas asiáticas e o aparecimento da linhagem africana do ZIKV, traz um alerta para a possibilidade de novas epidemias por esse vírus, pela baixa exposição da população à cepa da micronésia bem como a exposição a uma nova linhagem do vírus. Portanto, é imprescindível que haja um diagnóstico sensível, específico e de rápida execução para identificação do vírus e tomada de decisão ágil para o combate à doença, pois ainda não existe vacina para o vírus Zika no mercado.

O diagnóstico precoce pode ajudar a minimizar a transmissão e incidência dessa doença, porém, atualmente não é fácil determinar o diagnóstico clínico por causa da similaridade dos sinais e sintomas clínicos entre os arbovírus, principalmente entre *Flavivirus*, além da alta reatividade cruzada em testes sorológicos, dificultando assim o diagnóstico (MUSSO; CAO-LORMEAU; GUBLER, 2015). O diagnóstico dos *Flavivirus* é baseado principalmente na detecção do RNA viral no soro utilizando a PCR de transcrição reversa (RT-PCR), porém essa técnica é restrita a fase inicial da doença em que se tem carga viral detectável (MARDEKIAN; ROBERTS, 2015). Diante disto, os testes sorológicos são utilizados quando não há possibilidade de detecção de RNA viral. Dentre os vários tipos de testes sorológicos para infecções virais, o teste de neutralização fornece maior especificidade e uma diferença de título de anticorpos até 4 vezes maior entre a fase aguda e a convalescente. Esse ensaio baseia-se em identificar qual a titulação de anticorpos do paciente é capaz de neutralizar determinado vírus, sendo assim, uma alternativa diagnóstica (YAMANAKA *et al.*, 2017), além de nos permitir avaliar a capacidade protetiva dos anticorpos no soro de pacientes previamente infectados. Porém, é um teste de difícil execução e que, por utilizar a partícula viral, necessita de infraestrutura mais complexa, pessoal altamente capacitado. Os demais ensaios sorológicos demonstram uma alta taxa de reatividade cruzada com os demais *Flavivirus* pela alta similaridade entre eles. A sequência de aminoácidos é bastante conservada entre os *Flavivirus*, a proteína do envelope viral do vírus da Dengue e do vírus Zika, por exemplo, tem uma homologia entre 54% e 59%, o que favorece essa alta taxa de reatividade cruzada de anticorpos totais (DEJNIRATTISAI *et al.*, 2016). Entretanto, esta proteína é o principal alvo de anticorpos neutralizantes quando se encontra em forma de dímeros no envelope viral (ROBBIANI *et al.*, 2017), podendo ser uma ferramenta importante na otimização de ensaios diagnósticos.

O genoma do ZIKV, codifica uma poliproteína precursora, que sofre clivagens dando origem a 10 proteínas. Dessas, 3 são estruturais (proteínas do envelope (E), capsídeo (C) e de membrana (M)) e 7 são não estruturais (proteínas NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (LINDENBACH; RICE, 2003). A proteína E está diretamente relacionada com a entrada do vírus na célula, o ZIKV usa o domínio DIII da proteína E para a infecção das células hospedeiras por possuir sítios de ligação a receptores celulares (CRILL; ROEHRIG, 2001). A proteína E forma dímeros no envelope da partícula viral madura e é nessa estrutura dimérica que anticorpos neutralizantes se ligam, mais precisamente em epítomos quaternários do dímero da proteína E, impedindo assim, a entrada do vírus na célula hospedeira

(ROBBIANI *et al.*, 2017; DEJNIRATTISAI *et al.*, 2015). Sendo assim, visando reduzir a reatividade cruzada de anticorpos totais, diversos grupos buscam produzir a proteína recombinante do envelope viral do Zika vírus na forma dimérica, além de utilizar esta proteína para ativação de resposta imune mediado por células B e produção de candidatos a vacinas (KANG *et al.*, 2005; LAI *et al.*, 2017). Entretanto, a produção da proteína E na forma de dímero é complexa e por conta desta dificuldade de induzir dimerização *in vitro*, com isso, outros grupos produziram a proteína do envelope do ZIKV utilizando a sequência selvagem na forma monomérica. (METZ *et al.*, 2017; MODIS *et al.*, 2004).

A produção da proteína E em forma de dímero é uma importante estratégia para buscar novos métodos diagnósticos mais específicos e simples de reproduzir, para uma melhor identificação viral em caso de novas epidemias. Possibilita também, a criação de candidatos para vacinas, utilizando a proteína como antígeno, estimulando a produção de anticorpos capazes de neutralizar a infecção. Por conta disso, no presente trabalho, foi proposto realizar a produção e identificação da proteína do envelope modificada para formação de dímeros do vírus Zika.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ARBOVÍRUS NO BRASIL

Há décadas os arbovírus emergiram no Brasil, causando diversas epidemias e se tornando um grave problema de saúde pública. Dentre os arbovírus de maior impacto temos os *Flavivirus* DENV, YFV, ZIKV e o alfavírus CHIKV. O DENV, por exemplo, emergiu no Brasil em 1845, no Rio de Janeiro e após a epidemia 1845 houve outras epidemias no país em 1851 e 1916 (SCHNEIDER e DROLL, 2001; PINHEIRO e NELSON, 1997). Em 1976, com o programa de prevenção de febre amarela, coordenada pela Organização Pan-Americana de Saúde, o mosquito vetor foi erradicado, deixando o país livre do *Aedes aegypti*. Após 5 anos da erradicação do mosquito, em 1981, foi registrado uma reemersão do vírus no estado de Roraima em paralelo com a reinfestação do *Aedes aegypti* nas áreas urbanas do país (SIQUEIRA *et al.*, 2005; SCHNEIDER e DROLL, 2001). Desde então, a dengue se tornou endêmica no Brasil até os dias atuais (FARAES *et al.*, 2015). Os vírus da dengue, zika e chikungunya são transmitidos pelo mesmo vetor e são os arbovírus mais presentes e de maior impacto no país. Juntos, esses arbovírus foram responsáveis por 2,696 infecções (confirmadas) entre fevereiro e junho de 2015 em 12 distritos sanitários de Salvador (CARDOSO *et al.*, 2015). Outro arbovírus importante é o vírus da febre amarela, que após anos, reemergiu recentemente causando o maior surto das últimas décadas, com 33,5 % de casos fatais no Brasil (SELEMANE, 2018). Em 2020 o número de casos de infecção por arbovírus aumentou significativamente, na Bahia houve um aumento de 383,22% só de casos de Chikungunya comparado ao ano anterior (BRASIL, 2020). Apesar dos casos diminuírem a partir da epidemia de 2015, há o risco eminente de novas epidemias, uma vez que ainda há registros de casos de zika esporádicos entre 2016 e 2019 e aumento de casos em 2020, além da emersão da linhagem africana no país (KASPRZYKOWSKI *et al.*, 2020). Assim como ocorreu com o DENV, a iminência de novas epidemias pelo ZIKV faz com que seja necessário a continuidade nos estudos desse vírus de grande impacto na saúde pública.

### 2.2 ZIKA VÍRUS

O Zika vírus é um arbovírus do gênero *Flavivirus*, da família *Flaviviridae* que foi inicialmente isolado de primatas não humanos e mosquitos na África em 1947 (DICK, 1952). A infecção por esse vírus em humanos foi primeiramente descrita em 1954 (MACNAMARA, 1954). Após este episódio, poucos casos foram registrados por décadas, até que, em 2007

ocorreu o primeiro surto numa ilha do pacífico ocidental no Estado Federativo da Micronésia (DUFFY *et al.*, 2009). Então, em 2013 e 2014 ocorreu uma grande epidemia na Polinésia Francesa com uma estimativa de 30.000 casos de infecção sintomática (MALLET *et al.*, 2015). O Zika vírus emergiu pela primeira vez nas Américas em 2015 e no Brasil os primeiros casos foram registrados em março deste ano (CAMPOS *et al.*, 2015). A epidemia no Brasil coincidiu com o aumento do número de casos de síndrome de Guillan-Barré e síndrome congênita, principalmente casos de microcefalia (ARAÚJO *et al.*, 2016). Essas complicações neurológicas estão associadas com a infecção por este vírus. O ZIKV é transmitido principalmente pela picada do mosquito vetor *Aedes aegypti*. Além disso, o ZIKV pode ser transmitido também por contato sexual, transfusão de sangue e de forma vertical (ESTOFOLETE *et al.*, 2016). Os sinais e sintomas comuns são: febre, erupção cutânea com duração de 4-7 dias, conjuntivite, dor de cabeça, mialgia e prurido. Os sintomas menos comuns incluem dor retro orbital, anorexia, vômitos, diarreia e dor abdominal (HEUKELBACH *et al.*, 2016), além das complicações neurológicas, como nos casos de síndrome de Guillan-Barré e microcefalia (ARAÚJO *et al.*, 2016). A circulação de outros *Flavivirus* dificulta ainda mais o diagnóstico do ZIKV no Brasil, além do DENV e do arbovírus CHIKV, o vírus da febre amarela reemergiu recentemente, causando o maior surto das últimas décadas no país com 777 casos confirmados e 261 mortes decorrentes da infecção por este vírus (SELEMANE, 2018).

### 2.3 GENOMA DO ZIKV E SÍNTESE DA PROTEÍNA E

O material genético do Zika vírus é RNA cadeia simples, senso positivo, que codifica uma poliproteína que quando clivada, dá origem a 3 proteínas estruturais (proteína do capsídeo, pré membrana e envelope) e 7 não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (KUNO E CHANG, 2007). Derivada desta clivagem, a proteína E, no envelope viral, apresenta-se em forma de homodímeros, nos quais os monômeros são antiparalelos e constituídos, cada um deles, por 4 domínios distintos, DI, DII e DIII, e um domínio transmembrana, cada domínio possui uma função no processo de interação com a célula hospedeira. A proteína E é responsável por interagir e promover a fusão da partícula viral com a célula hospedeira, e, por estar exposta, acaba sendo um dos principais antígenos frente a resposta imune mediada por anticorpos. O domínio DI, formado por aproximadamente 130 aminoácidos distribuídos em 3 segmentos, corresponde à porção central da proteína E, contendo a sua região N terminal, este domínio possui sítios para glicosilação, as quais estão

relacionadas com a capacidade de invasão no tecido neural, que está diretamente relacionado com os casos de síndrome congênita em neonatos (ZHANG *et al.*, 2017). O domínio DII é o domínio mais conservado entre os *Flavivirus* (principal região responsável pela alta taxa de reatividade cruzada) e é nele que se encontra o *fusion loop*, região responsável pela fusão entre o vírus e a célula hospedeira (HEINZ e STIASNY, 2012), constituído por dois segmentos, os quais somam 187 aminoácidos (ZHANG *et al.*, 2017). O domínio DIII, formado por um único segmento contínuo de 100 aminoácidos, no qual estão presentes a região C terminal e o domínio transmembrana da proteína E, que se encontra ancorado no envelope lipídico, e por possuir sítios de ligação com receptores celulares, medeia a infecção do *Flavivirus* e é o principal alvo para anticorpos neutralizantes (DAI *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2017).

