

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Aggeu Magalhães

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

Bruno Henrique de Sousa Leite

Avaliação da expressão *in vitro* de vacinas de DNA contra o Vírus Zika

Recife

2022

Bruno Henrique de Sousa Leite

Avaliação da expressão *in vitro* de vacinas de DNA contra o Vírus Zika

Dissertação de Mestrado Acadêmico em Saúde Pública apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Doutor Roberto Dias Lins Neto
Co-orientadora: Doutora Isabelle Freire Tabosa Viana

Recife
2022

Título do trabalho em inglês: Evaluation of In Vitro Expression of DNA Vaccines Against Zika Virus.

O presente trabalho foi realizado com apoio de Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) - Código de Financiamento 001.

L533a Leite, Bruno Henrique de Sousa.
Avaliação da expressão in vitro de vacinas de DNA contra o Vírus Zika / Bruno Henrique de Sousa Leite. -- 2022.
129 f. : il. color.

Orientador: Roberto Dias Lins Neto.
Coorientadora: Isabelle Freire Tabosa Viana.
Dissertação (Mestrado Acadêmico em Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde), Recife, 2022.
Bibliografia: f. 1-129.

1. Vacina de DNA. 2. Imunogenicidade. 3. Expressão das proteínas prM/M-E in vitro. 4. Adjuvantes Moleculares. I. Título.

CDU 577

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Rede de Bibliotecas da Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecário responsável pela elaboração da ficha catalográfica: Adagilson Batista Bispo da Silva - CRB-1239
Biblioteca Luciana Borges Abrantes dos Santos

Bruno Henrique de Sousa Leite

Avaliação da expressão *in vitro* de vacinas de DNA contra o Vírus Zika

Dissertação de Mestrado Acadêmico em Saúde Pública apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 27 de Setembro de 2022

BANCA EXAMINADORA

Dr^a Norma Lucena Cavalcanti Licinio da Silva
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dr^o Rafael de Freitas e Silva
Universidade de Pernambuco (UPE)

Dr^o Roberto Dias Lins Neto
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

RESUMO

LEITE, Bruno Henrique de Sousa. Avaliação da expressão *in vitro* de vacinas de DNA contra o Vírus Zika. 2022. Dissertação (Mestrado em Biociências e biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2022.

O vírus Zika (ZIKV) é um flavivírus emergente que tem sido associado a distúrbios neurológicos como a Síndrome de Zika Congênita e a síndrome de *Guillain Barré*. Diante deste quadro, o desenvolvimento de estratégias vacinais capazes de conter a disseminação viral é uma prioridade de saúde pública. Sabe-se que as proteínas de superfície do vírus (Envelope – E e Pré - Membrana/Membrana – prM/M) são as mais antigênicas e indicadas como melhores candidatas à imunização. Desta forma, o nosso grupo de pesquisa desenhou formulações vacinais de DNA contra o ZIKV, a qual apresenta os antígenos vacinais de prM/M-E associados a adjuvantes moleculares visando potencializar as respostas celulares e humorais. As regiões do vírus relacionadas ao ancoramento à membrana celular foram retiradas das sequências finais contidas no plasmídeo. Portanto, nós hipotetizamos que formulações vacinais de DNA associadas a adjuvantes moleculares promovem aumento da expressão dos antígenos do vírus Zika *in vitro*, conferindo assim, uma maior imunogenicidade da vacina. Os resultados da primeira construção vacinal desenvolvida, p43.2 ZIKV/-C-prM/M-E-LAMP, mostraram que esta vacina expressa os antígenos virais em baixas concentrações quando avaliadas por imunofluorescência em células de mamíferos. Partindo disso, foram desenvolvidas novas formulações vacinais, inseridas no vetor de expressão pcDNA3.1, com substituições do peptídeo sinal da proteína nativa (C- terminal do Capsídeo de ZIKV) pelo peptídeo sinal da proteína do ativador de plasminogênio tecidual (SP-tPA), adição da sequência consenso Kozak, deleção da região Stem (Haste, tradução do inglês) e Transmembrana (TM), e adição ou remoção da proteína LAMP, denominadas neste trabalho como segunda formulações vacinas de DNA. Estas vacinas, foram avaliadas em células de camundongo, BHK-21, quanto aos níveis de expressão das proteínas prM/M-E por ELISA baseado em células e o tráfego celular destes antígenos foram observados por imunofluorescência, com auxílio do microscópio Leica *Dmi8*. Desta forma, foi observado que adjuvantes moleculares inseridos nas sequências vacinais, são essenciais para obter melhores níveis de expressão de proteínas e como melhor candidata, a vacina pCDNA3.1 ZIKVE Δ STEM obteve os melhores resultados quanto à expressão das proteínas virais de ZIKV. Além disso, esta vacina prosseguiu para testes pré-clínicos (*in vivo*, em camundongos), em colaboração com o grupo da Dr^a Maria Sato (USP), a fim de validar os efeitos protetores desta formulação.

Palavras-chave: vacina de DNA; imunogenicidade; expressão das proteínas prM/M-E *in vitro*; adjuvantes moleculares.

ABSTRACT

LEITE, Bruno Henrique de Sousa. Evaluation of the in vitro expression of DNA vaccines against Zika virus. 2022. Dissertation (Master in Biosciences and biotechnology in Health) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2022.

Zika virus (ZIKV) is an emerging flavivirus that has been associated with neurological disorders such as Congenital Zika Syndrome and Guillain Barré syndrome. Given this picture, the development of vaccine strategies capable of containing viral spread is a public health priority. It is known that the surface proteins of the virus (Envelope - E and Pre - Membrane/Membrane - prM/M) are the most antigenic and indicated as best candidates for immunization. Thus, our research group has designed DNA vaccine formulations against ZIKV, which present the prM/M-E vaccine antigens associated with molecular adjuvants aiming to potentiate cellular and humoral responses. The virus regions related to anchorage to the cell membrane were taken from the final sequences contained in the plasmid. Therefore, we hypothesized that DNA vaccine formulations associated with molecular adjuvants promote increased expression of Zika virus antigens in vitro, thus conferring enhanced immunogenicity of the vaccine. The results of the first vaccine construct developed, p43.2 ZIKV/-C-prM/M-E-LAMP, showed that this vaccine expresses the viral antigens at low concentrations when evaluated by immunofluorescence in mammalian cells. Based on this, new vaccine formulations were developed, inserted into the expression vector pcDNA3.1 expression vector, with substitutions of the native protein signal peptide (C-terminal of ZIKV capsid) for the signal peptide of tissue plasminogen activator protein (SP-tPA), addition of the Kozak consensus sequence, deletion of the Stem and Transmembrane (TM) regions, and addition or removal of the LAMP protein, denominated in this work as second DNA vaccine formulations. These vaccines were evaluated in mouse BHK-21 cells for the expression levels of prM/M-E proteins by cell-based ELISA, and the cellular traffic of these antigens was observed by immunofluorescence with the aid of a Leica DMI8 microscope. Thus, it was observed that molecular adjuvants inserted into the vaccine sequences, are essential to obtain better levels of protein expression and as the best candidate, the pCDNA3.1 ZIKVEΔSTEM vaccine obtained the best results regarding the expression of ZIKV viral proteins. In addition, this vaccine proceeded to preclinical testing (in vivo, in mice), in collaboration with Dr. Maria Sato's group (USP), in order to validate the protective effects of this formulation.

Keywords: DNA vaccine; immunogenicity; expression of prM/M-E proteins *in vivo*; molecular adjuvants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Difusão espacial do Zika vírus (ZIKV) no Brasil de 2014 a 2016 produzidos pelo Ministério Federal da Saúde e secretarias estaduais de saúde.....	13
Figura 2 -	Curva epidêmica dos casos prováveis de zika, por semanas epidemiológicas de início de sintomas, Brasil, 2019 a 2022 - SE 21	14
Figura 3 -	Genoma do ZIKV.....	16
Quadro 1-	Exemplos de vacinas construídas e sua imunogenicidade induzida contra o ZIKV.....	19
Figura 4 -	Resposta imune humoral e celular induzida pela vacinação com DNA.....	23
Figura 5 -	Linha do tempo do uso de adjuvantes moleculares em vacinas desenvolvidas para humanos.....	26
Figura 6 -	Anatomia básica do lisossomo.....	29
Figura 7 -	Características gerais da organização dos domínios da macrosialina e das proteínas LAMP-1, LAMP-2, CD-LAMP e CD68.....	30
Figura 8 -	Representação simplificada do mecanismo de apresentação mediada por MHC II e as proteínas LAMP.....	32
Figura 9 -	Representação simplificada da função do SP-tPA.....	34
Figura 10 -	Representação esquemática da escolha dos antígenos vacinais.....	40
Figura 11 -	Representação esquemática da técnica de ELISA baseado em células.....	45
Figura 12 -	Análise da pureza dos vetores comerciais e da identidade	

	dos genes otimizados correspondentes a vacina p43.2 ZIKV/-C-prM/M-E-LAMP e o vetor vazio p43.2.....	47
Figura 13	- Microscopia confocal observando a expressão da proteína GFP em células HEK-293T.....	48
Figura 14	- Microscopia confocal observando a expressão das proteínas de Febre Amarela em células HEK-293.....	49
Figura 15	- Microscopia confocal observando a expressão das proteínas de Zika em células HEK-293T.....	49
Figura 16	- Análise da integridade do DNA da segunda geração da vacina por eletroforese.....	50
Figura 17	- Padronização do ensaio de ELISA baseado em células utilizando a vacina pcDNA3.1 ZIKV Δ STEM.....	51
Figura 18	- Expressão das proteínas virais da segunda geração das vacinas medidas por ELISA baseado em células.....	53
Figura 19	- Microscopia confocal observando a expressão das proteínas de prM/M-E em células BHK-21 após transfecção com ZIKV Δ STEM.....	56
Figura 20	- Microscopia confocal observando a expressão das proteínas de Febre Amarela em células HEK-293 após transfecção com ZIKV Δ STEM/LAMP.....	57
Figura 21	- Microscopia confocal observando a expressão das proteínas de prM/M-E em células BHK-21 após transfecção com ZIKV Δ TM.....	58
Figura 22	- Microscopia confocal observando a expressão das proteínas de prM/M-E em células BHK-21 após transfecção com ZIKV Δ TM/LAMP.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Célula Apresentadora de Antígeno
AS	Adjuvant System
BHK	Baby Hamster Kidney cells
BSA	Bovine seric albumin
C	Capsídeo
CD	Célula Dendrítica
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CHIKV	Chikungunya Virus
CO ₂	Gás Carbônico
DC - LAMP	Dendritic cell – lysosomal associated membrane protein
DENV	Dengue Virus
DLD	Doenças Lisossômicas de Depósito
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
E	Envelope
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
GFP	Green fluorescent protein
HEK	Human embryonic kidney cells
LAMP	Lysosomal-associated membrane protein
LB	Luria Bertani
M	Membrana
MHCII	Compartimento do complexo principal de histocompatibilidade II
MPM	Marcador de peso molecular
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ORF	Open reading frame
PBS	Phosphate buffered saline
prM	Pré-membrana
RNA	Ácido Ribonucleico
SBF	Soro Fetal Bovino
SE	Semana Epidemiológica
SGB	Síndrome de Guillain-Barré

SINASC	Sistemas de Informações sobre Nascidos Vivos
SOC	Super Optimal Broth
TAE	Tampão TRIS-Acetato-EDTA
T _{FH}	T follicular helper cells
tPA-SP	Peptídeo sinal da proteína do Ativador do Plasminogênio Tecidual
Vero	Kidney Epithelial cells extracted from an African green monkey
WNV	West-Nile Virus
ZIKV	Zika Virus

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1	O VÍRUS ZIKA.....	11
2.1.1	Epidemiologia do ZIKV.....	11
2.1.2	Manifestações clínicas associadas ao ZIKV.....	13
2.1.3	Características genéticas, moleculares e estruturais.....	14
2.1.3.1	Proteínas estruturais.....	15
2.1.4	Vacinas para ZIKV.....	17
2.2	VACINAS DE DNA	22
2.2.1	Adjuvantes moleculares.....	25
2.2.1.1	Alumínio.....	27
2.2.1.2	MF59.....	28
2.2.1.3	Adjuvant systems.....	28
2.2.1.4	Desenvolvimento de novos adjuvantes: novos conceitos.....	28
2.2.2	Proteína associada à membrana lisossomal.....	30
2.2.3	Peptídeo sinal do ativador do plasminogênio tecidual.....	34
3	JUSTIFICATIVA	36
4	PERGUNTA CONDUTORA	37
5	HIPÓTESE	38
6	OBJETIVOS	39
6.1	OBJETIVO GERAL.....	39
6.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
7	PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	40
7.1	DESENHO DOS PLASMÍDEOS VACINAS CONTRA ZIKV.....	40
7.2	TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR CHOQUE TÉRMICO.....	41
7.3	PREPARAÇÃO DO DNA (EM PEQUENA, MÉDIA E LARGA ESCALA).....	42
7.4	ELETROFORESE DE DNA EM GEL DE AGAROSE.....	42

7.5	CULTIVO DE CÉLULAS HEK 293-T, BHK-21 E VERO.....	43
7.6	TRANSFEÇÃO DOS PLASMÍDEOS EM CÉLULAS HEK-293T, BHK-21 E VERO.....	43
7.9	IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	44
7.10	ELISA BASEADO EM CÉLULAS	45
7.11	ANÁLISE DE DADOS.....	46
8	RESULTADOS.....	47
8.1	PRIMEIRA FORMULAÇÃO DA VACINA: INTEGRIDADE DO DNA E EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS VIRAIS.....	47
8.1.1	Identidade de sequência do gene sintético p43.2 ZIKV/-C-PRM/M-E-LAMP	47
8.1.2	Avaliação da localização das proteínas vacinais prM/M-E em compartimentos celulares por imunofluorescência.....	49
8.2	QUATRO NOVAS FORMULAÇÕES VACINAIS: INTEGRIDADE DOS DNAs VACINAIS, AVALIAÇÃO E OBSERVAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS VIRAIS.....	53
8.2.1	Confirmação da integridade dos DNAs vacinais.....	53
8.2.2	Validação do protocolo de ELISA baseado em células.....	53
8.2.3	Avaliação da expressão dos antígenos virais das formulações da segunda construção de vetores vacinais por ELISA baseado em células.....	55
8.2.4	Avaliação da localização e confirmação da expressão das proteínas prM/M-E nos compartimentos celulares por imunofluorescência.....	56
9	DISCUSSÃO.....	61
10	CONCLUSÕES.....	65
	REFERÊNCIA.....	66
	APÊNDICE I.....	90
	APÊNDICE II.....	91

1 INTRODUÇÃO

Os primeiros casos no Brasil de infecção pelo vírus Zika (*Zika virus* – ZIKV) foram registrados em dezembro de 2014, e desde então este vírus tem sido associado a relatos sem precedentes de distúrbios neurológicos variando desde a síndrome de Guillain Barré à microcefalia (BARRETO; *et al.*, 2016; WAKIMOTO *et al.*, 2016; SILVA-FLANNERY *et al.*, 2016). Devido a este impacto nos indivíduos e na sociedade, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou o ZIKV uma emergência de saúde global em fevereiro de 2016 (OMS, 2016).

Desde então, a endemia do ZIKV está presente em países tropicais e subtropicais, e seus relatos ocorrem de forma esporádica, porém, possui potencial de disseminação para novas áreas geográficas como observado com outros arbovírus emergentes, como West Nile (WN) e Chikungunya (CHIKV) (IOOS *et al.*, 2014; DUFFY *et al.*, 2009). No Brasil, por exemplo, até a semana epidemiológica (SE) 21 de 2022, 6 mil novos casos prováveis de Zika foram relatados, correspondendo a um aumento de aproximadamente 200% em relação ao ano anterior (BRASIL, 2022).

Esta disseminação também ocorre devido às diferentes vias de transmissão do ZIKV. Além do mosquito vetor, existe a transmissão materno-fetal, por transfusão sanguínea e através da relação sexual, na qual o sêmen dos homens pode abrigar o ZIKV por vários meses após uma infecção (LESSLER *et al.*, 2016; DRIGGERS *et al.*, 2016; MUSSO *et al.*, 2017).

Diante destas preocupações, o desenvolvimento de estratégias vacinais capazes de conter a propagação desta infecção viral faz-se uma prioridade mundial de saúde pública. No entanto, atualmente não há vacinas profiláticas ou terapêuticas contra infecções por ZIKV disponíveis para uso em humanos (OMS, 2021).

Dentre as estratégias vacinais disponíveis, a utilização de abordagem de entrega de vacinas baseada em genes (DNA) tem sido promissora (TANG, *et al.* 2022; SHAFATI, *et al.* 2022; LIU, *et al.* 2022). Estas vacinas possuem custos baixos de fabricação além de fácil manipulação e reformulação do antígeno e são estáveis à temperatura ambiente (DOWD, 2016; LUNARDELLI *et al.*, 2020; SABBAGHI, 2021; HARVEY; CARABELLI; JACKSON, *et al.*, 2021).

Estudos recentemente publicados têm descrito uma formulação vacinal de DNA expressando a sequência completa das proteínas de pré-membrana, membrana e envelope (prM/M-E) selvagem do ZIKV capaz de induzir proteção de curta duração em modelo de camundongo após desafio com o vírus (YANG *et al.*, 2016; SUN *et al.*, 2022; ZHOU *et al.*, 2021; LÓPEZ-CAMACHO *et al.*, 2017; IN, 2020). Contudo, as vacinas descritas não demonstraram a indução de resposta protetora ativa e passiva de longa duração, proteção do feto em modelo de camundongo durante o período gestacional ou proteção contra o desenvolvimento de complicações neurológicas.

Diante deste cenário, nosso grupo desenvolveu vacinas de DNA contra ZIKV. A primeira construção da vacina deste presente estudo, consiste no vetor p43.2 codificando para a porção C-terminal da proteína do capsídeo (C), e para as proteínas completas prM/M e E sem o domínio de transmembrana ((Δ -Deleção) TM) de ZIKV fusionadas à proteína de associação à membrana lisossomal (*lysosome associated membrane protein* – LAMP), resultando na construção chamada ZIKV-C-prM/M-E- Δ TM/LAMP. A seleção dos antígenos foi baseada em estudos mostrando que a co-expressão das proteínas prM/M e E induz a geração de anticorpos neutralizantes contra outros Flavivírus (YANG *et al.*, 2016; SUN *et al.*, 2022; ZHOU *et al.*, 2021). Além disso, a fusão das proteínas virais à proteína LAMP visa à expressão eficiente dos antígenos vacinais em células de humanos e o seu direcionamento ao MIIC ((compartimento do complexo principal de histocompatibilidade II (MHC II) – *MHC class II compartment*). Desta forma, as proteínas virais processadas e posteriormente apresentadas por moléculas do MHC II conseguem induzir robusta resposta auxiliar de linfócitos T CD4⁺ e resultar na geração de resposta humoral protetora (TEIXEIRA *et al.*, 2022; SUN *et al.*, 2022).

Testes *in vitro* realizados neste trabalho para a vacina ZIKV-C-prM/M-E- Δ TM/LAMP comprovaram a expressão das proteínas prM/M-E no citoplasma de células de mamíferos. No entanto, em colaboração, o grupo da Doutora Maria Sato (USP) realizou testes *in vivo* e os resultados obtidos demonstraram que esta vacina induziu baixa imunogenicidade. Ante o exposto, nós hipotetizamos que a baixa imunogenicidade desta vacina está relacionada à escolha das sequência das proteínas virais de ZIKV, que continham regiões de ancoramento à membrana celular, assim como, o papel do adjuvante molecular LAMP que

também estava mantendo as proteínas presas à membrana celular, portanto, dificultando a apresentação antigênica das proteínas virais processadas de prM/M-E.

Com base nisto, quatro novas formulações vacinais foram desenvolvidas, denominadas neste trabalho como: segunda formulações de vacinas de DNA. Estas construções foram inseridas no vetor pcDNA3.1 codificando para a proteína de Ativador do Plasminogênio Tecidual (tPA-SP), utilizada como peptídeo sinal para o retículo endoplasmático (RE), para a sequência consenso Kozak, para as proteínas completas de prM/M, para a proteína E com ou sem a região Stem (“Haste” - Tradução livre do inglês) e com ou sem a região TM, e fusionadas, ou não à proteína LAMP, resultando nas seguintes construções: ZIKV-tPA-prM/M-E- Δ STEM-LAMP (proteínas virais com deleção da região Stem fusionadas ao LAMP), ZIKV-tPA-prM/M-E Δ STEM (deleção da região Stem sem o LAMP), ZIKV-tPA-prM/M-E- Δ TM (proteínas virais com deleção da região TM sem o LAMP), e ZIKV-tPA-prM/M-E Δ TM-LAMP (proteínas virais com deleção da região TM fusionadas ao LAMP).

Para imunogenicidade e eficácia vacinais satisfatórias, tanto a expressão eficiente de um antígeno quanto a manutenção de sua conformação natural são necessárias (KOU *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2011; LUO *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2020). Desta forma, o SP (Peptídeo sinal) da proteína tPA foi usada nas quatro novas formulações vacinais da segunda criação como uma adjuvante molecular, com o intuito de conduzir as proteínas alvo na via de secreção celular (KOU *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2011; LUO *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2020).

Portanto, neste presente trabalho foi hipotetizado que existe o aumento nos níveis de expressão das proteínas virais *in vitro*, dos candidatos a vacinas de DNA baseados nos genes E e prM/M do ZIKV, quando adjuvantes moleculares são adicionados nestas sequências. Para testar nossa hipótese, nós utilizamos técnicas de imunofluorescência e ELISA baseadas em células para comprovar a expressão destas proteínas em células de mamíferos. Após a otimização das sequências vacinais, a vacina ZIKV-tPA-prM/M-E Δ STEM, quando avaliada por estas técnicas, conseguiu expressar em maior quantidade as proteínas virais. Tendo em vista os dados obtidos *in vitro* neste trabalho, a vacina ZIKV-tPA-prM/M-E Δ STEM seguiu para testes *in vivo*, por colaboradores, para analisar seu potencial quanto a imunogenicidade causado pela vacinação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O VÍRUS ZIKA

2.1.1 Epidemiologia do ZIKV

O ZIKV foi isolado pela primeira vez em 1947 de sangue de um macaco Rhesus febril na floresta Zika de Uganda, e posteriormente identificado em mosquitos *Aedes (Stegomyia) africanus* da mesma floresta (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). Relatos de sete anos depois, em 1954, os primeiros 3 casos de infecção humana foram identificados na Nigéria (MACNAMARA *et al.*, 1954).

A partir de então, estudos de sorovigilância em humanos sugeriram que o vírus continuou se dispersando de maneira esporádica para outras regiões e alguns surtos foram reportados em diferentes países da África, da Ásia e Ilhas do Pacífico (IOOS *et al.*, 2014). Entretanto, esses relatos podem superestimar a verdadeira prevalência do vírus, visto que existem características idênticas entre o ZIKV e flavivírus relacionados, como o vírus da dengue (DENV – *Dengue virus*, tradução do inglês) e o vírus WNV (KORHONEN *et al.*, 2015; BABA *et al.*, 1999).

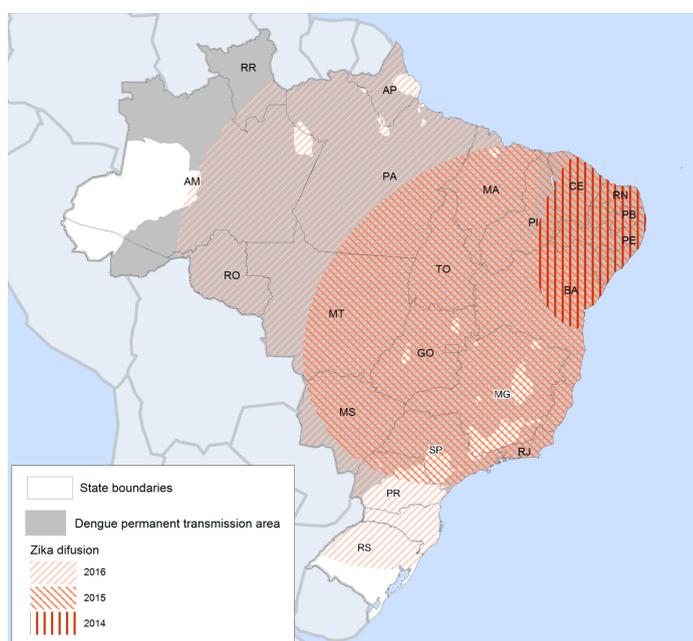
Historicamente, as infecções sintomáticas que ocorriam pelo ZIKV estavam limitadas a casos esporádicos ou pequenos grupos de pacientes. No entanto, esse padrão mudou em 2007, quando ocorreu o primeiro grande surto de infecção com o vírus em Yap (Estados Federados da Micronésia), que infectou cerca de 73% da população (DUFFY *et al.*, 2009).

Desde então, outras epidemias foram relatadas, principalmente em 2013 na Polinésia Francesa que se dispersou posteriormente para ilhas do Pacífico (ROTH *et al.*, 2014; TOGNARELLI *et al.*, 2016). Um estudo de Fauci e Morens em 2016, divulgou que no continente americano, os primeiros casos de circulação do vírus ocorreram em 2014 e foram confirmados no México, Paraguai, Guatemala, El Salvador, Colômbia, Panamá, Honduras, Ilha de Santiago, Cabo Verde e na Venezuela (FAUCI; MORENS, 2016).

No Brasil, os primeiros casos de infecção pelo ZIKV foram divulgados em

dezembro de 2014 (Figura 1). Em maio de 2015, a disseminação do ZIKV entre a população local foi confirmada através de testes sorológicos, primeiramente nos estados de Pernambuco (PE), Rio Grande do Norte (RN) e Bahia (BA) na região Nordeste e depois nos demais estados das regiões Centro-Oeste e Sudeste (ZANLUCA *et al.*, 2015; CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015).

Figura 1 - Difusão espacial do Zika virus (ZIKV) no Brasil de 2014 a 2016 produzidos pelo Ministério Federal da Saúde e secretarias estaduais de saúde

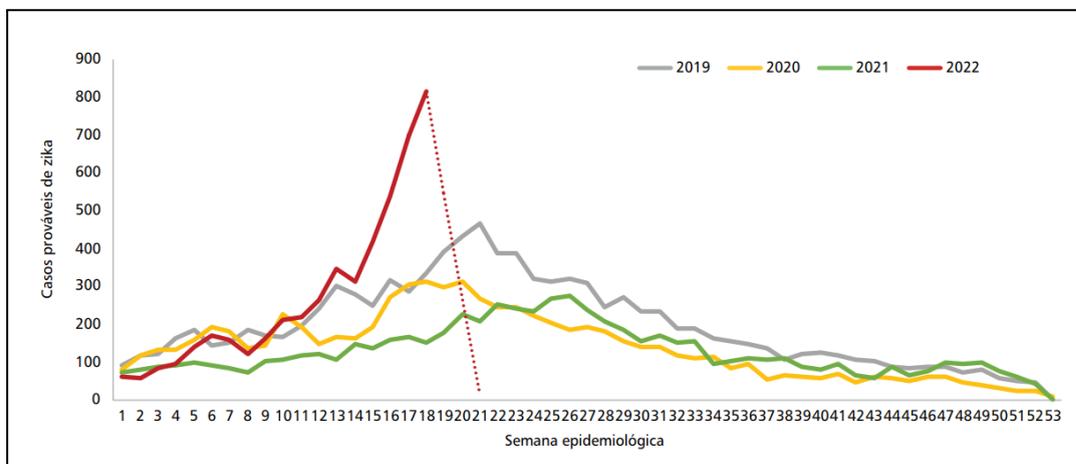


Fonte: Ministério da Saúde. Dengue, Chikungunya e Zika, (2016).

Disponível online: <http://combateaedes.saude.gov.br/en/epidemiological-situation>.

Com relação aos dados de infecção por ZIKV em 2022 no Brasil, ocorreram 6.000 casos prováveis até a SE 21 de 2022, correspondendo a uma taxa de incidência de 2,7 casos por 100 mil habitantes no País (Figura 2). Em relação a 2019, os dados representam um aumento de 14,4% no número de casos no país. Quando comparado com o ano de 2021, observa-se um aumento de aproximadamente 200% no número de casos (BRASIL, 2022).

Figura 2 - Curva epidêmica dos casos prováveis de zika, por semanas epidemiológicas de início de sintomas, Brasil, 2019 a 2022 - SE 21



Fonte: Ministério da Saúde. Dengue, Chikungunya e Zika, SE (2022).

2.1.2 Manifestações clínicas associadas ao ZIKV

De modo geral, os quadros infecciosos variam em sintomas inespecíficos, que podem cursar com início abrupto de febre acompanhado de cefaléia, mialgia, artralgia, vômito, dor retro-orbital, conjuntivite, erupção maculopapular e fadiga (HEANG *et al.*, 2012). No entanto, também podem estar relacionados a acometimentos neurológicos graves. Durante a recente epidemia, a infecção pelo ZIKV foi melhor elucidada. Este vírus infecta e lesa preferencialmente células progenitoras neurais (TANG *et al.*, 2016), o que pode explicar sua capacidade de prejudicar o desenvolvimento do cérebro fetal e causar microcefalia e outras lesões do neurodesenvolvimento (MINER; DIAMOND, 2017).

Na epidemia ocorrida na Polinésia Francesa, em 2014, alguns pacientes infectados pelo ZIKV foram diagnosticados com a síndrome de Guillain-Barré (SGB) (CAO-LORMEAU *et al.*, 2016). Esta síndrome é uma condição de origem auto-imune que se caracteriza por polineuropatia e paralisia ascendente

(NÓBREGA *et al.*, 2018; FÉLIX; FARIAS, 2019).

Além da SGB, a Síndrome da Zika Congênita (SZC) foi outra condição decorrente da infecção por ZIKV. A SZC, abrange alterações morfológicas e funcionais, caracterizada por dificuldades no desenvolvimento intelectual, deficiências visuais, auditivas e motoras (FRANCA *et al.*, 2016; BHATNAGAR *et al.*, 2016; MLAKAR *et al.*, 2016).

A detecção do ZIKV no líquido amniótico de gestantes e a presença do vírus no cérebro de neonatos comprovaram as evidências finais para associação do ZIKV com o surto de microcefalia (ARAUJO *et al.*, 2016; HAZIN *et al.*, 2016; ARAUJO *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2018). Dados do Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos (SINASC) indicaram que no período de 2000 a 2014 existia uma média anual de 164 casos de microcefalia no Brasil. Mas, em 2015, foi observado um aumento inesperado da ocorrência destes casos e, a partir de então, os casos de microcefalia passaram a ter a notificação obrigatória no país, quando o governo declarou estado de emergência em saúde pública (MARINHO *et al.*, 2016). Ainda, segundo o Ministério da Saúde (MS), entre novembro de 2015 e novembro de 2018, foram notificados 16.900 casos suspeitos de microcefalia provavelmente relacionados à infecção pelo ZIKV, dos quais 3.279 foram confirmados, atingindo principalmente a região Nordeste do país (BRASIL, 2018).

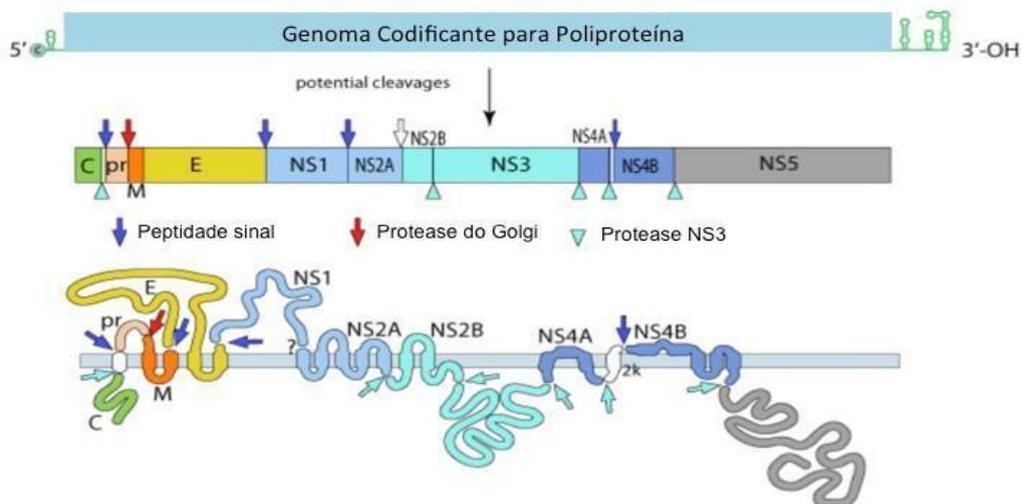
2.1.3 Características genéticas, moleculares e estruturais

O ZIKV é um arbovírus pertencente ao gênero *Flavivirus*. Neste gênero, pode-se destacar o vírus da DENV, vírus da Febre Amarela (YFV – *Yellow Fever virus*, tradução do inglês), o WNV, vírus da Encefalite do Carrapato (TEBV – *Tick-Borne Encephalitis virus*, tradução do inglês), como agentes infecciosos de ampla importância na saúde pública (HAYES, 2009; WEAVER *et al.*, 2016; VASILAKIS; WEAVER, 2017).

Como outros flavivírus, as partículas virais do Zika são envelopadas e esféricas, com cerca de 40 a 60 nanômetros de diâmetro, apresentando um genoma

de ácido ribonucleico (RNA) de cadeia simples (ssRNA) com 9,6 a 12,3 quilobases, linear e de polaridade positiva. O ZIKV apresenta uma única ORF que codifica para uma poliproteína que é processada por peptidases virais e do hospedeiro a fim de gerar 10 proteínas: três estruturais (C, prM/M e E) e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Figura 03) (LINDENBACH; RICE, 2003; KUNO; CHANG, 2007; KLEMA *et al.*, 2015).

Figura 3 - Genoma do Zika Vírus



Fonte: https://viralzone.expasy.org/24?outline=all_by_species, adaptado pelo autor, acessado em: (15/10/2021)

Legenda: A poliproteína do ZIKV codifica para proteínas estruturais além de proteínas não estruturais. Na figura também é possível notar as origens de clivagens das peptidases viral e do hospedeiro, com sinais específicos de reconhecimento para corte

As proteínas virais são codificadas na ordem que aparecem no genoma (Figura 03) flanqueadas por regiões 3' e 5' UTR (*Untranslated Regions*, regiões não traduzidas, tradução do inglês). A região 3' terminal não é poliadenilada, já a região 5' contém uma sequência promotora e uma terminação com um tampão CAP tipo I, seguido por dois nucleotídeos conservados, adenosina e guanosina (EKINS *et al.*, 2016).

2.1.3.1 Proteínas estruturais

As proteínas estruturais estão envolvidas na montagem de vírus infecciosos e na entrada e saída bem-sucedida das células hospedeiras (Li *et al.*, 2008). A montagem do vírus ZIKV envolve: (i) interação prM com a proteína E no retículo endoplasmático; (ii) encapsulamento do genoma de RNA com proteína C e cobertura com uma bicamada lipídica contendo um complexo de proteína prM-E para formar vírions imaturos; (iii) clivagem da proteína prM em proteína M por furina ou protease tipo furina na rede trans-Golgi antes da liberação de vírions maduros (PIERSON; DIAMOND, 2012 ; LIN *et al.*, 2018).

A proteína E é a principal proteína de superfície de flavivírus. Esta proteína está envolvida no reconhecimento dos receptores da célula hospedeira, no processo de entrada do vírus e na montagem viral. Também tem um papel importante na resposta imune, representando o principal alvo dos anticorpos neutralizantes. A estrutura da proteína E do ZIKV mostra que ela é disposta em dímeros, e que cada dímero é composto por três domínios: domínio I (DI), domínio II (DII) e domínio III (DIII). A região transmembrana (TM) está localizada na bicamada lipídica do vírus e a região Stem (tradução do inglês - haste) está localizada próximo ao DIII. Estas regiões possuem uma sequência de aminoácidos conservada que interage com a membrana endossomal da célula hospedeira durante o processo de fusão vírus-membrana, promovendo o mecanismo de adsorção e auxiliam nas mudanças das conformações estruturais da proteína E (STIASNY; KIERMAYR; BERNHART, 2013; FRITZ *et al.*, 2011).

O RNA do genoma ZIKV é sintetizado dentro de vesículas de replicação e são intimamente ligadas ao retículo endoplasmático (RE). A proteína C, por sua vez, possui papel fundamental na montagem de partículas virais e sinalização para o RE. Esta proteína em associação com o RNA do genoma recém-sintetizado, promove o direcionamento para a face citoplasmática da membrana do RE, contendo os heterodímeros prM-E (TAN *et al.*, 2020; KROL; BRZUSKA; SZEWCZYK, 2019).

As proteínas prM protegem as proteínas E da fusão prematura nas condições de baixo pH durante o transporte na rede trans-Golgi. Antes da liberação do virion

da célula, a clivagem da proteína prM em M resulta na liberação do peptídeo pr, permitindo o rearranjo de proteínas E em homodímeros e facilitando a maturação do vírion (FRITZ *et al.*, 2011).

As proteínas prM e E do ZIKV estão sendo usadas como alvos no desenho para a maioria das vacinas atualmente em ensaios clínicos e pré-clínicos (OMS, 2018). Essas proteínas estruturais são os principais alvos terapêuticos, pois, representam as subunidades não replicantes do genoma do ZIKV, apresentando um perfil candidato mais seguro para vacinas, além de serem determinantes para a alta estabilidade do ZIKV e apresentarem epítomos para respostas imunes adaptativas de células T CD4⁺ e CD8⁺ (VALENTE; MORAES, 2019).

2.1.4 Vacinas para ZIKV

A estreita relação entre o ZIKV e outros flavivírus bem estudados, como o JEV, WNV, DENV e o TBEV, direcionou a pesquisa e o desenvolvimento de vacinas para ZIKV (PUTNAK *et al.*, 1996; MONATH *et al.*, 2003; DAVIS *et al.*, 2001). A experiência com vacinas guiadas por estes flavivírus sugere que a proteção contra o ZIKV pode ser alcançada por anticorpos que se ligam à proteína E (NOWAKOWSKI, *et al.*, 2016).

Apesar das semelhanças de replicação e de estrutura do ZIKV com outros flavivírus, as doenças causadas por este agente são diferentes. Morte fetal ou teratogenicidade foram relatados em muitos estudos de ZIKV, e estas infecções causadas por este vírus no cérebro fetal só são efetuadas devido a sua capacidade de atravessar a barreira placentária (MINER; DIAMOND, 2017). Por isso, pesquisas se concentram em um perfil para uma vacina contra ZIKV que inclui mulheres grávidas e também homens com a possibilidade de transmissão sexual do vírus, como alvos iniciais (BRASIL *et al.*, 2016; D'ORTENZIO *et al.*, 2016).

Portanto, a segurança das vacinas contra ZIKV é crítica. A preocupação de desenvolver vacinas que não causem a síndrome de Guillain-Barré ou outros eventos adversos neurológicos são questões de extrema importância (DAN *et al.*,

2017).

Um relatório da OMS de março de 2016 mostrou que havia 18 vacinas conhecidas contra o ZIKV em desenvolvimento. Fazem parte destas: vacinas de DNA, vacinas baseadas em peptídeos, vírus inativados purificados (PIVs), vírus atenuados vivos (LAVs), vacinas de mRNA, vacinas de vetor viral que incluem, vírus vaccinia modificado Ancara (MVA), vírus do sarampo (MV) e adenovírus (Ad) (Quadro 01) (PATTNAIK; SAHOO, 2020; OMS, 2016).

Quadro 1 - Exemplos de vacinas construídas e sua imunogenicidade induzida contra o ZIKV

	Nome ou componente da vacina	Imunogenicidade na indução de respostas imunológicas	Modelo animal	Doses De Vacina	Via de Administração	Vírus desafiado
Vacinas de DNA	prM e E	Camundongos totalmente protegidos contra danos aos testículos e espermatozoides associados ao ZIKV e evitou a persistência viral nos testículos	Camundongos knockout para interferon tipo I	Duas doses com intervalo de duas semanas	i.m.	Cepa de Puerto Rico PRVABC59
	pVAX1-ZME (prM e E)	Induziu respostas imunes celulares e humorais de longo prazo robustas específicas do ZIKV com atividade neutralizante elevada e sustentada, que forneceu proteção passiva contra a infecção pelo ZIKV em camundongos neonatais	Camundongos BALB / c	Três doses em intervalos de três semanas	i.m.	(Cepa SMGC-1, número de acesso GenBank: KX266255
Vacinas de Subunidade	EDIII	Induziu alto título de anticorpos neutralizantes de IgG e ZIKV e não mostrou evidência de indução de ADE em soro de camundongo	Camundongos C57BL / 6	Quatro doses em intervalos de três semanas	s.c.	Cepa Porto Rico PRVABC59
	Fragmentos EDIII (E296-406; E298-409; E301-404)	Os anticorpos de neutralização de amplo espectro induzidos e a transferência passiva dos anticorpos específicos do E298-409 preveniram a infecção pelo ZIKV em recém-nascidos e adultos imunocomprometidos.	Camundongos BALB / c e camundongos A129	Cinco doses nos dias 0, 21, 42, 210 e 300	i.m.	Cepas R103451 e FLR
Vacinas Vivas Atenuadas	ZIKV-3 ' UTR-10-LAV	Mostrou proteção completa contra viremia e induziu uma resposta saturada de anticorpos neutralizantes	Ratos A129	Dose única	s.c.	Cepa Cambojana FSS13025 e Cepa Porto Rico PRVABC59
	ZIKV-3 ' UTR-20-LAV	Induziu fortes respostas imunológicas e protegeu o dano induzido pelo ZIKV aos testículos em camundongos; imunidade esterilizante induzida em NHPs	Camundongos A129 e macacos rhesus	Dose única	s.c.	Cepa Cambojana FSS13025 e Cepa Porto Rico PRVABC59
Baseadas em vetores de vírus	ChAdOx1	Induziu altos níveis de respostas protetoras em camundongos desafiados	Camundongos BALB / c	Dose única	i.m.	ZIKV brasileiro
	RhAd52-prMEnv	Anticorpos neutralizantes específicos para ZIKV induzidos em macacos rhesus; anticorpos suficientes para proteção contra o desafio de ZIKV em camundongos	Macacos Rhesus e camundongos BALB / c	Dose única	i.m.	ZIKV brasileiro e cepa de Porto Rico PRVABC59
Vacinas de Vírus Inativado	PIZV	Provocou uma resposta de anticorpos neutralizantes dependente da dose e de longa duração	Macacos rhesus indianos	Duas doses com intervalo de quatro semanas	i.m.	Cepa Porto Rico PRVABC59
		A vacinação de duas doses do tipo de vacina deu uma proteção robusta contra o desafio de ZIKV.	macacos rhesus	Duas doses com intervalo de quatro semanas	s.c. e i.m.	Brasil ZKV2015
		Seguro e bem tolerado em humanos até 52 semanas de acompanhamento; mas duas doses não são duráveis para a imunogenicidade necessária	Ensaio clínico Fase I	Dose única e duas doses com intervalo de duas / quatro semanas	i.m.	-
Baseadas em VLP e mRNA	prM e E (sistema de expressão HEK293)	Induziu uma resposta de anticorpo protetora	Camundongos AG129	Duas doses nos dias 0 e 32	i.m.	Cepa protótipo Zika Nica 2-16
	EDIII (sistema de expressão de planta Nicotiana benthamiana)	Respostas imunes humorais e celulares potentes induzidas correlacionadas com imunidade protetora contra múltiplas cepas	Camundongos C57BL / 6	Três doses em intervalos de três semanas	sc	Cepa Porto Rico PRVABC59

Fonte: PATTNAIK; SAHOO, (2020). Adaptado pelo autor

Legenda: Majoritariamente, a proteína do E de ZIKV foi utilizada nas vacinas mostradas no quadro. Quanto à administração das vacinas via: i.m., injeção intramuscular; s.c, injeção subcutânea.

Abbink e Larocca desenvolveram uma vacina de DNA que expressa a prM e as proteínas E com o peptídeo sinal excluído para expressão aprimorada do ZIKV (aminoácidos prM-E 216-794). Nesta plataforma vacinal, foi possível observar a indução de anticorpos neutralizantes específicos para ZIKV e proteção em camundongos e macacos rhesus contra o desafio letal com cepas de ZIKV do Brasil e de Porto Rico (ABBINK *et al.*, 2018; LAROCCA *et al.*, 2016).

Uma outra vacina, desta vez de vírus inativado (ZPIV) foi desenvolvida pelo *Walter Reed Army Institute of Research* (Silver Spring, MD, EUA) e mostrou eficácia protetora em camundongos e primatas não humanos após uma única dose. A ZPIV conseguiu aumentar os títulos de anticorpos e proteção superior quando administrada por via intramuscular em comparação com a via subcutânea (LECOUTURIER *et al.*, 2019)

Uma vacina LAV contra o ZIKV, foi desenvolvida pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos e o Instituto Butantan. Essa vacina é baseada na vacina tetravalente contra DENV que está em fase de testes clínicos no Brasil. Em outro estudo, uma vacina utilizando Adenovirus de rhesus sorotipo 52 (RhAd52-prM-E) também foi avaliada. Uma única dose desta, causou uma resposta robusta de anticorpos com 100% de proteção em animais expostos ao vírus (POLAND *et al.*, 2018).

Vacinas baseadas em peptídeos também têm ganhado destaque nos últimos anos. O *Mayo Clinic Vaccine Research Group* realizou estudos iniciais para identificar epítomos HLA classe I e II do ZIKV, tendo como objetivo desenvolver uma vacina imunogênica à base de peptídeo encapsulado em nanopartículas, que seja facilmente fabricada, estável e segura para uso em gestantes e indivíduos imunocomprometidos (POLAND *et al.*, 2019).

Os RNAs mensageiros sintéticos (mRNAs) surgiram como uma plataforma vacinal versátil e altamente eficaz para a codificação de antígenos virais. Uma vacina de mRNA auto-replicante que codifica as proteínas prM-E do ZIKV foi gerada, e a aplicação intradérmica de apenas 1 µg desta vacina provocou respostas imunes humorais e celulares potentes em camundongos BALB/c e C57BL/6 IFNAR1^{-/-} (ZHONG *et al.*, 2019).

As metodologias vacinais citadas, em sua maioria, estão em fase pré-clínica ou fase 1/2 de testes clínicos. E, até o momento, estas vacinas descritas não demonstraram proteção contra o desenvolvimento de complicações neurológicas, indução de resposta protetora de longa duração e proteção do feto em modelo de camundongo durante o período gestacional. A dificuldade em avançar para próximas fases clínicas se deve principalmente à limitação de modelos animais imunocompetentes, e a capacidade das vacinas de prevenir complicações da infecção pelo ZIKV, ainda precisam ser determinadas (ZHOU *et al.*, 2021).

2.2 VACINAS DE DNA

A imunização por DNA foi descrita na década de 1990, onde foi observado que o DNA de plasmídeo poderia transfectar diretamente células animais *in vivo* e conseqüentemente, estimular respostas imunes robustas. Por sua vez, este método de imunização tem sido utilizado para induzir anticorpos protetores e respostas imunes mediadas por células T e B em uma ampla variedade de modelos animais pré-clínicos (DONNELLY *et al.*, 1997).

Em comparação com as vacinas convencionais, a principal vantagem dos métodos baseados em vacinas de DNA é sua facilidade de manipulação e reformulação dos antígenos vacinais (SABBAGHI, 2021). Ainda, as vacinas de DNA são mais seguras quando comparadas com vacinas com organismos vivos ou atenuados, pois, o vírus é parcialmente revertido ou incompletamente inativo (RAJCÁNI *et al.*, 2005).

Vacinas de DNA possuem custos baixos de fabricação além de fácil manipulação e são estáveis à temperatura ambiente (DOWD, 2016; LUNARDELLI *et al.*, 2020). Devido a isto, a imunogenicidade e eficácia destas vacinas já foram analisadas em diferentes sistemas, e os resultados de estudos pré-clínicos foram suficientes para prosseguir para ensaios clínicos em humanos, conduzindo pesquisas com estas vacinas para doenças como câncer, infecção por HIV, malária, autoimunidade, entre outros (LEITNER; YING, 1999).

A tecnologia do DNA recombinante é uma ferramenta de extrema importância para vacinas gênicas (LI; PETROVSKY, 2016). Por se tratar de organismos que conseguem realizar mutações constantes, a manipulação do DNA contido no plasmídeo é realizada de modo a rapidamente redesenhar os antígenos para estes agentes patogênicos, podendo ser citado, o vírus da SARS-CoV-2 que exibe uma alta deriva antigênica (HARVEY; CARABELLI; JACKSON, *et al.*, 2021).

Por exemplo, ZyCoV-D, a vacina de DNA contra a COVID-19, recentemente desenvolvida e autorizada na Índia, consiste em um plasmídeo que carrega um gene que codifica a proteína spike de SARS-CoV-2 da cepa de Wuhan. Esta vacina é administrada na pele sem uma injeção e demonstrou ser 67% protetor contra a doença sintomática em ensaios clínicos (MOMIN *et al.*, 2021).

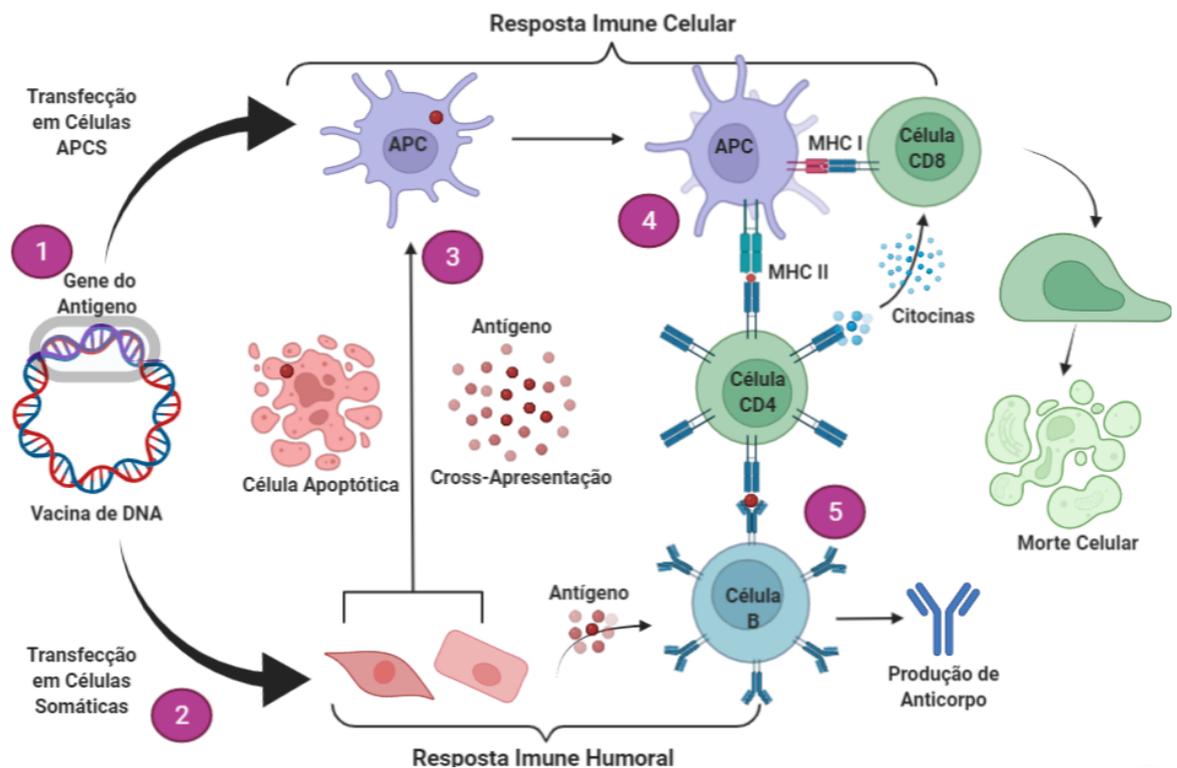
As vacinas de DNA podem ser administradas por vias intramuscular, subcutânea, mucosa ou intradérmica. Métodos auxiliares já foram descritos na literatura, como injeção a jato, que consiste em um dispositivo sem agulha que injeta vacina de DNA de maneira praticamente indolor, segura e é absorvido pela pele mais rapidamente, demonstrada na vacina contra influenza Afluria (MARSTON; LACERDA, 2019; ENGELKE *et al.*, 2015). A eletroporação também demonstrou um maior recrutamento de células apresentadoras de antígeno (APCs) no local da inoculação e, em seguida, fornece um (direcionamento de citocinas adequadas) fundo de citocinas melhorado que favorece a apresentação do antígeno (CHEN *et al.*, 2016). De modo geral, a injeção das formulações vacinais visa a indução de expressão dos antígenos *in vivo*, possibilitando a apresentação por via do complexo MHC I e II (Figura 4) (LI; PETROVSKY, 2016).

Células transfectadas com o plasmídeo de DNA realizam tradução proteica, secreção ou processamento do antígeno. Desse modo, os antígenos gerados endogenamente são processados no citoplasma e apresentados via classe I do MHC, mas também podem ser apresentado pelo MHC de classe II quando secretados, endocitados e por fim, degradados no endossomo, também conhecido como apresentação cruzada (Figura 4) (BAI *et al.*, 2017).

Uma limitação das vacinas de DNA são os perfis de imunogenicidade

relativamente baixos, que impedem a aplicação clínica ampla (LI; PETROVSKY, 2017). A imunização com plasmídeos que codificam epítomos de classe I do MHC geralmente induz baixa resposta de linfócitos T CD8+ citotóxicos (CTL - *cytotoxic T lymphocytes*) e, as construções com epítomos de classe II do MHC podem melhorar a amplitude da resposta CTL (VATAKIS *et al.*, 2005).

Figura 4 - Resposta imune humoral e celular induzida pela vacinação com DNA



Fonte: QIN *et al.* (2021), adaptado pelo autor.

Legenda: 1. A sequência gênica de interesse é inserida no plasmídeo para posteriormente ser entregue ao hospedeiro. Quando inoculadas, os plasmídeos entram no núcleo de células somáticas e células apresentadoras de antígeno (APCs). Utilizando a maquinaria celular, o antígeno (Ag) é produzido. 2. A ativação da resposta imune humoral através da apresentação do Ag endógeno por moléculas de MHC I. 3. A expressão dos genes do Ag ocorre por meio de exossomos ou corpos apoptóticos e libera peptídeos e proteínas derivados, que são então endocitados e processados por células APCs e apresentados via MHC II. 4. APCs migram para o linfonodo drenante e estimulam a proliferação das células CD8+ e CD4+. 5. O Ag secretado pode ser reconhecido por receptor de célula B e apresentado ao T CD4+, conduzindo as respostas de anticorpos.

A apresentação de antígenos por moléculas de MHC II são essenciais para ativação de linfócitos T auxiliares (*Th - T helper*), por isso, o desenho de vacinas

gênicas têm buscado alvos que direcionam para estas moléculas. A ativação destas células Th impulsiona a expansão clonal de células B específicas secretoras de anticorpos, geração de células T de memória, aumento na expressão de sinais de coestimuladores e também produção de citocinas. Vantagens presentes nestas vacinas direcionadas (QIN *et al.*, 2021).

Além disso, estudos com vacinas de DNA também demonstraram a capacidade de gerar populações de células T auxiliares foliculares (T_{FH} – T follicular helper cells). Estas células são essenciais para induzir respostas eficazes de células B antígeno-específicas (HOLLISTER *et al.*, 2014).

Foi demonstrado que a co-administração de adjuvantes moleculares com vacinas de DNA é uma abordagem promissora para promover imunidade protetora, aumentando a eficiência de transfecção de vacinas de DNA. Estratégias utilizando adjuvantes genéticos capazes de promover a apresentação e secreção das proteínas antigênicas com sua conformação estrutural ideal, ativação das células apresentadoras de antígeno (APCs) e células Th são promissores para o desenvolvimento de vacinas de DNA eficientes (SABBAGHI; GHAEMI, 2021). Estes conceitos abordados, foram aplicados nas vacinas desenvolvidas neste projeto contra ZIKV.

2.2.1 Adjuvantes moleculares

O termo adjuvante originou-se da palavra latina *adjuvare* que significa ajudar. Em teoria, cada molécula ou substância capaz de amplificar, ou intensificar a cascata de eventos imunológicos que compõem a resposta imune pode ser classificada como adjuvante (SCHIJNS, 2003). Estes compostos são usados para ajudar o antígeno a desencadear uma resposta imune rápida, intensa e duradoura (GUPTA; SIBAER, 1995; HE *et al.*, 2000).

O adjuvante ideal deve proporcionar o mínimo de reações tóxicas locais e sistêmicas, além de ser biodegradável, econômico e de simples fabricação. Os adjuvantes podem ser agrupados em substâncias que atuam de diferentes

formas, como carreador de antígeno até as células APCs (lipossomas, adjuvante a base de óleo), agindo como estimulador do sistema imune (Adjuvante Completo de Freund – FCA, Lipopolissacarídeo – LPS, Toxina de Pertussis – PT) ou, atuando como causador da formação de depósito no local da injeção (adjuvantes a base de óleo, combinações minerais) (GUPTA; SIBAER, 1995).