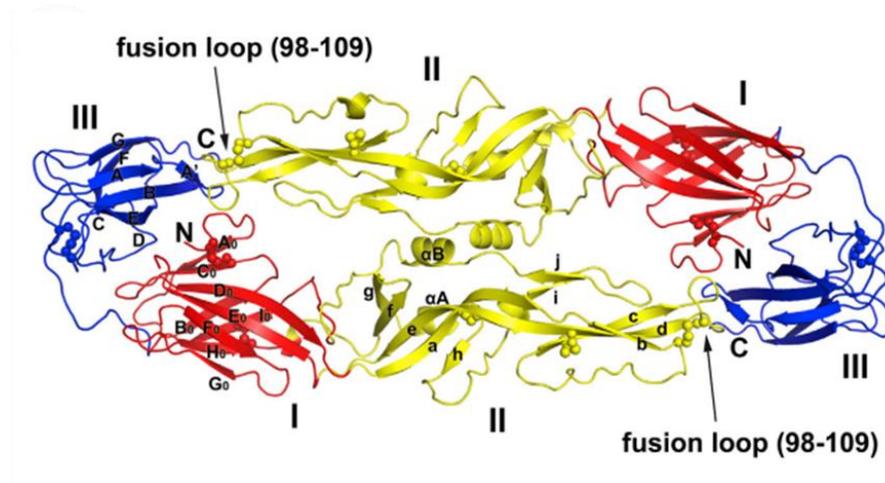


Figura 1 – Estrutura de um dímero da proteína do envelope do Zika vírus. DI em vermelho, DII em amarelo, DIII em azul e *fusion loop* indicado por setas.

Fonte: DAI *et al.*, 2016.

A interação com anticorpos neutralizantes ocorre, majoritariamente, em dois locais: na região de interface entre os monômeros (onde encontra-se o *fusion loop*) e no domínio III. Mesmo que uma quantidade significativa da resposta humoral contra os *Flavivirus* seja direcionada para epítomos do dímero, os anticorpos neutralizantes mais potentes e eficazes possuem prevalência de ligação na região do domínio III (GONG *et al.*, 2018). Entretanto, existe uma dicotomia sobre este tema, pois estudos *in vivo* demonstraram que apenas o estímulo com domínio III recombinante não é capaz de promover proteção imunológica em

dengue, sugerindo que outros epítomos da proteína do envelope, como DI, DII e epítomos quaternários presentes na proteína dimérica madura, são importantes para a estimulação da produção de anticorpos neutralizantes (Williams *et al.*, 2012).

## 2.4 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico clínico nos casos de infecção por Zika vírus é bastante difícil, uma vez que os sinais e sintomas são parecidos com outros arbovírus, como Dengue e Chikungunya. Então, o diagnóstico laboratorial é determinante para o desfecho e prognóstico de casos de infecção por estes vírus. Entretanto, em exames sorológicos convencionais há uma alta taxa de reatividade cruzada entre os *Flavivirus* devido à grande similaridade gênica entre os vírus deste gênero, principalmente com o DENV, homologia maior que 50% com a proteína do envelope do ZIKV (PRIYAMVADA *et al.*, 2016). Como no ensaio de detecção de anticorpos por ELISA com anticorpos totais (utilizando antígenos recombinantes), e por MAC-ELISA (utilizando captura de anticorpos IgM para posterior imobilização das partículas virais, possibilitando a detecção das partículas virais por anticorpos anti proteína do envelope de *Flavivirus* (PRIYAMVADA *et al.*, 2016).

Diante disto, os principais testes diagnósticos são RT-PCR, que consiste em fazer transcrição reversa e amplificar o material genético viral para detecção, se houver RNA viral presente na amostra (porém é limitado ao estágio inicial da infecção), e o teste de neutralização por redução de placas (PRNT), que baseia-se em determinar qual é o título de anticorpos do paciente (soro ou plasma) capaz de inibir determinada porcentagem de infecção celular (capacidade de neutralização), anticorpos estes que aparecem em torno de 5 dias de infecção, porém é um método que demanda muito tempo, pessoal devidamente treinado para realização do ensaio e infraestrutura adequada para manipulação das partículas virais (BAUD *et al.*, 2017).

O PRNT é o imunoensaio confirmatório para o ZIKV quando ensaios sorológicos são positivos ou inconclusivos. Essa recomendação ocorre da mesma maneira para outros *Flavivirus*, como para o vírus da febre amarela (VÁZQUEZ, *et al.*, 2003). Apesar de ser o imunoensaio mais específico, o PRNT ainda pode apresentar reatividade cruzada devido a infecções secundárias a outros *Flavivirus* (JAVED *et al.*, 2018). Por conta da dificuldade do diagnóstico, aumentou-se a busca por otimização de ensaios de neutralização com finalidade de aumentar a especificidade do PRNT como o teste de neutralização baseado em imagem fluorescente, um teste mais rápido de ser executado e mais específico que o MAC-ELISA.

Nesse ensaio em placa, é feita diluições seriadas de soro dos pacientes e adicionado ao vírus, essa mistura é incubada junto com células Huh 7.5 e diferentemente do PRNT convencional, nesse teste, é utilizado um anticorpo anti proteína do envelope de *Flavivirus* (4G2) para detectar a porcentagem de células infectadas em amostras com soro de paciente comparado ao controle (sem soro), posteriormente incubado com anticorpo secundário conjugado a um fluoróforo, diminuindo viés de análise por usar o equipamento Operetta para contar as células infectadas, possibilitando aumento da acurácia do teste. Entretanto, para este ensaio é preciso utilizar um equipamento muito caro, podendo ser realizado apenas em laboratórios específicos e o uso da partícula viral ainda é utilizada (KOISHI *et al.*, 2018). Por isso, se faz necessário a busca por um método sorológico rápido, eficaz e seguro, com substituição do uso de partículas virais por proteínas recombinantes, para o diagnóstico desta doença.

### 3.5 CANDIDATOS A VACINA

Ainda não existe uma vacina para a febre zika e a preocupação com novas epidemias faz com que a produção de um imunógeno contra ZIKV seja cada vez mais importante. Ao contrário do Dengue que tem 4 sorotipos, é considerado que ZIKV tem apenas um sorotipo, pois há uma similaridade maior que 95% entre as linhagens (Africana e Asiática) e a exposição a apenas uma delas favorece a produção de anticorpos capazes de neutralizar o vírus da outra linhagem (DOWD *et al.*, 2016). Sendo assim, uma boa vacina seria capaz de proteger contra as duas linhagens do vírus. Os candidatos atuais a vacina (em fase pré-clínica ou clínica) estão sendo desenvolvidas com diferentes tecnologias: vírus atenuado, vírus inativado com formalina e de subunidade (DNA, mRNA, VLP, peptídeo, vetores virais e proteína E).

Um estudo conduzido por Shan e colaboradores (2017) produziu um vírus atenuado com a deleção de 10 nucleotídeos e a administração em dose única em camundongos foi capaz de promover uma indução de produção de anticorpos neutralizantes capazes proteger contra viremia após desafio, além de induzir uma robusta resposta de células T. Outro candidato a vacina em potencial é com vírus inativado com formalina, que utilizando duas doses (no dia 1 e dia 29), demonstrou que não houve efeitos colaterais graves e que no dia 57 do estudo, 92% dos participantes que receberam a as duas doses foram capazes de soro converter anticorpos neutralizantes com títulos maiores que 1:10 e 77% tiveram títulos maiores que 1:100 (MODJARRAD *et al.*, 2018). Como vacina de subunidade, um estudo em

fase clínica utilizando um plasmídeo contendo o gene selvagem de prM-E demonstrou que o candidato é seguro e após 3 doses (nas semanas 0, 4 e 8) foi capaz de gerar uma forte resposta imune em 100% dos voluntários, com títulos de anticorpos neutralizantes maiores que 1:100 e significativa resposta de células T (Gaudinski et al., 2018).

Yang e colaboradores (2019) produziram uma proteína do envelope modificada para formação de dímeros através da formação de ponte dissulfeto e além de confirmar a formação de dímeros após a mutação de uma alanina por uma cisteína na posição 264, demonstrou que a proteína recombinante é capaz de estimular a produção de anticorpos neutralizantes, podendo então, ser mais uma candidata a vacina contra ZIKV. O valor para importação de uma vacina é muito alto e se vê, cada dia mais, a necessidade de buscar por tecnologias que possibilitem a produção de um imunógeno nacional, para ampla distribuição em todo o país.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 GERAL**

Produzir a proteína do Envelope modificada para formação de dímeros do vírus Zika.

#### **3.2 ESPECÍFICOS**

Determinar condições de expressão e purificação da proteína do Envelope modificada para formação de dímero e a proteína do Envelope na forma selvagem, ambas sob forma recombinante em sistema células de inseto/baculovírus;

Determinar rendimento da produção de proteína nesse sistema;

Determinar a identidade da proteína purificada por western blot.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 CONSTRUÇÃO DO DNA QUE CODIFICA PROTEÍNA E MODIFICADA PARA FORMAÇÃO DE DÍMERO ( $E_D$ ) E PROTEÍNA E SELVAGEM ( $E_M$ ).

A sequência de aminoácidos da proteína E do ZIKV foi analisada e modificada para que os monômeros da proteína E sofram atração eletrostática para formar dímeros. A construção de DNA é composta pela sequência líder da AcMNPV gp65 (para direcionar a proteína para o retículo endoplasmático), sequência da proteína  $E_D$ , sequência para clivagem TEV, sequência codificando uma cauda de 6 histidinas (necessária para a purificação da proteína) e os sítios para enzima de restrição *Sal* I e *Not* I nas extremidades 5' e 3', respectivamente (Figura 2A). Duas outras sequências foram também construídas. A primeira corresponde a sequência da proteína  $E_M$  e contém os mesmos elementos utilizados na construção do gene da proteína  $E_D$  (Figura 2B). A segunda corresponde a proteína de membrana do ZIKV (prM) (Figura 2C). Essa proteína aumenta a eficiência do processo de produção e secreção da proteína E (KIM *et al.*, 2018). A construção de DNA que codifica a proteína prM foi composta por uma sequência correspondente aos 20 primeiros aminoácidos da proteína de capsídeo do ZIKV, a sequência que codifica prM, sequência espaçadora e sítios de restrição *Nhe* I na extremidade 5' e *Sph* I na extremidade 3'. Todas as sequências foram sintetizadas comercialmente (Genescript, Piscataway, NJ, EUA) e clonadas no plasmídeo pUC57-Kan. Todas as sequências tiveram seus códons otimizados para a expressão em células de inseto. Os plasmídeos foram nomeados da seguinte forma:

1. prM: pUK57-Kan-ZIKV prM Bac
2. Proteína  $E_D$ : pUK57-Kan-ZIKV  $E_D$  Bac
3. Proteína  $E_M$ : pUK57-Kan-ZIKV  $E_M$  Bac

Na etapa seguinte, foram gerados dois plasmídeos a partir das construções e do pFasBac® Dual (Thermo Fischer Scientific, Carlsbad, CA, EUA) (mapa, Anexo I). Em um plasmídeo, foi clonado o inserto ZIKV prM Bac no promotor p10 e ZIKV  $E_M$  Bac no promotor da polihedrina. No segundo plasmídeo, foi clonado o inserto ZIKV prM Bac no promotor p10 e foi clonado o inserto ZIKV  $E_D$  Bac no promotor da polihedrina.

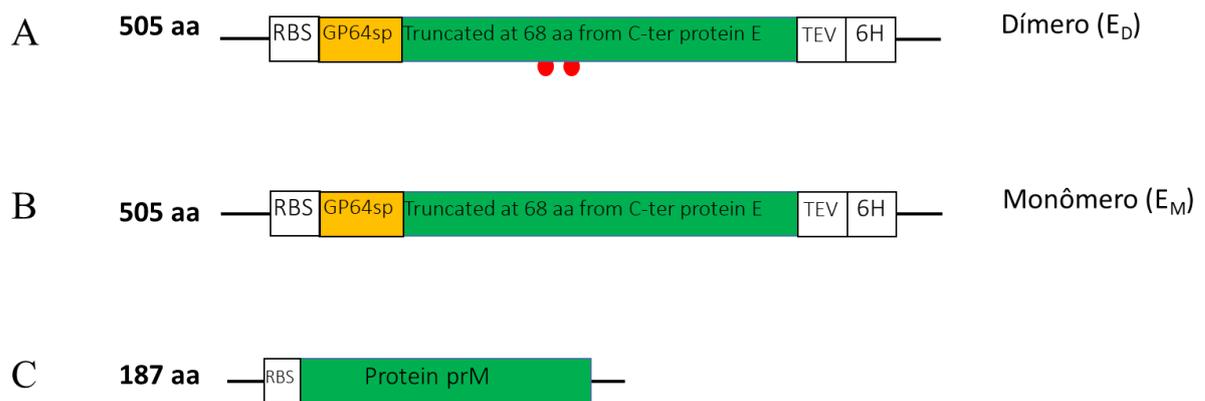


Figura 2 - Esquema representando as construções dos DNAs de interesse. A) E<sub>D</sub>. B) E<sub>M</sub>. C) prM.

#### 4. 2 TRANSPOSIÇÃO DE INSERTO PARA BACMÍDEO

Para gerar os genomas (DNA genômicos) de baculovírus contendo os genes de interesse, os plasmídeos foram inseridos por transformação em bactérias quimiocompetentes da *Escherichia coli* cepa DH10AcBacΔCC (Sambrook *et al.*, 1989). Essa cepa possui bacmídeo-ΔCC e um plasmídeo auxiliador que codifica os elementos necessários para transpor a região onde foi clonado os genes de interesse para o bacmídeo. Dessa forma, cada plasmídeo foi adicionado ao seu respectivo tubo contendo 50 μL de bactéria quimiocompetente. Os tubos foram incubados 30 minutos no gelo e, em seguida, levados ao banho maria por 90 segundos a 42 °C e novamente levados ao gelo por 2 minutos. Após esta etapa, foram adicionados 900 μL de meio LB (Tryptona 10 g/L; Extrato de levedura 5 g/L e Cloreto de sódio 5 g/L) aos tubos. Os tubos foram incubados a 37 °C sob agitação por 1 hora. Após período de incubação em meio líquido, a suspensão de bactéria de cada tubo foi adicionada a duas placas de petri diferentes contendo meio LB sólido com os antibióticos tetraciclina, gentamicina e kanamicina, para seleção das bactérias transformadas. Como controle negativo, foi utilizada a cepa DH10AcBacΔCC sem a construção de interesse. As placas foram incubadas por 18 horas. Em seguida, os isolados foram colocados em cultura em meio líquido Luria-Bertani com antibióticos para purificação dos bacmídeos recombinantes por minipreparação (*in house*) modificada para moléculas grandes de DNA.

#### 4. 3 PURIFICAÇÃO DE BACMÍDEO

Após as 18 horas de cultivo em meio líquido sob agitação a 37 °C, as amostras foram transferidas para um tubo Eppendorf de 1,5 mL e foram centrifugadas a 14.000 xg por 45 segundos a 4 °C. O sobrenadante foi removido e sedimento bacteriano foi ressuspensão em 0,3 mL da solução I (15 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, RNase 100 µg/mL, pH 8,0) com auxílio de vórtex. Em seguida 0,3 mL de solução II (0,2 N NaOH, 1% - SDS) foram adicionados a cada tubo Eppendorf e as suspensões foram misturadas, gentilmente, por inversão dos tubos por 4 ou 5 vezes. Depois, 0,3 mL de solução III (gelada) (acetato de potássio a 3 M, pH 5,5) foram adicionados a cada tubo. O conteúdo de cada tubo foi misturado por inversão e os tubos foram incubados em gelo por 10 minutos, para neutralização do pH e solubilização de DNA de bacmídeo. Os tubos foram centrifugados a 14.000 xg por 10 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos Eppendorf e DNA de bacmídeo foi precipitado pela adição de 0,8 mL de isopropanol por tubo, incubação em gelo por 10 minutos e centrifugação a 14.000 xg por 15 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram descartados e a cada tubo foram acrescentados 0,5 mL de etanol a 70%. Os tubos foram centrifugados a 14.000 xg por 5 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram removidos e os tubos foram deixados a temperatura ambiente para evaporação de etanol por cerca de 10 minutos. Depois disso, cada sedimento de DNA de bacmídeo foi ressuspensão com 40 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0). Os tubos foram armazenados a -20 °C (Sambrook *et al.*, 1989).

#### 4. 4 OBTENÇÃO DE ESTOQUE VIRAL

Amostras do bacmídeo que codifica proteína E<sub>D</sub> e proteína E<sub>M</sub> foram utilizadas para transfectar células SF9 cultivadas em monocamada em placas de 6 poços, usando lipofectamina (Invitrogen) para formação de complexos DNA/lipossoma. Em cada poço, foram adicionadas  $9 \times 10^5$  de células em um volume de 2 mL de meio TNM-FH suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 10 µg/mL de gentamicina. As placas foram incubadas por 1 hora e, em seguida, o meio foi removido e as células foram lavadas 2 mL de meio TNM-FH. Em seguida, 1 mL de suspensão contendo bacmídeo, lipofectamina e meio TNM-FH foi adicionada em cada poço. Para a preparação dessa suspensão, em um tubo chamado de “A”, foi adicionado 5 µL de mini-preparação do bacmídeo que codifica E<sub>D</sub> ou E<sub>M</sub> e 100 µL do meio TNMFH. Outro tubo, chamado de “B”, foi adicionado 8 µL de

lipofectamina e 100  $\mu\text{L}$  do meio TNM-FH. O conteúdo dos tubos “A” e “B” foi preparado e incubado por 15 minutos, em temperatura ambiente, para formação de complexos DNA/lipossoma. Após esse período, foram adicionados 800  $\mu\text{L}$  de meio TNM-FH, resultando em aproximadamente 1 mL de suspensão para cada bacmídeo. As placas foram incubadas a 27 °C, por 5 horas na estufa B.O.D, e após esse período de incubação, o sobrenadante de cada poço foi removido e substituído por 2 mL de meio TNM-FH completo. As placas foram incubadas por 6 dias, a 27 °C, em câmara úmida. O sobrenadante de cada poço foi coletado e centrifugado a 500 xg por 5 minutos a 4 °C e os sobrenadantes (estoque viral de primeira passagem) foram armazenados a 4 °C, protegidos da luz.

#### 4.5 TITULAÇÃO DE ESTOQUE VIRAL

O título do estoque viral foi determinado em placas de microtitulação de 96 poços pelo método de *end point* (O'REILLY *et al.*, 1992). Foram colocadas 10.000 células Sf9 por poço em um volume de 90  $\mu\text{L}$ . Em seguida, foi feita uma diluição seriada do baculovírus de  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$  em microtubos, sendo aplicados 10  $\mu\text{L}$  do meio TNM-FH completo ou de 10  $\mu\text{L}$  de cada estoque viral nas diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  e  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  em TNM-FH completo a uma fileira de 12 poços da placa de microtitulação. As placas foram incubadas em câmara úmida a 27 °C por 7 dias. A partir do quarto dia, as células de cada poço foram examinadas para sinais de infecção viral. Esses sinais incluem a parada de proliferação celular, aumento do tamanho de células, aumento do tamanho do núcleo, presença de um halo em torno do núcleo e lise celular. O título viral foi calculado a partir da determinação da maior diluição capaz de causar pelo menos 50% de efeito citopático nas células. Após essa determinação, foi realizado um cálculo para determinação de TCID<sub>50</sub>.