Há meio século, o uso de adjuvantes para auxiliar na vacinação em seres humanos foi iniciado, utilizando géis de hidróxido de alumínio na incorporação de vacinas bacterianas. Não obstante, substâncias que amplificaram a imunidade humoral e mediada por células continuaram a ser desenvolvidas e caracterizadas em animais. Isto contribuiu para a ampliação e subsequente compreensão de eventos imunológicos até então complexos (JOHNSON, 2021).

Fatores centrais envolvidos nos mecanismos de ação de adjuvantes no aumento da imunogenicidade de um antígeno incluem: a proliferação de células T e sua ativação, a ativação e mobilização de células APCs (LAMBRECHT *et al.*, 2009). No final da década de 1990, foi descoberto que o estímulo de receptores Toll-like (TLRs), resulta na ativação de células dendríticas (DCs), o que promove as respostas das células T e B específicas contra o antígeno (BEUTLER, 2004; KAWAI; AKIRA, 2010).

Na década de 2000, as descobertas de TLRs, outros receptores de reconhecimento de padrões inatos (PRRs), sensores de DNA e receptores citosólicos mostraram impactar a imunidade adaptativa. Desse modo, moléculas que têm alvo para estes receptores estão sendo avaliadas como potenciais adjuvantes de vacinas (PULENDRAN; ARUNACHALAM; O'HAGAN, 2021).

Embora apenas alguns adjuvantes estejam disponíveis para uso clínico, muitas vacinas, que foram utilizadas com segurança em humanos, contêm adjuvantes endógenos (Figura 5) (PULENDRAN; AHMED, 2011). Avanços no delineamento dos PRRs e conhecimentos significativos na imunidade inata mostraram que vacinas vivas amplamente utilizadas, como a vacina viva atenuada contra a febre amarela (YF-17D) e a vacina *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) contra a tuberculose, ativam a imunidade inata por meio da expressão de vários PAMPs (*Pathogen-associated molecular pattern*, tradução - Padrões moleculares associados a patógenos) (QUEREC *et al.*, 2006; TSUJI *et al.*, 2000).

COVID-19 aprovadas para uso limitado ou de emergência em alguns países (XIA *et al.*, 2021).

2.2.1.2 MF59

Outro adjuvante bastante utilizado é o MF59, sendo ele um adjuvante de emulsão de óleo esqualeno em água, estabilizado por surfactantes não iônicos Tween 80 e Span 85, incluído em uma vacina licenciada contra influenza na Europa desde 1997 (O'HAGAN *et al.*, 2013). A administração de MF59 no músculo ativa as células mieloides, como macrófagos e DCs, que respondem pela produção de quimiocinas, havendo recrutamento de células (neutrófilos, eosinófilos e mais monócitos e DCs) para o local da injeção. Essas células amplificam ainda mais a resposta e migram para os linfonodos de drenagem para ativar as células B e T (O'HAGAN *et al.*, 2012; CALABRO *et al.*, 2011).

2.2.1.3 Adjuvant systems

Já os *Adjuvant Systems* (AS0) foram desenvolvidos pela GlaxoSmithKline nas últimas três décadas e são baseados em uma combinação racional de moléculas adjuvantes clássicas (O'HAGAN *et al.*, 2017). Estes adjuvantes incluem alumínio, emulsões e lipossomas em suas formulações, descritas em inúmeras vacinas como do vírus da hepatite B (HBV), do papilomavírus humano (HPV), varicela zoster (HHV-3), entre outras (KUNDI *et al.*, 2007; GARCON *et al.*, 2011; LAL *et al.*, 2015).

2.2.1.4 Desenvolvimento de novos adjuvantes: novos conceitos

Por décadas, a pesquisa de adjuvante progrediu lentamente, pois,

primeiramente são pré-testados em ensaios pré-clínicos em camundongos e posteriormente seguem para testes clínicos em humanos. No entanto, a imunogenicidade causada por adjuvantes pode ser diferentes em humanos e camundongos, portanto, a incorporação de novos adjuvantes em ensaios clínicos de fases iniciais de vacinas em humanos pode acelerar o processo de desenvolvimento e conhecimento dos efeitos biológicos deles (CASKEY *et al.*, 2011; NAKAYA *et al.*, 2016).

Outros conceitos têm ganhado força nos últimos anos para caracterizar e desenvolver novos adjuvantes. A morte celular foi um destes, visto que ela atua como um regulador chave das respostas imunológicas. O estado metabólico das células mielóides, como macrófagos e DCs, também tem sido alvo de adjuvantes, pois, estas células, em diferentes estágios de maturação ou em diferentes tecidos, apresentam estados metabólicos distintos, estando intimamente relacionadas à resposta imune inata e capacidade de estimular células T (TANG *et al.*, 2019; PULENDRAN *et al.*, 2015; PEARCE; EVERTS, 2015).

As DCs têm sido consideradas os alvos celulares primários dos adjuvantes de vacinas. Estudos mostraram evidências claras de que as DCs são essenciais para a atividade adjuvante dos ligantes de TLR (PULENDRAN; AHMED, 2011; HO, *et al.*, 2018). Kasturi e colaboradores em 2011, perceberam que a atividade destes adjuvantes estava comprometida em camundongos com deficiência de DCs (KASTURI *et al.*, 2011). Mesmo para adjuvantes não baseados em TLR, como alumínio ou MF59, a ausência condicional de DCs ou subconjuntos de DCs resulta em um grande comprometimento das respostas imunes adaptativas (KOOL *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2020). Portanto, adjuvantes voltados para DCs têm se mostrado essencial para ativação destas células, induzindo posteriormente células B e T através de seus receptores e vias de apresentação de antígeno.

A utilização de moléculas endógenas do organismo humano, como adjuvantes imunológicos também podem induzir resposta protetora. Proteínas de associação a membrana lisossomal (LAMP - Lysosomal-associated membrane protein, tradução do inglês), quando associada à vacina de DNA pL/YFV de Febre Amarela, mostraram maior eficácia protetora, pois, os antígenos são apresentados por MHC II, responsável por ativar células T CD4 + e sustentar

respostas celulares de T CD8 + (DHALIA *et al.*, 2009).

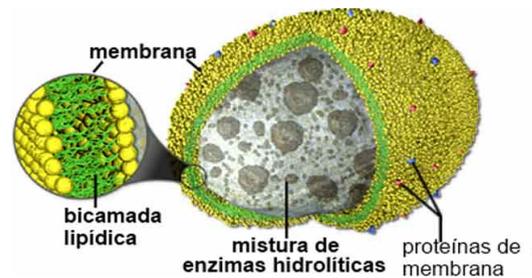
2.2.2 Proteína associada à membrana lisossomal

Os lisossomos são organelas encontradas em grande parte das células eucarióticas, constituídas principalmente de enzimas digestivas e envolta por uma membrana lipoprotéica. Com o complexo de Golgi e os retículos endoplasmáticos, eles representam o maior compartimento vacuolar citoplasmático conhecido (DE DUVE, 2005).

Estas organelas são originadas no complexo de Golgi, onde vários processos de adição de enzimas e da membrana são feitas antes de ser liberado para o citoplasma como lisossomo primário. Elas desempenham papéis fundamentais tais como digestão autofágica e heterofágica, reparo de membrana, endocitose, apoptose (SHUHEI; TAMOTSU, 2017).

Existem duas classes de proteínas que são essenciais para o funcionamento dos lisossomos, as hidrolases lisossômicas solúveis e proteínas associadas à membrana lisossomal (LAMP) (Figura 6) (SANTOS, 2010). Uma vasta gama de hidrolases lisossômicas são conhecidas, e cada uma possui um substrato específico para degradação, além disso, essas enzimas ainda podem atuar coletivamente em outras atividades como o início da apoptose, processamento do antígeno e degradação da matriz extracelular (SAFTIG; KLUMPERMAN, 2009).

Figura 6 - Anatomia básica do lisossomo



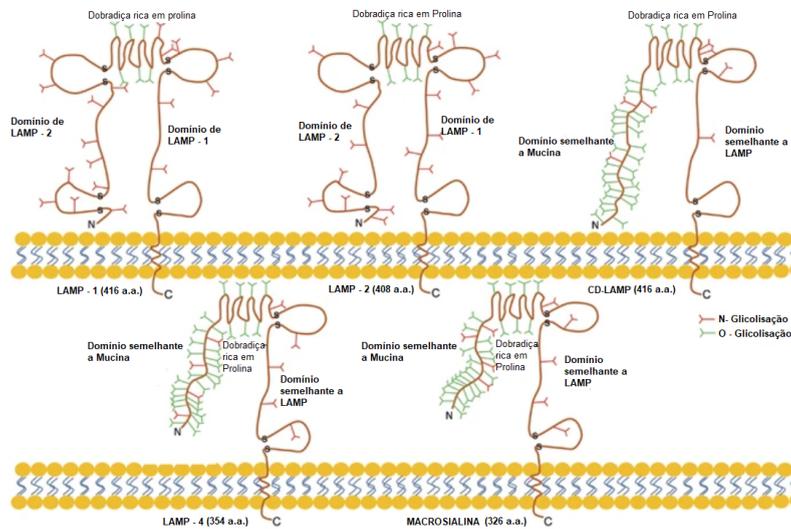
Fonte: Blog Biologia.top, (2017) - (Acessado em: 23/08/2021).

Legenda: Destaca-se a presença das proteínas de membrana e enzimas hidrolíticas, além disso, a membrana é envolta por uma bicamada lipídica resistente a auto degradação.

Já as proteínas LAMPs, são principalmente encontradas na membrana que delimita o lisossomo. No entanto, o mecanismo de degradação dos lisossomos é potencialmente nocivo à membrana ao qual é limitado, devido à capacidade de degradar membranas lipídicas intactas (PERERA; STOYAKOVA, *et al.*, 2015). Para isso, o interior da membrana lisossomal é protegido da degradação, principalmente pela grande presença destas proteínas de membrana altamente glicosiladas (MOHAIR; PECK; LEE, 2013).

Essas proteínas são codificadas pelos genes LAMP-1 e -2, sendo o gene LAMP-2 possuindo três formas de apresentação, LAMP-2A, -2B, -2C, que diferem nas regiões transmembrana e citosólica (KAZUE *et al.* 2016). Além destas, existem mais três formas que só são expressas em células específicas, apresentadoras de antígeno, tais como as macrosialinas, BAD-LAMP e CD-LAMP (Figura 7) (ESTER *et al.*, 2014).

Figura 7 - Características gerais da organização dos domínios da macrosialina e das proteínas LAMP-1, LAMP-2, CD-LAMP e CD68



Fonte: Chistiakov *et al.*, (2017). Adaptado pelo autor.

Legenda: De forma geral, as proteínas LAMPs, contém em comum a dobradiça rica em prolina, quantidade de amino ácido e seu ancoramento ocorre na membrana lisossomal na região C-terminal.

A estrutura do domínio LAMP é bem definida, apresentando uma estrutura compacta em sanduíche de folha β (DE SAINT-VIS; VINCENT; VANDENABEELE, 1998; WILKE; KRAUSZE; BÜSSOW, 2012). Além disso, todas as proteínas LAMP são ancoradas dentro do lúmen da vesícula, através da curta cauda citoplasmática na região C-terminal (Figura 7) (CHISTIAKOV; KILLINGSWORTH; MYASOEDOVA, *et al.*, 2017).

É importante ressaltar que a glicosilação influencia significativamente as propriedades estruturais e funcionais das proteínas LAMP (QUAST; LÜNEMANN, 2014). Um exemplo clássico de aplicação conhecida destas proteínas, é a contribuição para auxiliar o reconhecimento do antígeno por um receptor de células T em uma sinapse imunológica (RUDD; WORMALD; STANFIELD, *et al.* 1999).

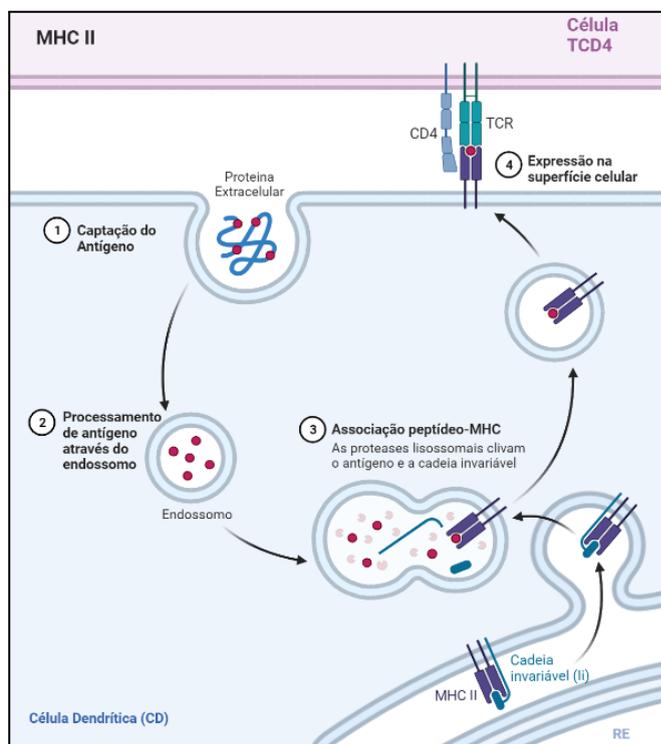
O último membro identificado até então da família LAMP, CD-LAMP, é transitoriamente expresso após ativação de células dendríticas (CDs) humanas na membrana limitante dos compartimentos de armazenamento intracelular de

moléculas de MHC de classe II (SALAUN; DE SAINT-VIS; CLAIR-MONINOT, *et al.*, 2003). De acordo com Saint-Vis e colaboradores, em 1998, através da distribuição celular de CD-LAMP, conseguiram identificar um papel fundamental, embora não único para esta proteína, na remodelação de compartimentos de processamento de antígenos especializados e na apresentação de antígenos restrita ao MHC de classe II (SAINT-VIS *et al.*, 1998).

Como o CD-LAMP só pode ser detectado em células dendríticas interdigitantes (IDC), ele representa o primeiro marcador específico para essas CDs maduras (ADRIEN *et al.*, 2021). Em CDs, os níveis de CD-LAMP aumentam conforme a diferenciação e ativação destas células (MARONGIU *et al.*, 2019).

As CDs, ao fagocitar um patógeno, se tornam ativas e migram diretamente para os linfonodos drenantes mais próximos. Posteriormente, apresentam os antígenos em sua superfície celular através de moléculas de MHC de classe II. Pós evento de ativação, as proteínas CD-LAMP aumentam seus níveis, e se co-localizam com moléculas de MHC II no compartimento intracelular, a fim de manter a membrana lisossomal intacta e estabilizar a apresentação do antígeno na superfície (Figura 8) (WILKE *et al.*, 2012).

Figura 8 - Representação simplificada do mecanismo de apresentação mediada por MHC II e as proteínas LAMP



Fonte: O autor, aplicativo BioRender (2021).

Legenda: A associação do MHC pós processamento do antígeno é fundamental para a apresentação na membrana para células CD4 +.

Diante de resultados prévios (MACIEL; CORDEIRO, *et al.*, 2015) que mostram a magnitude das respostas humorais e celulares contra antígenos virais codificados por formulações de DNA é significativamente aumentada quando os antígenos são fusionados à LAMP e assim direcionados para apresentação via MHC de classe II. Portanto, a indicação quanto a aplicabilidade desta estratégia foi abordada neste trabalho, com intuito de gerar respostas imunológicas robustas.

2.2.3 Peptídeo sinal do ativador do plasminogênio tecidual

O peptídeo sinal desempenha um papel importante em proteínas de células procarióticas e eucarióticas. Essa curta e transitória sequência peptídica funciona como um endereçador de proteínas para secreção ou para transferência para organelas específicas para processamento adicional (VON, 1990; JARJANAZI *et al.*, 2008).

O transporte de proteínas de uma célula eucariótica se inicia no citoplasma. Proteínas que não são sinalizadas com peptídeo sinal permanecem no citoplasma pelo restante do transporte. Em alguns estudos, foi observado que a introdução de SP-tPA (peptídeo sinal derivado do ativador do plasminogênio tecidual), em proteínas que não possuem peptídeos sinais nativos, conseguem produzir naturalmente proteínas em sua forma secretora (MIDHA; BHATNAGAR 2009; QIU *et al.*, 2000).

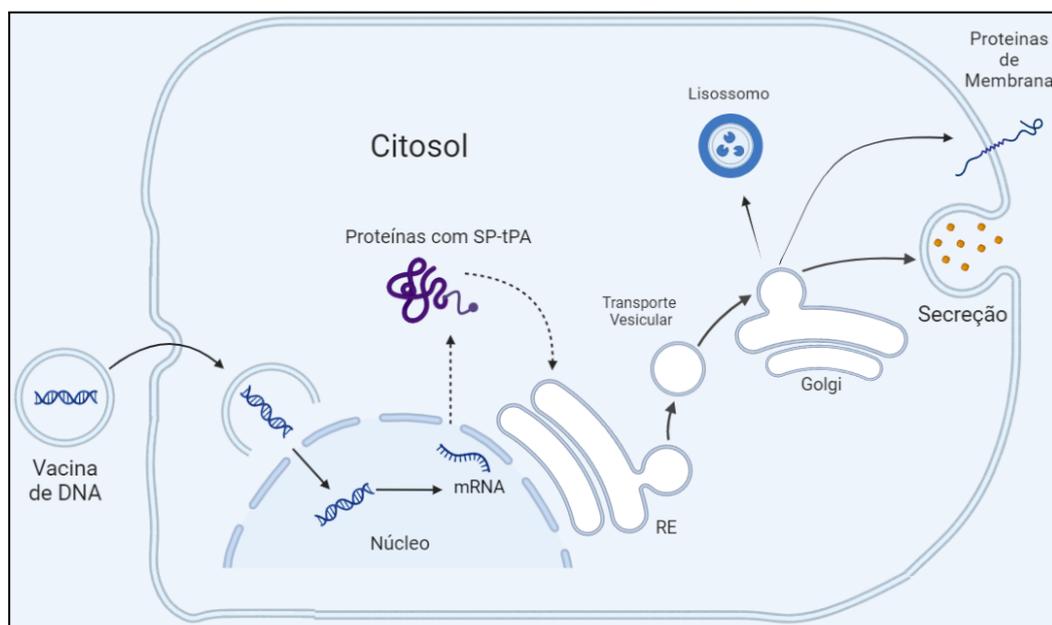
O SP-tPA é utilizado com o intuito de aumentar a secreção de proteínas. (CHAPMAN *et al.*, 1991; LI *et al.*, 1999; QIU *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2006). Descobriu-se que algumas proteínas, como a glicoproteína do envelope do HIV-1, são secretadas em baixos níveis em sistemas de expressão *in vitro*. No entanto, notou-se que quando essas proteínas têm seu peptídeo sinal nativo substituído pelo SP-tPA têm um aumento acentuado na produção destas proteínas (WANG *et al.*, 2011).

Efeitos da substituição do peptídeo sinal das proteínas E1 e E2 do vírus da hepatite C por SP-tPA também foram avaliados. Esta substituição resultou em aumentos nos níveis de expressão e secreção das proteínas virais em células de mamíferos, sem afetar a glicosilação destas proteínas (BO WEN *et al.*, 2011). Este mesmo efeito, é observado em outras construções vacinais de diferentes agentes infecciosos (KOU *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2011; LUO *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2020).

Para imunogenicidade e eficácia de vacinas tanto a manutenção da conformação natural quanto a expressão eficiente de um antígeno são necessárias. Por sua vez, o SP-tPA é usualmente utilizado em formulações

vacinais, que buscam o aumento de sua imunogenicidade. Vacinas de diferentes metodologias contra Tuberculose, H5N1, Hepatitis, DENV, ZIKV, entre outros agentes, já demonstraram expressão melhorada em células de mamíferos utilizando este peptídeo sinal (KOU *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2011; LUO *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2020). Partindo desta perspectiva, neste presente trabalho, a sequência SP-tPA foi introduzida no plasmídeo vacinal da segunda formulações da vacina, substituindo o peptídeo sinal da proteína C (nativo) do ZIKV ao qual estava contida na primeira formulação desta vacina (Figura 9).

Figura 9 - Representação simplificada da função do SP-tPA



Fonte: O autor, aplicativo BioRender (2022).

Legenda: As vacinas de DNA da segunda criação contendo em suas sequências o SP-tPA, é esperado um aumento nos níveis de expressão das proteínas virais, através da secreção destas proteínas e, portanto, aumentando a sua imunogenicidade.

3 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista os impactos causados pela epidemia do vírus Zika (ZIKV) na saúde pública, é de suma importância o desenvolvimento de vacinas que sejam capazes de proteger a população e de evitar os efeitos neurológicos degenerativos em crianças nascidas de mães infectadas (Síndrome de Zika Congênita – SZC) e em indivíduos adultos (Síndrome de *Guillain-Barré*). As vacinas até então desenvolvidas contra o ZIKV, não demonstraram a indução de resposta protetora de longa duração, proteção do feto em modelo de camundongo durante o período gestacional ou proteção contra o desenvolvimento de complicações neurológicas. Portanto, diante deste cenário apresentado, este projeto avalia a expressão *in vitro* de vacinas de DNA desenvolvidas contra ZIKV fusionados a adjuvantes moleculares. Deste modo, espera-se que estas vacinas desenhadas sejam capazes de conferir imunogenicidade suficiente contra o ZIKV, visto que as doenças às quais o vírus está associado, impactam diretamente na qualidade de vida dos indivíduos. Além disso, estas formulações vacinais contribuem para o entendimento sobre a expressão melhorada de antígenos virais, contendo adjuvantes que direcionam a apresentação destes antígenos para via de MHC II e/ou secreção.

4 PERGUNTA CONDUTORA

Vacinas de DNA associadas a adjuvantes moleculares poderão aumentar a eficiência da expressão dos antígenos do vírus Zika em células de mamíferos?

5 HIPÓTESE

Formulações vacinais de DNA associadas a adjuvantes moleculares promovem aumento da expressão dos antígenos do vírus Zika em células de mamíferos.

6 OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão *in vitro* de vacinas de DNA contra ZIKV fusionados a adjuvantes moleculares.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a localização da expressão dos antígenos vacinais *in vitro*;
2. Desenvolver e padronizar um ELISA baseado em células;
3. Avaliar a eficiência de expressão *in vitro* dos antígenos virais das diferentes formulações vacinais contendo ou não o adjuvante LAMP;
4. Avaliar o efeito do adjuvante molecular tPA nas formulações vacinais.

7 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

7.1 DESENHO DOS PLASMÍDEOS VACINAS CONTRA ZIKV

Os genes que codificam para as proteínas pré-Membrana, Membrana, Envelope e a região N-Terminal do Capsídeo (cepa ZikaSPH2015) do ZIKV foram obtidos no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). As sequências de regiões relacionadas ao ancoramento das proteínas virais à membrana da célula foram removidas das vacinas (O domínio Stem e o domínio de transmembrana). Para a primeira formulação vacinal, a região C-terminal da proteína do Capsídeo foi mantida servindo como peptídeo sinal (nativo) ao retículo endoplasmático (Tabela 1). A região de transmembrana (TM) da proteína E do vírus foi removida da sequência final e fusionada à proteína LAMP. Estas sequências foram inseridas no vetor de expressão p43.2, construindo então o plasmídeo p43.2 ZIKV/C-prM/M-E Δ TM-LAMP (Figura 10, A). Diante dos resultados dos testes *in vivo*, feito por colaboradores, novas sequências vacinais foram desenvolvidas e denominadas neste trabalho como a segunda criação de vacinas (Tabela 1). As vacinas da segunda formulação foram inseridas no vetor de expressão pcDNA3.1 e são compostas pelo fragmento de consenso Kozak e peptídeo sinal para o retículo endoplasmático tPA_SP. A Sequência pcDNA3.1 ZIKV/-tPA-prM/M-E- Δ STEM-LAMP contém os genes que codificam as proteínas virais com remoção da região Stem e associadas à proteína LAMP (Figura 10, B). A Sequência pcDNA3.1 ZIKV/-tPA-prM/M-E- Δ STEM contém os genes que codificam as proteínas virais com remoção da região Stem (Figura 10, C). A Sequência pcDNA3.1 ZIKV/-tPA-prM/M-E- Δ TM contém os genes que codificam as proteínas virais com remoção da região de TM (Figura 10, D). A Sequência pcDNA3.1 ZIKV/-tPA-prM/M-E Δ TM-LAMP contém os genes que codificam as proteínas virais com remoção da região TM e associadas à proteína LAMP (Figura 10, E). Os plasmídeos foram transformados em bactérias DH5 α de *Escherichia coli* (Invitrogen, Carlsbad, CA) e amplificados através de pequena, média e larga escala (QIAGEN®).

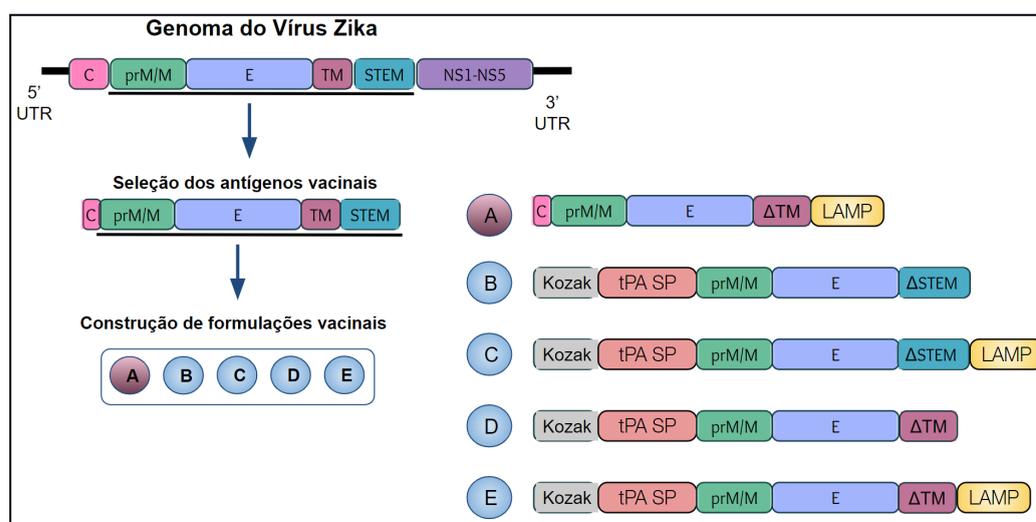
Tabela 1 - Formulações vacinais contendo as sequências antigênicas e adjuvantes

Plasmídeo	Sequências dos antígenos de ZIKV	Adjuvantes	Nome dado neste trabalho	Criação da vacina
p43.2	SP-C-prM/M-EΔTM	LAMP	ZIKV/C-prM/M-EΔTM /LAMP	Primeira
pcDNA3.1	prM/M-EΔSTEM	SP-tPA	ZIKVΔSTEM	Segunda
pcDNA3.1	prM/M-EΔSTEM	SP-tPA e LAMP	ZIKVΔSTEM/LAMP	Segunda
pcDNA3.1	prM/M-EΔTM	SP-tPA	ZIKVΔTM	Segunda
pcDNA3.1	prM/M-EΔTM	SP-tPA e LAMP	ZIKVΔTM/LAMP	Segunda

Fonte: o autor.

Legenda: Os plasmídeos vacinais foram sintetizados e clonados diretamente no vetor de expressão de interesse (p43.2 e pcDNA3.1, Novagen).

Figura 10 - Representação esquemática da escolha dos antígenos vacinais



Fonte: O autor (2022).

Legenda: Cinco formulações vacinais foram desenvolvidas. A- Indica a vacina da primeira formulação.

B, C, D e E- Indicam quatro formulações da segunda construção.

7.2 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR CHOQUE TÉRMICO

Vinte microlitros (20 µL) de bactérias competentes *E. coli* das cepas DH5α (Invitrogen) foram transformadas com 1 µg de DNA correspondente aos

plasmídeos desenhados para clonagem e expressão procariótica codificando para as proteínas quiméricas. O procedimento consistiu na incubação das células em gelo por 30 min (minutos), seguido de choque térmico a 42 °C por 2 min, etapa na qual ocorre a entrada do DNA alvo nas células bacterianas. Após o choque térmico, as bactérias foram incubadas à 37 °C, 1 h, 225 rpm (rotações por minuto) e transferidas para placa de cultura contendo meio LB (Luria-Bertani) e ágar, suplementado com 100 µg/mL ampicilina (LB-AMP). As placas foram, por sua vez, incubadas à 37 °C por 16h, para a verificação do crescimento das colônias contendo os plasmídeos de interesse.