#### 4.6 AMPLIFICAÇÃO DE ESTOQUE VIRAL

A amplificação do estoque viral (obtenção de estoque da segunda e terceira passagem) foi realizada usando células Sf9 cultivadas em suspensão. Para isso, suspensão de células na concentração de  $2 \times 10^6$  células/mL foi inoculada com 0,1 partículas virais por célula de estoque viral de primeira passagem para gerar um estoque de segunda passagem e assim por diante. Suspensão de células SF9 com volume de 100 mL foi usada para a amplificação de estoque viral de AcBac $\Delta$ CC-ZIKVprMBac-ZIKVE<sub>D</sub>Bac e AcBac $\Delta$ CC-ZIKVprMBac-

ZIKVE<sub>M</sub>Bac. Três dias após a inoculação, quando a viabilidade celular se encontrava em torno de 75 %, cada suspensão celular foi centrifugada a 130 xg por 5 minutos a 4 °C, e cada sobrenadante foi armazenado a 4 °C, protegido da luz. A titulação das amplificações dos estoques foi realizada conforme método descrito anteriormente (Ver capítulo 4.5).

#### 4.7 ENSAIO DE OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

A otimização da produção das proteínas E<sub>D</sub> e E<sub>M</sub> recombinantes foi realizada em células High-Five com intuito de verificar quais eram as melhores condições de MOI (do inglês “*Multiplicity of infection*”, que se refere a quantidade de partículas virais utilizadas para infectar uma célula) e TOI (do inglês “*Time of Infection*”, que se refere ao tempo de infecção) para produção das respectivas proteínas. Para isso, foram adicionadas 1x10<sup>6</sup> células em um volume de 2 mL/poço em placas de 6 poços. As placas foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente. Após esse período, foram adicionados volumes de estoque virais da construção de baculovírus recombinante AcBacΔCC-ZIKVprMBac-ZIKVE<sub>D</sub>Bac ou AcBacΔCC-ZIKVprMBac-ZIKVE<sub>M</sub>Bac para MOI 2, 5 e 10 (2, 5 ou 10 partículas virais para cada célula em cultura) ou construção controle negativo (AcBacΔCCpFastBac1) para MOI 10, respectivamente. As placas foram incubadas a 27 °C em câmara úmida. As células foram removidas do fundo da placa e os cultivos foram coletados 24, 48 ou 72 horas após a infecção e transferidos para tubos de 1,5 mL. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos, a 200 xg, na temperatura ambiente. Os sobrenadantes resultantes foram transferidos para novos tubos. Sobrenadante e sedimento foram armazenados a – 20 °C até o uso.

#### 4.8 DOT BLOT

Para análise da expressão solúvel das proteínas recombinantes E<sub>D</sub> e E<sub>M</sub> no ensaio de otimização, foi realizado um *Dot blot* com sobrenadante da cultura infectada com os baculovírus que codificam E<sub>D</sub>, E<sub>M</sub> e controle negativo. Uma membrana de nitrocelulose foi umedecida com salina tamponada com Tris (TBS, NaCl a 137 mM, Tris 24,8 mM, pH 7,5) e colocada em um aparelho para impregnação. Os sobrenadantes do ensaio de otimização foram usados na quantidade de 150 µL de cada. As amostras foram obtidas de cultura de células High-five inoculadas com baculovírus AcBacΔCC-ZIKVprMBac-ZIKVE<sub>D</sub>Bac (MOI 2, 5 ou 10), AcBacΔCC-ZIKVprMBac-ZIKVE<sub>M</sub>Bac (MOI 1, 2 ou 5) ou AcBacΔCC-pFastBac1

(MOI 10). Todas as amostras foram de cultivos de diferentes tempos de infecção, de 24, 48 ou 72 horas. A membrana de nitrocelulose foi retirada do aparelho e bloqueada com leite desnatado a 5% em salina tamponada com Tris e Tween 20 a 0,05 % (v/v) por 2 horas a temperatura ambiente (TBST-L). A membrana foi lavada 3 vezes com tampão TBS e Tween 20 a 0,05% (TBS-T) Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo anti-histidina, diluído 1:5000 em TBST-L, sob agitação suave, durante 1 hora à temperatura ambiente. Para retirar o excesso de anticorpo, foram feitas, então, 3 lavagens com TBS-T. Posteriormente, a membrana foi incubada com anticorpos anti-imunoglobulinas de camundongo (IgA, IgM e IgG) conjugados a fosfatase alcalina (Sigma Aldrich), diluídos de 1:500 em TBST-L, sob agitação suave, durante 1 hora à temperatura ambiente. Após esse período, foram feitas 3 lavagens com TBS-T e uma vez com TBS. A membrana foi revelada pela adição de substrato da fosfatase. A reação de revelação foi interrompida após cerca de 10-20 minutos pela adição de água destilada.

#### 4.9 SDS-PAGE

Para avaliação da expressão de proteína no ensaio de otimização a partir do sedimento celular, foi realizado um ensaio de eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE). Para o gel de resolução, foram utilizados 1,9 mL de água destilada, 1,7 mL de de acrilamida 30%, 1,3 mL de Tris 1,5 M (pH 8.8), 0,05 mL de SDS 10%, 0,05 mL de persulfato de amônia 10% e 0,002 mL de TEMED. Após a preparação, a solução do gel de resolução foi adicionada ao aparato de SDS-PAGE, uma camada de água destilada foi adicionada com cuidado acima da solução do gel para evitar contato do gel com oxigênio e facilitar a polimerização, a água foi removida após solidificação para aplicação do gel de estoque. Para o gel de estoque, foram utilizados 1,4 mL de água destilada, 0,33 mL de acrilamida 30%, 0,25 mL de Tris 1 M (pH 6.8), 0,02 mL de SDS 10%, 0,02 mL de persulfato de amônia e 0,002 mL de TEMED. A solução do gel foi adicionada acima do gel de resolução e, em seguida, adicionado o pente que delimita os poços no gel. As amostras foram adicionadas em tampão de corrida 2X (Tris/HCL pH 6.8, 4% de SDS, 0,2% de azul de bromofenol e 20% de glicerol) e aplicadas no gel de modo que em cada raia tivessem 50.000 células. A corrida foi realizada em 15 miliampere por aproximadamente 2 horas. Este ensaio foi realizado também para avaliar a produção de proteína ao final do estudo.

#### 4.10 EXPRESSÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE

Células High-Five foram cultivadas na concentração de  $2 \times 10^6$  células/mL e inoculadas com baculovírus recombinante com MOI 5 em 48 horas para E<sub>D</sub> e MOI 2 em 72 horas para E<sub>M</sub>. O cultivo foi realizado com células em suspensão em meio Express Five, sob agitação de 100 RPM a 27 °C. Ao final do cultivo, a suspensão foi centrifugada a 130 xg por 15 min a 4 °C, o sobrenadante foi transferido para tubos de ultracentrifugação e o sedimento foi armazenado a - 20°. Para remoção das partículas virais, o sobrenadante foi submetido a uma nova centrifugação a 23.300 xg por 1 hora e 30 minutos e armazenado a - 20°C. Em seguida, o sobrenadante foi separado através de diálise contra solução salina tamponada (PBS 1X, pH 7,2). Foram realizadas 3 etapas de separação através de diálise, 2 de três em três horas e 1 durante a noite (cerca de 16 horas).

#### 4.11 SOLUBILIZAÇÃO DE SEDIMENTO CELULAR

Para análise da retenção proteica nas células, o sedimento foi ressuspenso em tampão de lise, lisado mecanicamente através de um sonicador 5 vezes por 10 segundos com intervalos de 1 minuto a cada ciclo de sonicação. O lisado celular foi centrifugado a 17.000 xg por 15 minutos e o sedimento foi solubilizado com tampão de ureia 8 M (volume correspondente a 9 vezes o peso do sedimento), após a solubilização a amostra foi novamente centrifugada a 17.000 xg por 15 minutos e o sobrenadante solubilizado com ureia 8 M foi utilizado imediatamente para purificação.

#### 4.12 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE

A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel sefarose com volume de 1 mL (HisTrap™ FF), com fluxo de 1 mL por minuto, as frações purificadas foram avaliadas por SDS-PAGE e a concentração da proteína foi determinada por ensaio de micro BCA. As amostras do sobrenadante e sedimento, nos seus respectivos tampões, foram tratados com imidazol 30 mM e filtrado em filtro de 0,22 µM para purificação, porém as amostras do sedimento foram manuseadas com etapas a mais.

#### 4.12.1 *Purificação de amostras do sobrenadante*

A coluna cromatográfica foi lavada com 15 mL de água destilada e em seguida equilibrada com 10 mL de PBS 1X e imidazol 30 mM (pH 7,4). Então, o sobrenadante de cultura, tratado com imidazol 30 mM, foi re-aplicado na coluna, de modo que todo o volume da amostra pudesse passar pela coluna 15 vezes. Foi realizada a lavagem da coluna com 10 mL de tampão de equilíbrio (PBS 1X + imidazol 30 mM) para remover ligações inespecíficas. Após lavagem, a coluna foi submetida a eluição (PBS 1X + 500 mM de imidazol), coletando-se as amostras eluídas em 5 frações de 1 mL. A coluna foi lavada com 15 mL de água destilada e adicionado etanol 70% até ocupar todo o interior da coluna para armazenamento. As frações purificadas foram submetidos a 3 etapas de diálise contra PBS 1X pH 7.4 para remover o imidazol usado para eluir as frações proteicas.

#### 4.12.2 *Purificação de amostras do sedimento*

A coluna cromatográfica foi lavada com 15 mL de água destilada e equilibrada com 10 mL de tampão de ureia 8 M (PBS 1X, pH 7,4 e ureia 8 M) e imidazol 30 mM (como a amostra do sedimento está em tampão de ureia 8 M, a solução de equilíbrio deve ser o mesmo em que a proteína se encontra). A amostra foi passada na coluna, de modo que todo o volume da amostra pudesse passar pela coluna 15 vezes. Foi realizada a lavagem da coluna com um gradiente descontínuo de ureia (8 M, 6 M, 4 M, 2 M e 0 M) com 10 mL de cada tampão. O último tampão foi PBS 1X + imidazol 30 mM para remover a ureia da amostra. Após o gradiente descontínuo, a coluna foi submetida a uma solução de eluição (PBS 1X + 500 mM de imidazol), coletando-se as amostras eluídas em 5 frações de 1 mL. A coluna foi lavada com 15 mL de água destilada e adicionado etanol 70% até ocupar todo o interior da coluna para armazenamento. As frações purificadas foram submetidos a 3 etapas de diálise contra PBS 1X pH 7.4 para remover o imidazol usado para eluir as frações proteicas.