7.3 PREPARAÇÃO DO DNA (EM PEQUENA, MÉDIA E LARGA ESCALA)

Uma colônia bacteriana contendo o DNA plasmidial de interesse foi inoculada em 5 mL (para preparação em pequena escala), 50 mL (para preparação em média escala) ou 100 mL (para preparação em larga 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®), QIAprep Spin Midiprep Kit (QIAGEN®) e Gigaprep endotoxin-free plasmid DNA purification (QIAGEN®) de acordo com as recomendações do fabricante.

7.4 ELETROFORESE DE DNA EM GEL DE AGAROSE

Nesta etapa, 1 µg de DNA foi migrado em gel de 1% agarose preparado em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) suplementado com Sybr Green (Thermo Fisher) e posteriormente, o gel foi submetido a uma corrente elétrica constante de 150 V. 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).

7.5 CULTIVO DE CÉLULAS HEK 293-T, BHK-21 E VERO

As células HEK-293T, BHK-21 e Vero foram mantidas em garrafas T75 ou T125 em estufas a 37°C e 5% CO₂, contendo meio DMEM suplementado com SFB a 10% e antibióticos.

7.6 TRANSFEÇÃO DOS PLASMÍDEOS EM CÉLULAS HEK-293T, BHK-21 E VERO

As células HEK-293T (1x10⁶ células por poço) e BHK-21 (1,5x10⁵ células por poço) foram distribuídas em placas de 6 e 24 poços respectivamente contendo lamínulas, e células BHK-21 e Vero foram distribuídas em placas de 96 (0,5x10⁵ células por poço) poços em meio DMEM (GIBCO, Carlsbad, CA, EUA), Soro Fetal Bovino a 10%, PenStrep a 50µg/mL (Sigma) e incubadas a 37°C e 5% CO₂ por 24h. Após atingir a confluência de 70-90% das culturas, as células foram submetidas a transfecção por lipofecção, com meio Opti-Mem por 48h a 37°C e 5% CO₂, utilizando o reagente de transfecção Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) com os plasmídeos vacinais e os controles (Tabela 2). Como controle positivo de transfecção, o plasmídeo p43.2-eGFP foi utilizado. Foi utilizada como controle positivo dos experimentos, a vacina de DNA que codifica as proteínas de Febre Amarela (pL/YFV), gentilmente cedidas pelo Dr. Rafael Dhalia do Departamento de Virologia, Fiocruz-IAM, além do vetor vazio pcDNA3.1 e p43.2. Como controle negativo foram utilizadas células HEK-293, BHK-21 e Vero não transfectadas.

Tabela 2 - Transfecção dos plasmídeos vacinais e controles por lipofecção

Placa de Cultura	Mix (DNA + Lipofectamina)		Transfecção do DNA (Quantidade)	
	Volume total do meio	Volume da Diluição	DNA	Lipofectamina 2000
96 poços	100 µl	2 x 25 µl	0,2 µg	0,5 µl
24 poços	500 µl	2 x 50 µl	0,8 µg	1,0 µl
6 poços	2.5 ml	2 x 250 µl	4,0 µg	2,5 µl

Fonte: o autor (2022).

7.9 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Células HEK-293T (1×10^6 células por poço) e Células BHK-21 (1×10^5 células por poço) foram cultivadas em aderência sobre lamínulas e distribuídas em placas de 6 e 24 poços, respectivamente, com meio DMEM (GIBCO, Carlsbad, CA, EUA) e incubadas por 24h à 37°C e 5% CO₂. Posteriormente, as células foram transfectadas com os plasmídeos de interesse, utilizando o protocolo já descrito. Após 48hrs de transfecção, o meio de cultura foi retirado com o auxílio de uma bomba de vácuo e logo após, foi adicionado 1 mL de solução de fixação (PFA - Paraformaldeído 4% diluído em PBS 1X) por 1 hora. Em seguida, as células foram permeabilizadas com (0,1% de Triton 100X diluído em PBS 1X) por 15 min. 300 µL de solução (PBS 1X) foi utilizada para realizar as lavagens das lamínulas três vezes. Para a primeira etapa de bloqueio, foram utilizados 300 µL de cloreto de amônio a 50 mM e incubada por 15 min. A segunda etapa de bloqueio, 300 µL de solução de bloqueio foi usado (BSA 3% diluído em PBS 1X) e incubada por 15 min. As lamínulas foram então incubadas com anticorpo primário monoclonal 4G2 (1:1000 diluído em PBS 1X, Native Antigen) por 2h à temperatura ambiente. Posteriormente, as lamínulas foram incubadas com o anticorpo Anti-mouse IgG conjugado a FITC (1:500 diluído em PBS 1X) por 1h à temperatura ambiente. Para montagem final das lâminas, 7 µL de Prolong Gold Antifade + DAPI foi posto em lâminas limpas e imediatamente após, cada lamínula foi posta sobre o reagente. Os resultados foram captados com o uso do microscópio Leica *DMi8* com a objetiva 63X com imersão em óleo

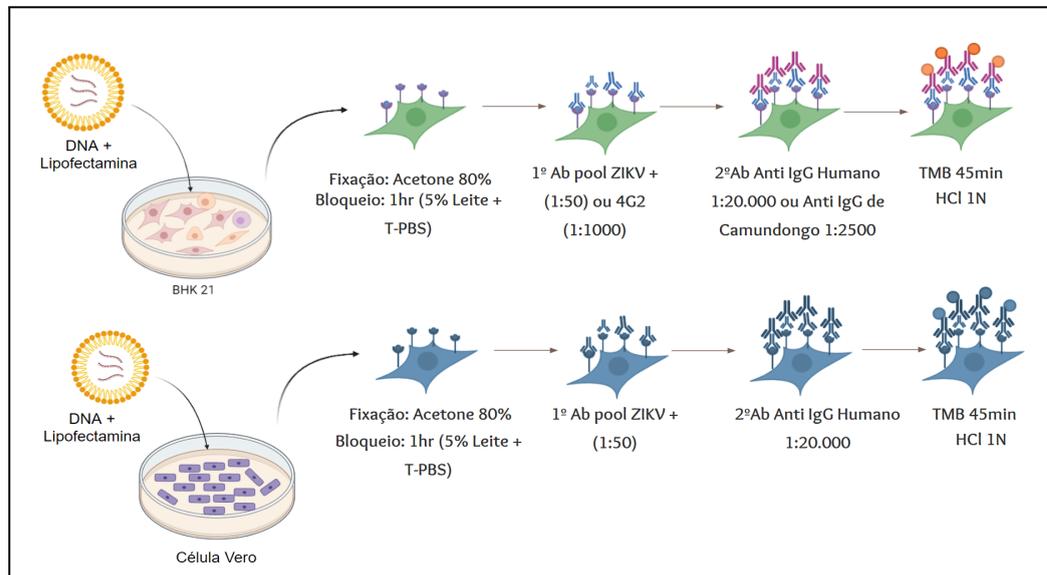
no Instituto Aggeu Magalhães, Fiocruz-PE.

7.10 ELISA BASEADO EM CÉLULAS

Células BHK-21 e Vero ($0,5 \times 10^5$ células por poço) foram distribuídas em placas de 96 poços contendo meio DMEM (GIBCO, Carlsbad, CA, EUA) e incubadas por 24h à 37°C e 5% CO₂. Posteriormente, as células foram transfectadas com os plasmídeos da segunda formulações de vacinas, utilizando o protocolo já descrito. Após 48hrs de transfecção, o meio de cultura foi retirado com o auxílio de uma bomba de vácuo e logo após foi adicionado 200 µL de acetona a 80% para fixação. Em seguida, reações inespecíficas foram bloqueadas por 30 min à temperatura ambiente com adição de 300 µL de tampão de ensaio (5% leite, 1X PBS, 0.01% Tween-20). As placas posteriormente foram incubadas com soros de pacientes infectados por ZIKV na diluição de 1:50 ou incubadas com anticorpo primário monoclonal anti-Flavivírus 4G2 1:1000 (produção *in house*) em tampão de ensaio por 2h à temperatura ambiente. Para as etapas de lavagem, 200 µL de tampão de lavagem (T-PBS 1x) foram adicionados por poço, a cada lavagem, por 5 vezes. Os anticorpos anti-Zika interagindo com as células transfectadas com o DNA vacinal foram detectados pela adição de imunoglobulina G de rato anti-IgG humana conjugada à peroxidase (Sigma®) na diluição de 1:20.000 em tampão de ensaio ou imunoglobulina G de rato anti-IgG de camundongo conjugada à peroxidase (Sigma®) por 1h à temperatura ambiente. As reações foram reveladas pela adição de 100 µL do substrato da enzima peroxidase (tetrametilbenzidina – TMB, KPL) por 45 min e sua reação foi parada ao adicionar 100 µL de HCL 1N (Figura 11). A Densidade Óptica (DO) foi determinada à 450 nm em leitor de ELISA (BioRad 2550 Reader EIA®). O painel sorológico utilizado contendo amostras comprovadamente positivas para ZIKV (12 soros) foi disponibilizado pelo biorrepositório de amostras localizado no Departamento de Virologia do IAM/FIOCRUZ, sob coordenação da Dr^a Isabelle Viana. Cada DNA vacinal foi testado em oito réplicas e os valores de Densidade Óptica do branco (células não transfectadas) foram subtraídos de todos os poços anteriormente à análise

dos dados.

Figura 11 - Representação esquemática da técnica de ELISA baseado em células



Fonte: O autor (2022).

Legenda: Células pós transfecção foram submetidas ao protocolo de ELISA baseado em células a fim de detectar a expressão das proteínas vacinais inseridas no plasmídeo de interesse.

7. 11 ANÁLISE DE DADOS

As análises estatísticas foram feitas através do software GraphPad Prism 7 Mac OS. Os valores mostrados nos gráficos correspondem à média das amostras e seu desvio padrão.

8 RESULTADOS

Os resultados aqui presentes, estão divididos em duas etapas: a primeira, se refere a primeira formulação vacinal desenvolvida de DNA, no qual os dados obtidos aqui neste trabalho, demonstraram a expressão de prM/M-E em células de mamíferos, entretanto, os dados *in vivo*, realizados por colaboradores, demonstraram baixa imunogenicidade. Portanto, foram desenvolvidas quatro outras formulações vacinais de DNA visando a expressão e secreção melhorada dos antígenos vacinais.

8.1 PRIMEIRA FORMULAÇÃO DA VACINA: INTEGRIDADE DO DNA E EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS VIRAIS

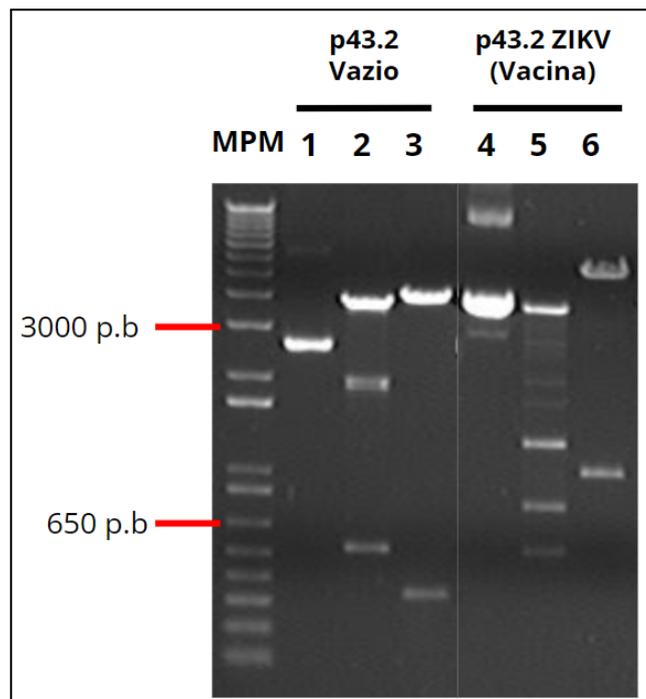
8.1.1 Identidade de sequência do gene sintético p43.2 ZIKV/-C-PRM/M-E-LAMP

A sequência de DNA codificando para a vacina ZIKV/-C-prM/M-E-LAMP foi sintetizada comercialmente e inserida no vetor comercial p43.2 (2163 pb, gentilmente cedidos pelo Dr. Rafael Dhalia). A integridade das amostras e o tamanho do vetor comercial foram verificados por eletroforese em gel de agarose (Figura 12). A análise da migração eletroforética das amostras de DNA e comparação com o marcador de peso molecular mostrou que todos os vetores apresentavam uma banda única e dentro do tamanho esperado (Figura 12, linha 1 e 4).

Após a confirmação dos pesos moleculares dos vetores, estes foram utilizados para transformar bactérias *E. coli* da cepa DH5 α . Para confirmar a identidade dos genes sintéticos (inseridos nos vetores), 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 (disponível em <http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>) foi utilizado para identificar

sítios de enzimas de restrição situados dentro e fora da sequência dos genes de interesse. O vetor p43.2 ZIKV/-C-prM/M-E-LAMP foi digerido com as enzimas NheI e EcoRI, e o vetor p43.2 Vazio foi digerido com as enzimas NheI e NcoI cujos sítios de restrição localizam-se fora da sequência dos genes alvo e são, portanto, aqui denominadas digestões comuns (Figura 12, linhas 2 e 5). Enquanto que as enzimas HindIII e EcoRV foram utilizadas para digerir o vetor p43.2 ZIKV/-C-prM/M-E-LAMP, e XbaI e HindIII para digerir o vetor p43.2 Vazio. Visto que o sítio de restrição destas enzimas localizam-se no interior da sequência dos genes alvos, estas são aqui denominadas digestões específicas (Figura 12, linhas 3 e 6).

Figura 12 - Análise da integridade dos vetores comerciais e da identidade dos genes otimizados correspondentes a vacina p43.2 ZIKV/-C-prM/M-E-LAMP e o vetor vazio p43.2.



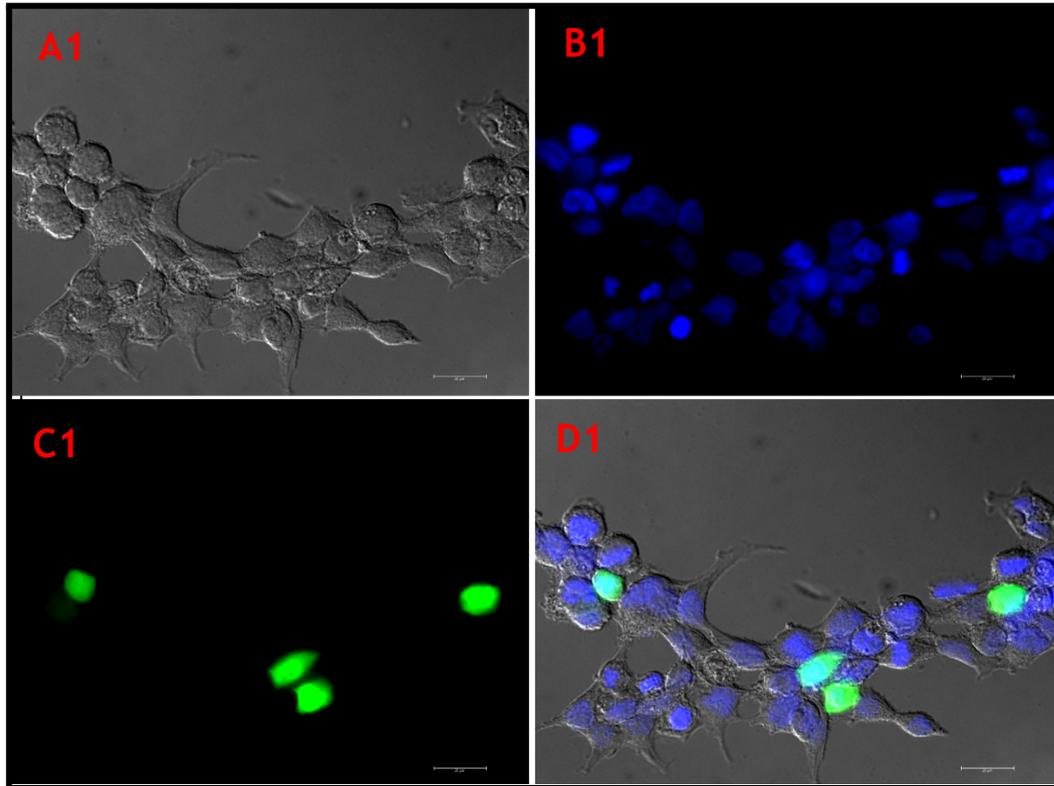
Fonte: O autor (2022).

Legenda: Análise da integridade dos vetores comerciais contendo os genes selecionados para a vacina de ZIKV de primeira formulação. Nesta etapa, 2 µg de DNA foram migrados em gel 1% agarose e as bandas apresentaram os tamanhos esperados (1 e 4). Análise da identidade dos genes após digestão comum (linhas 2 e 5) dos vetores com as enzimas de restrição e NheI e NcoI (para p43.2 vazio) e NheI e EcoRI (para p43.2 ZIKV - Vacina) e com as enzimas de restrição XbaI e HimdIII (para p43.2 vazio, linha 3) e HimdIII e EcoRV (para p43.2 ZIKV - Vacina). O marcador de peso molecular (MPM) utilizado no gel foi o 1Kb Plus Ladder (Invitrogen).

8.1.2 Avaliação da localização das proteínas vacinais prM/M-E em compartimentos celulares por imunofluorescência

Para confirmar a expressão das proteínas da vacina p43.2 ZIKV/-C-prM/M-E-LAMP, a técnica de imunofluorescência foi abordada em células HEK-293T transfectadas com o plasmídeo vacinal. Os vetores p43.2-eGFP, p43.2 YFV (pL/YFV) foram utilizados como controle positivo do experimento. A proteína eGFP é usualmente utilizada para padronizar ensaios de imunofluorescência, devido a sua característica de exibir um brilho verde-fluorescente quando exposta à luz azul ultravioleta. Na figura 13, é possível notar que o ensaio de padronização utilizando o vetor p43.2-eGFP funcionou, visto que conseguimos detectar a expressão da proteína (Figura 13).

Figura 13 - Microscopia confocal observando a expressão da proteína EGFP em células HEK-293T



Fonte: O autor (2021).

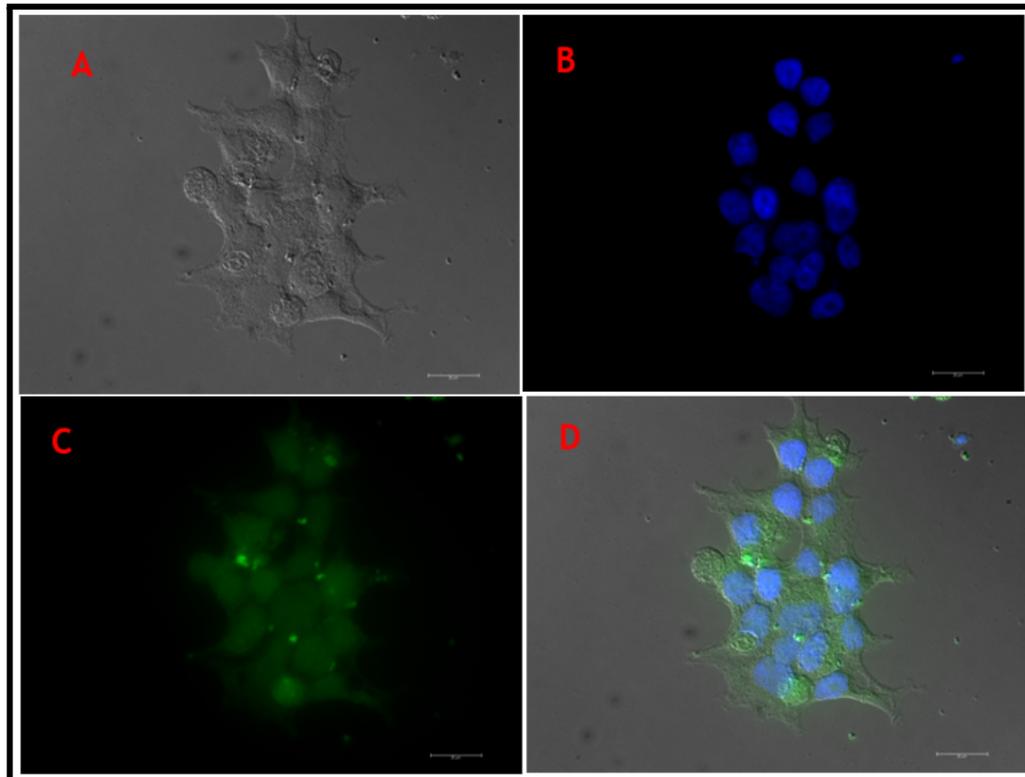
Legenda: Imunofluorescência de células HEK-293T transfectadas com 4 μ g do vetor pEGFP. A lâmina foi visualizada no microscópio Leica *DMI8* com a objetiva 63X com imersão em óleo. **A1** - Imagem sem filtro observando a morfologia celular. **B1** - A coloração azul indica o núcleo celular marcado com o DAPI sobre a luz ultravioleta com filtro DAPI. **C1** - A coloração em verde indica a expressão da proteína EGFP em todo o citoplasma celular, utilizando o filtro de cor FITC. **D1** - Superposição entre as imagens A1, B1 e C1.

As células HEK-293T, após transfecção com os plasmídeos pL/YFV e p43.2 ZIKV/-C-prM/M-E-LAMP, foram submetidas a ensaios de imunofluorescência (Figuras 14 e 15). Tendo em vista que a vacina p43.2 YFV já foi testada e avaliada em um estudo anterior, esta serviu como controle positivo de expressão nos compartimentos internos celulares para as outras vacinas testadas.

Nas figuras 14C e 15C, é possível detectar a expressão das proteínas virais em todo citoplasma celular e, além disso, o método de transfecção aplicado a ambos os vetores funcionaram. Portanto, as proteínas virais de ZIKV expressas pela vacina de DNA desenvolvida na primeira formulação são homoganeamente

expressas *in vitro* em todo o citoplasma celular.

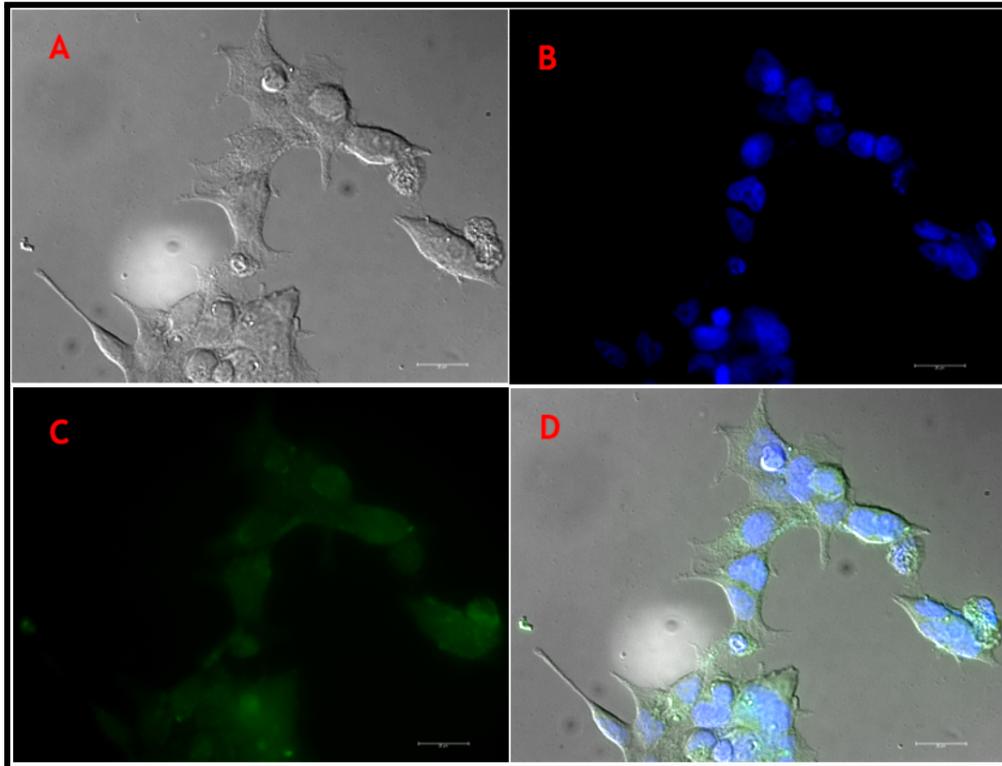
Figura 14 - Microscopia confocal observando a expressão das proteínas de Febre Amarela em células HEK-293T



Fonte: O autor (2021).

Legenda: Imunofluorescência de células HEK-293T transfectadas com 4 μg do vetor pL/YFV. A lâmina foi visualizada no microscópio Leica *DMi8* com a objetiva 63X com imersão em óleo. A - Imagem sem filtro observando a morfologia celular. B - A coloração azul indica o núcleo celular marcado com o DAPI sobre a luz ultravioleta com filtro DAPI. C - A coloração em verde indica a expressão das proteínas de Febre Amarela em todo o citoplasma celular, utilizando o filtro de cor FITC. D - Superposição entre as imagens A, B e C.

Figura 15 - Microscopia confocal observando a expressão das proteínas de Zika em células HEK-293T



Fonte: O autor (2021).

Legenda: Imunofluorescência de células HEK-293T transfectadas com 4 μ g do vetor p43.2 ZIKV/-C-prM/M-E-LAMP. A lâmina foi visualizada no microscópio Leica *DMi8* com a objetiva 63X com imersão em óleo. **A** - Imagem sem filtro observando a morfologia celular. **B** - A coloração azul indica o núcleo celular marcado com o DAPI sobre a luz ultravioleta com filtro DAPI. **C** - A coloração em verde indica a expressão das proteínas de Zika em todo o citoplasma celular, utilizando o filtro de cor FITC. **D** - Superposição entre as imagens A, B e C.

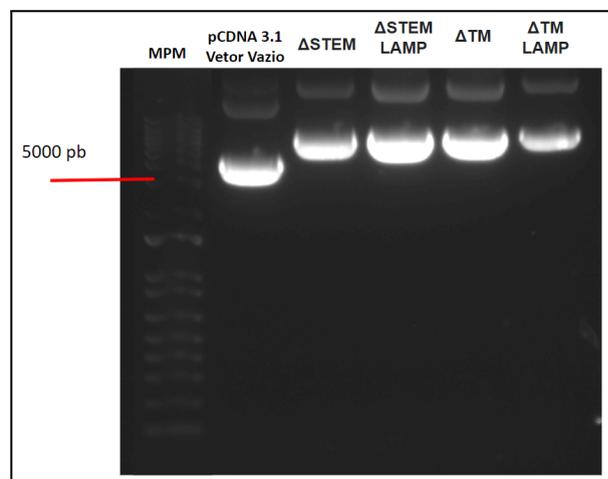
Em colaboração com o grupo da Dr^a Maria Sato (USP), e como parte da tese de doutorado, Franciane Teixeira, realizou testes *in vivo* em camundongos. Os dados obtidos indicaram que a vacina ZIKV/-C-prM/M-E-LAMP era pouco imunogênica e nós hipotetizamos que a apresentação antigênica estava sendo inadequada. Diante destes resultados, foram desenhadas quatro novas formulações de vacinas, no qual foram validadas *in vitro*, neste trabalho.

8.2 QUATRO NOVAS FORMULAÇÕES VACINAIS: INTEGRIDADE DOS DNAs VACINAIS, AVALIAÇÃO E OBSERVAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS VIRIAIS

8.2.1 Confirmação da integridade dos DNAs vacinais

As sequências de DNA codificando para as formulações vacinais da segunda construção foram sintetizadas comercialmente e inseridas no vetor comercial pcDNA3.1 (5428 pb, GenScript). A integridade das amostras e o tamanho do vetor pcDNA3.1 foram verificados por eletroforese em gel de agarose a 1% (Figura 16). A análise da migração eletroforética das amostras de DNA e comparação com o marcador de peso molecular mostrou que todos os vetores apresentavam uma banda única e dentro do tamanho esperado (Figura 16).