### 4.13 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTEICA

A quantificação das amostras proteicas foi realizada pelo ensaio de micro BCA (Micro BCA Protein Assay Kit, ThermoFisher Scientific) segundo recomendações do fabricante. O ensaio foi feito em placa de 96 poços e BSA foi utilizada como padrão para o teste. A primeira concentração foi de 320 µg/mL, seguidas de diluições de 1:2 até chegar na menor concentração de 0,625 µg/mL. As amostras de proteína foram quantificadas em duplicata, bem como a curva padrão. Cada amostra foi adicionada no volume de 150 µL juntamente com 150 µL do reagente de trabalho do kit (Micro BCA™ Protein Assay Kit, ThermoFisher) em cada poço e a placa foi incubada a 37 °C por 2 horas. Após período de incubação, foi realizado a leitura da placa em leitor de ELISA no comprimento de onda de 562 nm e os dados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism.

#### 4.14 WESTERN BLOT

A análise para confirmação da especificidade da banda da produção das proteínas recombinantes do envelope do Zika vírus foi realizada por *western blot* com transferência no sistema semi seco, utilizando amostras produzidas a partir do sedimento celular. Foi realizado um gel de *SDS-PAGE* a 10% como descrito anteriormente. Após a corrida do gel, foi realizada a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose no sistema semi seco. O gel foi incubado sob agitação por 15 minutos em solução de *Towbin*, após esse período, a membrana foi incubada com o gel por mais 5 minutos em uma nova solução de *towbin*. Os papéis filtros foram umedecidos no mesmo tampão e organizados no *transblotting*. Primeiro dois papéis foram colocados um em cima do outro, com cuidado para não deixar formar bolhas entre eles. Em seguida foram adicionados a membrana, o gel e mais dois papéis filtro, o aparelho foi fechado e foi aplicada uma corrente elétrica de 15 Volts por 1 hora para a migração das amostras do gel para a membrana. Após transferência, a membrana foi corada com vermelho Ponceau para avaliar se houve transferência e para realizar marcação do limite do gel e do padrão de peso molecular. A membrana foi lavada com TBST-20 3x e bloqueada com TBST-20 + 5% de leite desnatado. Foram feitas novamente 3 lavagens com TBST-20 e 1 com TBS, então o anticorpo primário anti-His C-terminal foi diluído em TBST-20 + 5% de leite na proporção de 1:2000 por uma hora. Foram realizadas mais 4 lavagens (3 com TBST-20 e 1 com TBS) e a membrana foi incubada com anticorpo anti imunoglobulina de camundongo diluído em TBST-20 + 5% de leite na proporção de 1:1000 por 1 hora. Foram realizadas mais 4 lavagens (3 com TBST-20 e 1 com TBS) e a membrana foi incubada com

tampão de substrato da fosfatase alcalina com 1% de BCIP e 1% de NTB por 2 minutos na ausência de luz e a reação foi parada adicionando-se água destilada.

## 5. RESULTADOS

Para avaliar as melhores condições de expressão para as proteínas  $E_D$  e  $E_M$ , foi realizado um ensaio de otimização em células High-Five utilizando o estoque viral para infecção. Amostras de sobrenadante e de sedimento foram coletas em tempos diferentes para cada MOI avaliado, sobrenadante foi analisado por *Dot blot* e sedimento por *SDS-PAGE*. Após o período de infecção observou-se que a melhor condição para expressão na forma secretada (detectável no sobrenadante de cultura) da proteína  $E_D$  é com MOI 5 em 48 horas (FIGURA 3A) e para a proteína  $E_M$  é com MOI 2 em 72 horas (FIGURA 3B).

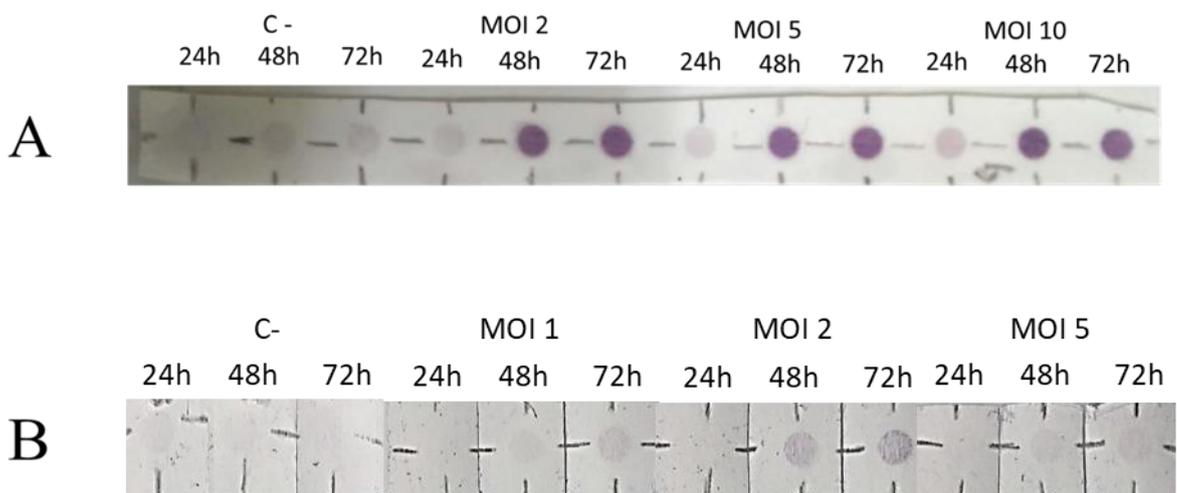


Figura 3 – Dot blot do ensaio de otimização da expressão de  $E_D$  (A) e  $E_M$ (B) no sobrenadante de cultura. A infecção foi feita com diferentes MOI (2, 5 e 10) e TOI (24, 48 e 72 horas). Como controle negativo, foi utilizando um baculovírus que não expressa nenhum gene recombinante na infecção com MOI 10 (C-).

Após análise no sobrenadante de cultura, o sedimento celular do ensaio de otimização também foi avaliado e as mesmas condições para expressão na forma secretada se mantiveram na análise de proteína retida nas células. Para a proteína  $E_D$  o MOI permaneceu 5 em 48 horas (FIGURA 4A) e, para a proteína  $E_M$  o MOI permaneceu 2 em 72 horas (FIGURA 4B). As células foram avaliadas por *SDS-PAGE*, sendo possível observar a presença da banda correspondente a proteína por volta de 52 KD (tamanho esperado da proteína).

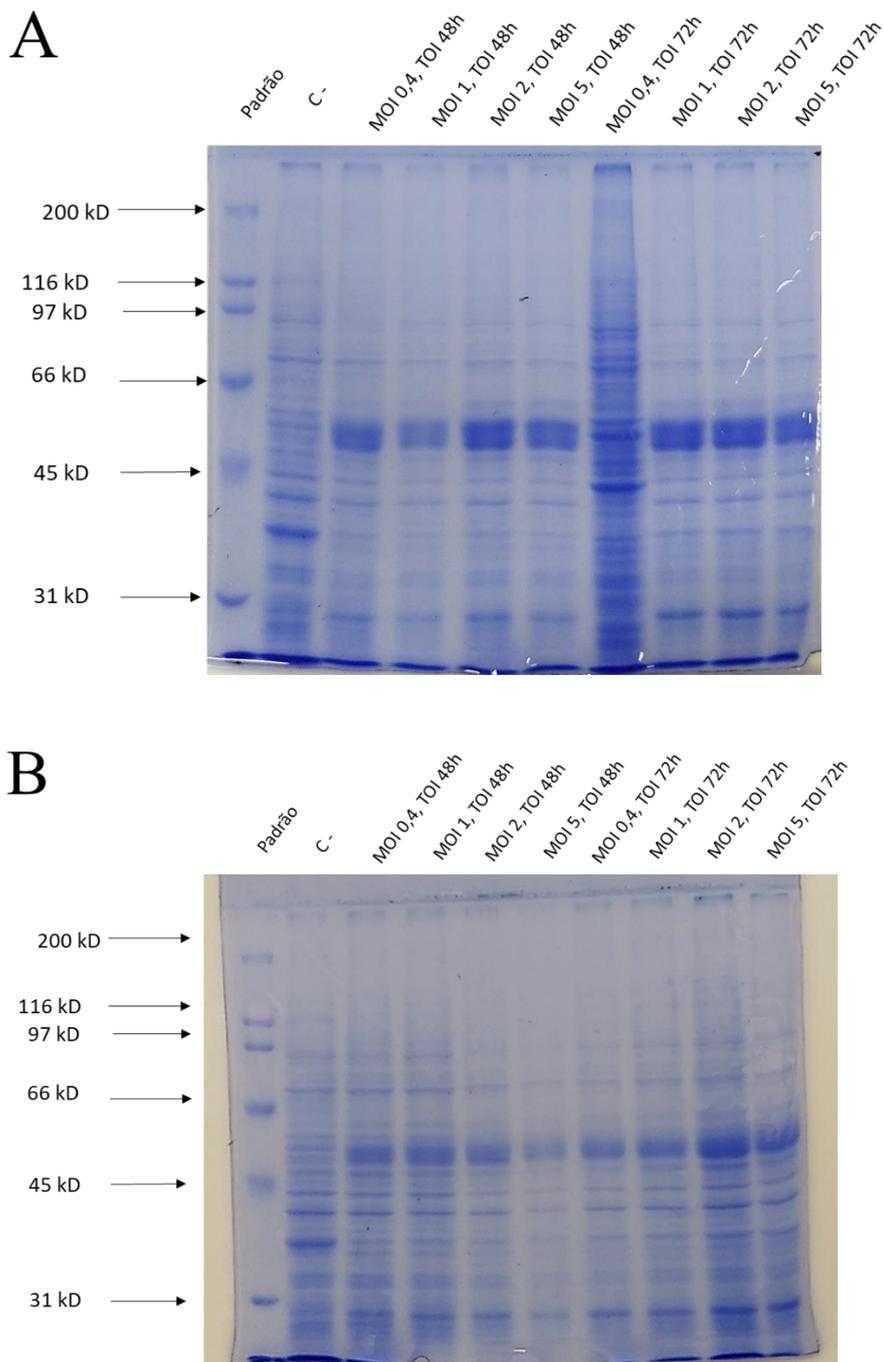


Figura 4 - SDS-PAGE de amostra de sedimento celular de ensaio de otimização para produção das proteínas ED (A) e EM. (B). A infecção foi feita com diferentes MOI (2, 5 e 10) e TOI (24, 48 e 72 horas). Como controle negativo, foi utilizando um baculovírus que não expressa nenhum gene recombinante na infecção com MOI 10 (C-).

Tendo em vista que as condições para produção proteica na forma solúvel e no sedimento foram definidas, foi iniciado o processo de produção em maior escala para purificação. As células High Five foram infectadas com baculovírus que expressa a proteína  $E_D$  ou a proteína  $E_M$  com MOI 5 e 2 e TOI 48 e 72, respectivamente. Após a infecção das

células, foram coletados sobrenadante da cultura e sedimento de células e realizada a purificação. As amostras foram analisadas em gel de poliacrilamida para verificar se o tamanho da banda da proteína purificada corresponde ao tamanho esperado (52KD). A Proteína  $E_D$  foi purificada a partir do sobrenadante de cultura ( $E_D$  SN), nas frações 3 e 4, com maior concentração na fração 3 (FIGURA 5A), e no sedimento de células ( $E_D$  SD) nas frações 1, 2 e 3, sendo que maior parte da proteína foi eluída na fração 2 (FIGURA 5B). A proteína  $E_M$  também foi purificada a partir do sobrenadante de cultura ( $E_M$  SN), detectável na fração 3 (FIGURA 5C), e do sedimento de células ( $E_M$  SD), nas frações 2, 3 e 4 (FIGURA 5D).

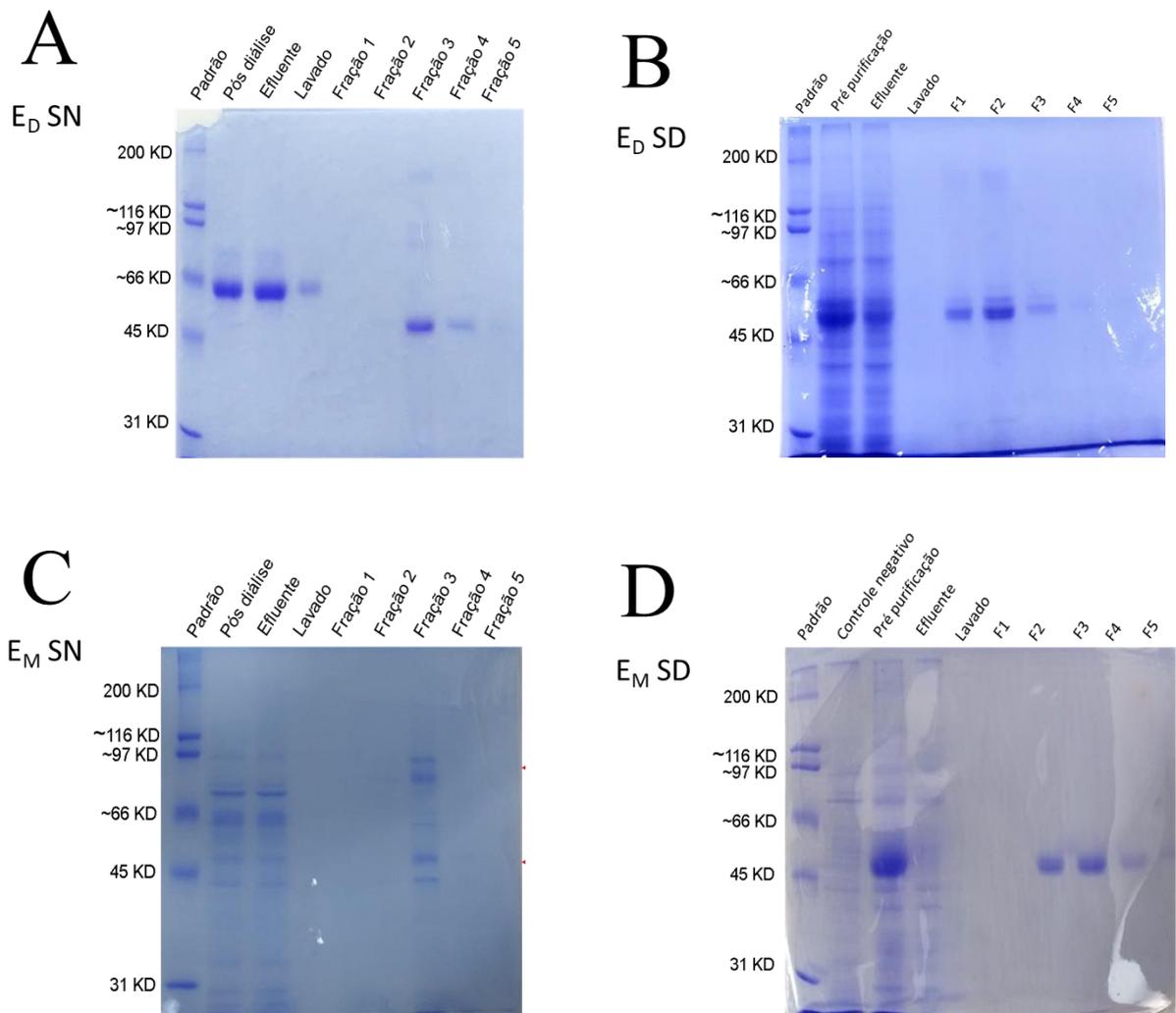


Figura 5 - SDS-PAGE da produção e purificação de proteína  $E_D$  e  $E_M$ . A) SDS-PAGE da purificação de  $E_D$  SN. B) SDS-PAGE da purificação de  $E_D$  SD. C) SDS-PAGE da purificação de  $E_M$  SN. D) SDS-PAGE da purificação de  $E_M$  SD.

É possível observar que as proteínas E<sub>D</sub> SN, E<sub>D</sub> SD e E<sub>M</sub> SD foram purificadas como esperado. Entretanto a proteína E<sub>M</sub> SN não teve uma purificação satisfatória, uma vez que é possível verificar que na raia com a fração 3, onde se encontra a proteína, tem outras bandas inespecíficas (FIGURA 6C).

Para determinar a concentração das amostras das proteínas E<sub>D</sub> SN, E<sub>D</sub> SD, E<sub>M</sub> SN e E<sub>M</sub> SD foi realizado o ensaio de Micro BCA. Após a determinação da concentração das amostras purificadas foi calculado o rendimento da expressão proteica, em que o rendimento encontrado foi de 1,2 mg/L e 2,3 mg/L para as proteínas E<sub>D</sub>SN e E<sub>D</sub>SD com MOI 5 e TOI 48 e 0,68 mg/L e 1,73 mg/L para as proteínas E<sub>M</sub>SN e E<sub>M</sub>SD com MOI 2 e TOI 72, respectivamente (TABELA 1).

Tabela 1 - Rendimento de produção de proteína.

Proteína	Concentração (µg/mL)	Rendimento (mg/L)
E <sub>D</sub> SN	168	1.2
E <sub>D</sub> SD	69	2.3
E <sub>M</sub> SN	112	0.68
E <sub>M</sub> SD	52	1.73

As proteínas E<sub>D</sub>SD e E<sub>M</sub>SD foram submetidas ao ensaio de *Western blot* para confirmação da identidade das proteínas produzidas considerando-se tanto o tamanho da banda como a detecção da cauda de histidina pelo anticorpo anti-His. Uma única banda foi identificada no tamanho aproximado de 52 kD, tanto na amostra proveniente da purificação de E<sub>D</sub>SD e E<sub>M</sub>SD (FIGURA 6). O extrato celular de células *High Five* infectadas com baculovírus recombinante que não expressa proteínas recombinantes foi utilizado como controle negativo (FIGURA 6). A proteína eGFP contendo cauda de histidina produzida em *E. coli* e purificada por cromatografia de afinidade foi utilizada como controle positivo. Para a proteína EGFP, uma banda predominante de cerca de 32 kD foi detectada (Figura 6).

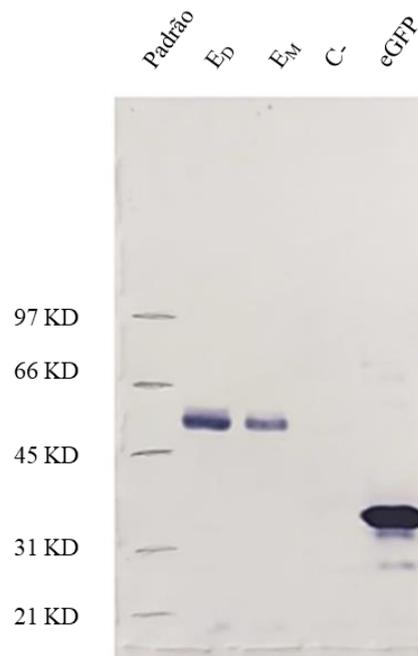


Figura 6 – Análise por Western blot de amostras das proteínas ED (Canaleta 2) e EM (Canaleta 3) purificadas por cromatografia de afinidade e obtidas da solubilização do do sedimento da cultura celular com ureia 8 M. Na canaleta 1, foi aplicado o padrão de peso molecular. Como controle negativo (C<sup>-</sup>, canaleta 4), foi utilizada uma amostra de sedimento celular infectado por um baculovírus que não produz proteína recombinante. Como controle positivo (C<sup>+</sup>, canaleta 5), foi utilizada uma amostra da proteína eGFP contendo cauda de histidina produzida em *E. coli* e purificada por cromatografia de afinidade.

## 6. DISCUSSÃO

O vírus Zika emergiu em 2015 nas Américas e no Brasil a epidemia por este vírus teve seu pico entre fevereiro e junho deste ano (CARDOSO *et al.*, 2015). Após a epidemia de 2015, os casos diminuíram entre 2016 e 2019, porém entre janeiro e julho de 2020 foi reportado aumento nos casos de arboviroses, inclusive de zika, com 4,666 registrados (BRASIL, 2020). Além do aumento de casos de infecção por ZIKV, foi reportada a entrada da linhagem africana do vírus Zika no país, linhagem esta que, até 2019 não tinha sido detectada nas amostras sequenciadas (KASPRZYKOWSKI *et al.*, 2020). O aparecimento da linhagem africana do ZIKV, em conjunto com a ausência de vacina e aumento de casos de arboviroses traz um alerta para a possibilidade de novas epidemias causadas pelo ZIKV. Nesse cenário, é imprescindível que haja um diagnóstico sensível, específico e de rápida execução para identificação do vírus e tomada de decisão ágil para combate a este vírus. No presente trabalho, foi produzido, no sistema baculovírus em células de inseto, a proteína do envelope modificada para formação de dímeros do Zika vírus tendo em vista sua utilização no diagnóstico ou como candidato à vacina. Também foi produzida a proteína sem modificações, ambas no sobrenadante de cultura e no sedimento celular, passível de solubilização e purificação por cromatografia de afinidade.