Figura 16 - Análise da integridade do DNA da segunda formulações das vacinas por eletroforese



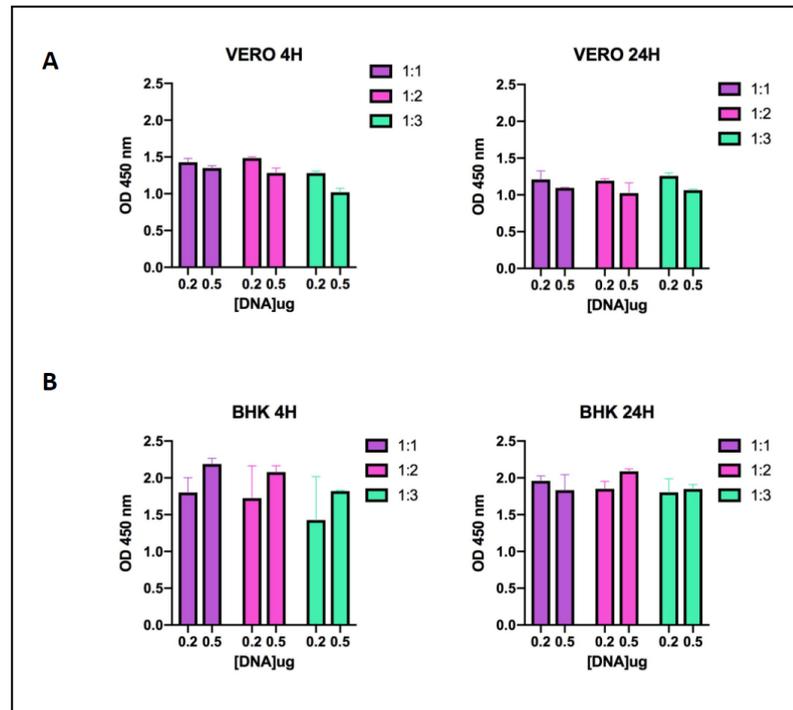
Fonte: O autor (2022).

Legenda: Nesta etapa, 1 µg de DNA foram migrados em gel 1% agarose e as bandas apresentaram os tamanhos esperados. O marcador de peso molecular (MPM) utilizado no gel foi o 1Kb Plus Ladder (Invitrogen).

8.2.2 Validação do protocolo de ELISA baseado em células

Com o intuito de analisar quantitativamente a expressão das proteínas vacinais em células, um novo protocolo de ELISA baseado em células foi estabelecido. Para validar o protocolo, foram realizadas transfecções com a vacina ZIKV Δ STEM em placas de 96 poços contendo $0,5 \times 10^5$ de células BHK 21 ou Vero. Estas células foram transfectadas com diferentes concentrações de DNA e do agente de transfecção, assim como o tempo de contato com a mistura da transfecção. Como prova de conceito, foi demonstrado neste ensaio a capacidade de detectar a expressão das proteínas virais por ligações específicas de anticorpos de um pool de soro de pacientes humanos positivos somente para ZIKV (Figura 17).

Figura 17 - Padronização do ensaio de ELISA baseado em células utilizando a vacina pcDNA3.1 ZIKVΔSTEM



Fonte: O autor (2022).

Legenda: Diferentes concentrações de DNA foram utilizadas para transfectar células BHK 21 e Vero, variando de 0,2 µg a 0,5 µg. O agente de transfecção Lipofectamina 2000 também teve sua concentração variada, onde 1:1 (0,2 µg ou 0,5 µg de DNA para 0,5 µL de Lipofectamina 2000), 1:2 (0,2 µg ou 0,5 µg de DNA para 1 µL de Lipofectamina 2000) e 1:3 (0,2 µg ou 0,5 µg de DNA para 1,5 µL de Lipofectamina 2000). O tempo de contato do mix (DNA + Lipofectamina 2000) também foi avaliado. Após incubação das placas com o pool de soro positivo e diluídas 1:50, a interação proteína-anticorpo foi detectada através da incubação com anticorpo anti-IgG humano marcado com peroxidase na diluição 1:20.000. A DO resultante foi detectada em leitor de ELISA apropriado à 450 nm. Os valores mostrados correspondem à média de oito réplicas e correspondente desvio padrão. Gráfico preparado com o programa GraphPad Prism 7.0 para Mac OS.

Diante dos resultados mostrados na Figura 17 a detecção da expressão das proteínas vacinais foi ligeiramente maior em placas revestidas com células BHK 21, o que sugere uma maior sensibilidade do ensaio utilizando esta linhagem celular (Figura 17 B). Além disso, as vacinas são posteriormente avaliadas *in vivo*, por colaboradores, em camundongos e por se tratar de células da mesma espécie, facilita a comparação em níveis de expressão das proteínas virais. Portanto, para o próximo resultado, foram escolhidas células BHK 21 com a concentração de 0,2 µg de DNA vacinal, 0,5 µL de Lipofectamina 2000 e tempo

de contato da transfecção por 24 horas.

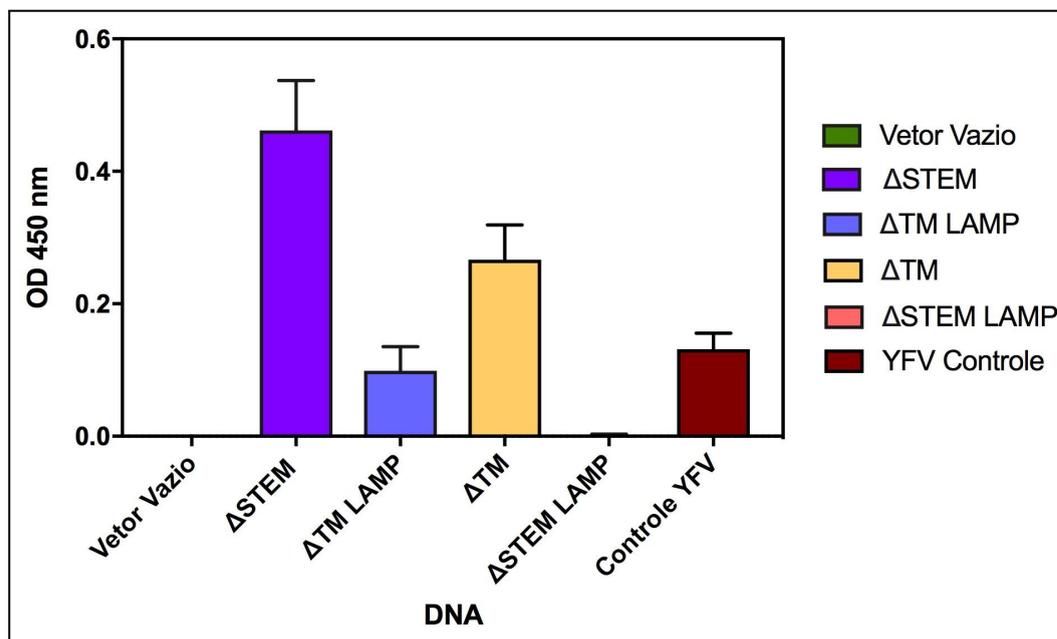
8.2.3 Avaliação da expressão dos antígenos virais das formulações da segunda construção de vetores vacinais por ELISA baseado em células

Considerando as condições previamente estabelecidas, um ensaio de ELISA baseado em células foi projetado, com o objetivo de avaliar quantitativamente a expressão das proteínas codificadas nos plasmídeos das quatro formulações vacinais. Para isso, o anticorpo monoclonal 4G2 foi utilizado, com o intuito de reconhecer as proteínas expressas.

A especificidade deste ensaio foi suportada por células BHK 21 que foram transfectadas com o pcDNA3.1 (Vetor vazio), garantindo que não houve ligações inespecíficas após incubações com os anticorpos. Os dados gerados foram corrigidos com o valor do branco (células não transfectadas) (Figura 18).

Nota-se que existe interação do anticorpo monoclonal 4G2 com as proteínas expressas, das quatro vacinas propostas, após a transfecção. A vacina de Febre Amarela (pL/YFV) foi utilizada como controle positivo de expressão. A vacina ZIKV Δ STEM obteve os melhores níveis de expressão proteica como vistas na Figura (18) seguidas das vacinas ZIKV Δ TM, ZIKV Δ TM/LAMP, e ZIKV Δ STEM/LAMP. Portanto, conclui-se que a vacina ZIKV Δ STEM consegue expressar em maior quantidade, as proteínas vacinais, quando comparada as outras três formulações vacinais. Além disso, as vacinas que não contêm a proteína LAMP expressam melhor as proteínas contidas nos plasmídeos vacinais.

Figura 18 - Expressão das proteínas virais da segunda formulações das vacinas medidas por ELISA baseado em células



Fonte: O autor (2022).

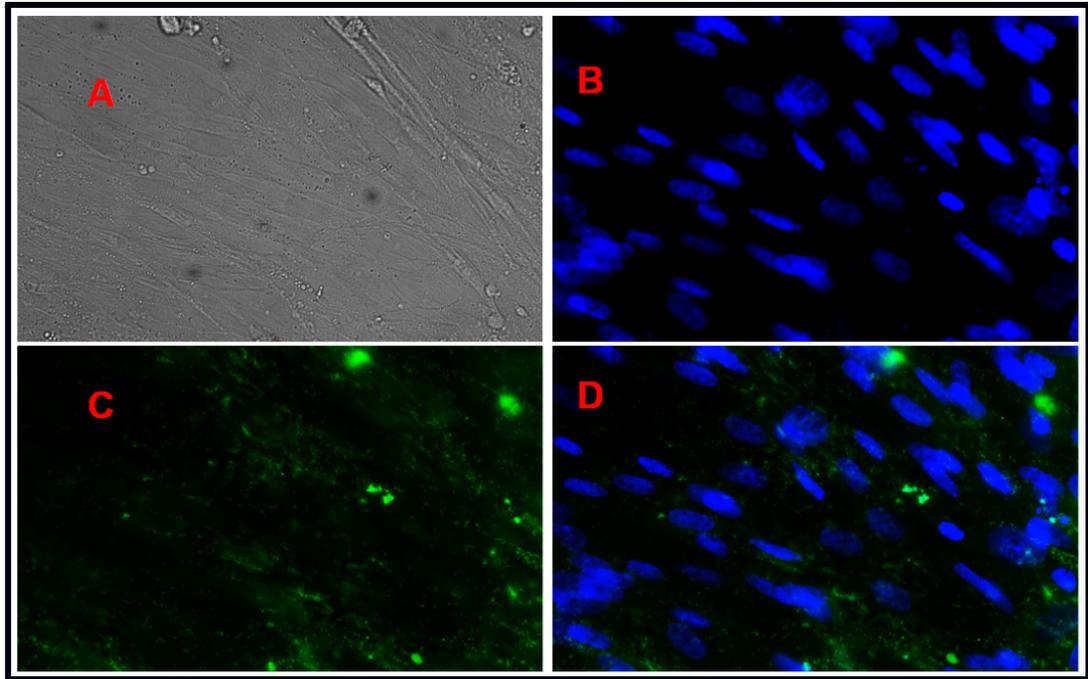
Legenda: Células BHK 21 foram transfectadas com 0.2 µg de cada DNA e 0.5 µL de Lipofectamina 2000, submetidas após a in-Cell ELISA. Após incubação das placas com o anticorpo monoclonal 4G2 e diluídas 1:1000, a interação proteína-anticorpo foi detectada através da incubação com anticorpo anti-IgG camundongo marcado com peroxidase na diluição 1:2.500. A DO resultante foi detectada em leitor de ELISA apropriado à 450 nm. Os valores mostrados correspondem à média de oito réplicas e correspondente desvio padrão. Gráfico preparado com o programa GraphPad Prism 7.0 para Mac OS.

8.2.4 Avaliação da localização e confirmação da expressão das proteínas prM/M-E nos compartimentos celulares por imunofluorescência

As células BHK-21, após transfecção com os plasmídeos p43.2 YFV ZIKVΔTM, ZIKVΔTM/LAMP, ZIKVΔSTEM e ZIKVΔSTEM/LAMP, foram submetidas a ensaios de imunofluorescência (Figuras 19, 20, 21, 22 e 23). O vetor p43.2 YFV foi utilizado como controle positivo do experimento.

Nas figuras 19C, 20C, 21C e 22C é possível visualizar a expressão das proteínas virais em todo citoplasma celular e, confirma que o método de transfecção aplicado a ambos os vetores funcionou. Portanto, as proteínas virais de ZIKV expressas pelas vacinas de DNA desenvolvidas na segunda formulações são homoganeamente expressas *in vitro* em todo o citoplasma celular.

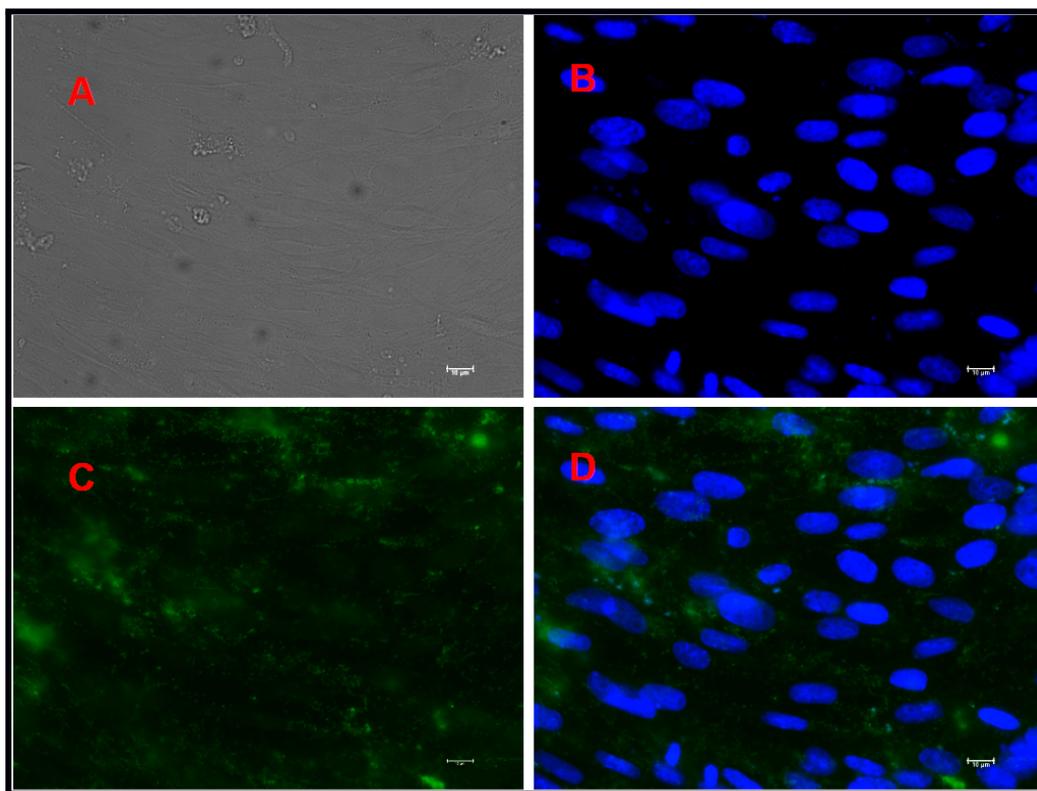
Figura 19 - Microscopia confocal observando a expressão das proteínas de prM/M-E em células BHK-21 após transfecção com ZIKV Δ STEM



Fonte: O autor (2022).

Legenda: Imunofluorescência de células BHK-21 transfectadas com 0.8 μ g do vetor pcDNA3.1 ZIKV Δ STEM. A lâmina foi visualizada no microscópio Leica *DMi8* com a objetiva 63X com imersão em óleo. **A** - Imagem sem filtro observando a morfologia celular. **B** - A coloração azul indica o núcleo celular marcado com o DAPI sobre a luz ultravioleta com filtro DAPI. **C** - A coloração em verde indica a expressão das proteínas de Febre Amarela em todo o citoplasma celular, utilizando o filtro de cor FITC. **D** - Superposição entre as imagens A, B e C.

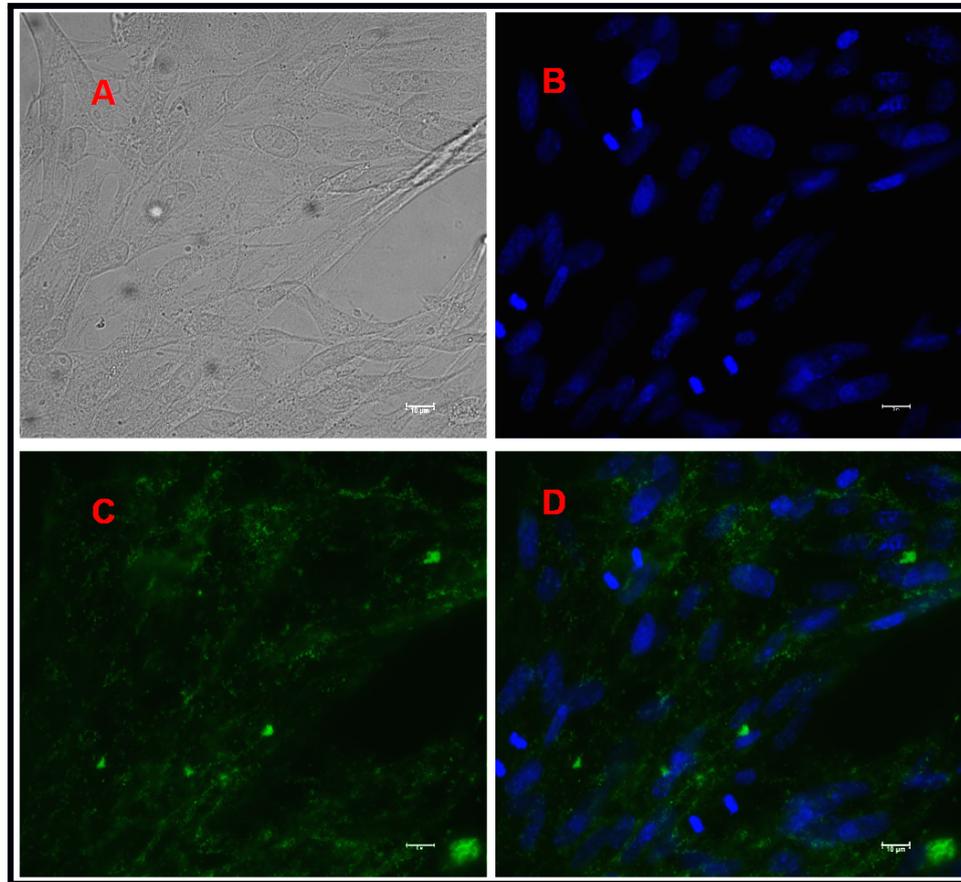
Figura 20 - Microscopia confocal observando a expressão das proteínas de prM/M-E em células BHK-21 após transfecção com ZIKV Δ STEM/LAMP



Fonte: O autor (2022).

Legenda: Imunofluorescência de células BHK-21 transfectadas com 0.8 μ g do vetor pcDNA3.1 ZIKV Δ STEM/LAMP. A lâmina foi visualizada no microscópio Leica *DMI8* com a objetiva 63X com imersão em óleo. **A** - Imagem sem filtro observando a morfologia celular. **B** - A coloração azul indica o núcleo celular marcado com o DAPI sobre a luz ultravioleta com filtro DAPI. **C** - A coloração em verde indica a expressão das proteínas de Febre Amarela em todo o citoplasma celular, utilizando o filtro de cor FITC. **D** - Superposição entre as imagens A, B e C.

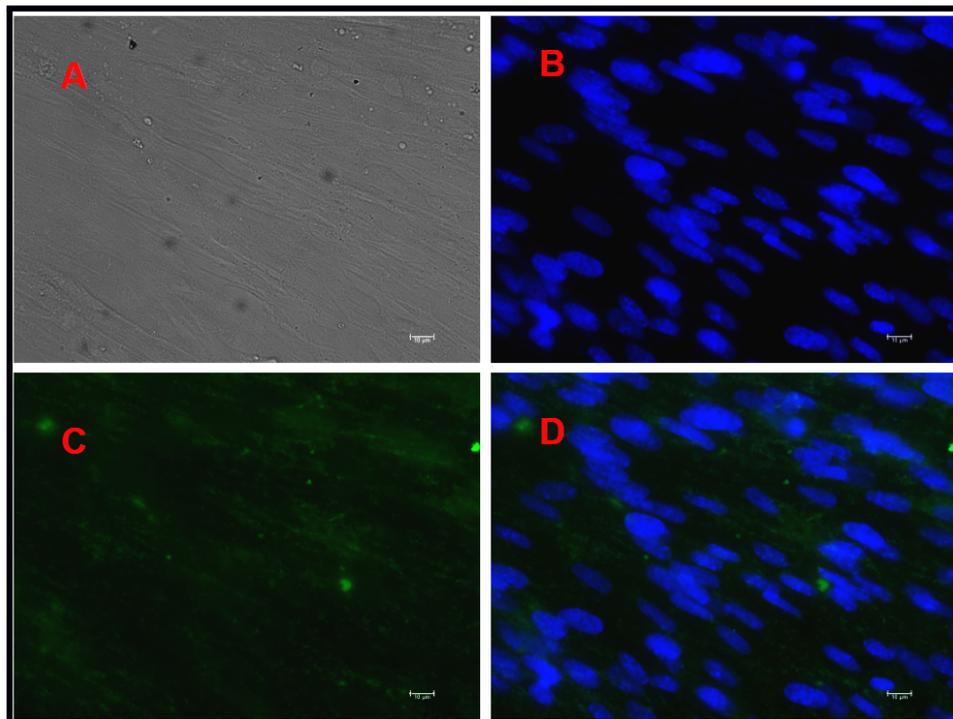
Figura 21 - Microscopia confocal observando a expressão das proteínas de prM/M-E em células BHK-21 após transfecção com ZIKV Δ TM



Fonte: O autor (2022).

Legenda: Imunofluorescência de células BHK-21 transfectadas com 0.8 μ g do vetor pcDNA3.1 ZIKV Δ TM. A lâmina foi visualizada no microscópio Leica *DMi8* com a objetiva 63X com imersão em óleo. **A** - Imagem sem filtro observando a morfologia celular. **B** - A coloração azul indica o núcleo celular marcado com o DAPI sobre a luz ultravioleta com filtro DAPI. **C** - A coloração em verde indica a expressão das proteínas de Febre Amarela em todo o citoplasma celular, utilizando o filtro de cor FITC. **D** - Superposição entre as imagens A, B e C.

Figura 22 - Microscopia confocal observando a expressão das proteínas de prM/M-E em células BHK-21 após transfecção com ZIKV Δ TM/LAMP



Fonte: O autor (2022).

Legenda: Imunofluorescência de células BHK-21 transfectadas com 0.8 μ g do vetor pcDNA3.1 ZIKV Δ TM/LAMP. A lâmina foi visualizada no microscópio Leica *DMi8* com a objetiva 63X com imersão em óleo. **A** - Imagem sem filtro observando a morfologia celular. **B** - A coloração azul indica o núcleo celular marcado com o DAPI sobre a luz ultravioleta com filtro DAPI. **C** - A coloração em verde indica a expressão das proteínas de Febre Amarela em todo o citoplasma celular, utilizando o filtro de cor FITC. **D** - Superposição entre as imagens A, B e C.

9 DISCUSSÃO

Desde 2015, o surgimento da transmissão epidêmica do ZIKV tem preocupado à comunidade global, pois, este vírus está associado a relatos de distúrbios neurológicos graves como a síndrome de Guillain-Barré e malformações congênitas como microcefalia (CDC, 2019; OMS, 2016; CASTANHA; MARQUES, 2020). Nesta perspectiva, muitas pesquisas buscaram elaborar vacinas que sejam eficientes contra o ZIKV, incluindo este presente trabalho. Em sua maioria, as vacinas desenvolvidas utilizaram as proteínas E e prM/M do ZIKV (OMS, 2018). Essas proteínas estruturais são consideradas como os principais alvos terapêuticos, pois, apresentam epítomos para respostas imunes adaptativas de células $T CD4^+$ e $CD8^+$ e representam as subunidades não replicantes do genoma do ZIKV, apresentando um perfil candidato mais seguro para vacinas (VALENTE; MORAES, 2019; TAN *et al.*, 2020; KROL; BRZUSKA; SZEWCZYK, 2019; SUN *et al.*, 2022).

A vacinação consiste em estimular o sistema imunológico com um agente infeccioso, ou componentes dele, modificado de tal forma que nenhum dano ou doença seja causado, mas garantindo que quando o hospedeiro for confrontado com aquele patógeno, o sistema imune possa agir antes que cause qualquer efeito nocivo (CDC, 2021; FDA, 2022; OMS, 2021). Recentemente, novas abordagens voltadas à vacinação foram desenvolvidas, entre elas, a introdução direta em tecidos de um plasmídeo contendo a sequência de DNA, que codifica os antígenos contra o qual se busca uma resposta imune. Essa abordagem tem ganhado força, pois oferece uma série de vantagens potenciais sobre as abordagens tradicionais, incluindo a estabilidade aprimorada da vacina, ausência de qualquer agente infeccioso e facilidade de fabricação em larga escala. Estas formulações vacinais de DNA também têm incluso em suas sequências, adjuvantes moleculares, com o intuito de auxiliar o DNA a entrar nas células, direcionar o DNA para células específicas, assim como atuar na estimulação ou direcionamento da resposta imune (OMS, 2022; DONNELLY *et al.*, 1997; DAVIS; MCCLUSKIE, 1999; DOWD, 2016). Não obstante, todas as vacinas desenvolvidas neste projeto incluem adjuvantes em suas formulações.

A primeira formulação da vacina desenvolvida neste trabalho foi baseada no eficiente desempenho de uma vacina de DNA contra Febre Amarela (pL/YFV). Esta vacina, descreve a expressão da sequência prM/M-E de YFV clonada *in-frame* com a sequência LAMP. Essa abordagem mostrou que as proteínas virais, impulsionada pela sequência citoplasmática de LAMP, foram direcionadas para compartimentos intracelulares ricos em MHC de classe II. Portanto, esperou-se que a vacina ZIKV/C-prM/M-E Δ TM-LAMP conseguisse ter expressões das proteínas codificadas semelhante aos resultados da vacina pL/YFV (MACIEL *et al.*, 2015). Quando observados a expressão dos antígenos em compartimentos celulares através da técnica de imunofluorescência, em células HEK-293T, a vacina ZIKV/C-prM/M-E Δ TM-LAMP conseguiu expressar as proteínas virais com menor intensidade quando comparadas a pL/YFV. Ainda, ensaios pré-clínicos em camundongos, realizados em colaboração com o grupo da Dr^a Maria Sato (USP), mostraram a baixa imunogenicidade desta vacina, e estes resultados corroboram com os nossos achados *in vitro*. Deste modo, nós hipotetizamos que esta baixa expressão das proteínas prM/M-E está relacionada à escolha das sequência das proteínas virais de ZIKV, que continham regiões de ancoramento à membrana celular, assim como, o papel do adjuvante LAMP que estava mantendo as proteínas presas à membrana celular, portanto, dificultando a apresentação antigênica das proteínas virais processadas. Tendo em vista que vacinas de DNA, em alguns casos, possuem baixa imunogenicidade, e com base nos resultados obtidos com a primeira formulação da vacina desenvolvida neste trabalho, nós modificamos a sequência vacinal, tendo como finalidade aumentar os níveis de expressão das proteínas virais prM/M-E de ZIKV.

As principais mudanças aplicadas nas sequências vacinais das segunda formulações deste trabalho foram: (i) adição da sequência consenso Kozak; (ii) substituição do peptídeo sinal nativo pela sequência líder heteróloga SP-tPA; (iii) deleção do domínio Stem do ZIKV; (iv) testar o efeito da adição ou remoção da sequência LAMP. A expressão melhorada das proteínas virais é de fundamental importância para obter uma imunogenicidade eficaz, efeitos positivos foram vistos em vacinas de DNA que optaram por incluir a sequência Kozak em suas construções, observando uma melhora na eficiência da tradução, portanto, a expressão geral do produto gênico (ÓLAFSDOTTIR *et al.*, 2008; MUTHUMANI *et*

al., 2008; GEORGE *et al.*, 2021). Além disso, a secreção das proteínas é um componente crítico da resposta imune inata (RAVINDRAN *et al.*, 2016). Para isso, o peptídeo sinal da proteína tPA é comumente utilizada por vacinas de DNA para direcionar as proteínas virais sintetizadas através do retículo endoplasmático, e do aparelho de Golgi para as vesículas, que se fundem com a membrana plasmática e as secretam no espaço extracelular (LI, *et al.*, 2020; LI *et al.*, 1999; HANIF, *et al.*, 2010; PÉREZ-VÉLEZ *et al.*, 2009). O domínio da região Stem e Transmembrana da proteína do E, estão envolvidos no ancoramento do vírus à membrana plasmática e auxiliam nas mudanças das conformações estruturais desta proteína. Vacinas contra o ZIKV demonstraram que a presença destes domínios do E prejudica a produção de anticorpos induzidos por vetores vacinais (LÓPEZ-CAMACHO *et al.*, 2017; LAROCCA *et al.*, 2016; ABBINK *et al.*, 2016). A vacina ChAdOx1 ZIKV prME Δ TM, por exemplo, conseguiu induzir anticorpos anti-E significativamente maiores quando comparados com a vacina equivalente ChAdOx1 prME. Achados semelhantes foram observados na vacina ChAdOx1 Env Δ TM com maior atividade de ligação de anticorpos ao envelope ZIKV quando comparado ao ChAdOx1 Env (LÓPEZ-CAMACHO *et al.*, 2017).

Quatro diferentes vacinas de DNA desenvolvidas da segunda construção deste trabalho, foram comparadas quanto à sua capacidade de conduzir altos níveis de expressão das proteínas virais inseridas na sequência gênica em testes *in vitro*. Estas vacinas, demonstraram expressar homoganeamente os antígenos virais no citoplasma de células BHK-21, quando avaliadas por imunofluorescência. Entretanto, dentre as formulações vacinais presentes neste trabalho, as vacinas ZIKV Δ STEM e ZIKVE Δ TM obtiveram os melhores níveis de expressão das proteínas virais quando avaliados por ELISA baseado em células, mostrando que a deleção dos domínios Stem e TM, a utilização da sequência consenso Kozak e o peptídeo sinal tPA impulsionam a expressão das proteínas de prM/M-E, corroborando com outros estudos citados. Além disso, este resultado mostrou que a expressão das proteínas prM/M-E é superior quando ocorre deleção da região Stem quando comparada com a deleção da região TM. Este mesmo efeito foi relatado em uma vacina de DNA contra ZIKV, E Δ STEM (IN, 2020). Neste estudo, seis vacinas de DNA foram desenvolvidas e avaliadas *in vitro* e *in vivo*. Células Vero transfectadas com o E Δ STEM mostraram uma maior

expressão da proteína E quando comparadas com as outras vacinas, incluindo EΔTM. Além disso, camundongos imunizados com a vacina EΔSTEM, tiveram produção robusta de IFN-γ e proteção eficaz contra o vírus Zika (IN, 2020).

Por outro lado, as vacinas que continham em sua formulação a sequência LAMP, ZIKVEΔTM/LAMP e ZIKVEΔSTEM/LAMP, obtiveram os menores valores de expressão. Este resultado demonstrou que o efeito de secreção de proteínas do tPA-SP contida nestes plasmídeos teve efeito antagônico com a função da proteína LAMP, que visa expor as proteínas virais processadas, através do ancoramento delas à membrana plasmática.

Estes passos iniciais, voltados principalmente em compreender como melhorar a imunogenicidade de vacinas de DNA, têm tido importância no cenário mundial para a vacinação e o conhecimento (função e estrutura) quanto às proteínas do agente infeccioso e aplicação biológica de adjuvantes em plasmídeos vacinais, podem solucionar esta baixa imunogenicidade. A vacina aqui descrita como ZIKVΔSTEM, conseguiu apresentar os melhores resultados de expressão das proteínas prM/M-E do ZIKV e estes resultados, no que lhe concerne, nos impulsionaram a prosseguir com testes pré-clínicos em animais, que está sendo validada pelo grupo colaborador da Dr^a Maria Sato (USP).

10 CONCLUSÕES

- I) Adjuvantes moleculares inseridos nas sequências vacinais, são essenciais para obter melhores níveis de expressão de proteínas.
- II) A deleção dos domínios de Transmembrana e Stem da proteína do Envelope do ZIKV são importantes para a expressão melhorada das proteínas prM/M-E facilitando o reconhecimento de anticorpos anti-E.
- III) Os baixos níveis de expressão das proteínas prM/M-E, com a vacina da primeira formulação, ZIKV/C-prM/M-E Δ TM-LAMP, ocorre devido ao ancoramento das proteínas processadas na membrana citoplasmática.
- IV) O efeito de secreção guiada pelo peptídeo sinal da proteína tPA ao retículo endoplasmático aumentou a expressão das proteínas virais *in vitro*, favorecendo sua imunogenicidade.
- V) Um novo método de ELISA baseado em células foi desenvolvido e é eficaz em quantificar a expressão das proteínas de prM/M-E após transfecções em células BHK 21 e Vero.
- VI) As vacinas da segunda criação, sem a presença da proteína LAMP em suas formulações, demonstraram os melhores resultados de expressão das proteínas de prM/E.
- VII) A vacina ZIKVE Δ STEM é a melhor candidata para seguir em testes *in vivo* por apresentar os melhores resultados de expressão das proteínas vacinais, neste trabalho.

REFERÊNCIA

ZELENSKY, A, N.; GREASY, J, E. The C-type lectin-like domain superfamily. **The FEBS journal**, v. 272, n. 24, p. 6179-6217, 2005.

ABBINK, Peter et al. Rapid cloning of novel rhesus adenoviral vaccine vectors. **Journal of virology**, v. 92, n. 6, p. e01924-17, 2018.

ABBINK, Peter. Zika virus vaccines. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 10, p. 594-600, 2018

JOSEPH, Adrien et al. Pyridoxal kinase and poly (ADP-ribose) affect the immune microenvironment of locally advanced cancers. **Oncolmunology**, v. 10, n. 1, p. 1950954, 2021.

AGRELLI, Almerinda et al. ZIKA virus entry mechanisms in human cells. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 69, p. 22-29, 2019.

AUBRY, FABIEN ET AL. RECENT AFRICAN STRAINS OF ZIKA VIRUS DISPLAY HIGHER TRANSMISSIBILITY AND FETAL PATHOGENICITY THAN ASIAN STRAINS. **NATURE COMMUNICATIONS**, V. 12, N. 1, P. 1-14, 2021.

DE SAINT-VIS, B. et al. A novel lysosome-associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment. **Immunity**, v. 9, n. 3, p. 325-336, 1998.

BABA, S. S.; FAGBAMI, A. H.; OJEH, C. K. Preliminary studies on the use of

solid-phase immunosorbent techniques for the rapid detection of Wesselsbron virus (WSLV) IgM by haemagglutination-inhibition. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 22, n. 1, p. 71-79, 1999.

BAI, Haiqing et al. Cytoplasmic transport and nuclear import of plasmid DNA. **Bioscience reports**, v. 37, n. 6, 2017.

BARRETO, Mauricio L. et al. Zika virus and microcephaly in Brazil: a scientific agenda. **The Lancet**, v. 387, n. 10022, p. 919-921, 2016.

BEUTLER, Bruce. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. **Nature**, v. 430, n. 6996, p. 257-263, 2004.

WEN, Bo et al. Signal peptide replacements enhance expression and secretion of hepatitis C virus envelope glycoproteins. **Acta biochim biophys Sin**, v. 43, n. 2, p. 96-102, 2011.

BRASIL, Patrícia et al. Zika virus outbreak in Rio de Janeiro, Brazil: clinical characterization, epidemiological and virological aspects. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 4, p. e0004636, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico. Monitoramento dos casos de dengue, febre chikungunya e febre pelo vírus Zika até a **Semana Epidemiológica 23**, Brasília, DF: Ministério da Saúde, v. 23, 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico. Monitoramento integrado de alterações no crescimento e

desenvolvimento relacionados à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas, até a **Semana Epidemiológica 45**, Brasília, DF: Ministério da Saúde, v. 49, n. 54, 2018.

BURNY, Wivine et al. Different adjuvants induce common innate pathways that are associated with enhanced adaptive responses against a model antigen in humans. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 943, 2017.

CRUZ-OLIVEIRA, Christine et al. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. **FEMS microbiology reviews**, v. 39, n. 2, p. 155-170, 2015.

CALABRO, Samuele et al. Vaccine adjuvants alum and MF59 induce rapid recruitment of neutrophils and monocytes that participate in antigen transport to draining lymph nodes. **Vaccine**, v. 29, n. 9, p. 1812-1823, 2011.

CAMPOS, Gubio S.; BANDEIRA, Antonio C.; SARDI, Silvia I. Zika virus outbreak, bahia, brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 21, n. 10, p. 1885, 2015.

CASILLAS-ITUARTE, Nadia N. et al. Amino acid polymorphisms in the fibronectin-binding repeats of fibronectin-binding protein A affect bond strength and fibronectin conformation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 21, p. 8797-8810, 2017.

CASKEY, Marina et al. Synthetic double-stranded RNA induces innate immune responses similar to a live viral vaccine in humans. **Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 12, p. 2357-2366, 2011.

CHAPMAN, Barbara S. et al. Effect of intron A from human cytomegalovirus

(Towne) immediate-early gene on heterologous expression in mammalian cells. **Nucleic acids research**, v. 19, n. 14, p. 3979-3986, 1991.

CHEN, Hui et al. Immunization with electroporation enhances the protective effect of a DNA vaccine candidate expressing prME antigen against dengue virus serotype 2 infection. **Clinical Immunology**, v. 171, p. 41-49, 2016.

CHISTI AKOV, Dimitry A. et al. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. **Laboratory investigation**, v. 97, n. 1, p. 4-13, 2017.

COÊLHO, Danilo F. et al. The influence of biotinylation on the ability of a computer designed protein to detect B-cells producing anti-HIV-1 2F5 antibodies. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 93, p. 107442, 2019.

COHNEN, André et al. Surface CD107a/LAMP-1 protects natural killer cells from degranulation-associated damage. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 122, n. 8, p. 1411-1418, 2013.

COMBES, Alexis et al. BAD-LAMP controls TLR9 trafficking and signalling in human plasmacytoid dendritic cells. **Nature communications**, v. 8, n. 1, p. 1-18, 2017.

D'ORTENZIO, Eric et al. Evidence of sexual transmission of Zika virus. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 22, p. 2195-2198, 2016.

BAROUCH, Dan H.; THOMAS, Stephen J.; MICHAEL, Nelson L. Prospects for a Zika virus vaccine. **Immunity**, v. 46, n. 2, p. 176-182, 2017.

DAVIS, Brent S. et al. West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays. **Journal of virology**, v. 75, n. 9, p. 4040-4047, 2001.

DAVIS, Heather L.; MCCLUSKIE, Michael J. DNA vaccines for viral diseases. **Microbes and Infection**, v. 1, n. 1, p. 7-21, 1999.

DE DUVE, Christian. The lysosome turns fifty. **Nature cell biology**, v. 7, n. 9, p. 847-849, 2005.

DE SAINT-VIS, B. et al. A novel lysosome-associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment. **Immunity**, v. 9, n. 3, p. 325-336, 1998.

DICK, George WA; KITCHEN, Stuart F.; HADDOW, Alexander John. Zika virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509-520, 1952.

DONNELLY, John J. et al. DNA vaccines. **Annual review of immunology**, v. 15, n. 1, p. 617-648, 1997.

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

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

ESKELINEN, Eeva-Liisa. Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. **Molecular aspects of medicine**, v. 27, n. 5-6, p. 495-502, 2006.

EKINS, Sean et al. Illustrating and homology modeling the proteins of the Zika virus. **F1000Research**, v. 5, 2016.

ENGELKE, Laura et al. Recent insights into cutaneous immunization: how to vaccinate via the skin. **Vaccine**, v. 33, n. 37, p. 4663-4674, 2015.

PEREIRA, Ester M. et al. Lysosome-associated protein 1 (LAMP-1) and lysosome-associated protein 2 (LAMP-2) in a larger family carrier of Fabry disease. **Gene**, v. 536, n. 1, p. 118-122, 2014.

FAUCI, Anthony S.; MORENS, David M. Zika virus in the Americas—yet another arbovirus threat. **New England journal of medicine**, v. 374, n. 7, p. 601-604, 2016.

FAYE, Oumar et al. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20th century. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 1, p. e2636, 2014.

FÉLIX, Vanessa Pereira da Silva Rodrigues; FARIAS, Aponira Maria de. Microcephaly and family dynamics: fathers' perceptions of their children's disability. **Cadernos De Saude Publica**, v. 34, p. e00220316, 2019.

FRITZ, Richard et al. The unique transmembrane hairpin of flavivirus fusion protein E is essential for membrane fusion. **Journal of virology**, v. 85, n. 9, p. 4377-4385, 2011.

FUKUDA, M. Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. **J. Biol. Chem.** 266, 21327–21330, 1991.

GARCON, N. et al. Development of an AS04-adjuvanted HPV vaccine with the adjuvant system approach. **BioDrugs** 25, 217–226, 2011.

GEORGE, Babuadza Giorgi et al. A novel DNA platform designed for vaccine use with high transgene expression and immunogenicity. **Vaccine**, v. 39, n. 49, p. 7175-7181, 2021.

GRUENBERG, Jean; STENMARK, Harald. The biogenesis of multivesicular endosomes. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 5, n. 4, p. 317-323, 2004.

GUPTA, Rajesh K.; SIBER, George R. Adjuvants for human vaccines—current status, problems and future prospects. **Vaccine**, v. 13, n. 14, p. 1263-1276, 1995.

HAMEL. R., et al. Biology of ZIKA virus infection in human skin cells. **J. Virol.**, 89, pp. 8880-8896, 2015.

HANIF, S. N. M.; AL-ATTIYAH, R.; MUSTAFA, A. S. DNA Vaccine Constructs Expressing Mycobacterium tuberculosis-Specific Genes Induce Immune Responses. **Scandinavian journal of immunology**, v. 72, n. 5, p. 408-415, 2010.

HARVEY, William T. et al. SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 7, p. 409-424,

2021.

HAYES, Edward B. Zika virus outside Africa. **Emerging infectious diseases**, v. 15, n. 9, p. 1347, 2009.

HE, Qing et al. Calcium phosphate nanoparticle adjuvant. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 7, n. 6, p. 899-903, 2000.

HERMIDA, MICELY D' EL-REI. Fagocitos mononucleares inflamatórios potencialmente envolvidos no transporte de Leishmania em hospedeiros vertebrados. **Dissertação de Mestrado, UFBA**, 2007

HO, N. I., et al. Adjuvants enhancing cross-presentation by dendritic cells: the key to more effective vaccines? *Front. Immunol.* 9, 2874, 2018.

HOLLISTER, Kristin et al. The role of follicular helper T cells and the germinal center in HIV-1 gp120 DNA prime and gp120 protein boost vaccination. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 10, n. 7, p. 1985-1992, 2014.

IN, Hyun Ju et al. Enhanced effect of modified zika virus e antigen on the immunogenicity of DNA vaccine. **Virology**, v. 549, p. 25-31, 2020.

IOOS S, MALLETT HP, GOFFART IL, GAUTHIER V, CARDOSO T, HERIDA M. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. **Med Mal Infect.**, 2014

JARJANAZI, Hamdi et al. Biological implications of SNPs in signal peptide domains of human proteins. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 70, n. 2, p. 394-403, 2008.

JOHNSON, Arthur G. Molecular adjuvants and immunomodulators: new approaches to immunization. **Clinical microbiology reviews**, v. 7, n. 3, p. 277-289, 1994.

KASTURI, S. P. et al. Programming the magnitude and persistence of antibody responses with innate immunity. **Nature** 470, 543–547, 2011.

KAUFMANN, Bärbel; ROSSMANN, Michael G. Molecular mechanisms involved in the early steps of flavivirus cell entry. **Microbes and infection**, v. 13, n. 1, p. 1-9, 2011.

KAWAI, T. & AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nat. Immunol.** 11, 373–384, 2010.

KAZUE TERASAWA, et al. Lysosome-associated membrane proteins-1 and -2 (LAMP-1 and LAMP-2) assemble via distinct modes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Volume 479, Issue 3, 2016.

KIM, E. H. et al. Squalene-based adjuvants stimulate CD8 T cell, but not antibody responses, through a RIPK3-dependent pathway. **eLife** 9, 2020.

KLEMA, V. J.; PADMANBHAN, R.; CHOI, K. H. Flaviviral Replication Complex: Coordination between RNA Synthesis and 5'-RNA Capping.

Viruses, v. 7, n. 8, p. 4640-56, Aug 13 2015.

KLUMPERMAN, SAFTIG, P. J. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. **Nature Reviews**, v. 10, p. 623 – 635. 2009.

KONISHI, E.; TERAZAWA, A.; FUJII, A. Evidence for antigen production in muscles by dengue and Japanese encephalitis DNA vaccines and a relation to their immunogenicity in mice. **Vaccine**, 21, n. 25-26, p. 3713-3720, Sep 8 2003.

KOOL, M. et al. Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. **J. Exp. Med.** 205, 869–882 , 2008.

KOOL, M. et al. Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome. **J. Immunol.** 181, 3755–3759, 2008.

KORHONEN EM, HUHTAMO E, SMURA T, KALLIO-KOKKO H, RAASSINA M, VAPALAHTI O. Zika virus infection in a traveller returning from the Maldives, June 2015. **Euro Surveill.** 2016.

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

KOU Y, et al. Tissue plasminogen activator (tPA) signal sequence enhances immunogenicity of MVA-based vaccine against tuberculosis. **Immunol Lett.** 2017

KROL, Ewelina; BRZUSKA, Gabriela; SZEWCZYK, Boguslaw. Production and biomedical application of flavivirus-like particles. **Trends in biotechnology**, v. 37, n. 11, p. 1202-1216, 2019.

KUNDI, M. New hepatitis B vaccine formulated with an improved adjuvant system. *Expert Rev. Vaccines* 6, 133–140, 2007.

KUNDRA R, KORNFELD S. Asparagine-linked oligosaccharides protect Lamp-1 and Lamp-2 from intracellular proteolysis. **J Biol Chem** 1999.

KUNO, G.; CHANG, G. J. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. **Arch Virol**, v. 152, n. 4, p. 687-96, 2007.

LAL, H. et al. Efficacy of an adjuvanted herpes zoster subunit vaccine in older adults. **N. Engl. J. Med.** 372, 2087–2096, 2015.

LAMBRECHT, B. N.; KOOL, M.; WILLART, M.; HAMMAD, H. Mechanism of action of clinically approved adjuvants. **Current opinion in Immunology**, 2009.

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

LECOUTURIER, Valérie et al. Immunogenicity and protection conferred by an optimized purified inactivated Zika vaccine in mice. **Vaccine**, v. 37, n. 20,

p. 2679-2686, 2019.

LEITNER WW, YING H, Restifo NP. DNA and RNA-based vaccines: principles, progress and prospects. **Vaccine**. 1999.

LI, A, et al. Vesicular Stomatitis Virus and DNA Vaccines Expressing Zika Virus Nonstructural Protein 1 Induce Substantial but Not Sterilizing Protection against Zika Virus **Infection**. **J Virol**. 2020.

LI L, PETROVSKY. N. Molecular mechanisms for enhanced DNA vaccine immunogenicity. **Expert Rev Vaccines**. 2016;

LI, Zhongming et al. Immunogenicity of DNA vaccines expressing tuberculosis proteins fused to tissue plasminogen activator signal sequences. **Infection and immunity**, v. 67, n. 9, p. 4780-4786, 1999.

LI, Anzhong et al. Vesicular stomatitis virus and DNA vaccines expressing Zika virus nonstructural protein 1 induce substantial but not sterilizing protection against Zika virus infection. **Journal of virology**, v. 94, n. 17, p. e00048-20, 2020.

LI, L.; PETROVSKY, N. Molecular Adjuvants for DNA Vaccines. MDPI and ACS Style. **Curr. Issues Mol. Biol**. 2017.

LI, Zhongming et al. Immunogenicity of DNA vaccines expressing tuberculosis proteins fused to tissue plasminogen activator signal sequences. **Infection and immunity**, v. 67, n. 9, p. 4780-4786, 1999.

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

LIU, JIE, et al. Immunogenicity of Varicella Zoster Virus DNA Vaccines Encoding Glycoprotein E and Immediate Early Protein 63 in Mice. **Viruses**, v. 14, n. 6, p. 1214, 2022.

LÒPPEZ-CAMACHO, et al. Rational Zika vaccine design via the modulation of antigen membrane anchors in chimpanzee adenoviral vectors. **Nat Commun** 9, 2441, 2018.

LOPEZ-CAMACHO, C.; ABBINK, P.; LAROCCA, R. A.; DEJNIRATTISAI, W. et al. Rational Zika vaccine design via the modulation of antigen membrane anchors in chimpanzee adenoviral vectors. **Nat Commun**, 9, n. 1, p. 2441, 2018.

LU, Y.; RAVIPRAKASH, K.; LEAO, I. C.; CHIKHLIKAR, P. R. et al. Dengue 2 PreM-E/LAMP chimera targeted to the MHC class II compartment elicits long-lasting neutralizing antibodies. **Vaccine**, 21, n. 17-18, p. 2178-2189, 2003.

LUNARDELLI, V.A.S; J.S. APOSTOLICO, E.R. FERNANDES, D. Santoro Rosa. Zika virus-an update on the current efforts for vaccine development. **Hum. Vaccines Immunother.** 2020.

LUO, M, et al.. Immunization with plasmid DNA encoding influenza A virus nucleoprotein fused to a tissue plasminogen activator signal sequence elicits strong immune responses and protection against H5N1 challenge in mice. **J Virol Methods.** 2008.

MACIEL, M., JR.; CRUZ, FDA, S.; CORDEIRO, M. T.; DA MOTTA, M. A. et al. A DNA vaccine against yellow fever virus: development and evaluation. **PLoS Negl Trop Dis**, 2015.

MACNAMARA, FN. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 1954.

MARINHO, FÁTIMA ET AL., Microcefalia no Brasil: prevalência e caracterização dos casos a partir do Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos (Sinasc), 2000-2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde, Brasília, DF**, v. 25, n. 4, p. 701-712, 2016.

MARONGIU, L, GORNATI, L, ARTUSO, I, ZANONI, I, GRANUCCI, F. Below the surface: The inner lives of TLR4 and TLR9. **J Leukoc Biol.** 2019.

MARQUES, A, et al. De Novo Design and Biophysical Characterization of an Affinity-Enhanced Protein Displaying the Structure of the Broadly Neutralizing HIV-1 2F5 Antibody Epitope. **Biophysical Journal**, 110, p. 346a, 2016.

MARSTON, J.O.; C.M.R. LACERDA. Characterization of jet injection efficiency with mouse cadavers. **J. Contr. Release : Off. J. Contr. Rel. Soc.**, 2019.

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. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, 65, n. 6, p. 159-160, 2016.

MCKEE, A. S. et al. Alum induces innate immune responses through

macrophage and mast cell sensors, but these sensors are not required for alum to act as an adjuvant for specific immunity. **J. Immunol.** 183, 4403–4414, 2009.

MELLO, ALEXANDRE SILVA DE. Efeito da criopreservação de linfócitos B transformados pelo vírus Epstein-Barr sobre a atividade de hidrolases lisossômicas. **Tese Doutorado, UFRGS**, 2010.

MIDHA, S; BHATNAGAR, R. Anthrax protective antigen administered by DNA vaccination to distinct subcellular locations potentiates humoral and cellular immune responses. **Eur J Immunol** 39(1):159–177, 2005.

MINER, Jonathan J.; DIAMOND, Michael S. Zika virus pathogenesis and tissue tropism. **Cell host & microbe**, v. 21, n. 2, p. 134-142, 2017.

Ministério da Saúde. Dengue, Chikungunya e Zika. Disponível online: <http://combateaedes.saude.gov.br/en/epidemiological-situation>, 2018.

MLERA L, MELIK W, BLOOM ME. The role of viral persistence in flavivirus biology. **Pathog Dis.** 2014.

MOHARIR A, PECK SH, BUDDEN T, LEE SY. The Role of N-Glycosylation in Folding, Trafficking, and Functionality of Lysosomal Protein CLN5. **PLoS ONE**, 2013.

MOMIN, Taufik et. al. Safety and Immunogenicity of a DNA SARS-CoV-2 vaccine (ZyCoV-D): Results of an open-label, non-randomized phase I part of phase I/II clinical study by intradermal route in healthy subjects in India, **EClinicalMedicine**, Volume 38, 2021.

MONATH, T. P. et al. Chimeric live, attenuated vaccine against Japanese encephalitis (ChimeriVax-JE): phase 2 clinical trials for safety and immunogenicity, effect of vaccine dose and schedule, and memory response to challenge with inactivated Japanese encephalitis antigen. **J. Infect. Dis.** 188, 1213–1230, 2003.

MUTHUMANI, K, et al. Immunogenicity of novel consensus-based DNA vaccines against Chikungunya virus. **Vaccine.** 2008

NAKAYA, H. I. et al. Systems biology of immunity to MF59-adjuvanted versus nonadjuvanted trivalent seasonal influenza vaccines in early childhood. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** 113, 1853–1858, 2016.

NÓBREGA, MARTHA ELIZABETH BRASIL DA; et al. Outbreak of Guillain-Barré syndrome possibly related to prior Zika virus infection, Metropolitan Region of Recife, Pernambuco, Brazil, 2015. **Epidemiol. serv. saúde**, 2018.

NOWAKOWSKI, T. J. et al. Expression analysis highlights AXL as a candidate Zika virus entry receptor in neural stem cells. **Cell Stem Cell** 18, 591–596, 2016.

O'HAGAN, D. T., et al. The history of MF59® adjuvant: a phoenix that arose from the ashes. **Expert Rev. Vaccines** 12, 13–30, 2013.

O'HAGAN, D. T., et al. The mechanism of action of MF59 — an innately attractive adjuvant formulation. **Vaccine** 30, 4341–4348, 2012.

O'HAGAN, D. T., et al. Towards an evidence based approach for the development of adjuvanted vaccines. *Curr. Opin. Immunol.* 47, 93–102, 2017.

ÓLAFSDÓTTIR, G. et al. In vitro analysis of expression vectors for DNA vaccination of horses: the effect of a Kozak sequence. *Acta Vet Scand* 50, 44, 2008.

PALMA, M. L.; DUANGKHAE, P.; DOURADINHA, B.; VIANA, I. F. T. et al. Development of potent class II transactivator gene delivery systems capable of inducing de novo MHC II expression in human cells, in vitro and ex vivo. *Gene Ther*, 24, n. 6, p. 342-352, Jun 2017.

PARKINSON-LAWRENCE EJ, DEAN CJ, CHANG M, HOPWOOD JJ, MEIKLE PJ, BROOKS DA. Immunochemical analysis of CD107a (LAMP-1) *Cell Immunol.* 2005.

PATTNAIK, A; SAHOO, BR. Current Status of Zika Virus Vaccines: Successes and Challenges. *Vaccines (Basel)*. 2020.

PEARCE, EJ & EVERTS, B. Dendritic cell metabolism. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 18–29, 2015.

PERERA RM, et al.. Transcriptional control of autophagy-lysosome function drives pancreatic cancer metabolism. *Nature*, 2015.

PERERA-LECOIN, L. MEERTENS, X. CARNEC, A. AMARA. Flavivirus entry receptors: an update .**Viruses**, **6** pp. 69-88, 2014.

PÉREZ-VÉLEZ, MARIEI E. et al. Induction of neutralization antibodies in mice by Dengue-2 envelope DNA vaccines. **Puerto Rico health sciences journal**, v. 28, n. 3, p. 239, 2009.

PERSAUD, M. , A. MARTINEZ-LOPEZ, C. BU, S.A. PORCELLI, F. DIAZ-GRI. Infection by ZIKA viruses requires the transmembrane protein AXL, endocytosis and low pH. **Virology**. 518, pp. 301-312 2018.

POLAND, GA. et al. Zika Vaccine Development: Current Status. **Mayo Clin Proc.** 2019.

POLAND, GA, et al. Development of vaccines against Zika virus. **Lancet Infect. Dis.** 2018.

PULENDRAN, B. e AHMED, R. Immunological mechanisms of vaccination. **Nat. Immunol.** 12, 509–517, 2011.

PULENDRAN, B. The varieties of immunological experience: of pathogens, stress, and dendritic cells. **Annu. Rev. Immunol.** 33, 563–606, 2015.

PULENDRAN, B., S. ARUNACHALAM, P. & O'HAGAN, D.T. Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants. **Nat Rev Drug Discov** 20, 454–475, 2021.

PUTNAK, R. et al. Development of a purified, inactivated, dengue-2 virus vaccine prototype in vero cells: immunogenicity and protection in mice and rhesus monkeys. **J. Infect. Dis.** 174, 1176–1184, 1996.

QIN FURONG, et al. A Guide to Nucleic Acid Vaccines in the Prevention and Treatment of Infectious Diseases and Cancers: From Basic Principles to Current Applications. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, Vol. 9, 2021.

QIU, JT, et al. Enhancement of primary and secondary cellular immune responses against human immunodeficiency virus type 1 gag by using DNA expression vectors that target Gag antigen to the secretory pathway. **J Virol** 74, 2000.

QUAST I, LÜNEMANN JD. Fc glycan-modulated immunoglobulin G effector functions. *J Clin Immunol* 2014.

QUEREC, T. et al. Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity. **J. Exp. Med.** 203, 413–424, 2006.

RAJCÁNI J, Mosko T, Rezuchová I. Current developments in viral DNA vaccines: shall they solve the unsolved? **Rev Med Virol.** 2005.

RAVIDRAN, M., et al. Opportunistic intruders: how viruses orchestrate ER functions to infect cells. **Nat Rev Microbiol** 14, 407–420, 2016.

ROTH A, et al. **Euro Surveill**. Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections - an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012-2014. 2014.

RUDD PM, WORMALD MR, STANFIELD RL et al,. Roles for glycosylation of cell surface receptors involved in cellular immune recognition. **J Mol Biol** 1999.