No passado, nosso grupo produziu algumas proteínas recombinantes no sistema baculovírus em células de inseto, entre elas, IL-7 e receptor solúvel de IL-10 (ambas com atividade biológica), todas caninas, com rendimento médio de pelo menos 5,5 mg/L e 2,8 mg/L, respectivamente (OLIVEIRA, B. M. N., 2016; SANTOS, C. O., 2016). Atualmente o grupo de pesquisa vem em busca de produzir proteínas virais, como as proteínas E, NS1 e NS3 de ZIKV e TAX e HBZ do Vírus T-Linfotrófico Humano (HTLV). Neste estudo, o rendimento das proteínas produzidas no sistema baculovírus em célula de inseto foi de 1,2 mg/L e 2,3 mg/L, para as proteínas E<sub>D</sub>SN e E<sub>D</sub>SD, e 0,68 mg/L e 1,73 mg/L para as proteínas E<sub>M</sub>SN e E<sub>M</sub>SD, respectivamente. Com isso, é possível afirmar que a modificação realizada para formação de dímeros não interferiu na produção da proteína E<sub>D</sub>, uma vez que o rendimento foi semelhante ao de E<sub>M</sub>. Em ambas as construções foi adicionada a sequência líder de AcMNPV (GP64), esta sequência é utilizada para direcionar a produção da proteína para o retículo endoplasmático, onde as proteínas sofrem ação de enzimas do tipo chaperona, favorecendo o processo de enovelamento proteico. Então, a proteína é direcionada para aparelho de Golgi e direcionada, no caso de GP64, para vesículas secretoras, fazendo com que a proteína seja secretada e encontrada no sobrenadante de cultura (ALBERTS *et al.*, 2010).

Entretanto, neste estudo, mesmo com a utilização de GP64, a maior parte da proteína produzida ficou retida nas células.

Diversos estudos buscam produzir a proteína do envelope do Zika vírus, em diferentes sistemas de expressão proteica, a fim de estudar a patogênese, em conjunto com outras proteínas deste vírus e, principalmente, por conta do seu potencial uso para diagnóstico e vacina. Por ter a capacidade de produção em larga escala, os sistemas de expressão de proteína procariótico e eucariótico são constantemente comparados. Em um estudo recente, os autores observaram que as proteínas recombinantes do envelope do ZIKV com sequência selvagem, produzidas nos dois sistemas, procariótico (*E. coli*) e eucariótico (células S2), foram capazes de estimular uma robusta resposta imune celular e humoral e boa proteção em camundongos imunocomprometidos contra doses letais do vírus Zika, entretanto não fica claro dados referentes ao rendimento da expressão proteica (LIANG *et al.*, 2018). Cada sistema tem vantagens e desvantagens. O sistema de expressão em bactérias é o que confere maior rendimento, é um método barato, mas não confere possibilidade de modificações pós tradução e a presença de LPS pode ser um interferente em determinadas análises por ser um estimulante do sistema imune. O sistema em células de mamífero e de inseto possuem a capacidade de ações pós tradução, são sistemas limpos, o que faz com que muitos estudos, assim como este, utilizem células eucariontes como sistema de produção de proteína. Entretanto, o rendimento nesses dois sistemas é inferior ao sistema em células procarióticas (GAGOSKI *et al.*, 2016),.

Apesar de proteínas que foram produzidas a partir da sequência selvagem serem capazes de induzir uma resposta imune, pesquisadores de todo o mundo tentam induzir a formação de dímeros para potencializar a resposta imune com anticorpos neutralizantes e tentar otimizar o diagnóstico. Yang e colaboradores (2019) desenharam uma construção para favorecer a formação de dímeros por formação de uma ponte dissulfeto, através da troca de uma alanina por uma cisteína na posição 264 da sequência que codifica a proteína do envelope do Zika vírus e comparou com a proteína recombinante com sequência selvagem, ambas as construções foram produzidas em células S2 com plasmídeo pMTBipV5His. Os autores demonstraram que a substituição dos aminoácidos é capaz de favorecer formação de dímeros. Além disso, foi possível afirmar que ambas as construções favorecem uma resposta imune robusta, entretanto, a proteína em forma de dímero foi capaz de estimular uma resposta mais forte, principalmente quando se trata de anticorpos neutralizantes. A abordagem de dimerização por formação de pontes dissulfeto já foi utilizada também para produção da

proteína do envelope do vírus da Dengue tipo 2, trocando uma alanina por uma cisteína na posição 259, favorecendo a ligação dos dois monômeros para formação de dímero e segundo os autores, esta proteína foi capaz de estimular o sistema imune além de ser candidata à vacina para Dengue tipo 2 (ROUVINSKI *et al.*, 2017). Muitos estudos utilizam células de inseto como sistema de expressão, entretanto, os autores não deixam claro qual é o rendimento da produção de proteína em seus sistemas. Além disso, é perceptível que, para proteínas de arbovírus, as células de inseto mais utilizadas para expressão proteica é a célula de *Drosófila S2*, utilizando transfecção transiente ou permanente.

O baculovírus é um vírus envelopado, com dupla fita de DNA, patogênico para insetos e o fato de ser seguro para humanos e plantas, o torna um bom candidato para uso em biotecnologia. Desde 1983, baculovírus vem sendo utilizado para expressão de proteínas em células de inseto (SMITH, SUMMERS e FRASER, 1983). Sua capacidade de expressar proteínas recombinantes em larga escala e possibilitar ações pós tradução, como enovelamento correto, glicosilação e fosforilação, faz com que esse sistema seja bastante utilizado (O'REILLY, MILLER e LUCKOW, 1994). Todavia, alguns fatores podem influenciar no processo de expressão de proteína neste sistema, como: o promotor utilizado, o tipo de célula hospedeira e saturação do sistema de transporte (MORRIS e MILLER, 1992).

A expressão gênica do baculovírus é dividida principalmente em três fases: inicial, tardia e muito tardia. A fase inicial não requer necessariamente produção de proteínas virais e precede replicação do DNA viral. A fase tardia é onde ocorre a replicação do DNA viral, e na fase muito tardia acontece a formação das partículas virais. É na última fase que acontece a expressão das proteínas poliedrina e proteína estrutural p10 em abundância. Os promotores para expressão dessas proteínas são os mais comumente utilizados para a produção de proteínas recombinantes neste sistema (ROHRMANN, 1999).

Em um estudo realizado por Martínez-Solís e colaboradores (2016), o promotor pSeL derivado do gene que codifica a proteína estrutural do envelope poliedro (PEP) de *S. exigua multiple nucleopolyhedrovirus* (SeMNPV) para expressão de GFP usando *Autographa californica nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) como vetor em diferentes células de inseto, entre elas, células *High Five*. O estudo comparou o promotor da poliedrina com o pSeL e demonstrou que os baculovírus que foram construídos com o promotor pSeL foram capazes de induzir uma expressão duas vezes maior do que com o promotor da poliedrina em células *High Five* e a combinação dos dois promotores no mesmo vetor aumentou a expressão quando comparado ao vetor com apenas o promotor da poliedrina. Em células Se301 e Sf21, o

vetor com a combinação de ambos os promotores foi capaz de potencializar a expressão de GFP, com expressão maior do que cada vetor com promotor isolado. Diversos estudos também investigaram outros promotores no sistema baculovírus em células de inseto. O promotor 39K de AcMNPV promove uma maior expressão que o promotor da poliedrina em células SF21 (LIN e JARVIS, 2012). Já o promotor pB2 de Lepidoptera *T. ni* é capaz de induzir a expressão proteica num período mais inicial da infecção, porém com menor rendimento que o promotor da poliedrina em células SF21 (LÓPEZ-VIDAL *et al.*, 2013). Portanto existem uma variedade de promotores para serem explorados na otimização do processo de expressão recombinante de proteína nesse sistema.

Uma vez que fica claro a grande variação de possibilidades para otimização do rendimento na produção de proteína recombinante em células de inseto, com diversas proteínas, não apenas com proteínas de arbovírus, o grupo pretende investigar qual é o melhor modelo para produção em larga escala desta proteína, buscando alternativas para expressão de proteínas de arbovírus, como transfecção transitória utilizando o plasmídeo pMTBipV5His. Inclusive, para proteína do envelope, que terá continuidade no sistema baculovírus, para determinação da formação de dímeros e avaliação da capacidade de estimulação do sistema imune, e será testada também a partir da produção em células S2 com transfecção.

## 7. CONCLUSÕES

Tendo em vista os dados apresentados, é possível afirmar que neste trabalho foi realizada a produção da proteína do envelope do Zika vírus, modificada para formação de dímeros e na forma selvagem, no sistema baculovírus em células *High Five*, tanto na forma solúvel quanto no sedimento celular, sendo passível de solubilização com ureia 8M, purificação e detecção por *SDS-PAGE* e *Western blot*. Estudos adicionais são necessários para avaliar se as proteínas produzidas possuem sua conformação nativa e se as modificações favorecem a formação de dímeros. Espera-se ainda que em breve as proteínas do envelope em forma de dímero e monômero sejam comparadas quanto a capacidade de estimulação de sistema imune celular e humoral, capacidade de estimulação de produção de anticorpos neutralizantes e capacidade de competição com a partícula viral para otimização de PRNT, buscando um candidato a vacina e melhoramento do diagnóstico atual.

## REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. 5a ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 728p.

ALENCAR, J. *et al.* Natural infection and vertical transmission of two flaviviruses (Yellow fever and Zika) in mosquitoes in primary forests in the Brazilian state of Rio de Janeiro (Diptera: Culicidae). **BioRxiv**, preprint doi: <https://doi.org/10.1101/688713>. 2020.

ALMEIDA, P. R. *et al.* Detection of a novel African-lineage-like Zika virus naturally infecting free-living neotropical primates in Southern Brazil. **BioRxiv**, preprint doi: <https://doi.org/10.1101/828871>. 2020.