SABBAGHI A., Ghaemi A. Molecular Adjuvants for DNA Vaccines: Application, Design, Preparation, and Formulation. **DNA Vaccines**. Methods in Molecular Biology, 2021.

SALAUN, B., et al. Cloning and characterization of the mouse homologue of the human dendritic cell maturation marker CD208/DC-LAMP. **Eur. J. Immunol.**, 2003.

SANTOS, ALANNA RACHEL ANDRADE DOS. Avaliação da atividade lisossomal de células de cérebro e fígado de gerbis (*Meriones unguiculatus*) infectados "in vitro" com *Neospora caninum*. **Monografia, UFRB** 2010.

SCHINJS, V. E. J. C. Mechanism of Vaccine Adjuvant Activity: initiation and regulation of immune response by vaccine adjuvants. **Vaccine**, v. 21, p. 829-831, 2003.

SHAFATI, Maryam et al. A brief review on DNA vaccines in the era of COVID-19. **Future Virology**, v. 17, n. 1, p. 49-66, 2022.

SHUHEI, NAKAMURA, TAMOTSU, YOSHIMORI; New insights into

autophagosome–lysosome fusion. **J Cell Sci** 1 April 2017.

STIASNY, K, et al. . The membrane-proximal "stem" region increases the stability of the flavivirus E protein postfusion trimer and modulates its structure. **J Virol**. 2013.

SUN, Yawei et al. Genomic Characteristics and E Protein Bioinformatics Analysis of JEV Isolates from South China from 2011 to 2018. **Vaccines**, v. 10, n. 8, p. 1303, 2022.

SUN, Yuanjie et al. Preparation of antibodies against TXR1 and construction of a new DNA tumor vaccine. **International Immunopharmacology**, v. 103, p. 108505, 2022.

SUSCHAK JJ, et al. Advancements in DNA vaccine vectors, non-mechanical delivery methods, and molecular adjuvants to increase immunogenicity. **Hum Vaccin Immunother**. 2017

T.C. PIERSON, M.S. DIAMOND. Degrees of maturity: the complex structure and biology of flaviviruses. *Curr. Opin. Virol.*, 2 2013.

TAN, T. Y. et al. Capsid protein structure in Zika virus reveals the flavivirus assembly process. **Nat. Commun**. 11, 895, 2020.

Tan, T.Y., Fibriansah, G., Kostyuchenko, V.A. et al. Capsid protein structure in Zika virus reveals the flavivirus assembly process. **Nat Commun** 11, 895 2020.

TANG, D., et al. The molecular machinery of regulated cell death. **Cell Res.** 29, 347–364, 2019.

TANG, Jianming et al. Therapeutic DNA Vaccines against HPV-Related Malignancies: Promising Leads from Clinical Trials. **Viruses**, v. 14, n. 2, p. 239, 2022.

TEIXEIRA, Franciane Mouradian Emidio et al. LAMP-1 Chimeric to HIV-1 p55Gag in the Immunization of Neonate Mice Induces an Early Germinal Center Formation and AID Expression. **Vaccines**, v. 10, n. 8, p. 1246, 2022.

TOGNARELLI J, et al. A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. **Virology**. 2016.

TSUJI, S. et al. Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette–Guérin: involvement of Toll-like receptors. **Infect. Immun.** 68, 6883–6890, 2000.

VALENTE, AP; MORAES, AH. Zika virus proteins at an atomic scale: how does structural biology help us to understand and develop vaccines and drugs against Zika virus infection? **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.** 2019

VAN-MAI, et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. **The Lancet**, Paris, v. 387, n. 10027, 2016.

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

VATAKIS, DN, et al. CD4⁺ T cell epitope affinity to MHC II influences the magnitude of CTL responses elicited by DNA epitope vaccines, **Vaccine**. **Volume** 23, Issue 20, Pages 2639-2646, 2005.

VIANA, I. F. T.; SOARES, T. A.; LIMA, L. F. O.; MARQUES, E. T. A. et al. De novo design of immunoreactive conformation-specific HIV-1 epitopes based on Top7 scaffold. **Rsc Advances**, 3, n. 29, p. 11790-11800, 2013.

VON HEIJNE, Gunnar. The signal peptide. **The Journal of membrane biology**, v. 115, n. 3, p. 195-201, 1990.

WANG, Shixia et al. Relative contributions of codon usage, promoter efficiency and leader sequence to the antigen expression and immunogenicity of HIV-1 Env DNA vaccine. **Vaccine**, v. 24, n. 21, p. 4531-4540, 2006.

WANG, Jia-Ye et al. Improved expression of secretory and trimeric proteins in mammalian cells via the introduction of a new trimer motif and a mutant of the tPA signal sequence. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 91, n. 3, p. 731-740, 2011.

HOU, Wangheng et al. Molecular cloning and characterization of the genes encoding the proteins of Zika virus. **Gene**, v. 628, p. 117-128, 2017.

WILKE, Sonja; KRAUSZE, Joern; BÜSSOW, Konrad. Crystal structure of the conserved domain of the DC lysosomal associated membrane protein: implications for the lysosomal glycoalyx. **BMC biology**, v. 10, n. 1, p. 1-15, 2012.

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

XIA, Shengli et al. Safety and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine, BBIBP-CorV: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 trial. **The Lancet infectious diseases**, v. 21, n. 1, p. 39-51, 2021.

ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 110, 569–572, 2015.

ZHONG, Z, et ai. Imunogenicidade e eficácia de proteção de uma vacina de vírus Zika baseada em mRNA auto-replicante nua. **Vacinas** 2019.

ZHOU, K. et al N. Current Progress in the Development of Zika Virus Vaccines. **Vaccines** 2021.

APÊNDICE 1

Identification of a Zika NS2B epitope for which absence of IgG response is associated with severe neurological symptoms and the design of a biomarker capable of discriminatory diagnostics between severe and non-severe clinical phenotypes

Felix F. Loeffler^{a,§}, Isabelle F.T. Viana^{b,§}, Nico Fischer^c, Danilo F. Coêlho^{b,d}, Carolina S. Silva^a, Antônio F. Purificação Jr.^b, Catarina M.C.S. Araújo^b, Bruno H.S. Leite^b, Ricardo Durães-Carvalho^e, Tereza Magalhães^f, Clarice N.L. Morais^g, Marli T. Cordeiro^h, Roberto D. Lins^{h,i}, Ernesto T.A. Marques^{b,h,k} and Thomas Jaenisch^{c,j,k*}

a. Max Planck Institute of Colloids and Interfaces, Department of Biomolecular Systems, Potsdam, Germany.

b. Department of Virology, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, PE, Brazil.

c. Section Clinical Tropical Medicine, Department of Infectious Diseases, Heidelberg University Hospital, Germany.

d. Department of Fundamental Chemistry, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

e. Department of Chemical Engineering, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

f. Laboratory of Virology, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil.

g. Arthropod-borne and Infectious Diseases Laboratory (AIDL), Department of Microbiology, Immunology and Pathology,

Colorado State University, Fort Collins, CO, United States of America.

h. Department of Infectious Diseases and Microbiology, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, United States of America

i. German Centre for Infection Research (DZIF), Heidelberg Site, Heidelberg, Germany.

§ These authors contributed equally to this work.

¶ These authors also contributed equally to this work.

*Corresponding author: thomas.jaenisch@urz.uni-heidelberg.de

Abstract

The identification of specific biomarkers for Zika infection and its clinical complications is fundamental to mitigate the infection spread, which has been associated with a broad range of neurological sequelae. We present the characterization of antibody responses in serum samples from individuals infected with Zika, presenting non-severe (classical) and severe (neurological disease) phenotypes, with high-density peptide arrays comprising the Zika NS1 and NS2B proteins. The data pinpoints one strongly IgG-targeted NS2B epitope in non-severe infections, which is absent in Zika patients, where infection progressed to the severe phenotype. This differential IgG profile between the studied groups was confirmed by multivariate data analysis. Molecular dynamics simulations and circular dichroism have shown that the peptide in solution presents itself in a sub-optimal conformation for antibody recognition, which led us to computationally engineer an artificial protein able to stabilize the NS2B epitope structure. The engineered protein was used to interrogate paired samples from mothers and their babies presenting Zika-associated microcephaly and confirmed the absence of NS2B IgG response in those samples. These findings suggest that the assessment of antibody responses to the herein identified NS2B epitope is a strong candidate biomarker for the diagnosis and prognosis of Zika-associated neurological disease.

APÊNDICE 2



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Neuroimmunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jneuroim

Are Zika virus cross-reactive antibodies against aquaporin-4 associated to Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder?

João P.M. Brainer-Lima^a, Bruno H.S. Leite^a, Catarina M.C.S. de Araújo^a, Rafael Dhalia^a, Danilo F. Côelho^{a,b}, Franciane M.E. Teixeira^c, Anna Cláudia C.C. Branco^c, Maria N. Sato^c, Ernesto T.A. Marques^{a,d}, Roberto D. Lins^{a,*}, Isabelle F.T. Viana^{a,*}

^a Department of Virology, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, PE 50740-465, Brazil

^b Department of Fundamental Chemistry, Federal University of Pernambuco, Recife, PE 50740-540, Brazil

^c Department of Dermatology, Tropical Medicine Institute of School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, SP 05403-000, Brazil

^d Department of Infectious Diseases and Microbiology, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA 15213, United States

ARTICLE INFO

Keywords:

Zika
Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder
Aquaporin-4
NS2B protein
Antibodies

ABSTRACT

Zika virus (ZIKV) infection has been associated with the development of Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder (NMOSD). ZIKV-induced antibodies that putatively cross-react to aquaporin-4 (AQP4) protein are suggested to cause inflammation of the optic nerve. A region of similarity between AQP4 and the ZIKV NS2B protein was identified. Our data showed that ZIKV-associated NMOSD patients develop anti-AQP4 antibodies, but not anti-ZIKV NS2B antibodies, revealing that cross-reacting antibodies are not the underlying cause of this phenotype. ZIKV infection in mice showed persistent viral replication in the eye tissue, suggesting that NMOSD symptoms are consequence of viral infection of the optic nerve cells.

1. Introduction

Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder (NMOSD) is an autoimmune inflammatory condition of the central nervous system, which is characterized by severe and debilitating functional deficits (Lennon et al., 2004). The core clinical presentations of NMOSD include longitudinally extensive transverse myelitis, area postrema syndrome, symptomatic brainstem, diencephalic or cerebral syndromes and optical neuritis (Huda et al., 2019). NMOSD is also known to be an astrocytopathic disorder, in which specific antibodies promote complement or cell-mediated destruction of astrocytes (Yamagami et al., 2019). Among the NMOSD clinical spectra, optical neuritis (ON) is considered one of the most severe and debilitating manifestations. ON is defined as an inflammation of the optic nerve, clinically manifested by partial or total visual loss and/or abnormal findings in ophthalmological assessment and with very little chance of functional improvement (Guier and Stokkermans, 2021).

In 2015, Wingerchuk et al. proposed new diagnostic criteria for NMOSD aiming to distinguish NMO-related ON from other types of ON and to standardize the diagnosis (Wingerchuk et al., 2015). The pathophysiology of ON has been attributed to autoantibodies that target the

aquaporin-4 (AQP4) protein channel, which is important to the brain's water homeostasis. According to the current diagnostic criteria, laboratorial identification of NMOSD consists of the detection of IgG antibodies against the recombinant AQP4 protein, which is usually produced as heterotetramers of the M1 or M23 isoforms in mammalian (HEK293) cells (Waters et al., 2014; Tampoia et al., 2019). An increased level of anti-AQP4 antibody response is considered a specific biomarker for NMOSD and has been correlated with poor prognosis of NMO-related ON (Takagi et al., 2009). The current diagnostic criteria defines that an anti-AQP4 antibody positive ON case is diagnosed as NMOSD even when myelitis or recurrent ON is not present. In the absence of anti-AQP4 antibodies, diagnosis of NMSOD-related ON requires additional core clinical features including dissemination in space and fulfillment of additional magnetic resonance imaging (MRI) requirements.

Although the pathogenesis of NMOSD is not completely understood, its development has been correlated with the presence of several viral infections (e.g., Varicella-Zoster virus (VZV) and Epstein-Barr virus) (Mathew et al., 2017; Koga et al., 2011; Zhong et al., 2018). In addition, after the recent Zika virus (ZIKV) outbreaks in Latin America (Pettersson et al., 2016; Faria et al., 2017), an increasing number of patients that developed ON has also been reported (Aspahan et al., 2019). ZIKV is a

* Corresponding authors.

E-mail addresses: roberto.lins@cpqam.fiocruz.br (R.D. Lins), isabelle.viana@fiocruz.br (I.F.T. Viana).

<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2021.577697>

Received 15 March 2021; Received in revised form 3 August 2021; Accepted 18 August 2021

Available online 20 August 2021

0165-5728/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

ANEXO I

Avaliação da expressão *In Vitro* de vacinas de DNA contra o vírus Zika

Autores: Bruno Leite[†]; Isabelle Viana[†] e Roberto Lins[†].

[†]Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife 50740-465, Brasil

Resumo: O vírus Zika (ZIKV) é um flavivírus emergente que tem sido associado a distúrbios neurológicos como a Síndrome de Zika Congênita e a síndrome de *Guillain Barré*. Diante deste quadro, o desenvolvimento de estratégias vacinais capazes de conter a disseminação viral é uma prioridade de saúde pública. Sabe-se que as proteínas de superfície do vírus (Envelope – E e Pré - Membrana/Membrana – prM/M) são as mais antigênicas e indicadas como melhores candidatas à imunização. Desta forma, o nosso grupo de pesquisa desenhou formulações vacinais de DNA contra o ZIKV, a qual apresenta os antígenos vacinais de prM/M-E fusionados a adjuvantes moleculares visando potencializar as respostas celulares e humorais. As regiões do vírus relacionadas ao ancoramento à membrana celular foram retiradas das sequências finais contidas no plasmídeo. Portanto, nós hipotetizamos que formulações vacinais de DNA associadas a adjuvantes moleculares promovem aumento da expressão dos antígenos do vírus Zika *in vitro*. Os resultados da primeira geração da vacina desenvolvida, p43.2 ZIKV/-C-prM/M-E-LAMP, mostraram que esta vacina expressa os antígenos virais em baixas concentrações quando avaliadas por imunofluorescência em células de mamíferos. Partindo disto, foram desenvolvidas novas formulações vacinais, inseridas no vetor de expressão pcDNA3.1, com substituições do peptídeo sinal da proteína nativa (C- terminal do Capsídeo de ZIKV) pelo peptídeo sinal da proteína do ativador de plasminogênio tecidual (SP-tPA), adição da sequência consenso Kozak, deleção da região Stem (Haste, tradução do inglês) e Transmembrana (TM), e adição ou remoção da proteína LAMP, denominadas neste trabalho como segunda geração de vacinas. Estas vacinas, foram avaliadas em células de camundongo, BHK-21, quanto aos níveis de expressão das proteínas prM/M-E por ELISA baseado em células e o tráfego celular destes antígenos foram observados por imunofluorescência, com auxílio do microscópio Leica *DMi8*. A vacina pCDNA3.1 ZIKVEΔSTEM obteve os melhores resultados quanto à expressão das proteínas virais de ZIKV e portanto, esta vacina prosseguiu para testes pré-clínicos (*in vivo*, em camundongos), em colaboração com o grupo da Dr^a Maria Sato (USP), a fim de validar os efeitos protetores desta formulação.

Introdução

Os primeiros casos no Brasil de infecção pelo vírus Zika (*Zika virus* – ZIKV) foram registrados em dezembro de 2014, e desde então este vírus tem sido associado a relatos sem precedentes de distúrbios neurológicos variando desde a síndrome de Guillain Barré à microcefalia (BARRETO; BARRAL-NETTO; STABELI; ALMEIDA-FILHO *et al.*, 2016; BRASIL; CALVET; SIQUEIRA; WAKIMOTO *et al.*, 2016; MARTINES; BHATNAGAR; KEATING; SILVA-FLANNERY *et al.*, 2016). Devido a este impacto nos indivíduos e na sociedade, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou o ZIKV uma emergência de saúde global em fevereiro de 2016 (OMS, 2016).

Desde então, a endemia do ZIKV está presente em países tropicais e subtropicais, e seus relatos ocorrem de forma esporádica, porém, possui potencial de disseminação para novas áreas geográficas como observado com outros arbovírus emergentes, como West Nile (WN) e Chikungunya (CHIKV) (IOOS *et al.*, 2014; DUFFY *et al.*, 2009). No Brasil, por exemplo, até a semana epidemiológica (SE) 21 de 2022, 6 mil novos casos prováveis de Zika foram relatados, correspondendo a um aumento de aproximadamente 200% em relação ao ano anterior (BRASIL, 2022).

Esta disseminação também ocorre devido às diferentes vias de transmissão do ZIKV. Além do mosquito vetor, existe a transmissão materno-fetal, por transfusão sanguínea e através da relação sexual, na qual o sêmen dos homens pode abrigar o ZIKV por vários meses após uma infecção (LESSLER *et al.*, 2016; DRIGGERS *et al.*, 2016; MUSSO *et al.*, 2017).

Diante destas preocupações, o desenvolvimento de estratégias vacinais capazes de conter a propagação desta infecção viral faz-se uma prioridade mundial de saúde pública. No entanto, atualmente não há vacinas profiláticas ou terapêuticas contra infecções por ZIKV disponíveis para uso em humanos (OMS, 2021).

Dentre as estratégias vacinais disponíveis, a utilização de abordagem de entrega de vacinas baseada em genes (DNA) tem sido promissora (TANG, *et al.* 2022; SHAFATI, *et al.* 2022; LIU, *et al.* 2022). Estas vacinas possuem custos baixos de fabricação além de fácil manipulação e reformulação do antígeno e são estáveis à temperatura ambiente (DOWD, 2016; LUNARDELLI *et al.* 2020; SABBAGHI, 2021; HARVEY, CARABELLI, JACKSON, *et al.* 2021).

Estudos recentemente publicados têm descrito uma formulação vacinal de DNA expressando a sequência completa das proteínas de pré-membrana, membrana e envelope (prM/M-E) selvagem do ZIKV capaz de induzir proteção de curta duração em modelo de camundongo após desafio com o vírus (YANG *et al.*, 2016; SUN *et al.*, 2022; ZHOU *et al.* 2021; LÓPEZ-CAMACHO *et al.* 2017; IN, 2020). Contudo, as vacinas descritas não demonstraram a indução de resposta protetora de longa duração, proteção do feto em modelo de camundongo durante o período gestacional ou proteção contra o desenvolvimento de complicações neurológicas.

Diante deste cenário, nosso grupo desenvolveu vacinas de DNA contra ZIKV. A primeira geração da vacina deste presente estudo, consiste no vetor p43.2

codificando para a porção C-terminal da proteína do capsídeo (C), e para as proteínas completas prM/M e E sem o domínio de transmembrana ((Δ -Deleção) TM) de ZIKV fusionadas à proteína de associação à membrana lisossomal (*lysosome associated membrane protein* – LAMP), resultando na construção chamada ZIKV-C-prM/M-E- Δ TM/LAMP. A seleção dos antígenos foi baseada em estudos mostrando que a co-expressão das proteínas prM/M e E induz a geração de anticorpos neutralizantes contra outros Flavivírus (YANG *et al.*, 2016; SUN *et al.*, 2022; ZHOU *et al.* 2021). Além disso, a fusão das proteínas virais à proteína LAMP visa à expressão eficiente dos antígenos vacinais em células de humanos e o seu direcionamento ao MHC ((compartimento do complexo principal de histocompatibilidade II (MHC II) – *MHC class II compartment*). Desta forma, as proteínas virais processadas e posteriormente apresentadas por moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (*major complex of histocompatibility* – MHC) de classe II (MHC II) conseguem induzir robusta resposta auxiliar de linfócitos T CD4⁺ e resultar na geração de resposta humoral protetora (TEIXEIRA *et al.*, 2022; SUN *et al.* 2022).

Testes *in vitro* realizados neste trabalho para a vacina ZIKV-C-prM/M-E- Δ TM/LAMP comprovaram a expressão das proteínas prM/M-E no citoplasma de células de mamíferos. No entanto, em colaboração, o grupo da Doutora Maria Sato (USP) realizou testes *in vivo* e os resultados obtidos demonstraram que esta vacina induziu baixa imunogenicidade. Ante o exposto, nós hipotetizamos que a baixa imunogenicidade desta vacina está relacionada à escolha das sequência das proteínas virais de ZIKV, que continham regiões de ancoramento à membrana celular, assim como, o papel do adjuvante molecular LAMP que também estava mantendo as proteínas presas à membrana celular, portanto, dificultando a apresentação antigênica das proteínas virais processadas de prM/M-E.

Com base nisto, quatro novas formulações vacinais foram desenvolvidas, denominadas neste trabalho como: segunda geração de vacinas de DNA. Estas formulações foram inseridas no vetor pcDNA3.1 codificando para a proteína de Ativador do Plasminogênio Tecidual (tPA-SP), utilizada como peptídeo sinal para o retículo endoplasmático (RE), para a sequência consenso Kozak, para as proteínas completas de prM/M, para a proteína E com ou sem a região Stem (“Haste” - Tradução livre do inglês) e com ou sem a região TM, e fusionadas, ou não à proteína LAMP, resultando nas seguintes construções: ZIKV-tPA-prM/M-E- Δ STEM-LAMP (proteínas virais com deleção da região Stem fusionadas ao LAMP), ZIKV-tPA-prM/M-E Δ STEM (deleção da região Stem sem o LAMP), ZIKV-tPA-prM/M-E- Δ TM (proteínas virais com deleção da região TM sem o LAMP), e ZIKV-tPA-prM/M-E Δ TM-LAMP (proteínas virais com deleção da região TM fusionadas ao LAMP).

Para imunogenicidade e eficácia vacinais satisfatórias, tanto a expressão eficiente de um antígeno quanto a manutenção de sua conformação natural são necessárias (KOU *et al.* 2017; WANG *et al.* 2011; LUO *et al.* 2008; LI *et al.* 2020). Desta forma, o SP (Peptídeo sinal) da proteína tPA foi usada nas formulações vacinais da segunda geração como uma adjuvante molecular, com o intuito de conduzir as proteínas alvo na via de secreção celular (KOU *et al.* 2017; WANG *et al.* 2011; LUO *et al.* 2008; LI *et al.* 2020).

Portanto, neste presente trabalho foi hipotetizado que existe o aumento nos níveis de expressão das proteínas virais *in vitro*, dos candidatos a vacinas de DNA baseados nos genes E e prM/M do ZIKV, quando adjuvantes moleculares são adicionados nestas sequências. Para testar nossa hipótese, nós utilizamos técnicas de imunofluorescência e Elisa baseadas em células para comprovar a expressão destas proteínas em células de mamíferos. Após a otimização das sequências vacinais, a vacina ZIKV-tPA-prM/M-E Δ STEM, quando avaliada por estas técnicas, conseguiu expressar em maior quantidade as proteínas virais. Tendo em vista os dados obtidos *in vitro* neste trabalho, a vacina ZIKV-tPA-prM/M-E Δ STEM seguiu para testes *in vivo*, para analisar seu potencial quanto a imunogenicidade causado pela vacinação.

Resultados e Discussão

Desde 2015, o surgimento da transmissão epidêmica do ZIKV tem preocupado à comunidade global, pois, este vírus está associado a relatos de distúrbios neurológicos graves como a síndrome de Guillain-Barré e malformações congênitas como microcefalia (CDC, 2019; OMS, 2016; CASTANHA e MARQUES, 2020). Atualmente não existem vacinas profiláticas contra o vírus. Nesta perspectiva, desenvolvemos vacinas de DNA contra o ZIKV utilizando suas proteínas de E e prM/M e adicionados à sequência, adjuvantes moleculares visando a apresentação correta e secreção dos antígenos virais codificados (Figura 01).

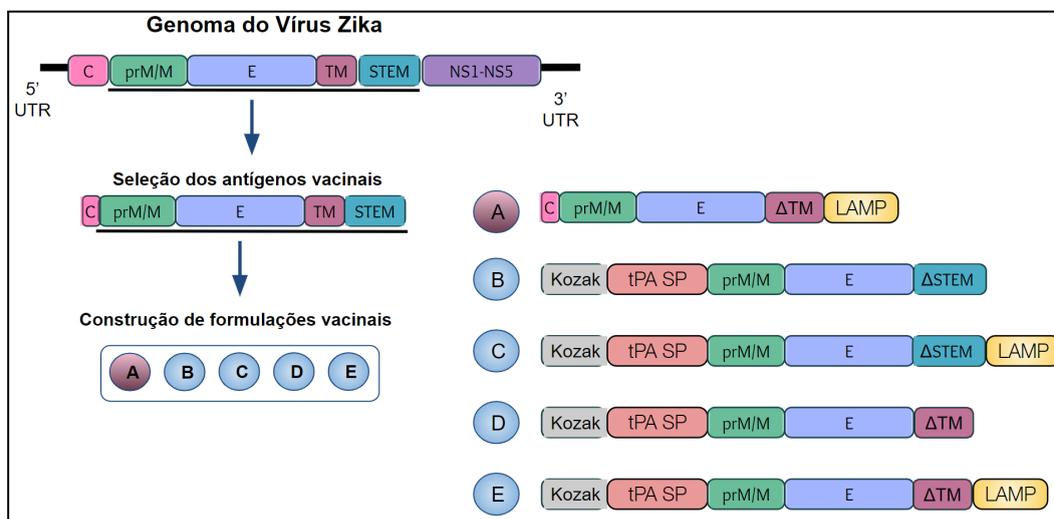


Figura 01: Representação esquemática da escolha dos antígenos vacinais. Cinco formulações vacinais foram desenvolvidas. A- Indica a vacina da primeira geração. B, C, D e E- Indicam quatro formulações da segunda geração.

Fonte: O autor.

A primeira geração da vacina desenvolvida neste trabalho foi baseada no eficiente desempenho de uma vacina de DNA contra Febre Amarela (pL/YFV). Esta vacina, descreve a expressão da sequência prM/M-E de YFV clonada

in-frame com a sequência LAMP. Essa abordagem mostrou que as proteínas virais, impulsionada pela sequência citoplasmática de LAMP, foram direcionadas para compartimentos intracelulares ricos em MHC de classe II (MACIEL et al. 2015). Neste trabalho, a vacina pL/YFV foi utilizada como controle positivo dos experimentos de imunofluorescência em células HEK 293T (Figura 02, C).

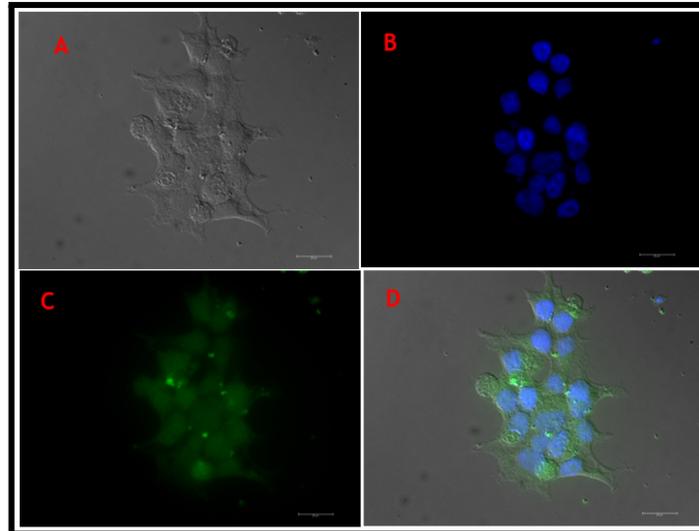


Figura 02. Microscopia confocal observando a expressão das proteínas de Febre Amarela em células HEK-293T. Imunofluorescência de células HEK-293T transfectadas com 4 μ g do vetor pL/YFV. A lâmina foi visualizada no microscópio Leica *DMi8* com a objetiva 63X com imersão em óleo. **A** - Imagem sem filtro observando a morfologia celular. **B** - A coloração azul indica o núcleo celular marcado com o DAPI sobre a luz ultravioleta com filtro DAPI. **C** - A coloração em verde indica a expressão das proteínas de Febre Amarela em todo o citoplasma celular, utilizando o filtro de cor FITC. **D** - Superposição entre as imagens A, B e C.

Fonte: O autor

Portanto, esperou-se que a vacina ZIKV/C-prM/M-E Δ TM-LAMP conseguisse ter expressões das proteínas codificadas semelhante aos resultados da vacina pL/YFV. Quando observados a expressão dos antígenos em compartimentos celulares através da técnica de imunofluorescência, em células HEK-293T, a vacina ZIKV/C-prM/M-E Δ TM-LAMP conseguiu expressar as proteínas virais com menor intensidade quando comparadas a pL/YFV (Figura 03).