ARAÚJO, L. M.; FERREIRA, M.L.; NASCIMENTO, O.J. Guillain-Barre syndrome associated with the Zika vírus outbreak in Brazil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 74, n. 3, p. 253-255, 2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, chikungunya e Zika), Semanas Epidemiológicas 01 a 52**. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2020/janeiro/20/Boletim-epidemiologico-SVS-02-1-.pdf>. Acesso em 3 out 2020.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes aegypti (dengue, chikungunya e zika), Semanas Epidemiológicas 1 a 13, 2020**. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2020/April/07/Boletim-epidemiologico-SVS-14.pdf>. Acesso em 3 out 2020.

OLIVEIRA, B. M. N. de. **Produção de IL-7 canina no sistema baculovírus-células de inseto**. Dissertação (Mestrado) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2016.

CAMPOS, G.S.; BANDEIRA, A.C.; SARDI, S.I. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, p. 1885–1886, 2015.

CARDOSO, C. W. *et al.* Outbreak of Exanthematous Illness associated with Zika, Chikungunya, and Dengue viruses, Salvador, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 12, p. 2274–2276, 2015.

CATIULE DE OLIVEIRA SANTOS. **Produção e avaliação do receptor solúvel de IL-10 canina recombinante**. Dissertação (Mestrado) - Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2016.

CRILL, W.D.; ROEHRIG, J.T. Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. **Journal of Virology**, v. 75, n. 16, p. 7769-7773, 2001.

- DAI, L. *et al.* Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. **Cell Host & Microbe**, v. 19, p. 696–704, 2016.
- DEJNIRATTISAI, W. *et al.* A new class of highly potent, broadly neutralizing antibodies isolated from viremic patients infected with dengue virus. **Nature Immunology**, v. 16, n. 2, p. 170-177, 2015.
- DEJNIRATTISAI, W.; SUPASA, P.; WONGWIWAT, W. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. **Nature Immunology**, v. 17, p. 1102–1108, 2016.
- DICK, G.W. Zika virus. II. Pathogenicity and physical properties. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 521-534, 1952.
- DOWD, K. A. *et al.* Broadly Neutralizing Activity of Zika Virus-Immune Sera Identifies a Single Viral Serotype. **Cell Reports**, v. 16, p. 1485–1491, 2016.
- DUFFY, M. R. *et al.* Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal of Medicine** v. 360, p. 2536–2543, 2009.
- FARES, R. C. *et al.* Epidemiological Scenario of Dengue in Brazil. **BioMed Research International**, v. 15, p. 13, 2015.
- ESTOFOLETE, F. C. *et al.* Clinical and laboratory profile of Zika virus infection in dengue suspected patients: A case series. **Journal of Clinical Virology**, v. 81, p. 25–30, 2016.
- GAGOSKI, D. *et al.* Performance Benchmarking of Four Cell-Free Protein Expression Systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 113, p. 2, 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. **The Lancet**. v. 391, p. 552–562, 2018.
- GONG, D. *et al.* High-Throughput Fitness Profiling of Zika Virus E Protein Reveals Different Roles for Glycosylation during Infection of Mammalian and Mosquito Cells. **Science**, v. 1, p. 97–111, March 23, 2018.
- HEUKELBACH, J. *et al.* Zika virus outbreak in Brazil. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 10, n. 2, p. 116–120, 2016.
- JAVED, F. *et al.* Zika virus: what we need to know? **Journal Basic Microbiology**, v. 58, p. 3–16, 2018.
- KANG, S. *et al.* Modified HIV envelope proteins with enhanced binding to neutralizing monoclonal antibodies. **Virology**. V. 331, p. 20 – 32, 2005.
- KASPRZYKOWSKI, JOSÉ I. *et al.* A recursive sub-typing screening surveillance system detects the arising of the ZIKV African lineage in Brazil: Is there risk of a new epidemic?. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 1, p. 1, 2020.

- KIM, Y. C. *et al.* Optimization of Zika virus envelope protein production for ELISA and correlation of antibody titers with virus neutralization in Mexican patients from an arbovirus endemic region. **Virology Journal**, v. 15, p. 193, 2018.
- KOISHI, A. C. *et al.* Development and evaluation of a novel high-throughput image-based fluorescent neutralization test for detection of Zika virus infection. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, p. 12, 2018.
- KUNO, G. E.; CHANG, G.-J. J. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. **Archives Virology**, v. 152, p. 687–696, 2007.
- LAI, Y. *et al.* Antibodies Against Modified NS1 Wing Domain Peptide Protect Against Dengue Virus Infection. **Scientific Reports**, v. 7, p. 6975, 2017.
- LIANG, H. *et al.* Recombinant Zika virus envelope protein elicited protective immunity against Zika virus in immunocompetent mice. **PLoS ONE**, v. 13, p. 3, 2018.
- LIN C-H.; JARVIS, D. L. Utility of temporally distinct baculovirus promoters for constitutive and baculovirus-inducible transgene expression in transformed insect cells. **Journal of Biotechnology**, v. 29, p. 997–1003, 2012.
- LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. **Advances in Virus Research**, v. 59, p. 23-61, 2003.
- LÓPEZ-VIDAL J. *et al.* Characterization of a Trichoplusia Ni hexamerin-derived promoter in the AcMNPV baculovirus vector. **Journal of Biotechnology**, V. 165, P. 201–208, 2013.
- MACNAMARA FN. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, p. 139 –145, 1954.
- MALLET HP, VIAL AL, MUSSO D. French Polynesia outbreak of Zika in French Polynesia, 2013–2014. **Bull Inform Sanit Epidemiol**, v. 13, p. 1–5, 2015.
- MARDEKIAN, S. K. AND ROBERTS A. L. Diagnostic Options and Challenges for Dengue and Chikungunya Viruses. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 834371, 2015.
- MARTÍNEZ-SOLÍS, M. *et al.* A novel baculovirus-derived promoter with high activity in the baculovirus expression system. **PeerJ**, v. 4, p. 2183, 2016.
- METZ, S. W. *et al.* In Vitro Assembly and Stabilization of Dengue and Zika Virus Envelope Protein Homo-Dimers. **Scientific Reports**, v. 7, p. 4524, 2017.
- MODIS, Y. *et al.* Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature**, v. 427(6972), p. 313-319, 2004.
- MODJARRAD, K. *et al.* Safety and immunogenicity of a purified inactivated Zika virus vaccine candidate: preliminary aggregate results from three phase 1a randomized, double-blind, placebo controlled clinical trials. **The Lancet**, v. 10; 391(10120), p. 563–571, 2018.

- MORRIS TD, MILLER LK. Promoter influence on baculovirus-mediated gene expression in permissive and nonpermissive insect cell lines. **Journal of Virology**, v. 66(12), p. 7397–7405, 1992.
- MUSSO, D.; CAO-LORMEAU, V. M.; GUBLER, D. J. Zika virus: following the path of dengue and chikungunya? **The Lancet**, v. 386, n. 9990, p. 243–244, 2015.
- OLIVEIRA, B. M. N. de. **Produção de IL-7 canina no sistema baculovírus-células de inseto**. Dissertação (Mestrado) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2016.
- O'REILLY, D. R.; MILLER, L. K.; LUCKOW, V. A. **Baculovirus expression vectors: a laboratory manual**. Oxford: Oxford University Press. 1994.
- O'REILLY, D. R. *et al*, **Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual**. New York, Oxford University Press: Libraries Australia, 1994. 347p.
- PINHEIRO, F. E.; NELSON, M. Re-emergence of dengue and emergence of dengue hemorrhagic fever in the Americas. **Dengue Bulletin**, v. 21, p. 16–24, 1997.
- PRIYAMVADA, L. *et al*. Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, p. 7852–7857, 2016.
- ROBBIANI, D. F. *et al*. Recurrent Potent Human Neutralizing Antibodies to Zika Virus in Brazil and Mexico. **Cell**, v. 169(4), p. 597-609 e511, 2017.
- ROHRMANN GF. **Nuclear polyhedrosis viruses**. In: **Encyclopedia of virology**. Second edition. London: Academic Press, 146–152, 1999.
- SAMBROOK, J.; FRISTSCH, E. F.; MANIATIS T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York, Cold Spring Harbor. 1-3, 1998.
- SCHNEIDER, J. e DROLL, D. **A timeline for dengue in the Americas to December 31, 2000 and noted first occurrences**. Organização Pan-Americana de saúde, 2001. Acessado em: [http://www.paho.org/English/HCP/HCT/dengue timeline.xls](http://www.paho.org/English/HCP/HCT/dengue%20timeline.xls).
- SELEMANE, I. Epidemiological monitoring of the last outbreak of yellow fever in Brazil – an outlook from Portugal. **Travel Medicine and Infectious Disease**. 2018.
- SHAN, C. *et al*. A live-attenuated Zika virus vaccine candidate induces sterilizing immunity in mouse models. **Nature Medicine**, v. 23(6), p. 763–767, 2017.
- SIQUEIRA, J. B. J. *et al*. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981–2002. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, p. 48–53, 2005.
- SMITH, G.E.; SUMMERS, M.D.; FRASER, M.J. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. **Molecular and Cellular Biology**, v. 3(12), p. 2156–2165, 1983.

VÁZQUEZ, S. *et al.* MAC-ELISA and ELISA inhibition methods for detection of antibodies after yellow fever vaccination. **Journal of Virological Methods**, v. 110, p. 179-184, 2003.

WILLIAMS, K. L. *et al.* Antibodies targeting dengue virus envelope domain III are not required for serotype-specific protection or prevention of enhancement in vivo. **Virology**, v. 20, n. 429(1), p. 12–20, 2012.

YAMANAKA, A. *et al.* Utility of Japanese encephalitis virus subgenomic replicon-based single-round infectious particles as antigens in neutralization tests for Zika virus and three other flaviviruses. **Journal of Virological Methods**, v. 243, p. 164–171, 2017.

YANG, C. *et al.* Characterization of two engineered dimeric Zika virus envelope proteins as immunogens for neutralizing antibody selection and vaccine design. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294(27), p. 10638–10648, 2019.

ZHANG, J. *et al.* Optimum Infection Conditions for Recombinant Protein Production in Insect Cell (Bm5) Suspension Culture. **Biotechnology Progress**, v 10, N. 6, 1994.

ZHANG, X. *et al.* Structures and Functions of the Envelope Glycoprotein in Flavivirus Infections. **Viruses**, v. 9, p. 338, 2017.

## Anexo I - Mapa do plasmídeo pFastBacDual.