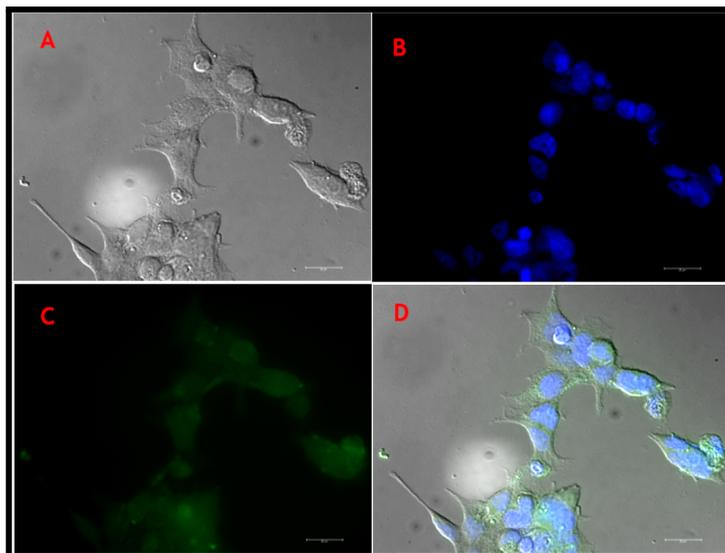


Figura 03. Microscopia confocal observando a expressão das proteínas de Zika em células HEK-293T. Imunofluorescência de células HEK-293T transfectadas com 4 μg do vetor p43.2 ZIKV/-C-prM/M-E-LAMP. A lâmina foi visualizada no microscópio Leica *DMi8* com a objetiva 63X com imersão em óleo. **A** - Imagem sem filtro observando a morfologia celular. **B** - A coloração azul indica o núcleo celular marcado com o DAPI sobre a luz ultravioleta com filtro DAPI. **C** - A coloração em verde indica a expressão das proteínas de Zika em todo o citoplasma celular, utilizando o filtro de cor FITC. **D** - Superposição entre as imagens A, B e C.

Fonte: O autor

Ainda, ensaios pré-clínicos em camundongos, realizados em colaboração com o grupo da Dr^a Maria Sato (USP), mostraram a baixa imunogenicidade desta vacina, e estes resultados corroboram com os nossos achados *in vitro*. Deste modo, nós hipotetizamos que esta baixa expressão das proteínas prM/M-E está relacionada à escolha das sequência das proteínas virais de ZIKV, que continham regiões de ancoramento à membrana celular, assim como, o papel do adjuvante LAMP que estava mantendo as proteínas presas à membrana celular, portanto, dificultando a apresentação antigênica das proteínas virais processadas. Tendo em vista que vacinas de DNA, em alguns casos, possuem baixa imunogenicidade, e com base nos resultados obtidos com a primeira geração da vacina desenvolvida neste trabalho, nós decidimos modificar a sequência vacinal, tendo como finalidade aumentar os níveis de expressão das proteínas virais prM/M-E de ZIKV.

As principais mudanças aplicadas nas sequências vacinais da segunda geração deste trabalho foram: (i) adição da sequência consenso Kozak; (ii) substituição do peptídeo sinal nativo pela sequência líder heteróloga SP-tPA; (iii) deleção do domínio Stem do ZIKV; (iv) testar o efeito da adição ou remoção da sequência LAMP. A expressão melhorada das proteínas virais é de fundamental importância para obter uma imunogenicidade eficaz, efeitos positivos foram vistos em vacinas de DNA que optaram por incluir a sequência Kozak em suas construções, observando uma melhora na eficiência da tradução, portanto, a expressão geral

do produto gênico (Ólafsdóttir, G et al. 2008; Muthumani K et al. 2008; GEORGE et al. 2021). Além disso, a secreção das proteínas é um componente crítico da resposta imune inata (RAVINDRAN et al. 2016). Para isso, o peptídeo sinal da proteína tPA é comumente utilizada por vacinas de DNA para direcionar as proteínas virais sintetizadas através do retículo endoplasmático, e do aparelho de Golgi para as vesículas, que se fundem com a membrana plasmática e as secretam no espaço extracelular (LI, Anzhong et al. 2020; LI, Zhongming et al. 1999; HANIF, S et al. 2010; PÉREZ-VÉLEZ, et al. 2009). O domínio da região Stem e Transmembrana da proteína do E, estão envolvidos no ancoramento do vírus à membrana plasmática e auxiliam nas mudanças das conformações estruturais desta proteína. Vacinas contra o ZIKV demonstraram que a presença destes domínios do E prejudica a produção de anticorpos induzidos por vetores vacinais (LÓPEZ-CAMACHO et al. 2017; LAROCCA et al. 2016; ABBINK et al. 2016). A vacina ChAdOx1 ZIKV prME Δ TM, por exemplo, conseguiu induzir anticorpos anti-E significativamente maiores quando comparados com a vacina equivalente ChAdOx1 prME. Achados semelhantes foram observados na vacina ChAdOx1 Env Δ TM com maior atividade de ligação de anticorpos ao envelope ZIKV quando comparado ao ChAdOx1 Env (LÓPEZ-CAMACHO et al. 2017).

Quatro diferentes vacinas de DNA desenvolvidas da segunda geração deste projeto, foram comparadas quanto à sua capacidade de conduzir altos níveis de expressão das proteínas virais inseridas na sequência gênica em testes *in vitro*. Estas vacinas demonstraram expressar homoganeamente os antígenos virais no citoplasma de células BHK-21, quando avaliadas por imunofluorescência nas figuras 04C, 05C, 06C e 07C.

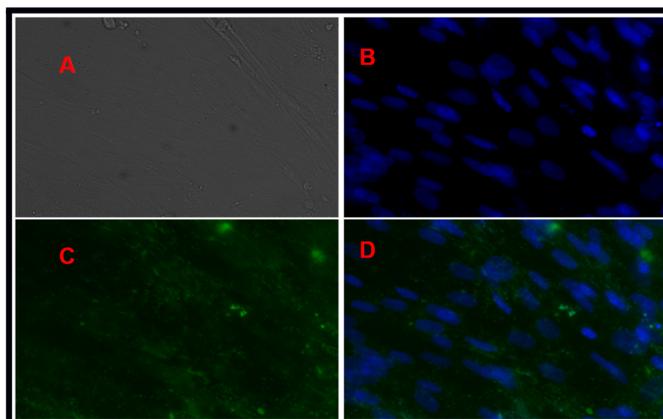


Figura 04. Microscopia confocal observando a expressão das proteínas de prM/M-E em células BHK-21 após transfecção com ZIKV Δ STEM. Imunofluorescência de células BHK-21 transfetadas com 0.8 μ g do vetor pcDNA3.1 ZIKV Δ STEM. A lâmina foi visualizada no microscópio Leica *DMi8* com a objetiva 63X com imersão em óleo. **A** - Imagem sem filtro observando a morfologia celular. **B** - A coloração azul indica o núcleo celular marcado com o DAPI sobre a luz ultravioleta com filtro DAPI. **C** - A coloração em verde indica a expressão das proteínas de Febre Amarela em todo o citoplasma celular, utilizando o filtro de cor FITC. **D** - Superposição entre as imagens A, B e C.

Fonte: O autor

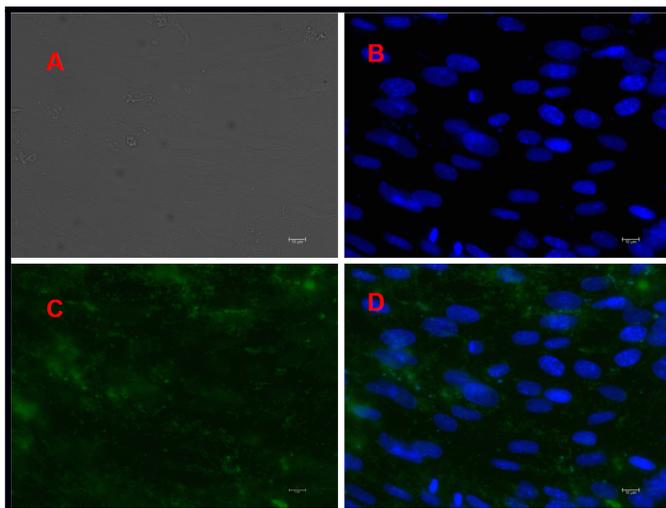


Figura 05. Microscopia confocal observando a expressão das proteínas de prM/M-E em células BHK-21 após transfecção com ZIKV Δ STEM/LAMP. Imunofluorescência de células BHK-21 transfectadas com 0.8 μ g do vetor pcDNA3.1 ZIKV Δ STEM/LAMP. A lâmina foi visualizada no microscópio Leica *DMi8* com a objetiva 63X com imersão em óleo. **A** - Imagem sem filtro observando a morfologia celular. **B** - A coloração azul indica o núcleo celular marcado com o DAPI sobre a luz ultravioleta com filtro DAPI. **C** - A coloração em verde indica a expressão das proteínas de Febre Amarela em todo o citoplasma celular, utilizando o filtro de cor FITC. **D** - Superposição entre as imagens A, B e C.

Fonte: O autor

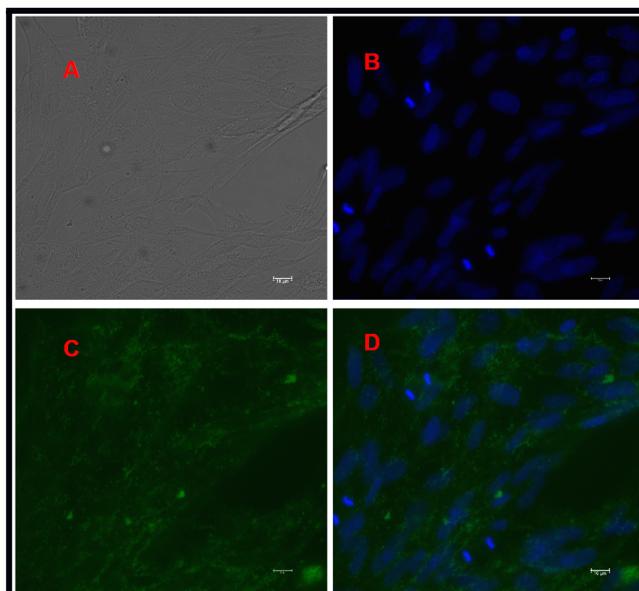


Figura 06. Microscopia confocal observando a expressão das proteínas de prM/M-E em células BHK-21 após transfecção com ZIKV Δ TM. Imunofluorescência de células BHK-21 transfectadas com 0.8 μ g do vetor pcDNA3.1 ZIKV Δ TM. A lâmina foi visualizada no microscópio Leica *DMi8* com a objetiva 63X com imersão em óleo. **A** - Imagem sem filtro observando a

morfologia celular. **B** - A coloração azul indica o núcleo celular marcado com o DAPI sobre a luz ultravioleta com filtro DAPI. **C** - A coloração em verde indica a expressão das proteínas de Febre Amarela em todo o citoplasma celular, utilizando o filtro de cor FITC. **D** - Superposição entre as imagens A, B e C.

Fonte: O autor

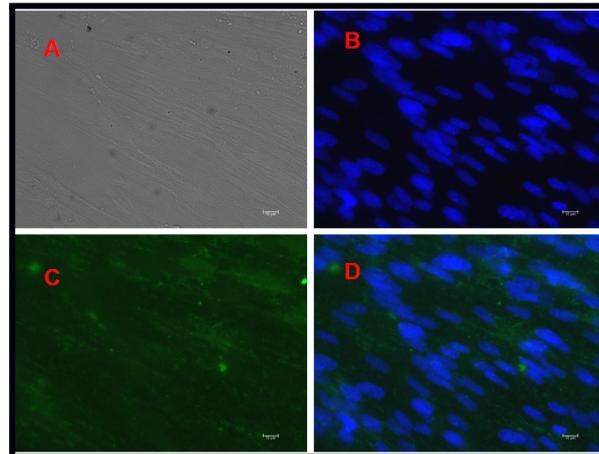


Figura 07. Microscopia confocal observando a expressão das proteínas de prM/M-E em células BHK-21 após transfecção com ZIKV Δ TM/LAMP. Imunofluorescência de células BHK-21 transfectadas com 0.8 μ g do vetor pcDNA3.1 ZIKV Δ TM/LAMP. A lâmina foi visualizada no microscópio Leica *DMi8* com a objetiva 63X com imersão em óleo. **A** - Imagem sem filtro observando a morfologia celular. **B** - A coloração azul indica o núcleo celular marcado com o DAPI sobre a luz ultravioleta com filtro DAPI. **C** - A coloração em verde indica a expressão das proteínas de Febre Amarela em todo o citoplasma celular, utilizando o filtro de cor FITC. **D** - Superposição entre as imagens A, B e C.

Fonte: O autor

Com o intuito de analisar quantitativamente a expressão das proteínas vacinais em células, um novo protocolo de ELISA baseado em células foi estabelecido. Para validar o protocolo, foram realizadas transfecções com a vacina ZIKV Δ STEM em placas de 96 poços contendo $0,5 \times 10^5$ de células BHK 21 ou Vero. Estas células foram transfectadas com diferentes concentrações de DNA e do agente de transfecção, assim como o tempo de contato com a mistura da transfecção. Como prova de conceito, foi demonstrado neste ensaio a capacidade de detectar a expressão das proteínas virais por ligações específicas de anticorpos de um pool de soro de pacientes humanos positivos somente para ZIKV (Figura 08A e 08B).

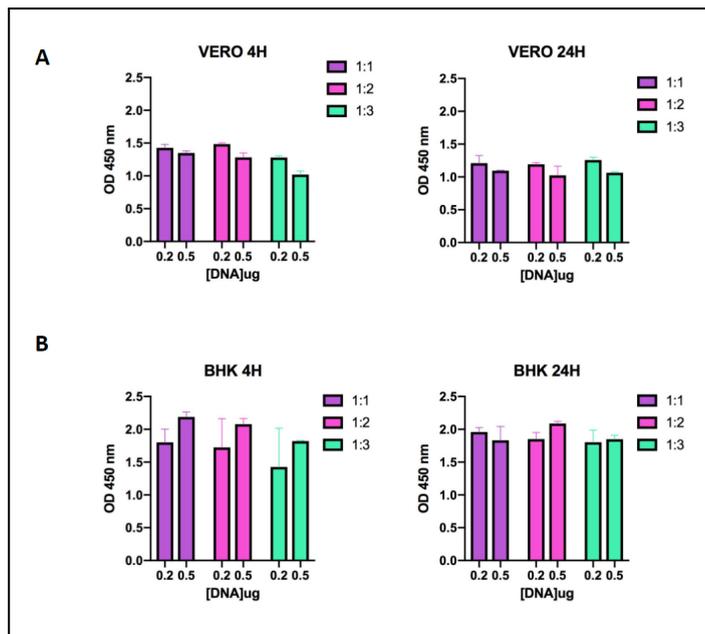


Figura 08. Padronização do ensaio de ELISA baseado em células utilizando a vacina pcDNA3.1 ZIKVΔSTEM. Diferentes concentrações de DNA foram utilizadas para transfectar células BHK 21 e Vero, variando de 0,2 µg a 0,5 µg. O agente de transfecção Lipofectamina 2000 também teve sua concentração variada, onde 1:1 (0,2 µg ou 0,5 µg de DNA para 0,5 µL de Lipofectamina 2000), 1:2 (0,2 µg ou 0,5 µg de DNA para 1 µL de Lipofectamina 2000) e 1:3 (0,2 µg ou 1,5 µg de DNA para 0,5 µL de Lipofectamina 2000). O tempo de contato do mix (DNA + Lipofectamina 2000) também foi avaliado. Após incubação das placas com o pool de soro positivo e diluídas 1:50, a interação proteína-anticorpo foi detectada através da incubação com anticorpo anti-IgG humano marcado com peroxidase na diluição 1:20.000. A DO resultante foi detectada em leitor de ELISA apropriado à 450 nm. Os valores mostrados correspondem à média e correspondente desvio padrão. Gráfico preparado com o programa GraphPad Prism 7.0 para Mac OS.

Fonte: O autor

Diante dos resultados mostrados na Figura 08 a detecção da expressão das proteínas vacinais foi ligeiramente maior em placas revestidas com células BHK 21, o que sugere uma maior sensibilidade do ensaio utilizando esta linhagem celular (Figura 08B). Além disso, as vacinas são posteriormente avaliadas *in vivo*, por colaboradores, em camundongos e por se tratar de células da mesma espécie, facilita a comparação em níveis de expressão das proteínas virais.

Considerando as condições previamente estabelecidas, um ensaio de ELISA baseado em células foi projetado, com o objetivo de avaliar quantitativamente a expressão das proteínas codificadas nos plasmídeos das quatro formulações vacinais da segunda geração (Figura 09). Nota-se que existe interação do anticorpo monoclonal 4G2 com as proteínas expressas, das quatro vacinas propostas, após a transfecção. A vacina de Febre Amarela (pL/YFV) foi utilizada como controle positivo de expressão.

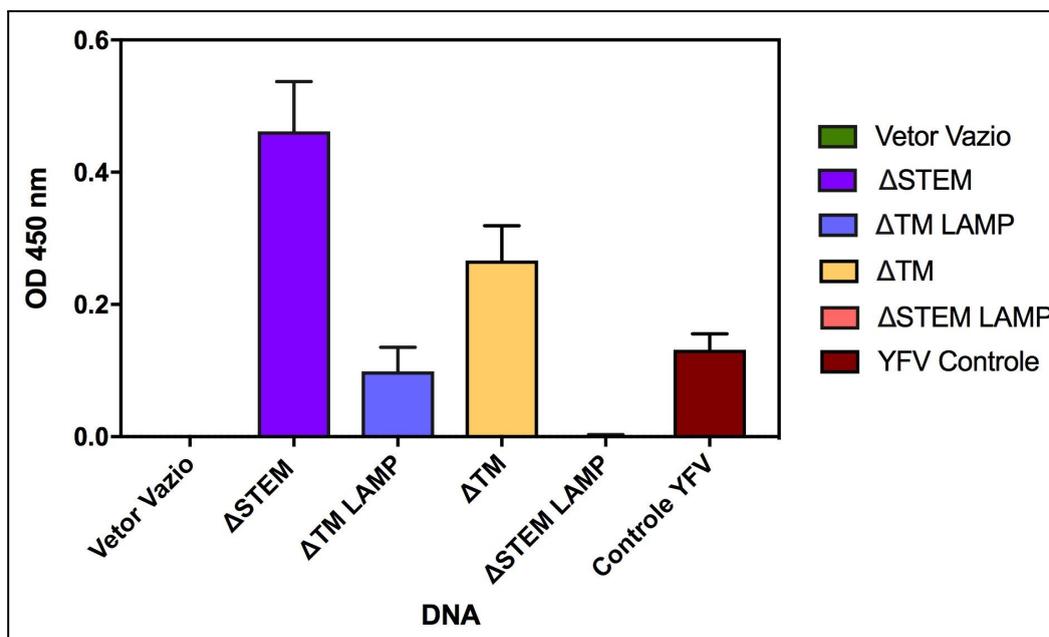


Figura 09. Expressão das proteínas virais da segunda geração das vacinas medidas por ELISA baseado em células. Células BHK 21 foram transfectadas com 0.2 µg de cada DNA e 0.5 µL de Lipofectamina 2000, submetidas após a in-Cell ELISA. Após incubação das placas com o anticorpo monoclonal 4G2 e diluídas 1:1000, a interação proteína-anticorpo foi detectada através da incubação com anticorpo anti-IgG camundongo marcado com peroxidase na diluição 1:2.500. A DO resultante foi detectada em leitor de ELISA apropriado à 450 nm. Os valores mostrados correspondem à média e correspondente desvio padrão. Gráfico preparado com o programa GraphPad Prism 7.0 para Mac OS.

Fonte: O autor

Dentre as formulações vacinais presentes neste trabalho, as vacinas ZIKVΔSTEM e ZIKVEΔTM obtiveram os melhores níveis de expressão das proteínas virais quando avaliados por ELISA baseado em células, mostrando que a deleção dos domínios Stem e TM, a utilização da sequência consenso Kozak e o peptídeo sinal tPA impulsionam a expressão das proteínas de prM/M-E, corroborando com outros estudos citados (Figura 09). Além disso, este resultado mostrou que a expressão das proteínas prM/M-E é superior quando ocorre deleção da região Stem quando comparada com a deleção da região TM. Este mesmo efeito foi relatado em uma vacina de DNA contra ZIKV, EΔSTEM (IN, 2020). Neste estudo, seis vacinas de DNA foram desenvolvidas e avaliadas *in vitro* e *in vivo*. Células Vero transfectadas com o EΔSTEM mostraram uma maior expressão da proteína E quando comparadas com as outras vacinas, incluindo EΔTM. Além disso, camundongos imunizados com a vacina EΔSTEM, tiveram produção robusta de IFN-γ e proteção eficaz contra o vírus Zika (IN, 2020).

Por outro lado, as vacinas de segunda geração deste trabalho, que possuíam a sequência LAMP, ZIKVEΔTM/LAMP e ZIKVEΔSTEM/LAMP obtiveram os menores valores de expressão. Este resultado demonstrou que o efeito de secreção de proteínas do tPA-SP contida nestes plasmídeos teve efeito antagonico com a função da proteína LAMP, que visa expor as proteínas virais

processadas, através do ancoramento delas à membrana plasmática.

Estes passos iniciais, voltados principalmente em compreender como melhorar a imunogenicidade de vacinas de DNA, têm tido importância no cenário mundial para a vacinação e o conhecimento (função e estrutura) quanto às proteínas do agente infeccioso e aplicação biológica de adjuvantes em plasmídeos vacinais, podem solucionar esta baixa imunogenicidade. A vacina aqui descrita como ZIKV Δ STEM, conseguiu apresentar os melhores resultados de expressão das proteínas prM/M-E do ZIKV e estes resultados, no que lhe concerne, nos impulsionaram a prosseguir com testes pré-clínicos em animais, que está sendo validada pelo grupo colaborador da Dr^a Maria Sato (USP).

Conclusões

I) Adjuvantes moleculares inseridos nas sequências vacinais, são essenciais para obter melhores níveis de expressão de proteínas.

II) A deleção dos domínios de Transmembrana e Stem da proteína do Envelope do ZIKV são importantes para a expressão melhorada das proteínas prM/M-E facilitando o reconhecimento de anticorpos anti-E.

III) Os baixos níveis de expressão das proteínas prM/M-E, com a vacina de primeira geração, ZIKV/C-prM/M-E Δ TM-LAMP, ocorre devido ao ancoramento das proteínas processadas na membrana citoplasmática.

IV) O efeito de secreção guiada pelo peptídeo sinal da proteína tPA ao retículo endoplasmático aumentou a expressão das proteínas virais *in vitro*, favorecendo sua imunogenicidade.

V) Um novo método de ELISA baseado em células foi desenvolvido e é eficaz em quantificar a expressão das proteínas de prM/M-E após transfecções em células BHK 21 e Vero.

VI) As vacinas da segunda geração, sem a presença da proteína LAMP em suas formulações, demonstraram os melhores resultados de expressão das proteínas de prM/E.

VII) A vacina ZIKVE Δ STEM é a melhor candidata para seguir em testes *in vivo* por apresentar os melhores resultados de expressão das proteínas vacinais, neste trabalho.

Metodologia

Desenho dos plasmídeos vacinas contra ZIKV

Os genes que codificam para as proteínas pré-Membrana, Membrana, Envelope e a região N-Terminal do Capsídeo (cepa ZikaSPH2015) do ZIKV foram obtidos no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). As sequências de regiões relacionadas ao ancoramento das proteínas virais à membrana da célula foram removidas das vacinas (O domínio Stem e o domínio de transmembrana). Para a primeira geração de vacinas, a região C-terminal da proteína do Capsídeo foi mantida servindo como peptídeo sinal (nativo) ao retículo endoplasmático (Tabela 1). A região de transmembrana (TM) da proteína E do vírus foi removida da sequência final e fusionada à proteína LAMP. Estas sequências foram inseridas no vetor de expressão p43.2, construindo então o plasmídeo p43.2 ZIKV/C-prM/M-E Δ TM-LAMP (Figura 01 A). Diante dos resultados dos testes *in vivo*, feito por colaboradores, novas sequências vacinais foram desenvolvidas e denominadas neste trabalho como a segunda geração de vacinas (Tabela 1). As vacinas da segunda geração foram inseridas no vetor de expressão pcDNA3.1 e são compostas pelo fragmento de consenso Kozak e peptídeo sinal para o retículo endoplasmático tPA_SP. A Sequência pcDNA3.1 ZIKV/-tPA-prM/M-E- Δ STEM-LAMP contém os genes que codificam as proteínas virais com remoção da região Stem e associadas à proteína LAMP (Figura 01, B). A Sequência pcDNA3.1 ZIKV/-tPA-prM/M-E- Δ STEM contém os genes que codificam as proteínas virais com remoção da região Stem (Figura 01, C). A Sequência pcDNA3.1 ZIKV/-tPA-prM/M-E Δ TM contém os genes que codificam as proteínas virais com remoção da região de TM (Figura 01, D). A Sequência pcDNA3.1 ZIKV/-tPA-prM/M-E Δ TM-LAMP contém os genes que codificam as proteínas virais com remoção da região TM e associadas à proteína LAMP (Figura 01, E). Os plasmídeos foram transformados em bactérias DH5 α de *Escherichia coli* (Invitrogen, Carlsbad, CA) e amplificados através de pequena, média e larga escala (QIAGEN®).

Plasmídeo	Sequências dos antígenos de ZIKV	Adjuvantes	Nome dado neste trabalho	Geração da vacina
p43.2	SP-C-prM/M-EΔTM	LAMP	ZIKV/C-prM/M-EΔTM /LAMP	Primeira
pcDNA3.1	prM/M-EΔSTEM	SP-tPA	ZIKVΔSTEM	Segunda
pcDNA3.1	prM/M-EΔSTEM	SP-tPA e LAMP	ZIKVΔSTEM/LAMP	Segunda
pcDNA3.1	prM/M-EΔTM	SP-tPA	ZIKVΔTM	Segunda
pcDNA3.1	prM/M-EΔTM	SP-tPA e LAMP	ZIKVΔTM/LAMP	Segunda

Tabela 1: Vacinas da primeira e segunda geração e seus componentes. Os plasmídeos vacinais foram sintetizados e clonados diretamente no vetor de expressão de interesse (p43.2 e pcDNA3.1, Novagen).

Fonte: o autor.

Transformação bacteriana por choque térmico

Vinte microlitros (20 µL) de bactérias competentes *E. coli* das cepas DH5α (Invitrogen) foram transformadas com 1 µg de DNA correspondente aos plasmídeos desenhados para clonagem e expressão procariótica codificando para as proteínas quiméricas. O procedimento consistiu na incubação das células em gelo por 30 min (minutos), seguido de choque térmico a 42 °C por 2 min, etapa na qual ocorre a entrada do DNA alvo nas células bacterianas. Após o choque térmico, as bactérias foram incubadas à 37 °C, 1 h, 225 rpm (rotações por minuto) e transferidas para placa de cultura contendo meio LB (Luria-Bertani) e ágar, suplementado com 100 µg/mL ampicilina (LB-AMP). As placas foram, por sua vez, incubadas à 37 °C por 16h, para a verificação do crescimento das colônias contendo os plasmídeos de interesse.

Preparação do DNA (em pequena, média e larga escala)

Uma colônia bacteriana contendo o DNA plasmidial de interesse foi inoculada em 5 mL (para preparação em pequena escala), 50 mL (para preparação em média escala) ou 100 mL (para preparação em larga 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®), QIAprep Spin Midiprep Kit (QIAGEN®) e Gigaprep endotoxin-free plasmid DNA purification (QIAGEN®) de acordo com as recomendações do fabricante.

Eletroforese de DNA em gel de agarose

Nesta etapa, 1 µg de DNA foi migrado em gel de 1% agarose preparado em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) suplementado com Sybr Green (Thermo Fisher) e posteriormente, o gel foi submetido a uma corrente elétrica constante de 150 V. 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).

Cultivo de Células HEK 293-T, BHK-21 e Vero

As células HEK-293T, BHK-21 e Vero foram mantidas em garrafas T75 ou T125 em estufas a 37°C e 5% CO₂, contendo meio DMEM suplementado com SFB a 10% e antibióticos.

Transfecção dos plasmídeos em células HEK-293T, BHK-21 e Vero

As células HEK-293T (1x10⁶ células por poço) e BHK-21 (1,5x10⁵ células por poço) foram distribuídas em placas de 6 e 24 poços respectivamente contendo lamínulas, e células BHK-21 e Vero foram distribuídas em placas de 96 (0,5x10⁵ células por poço) poços em meio DMEM (GIBCO, Carlsbad, CA, EUA), Soro Fetal Bovino a 10%, PenStrep a 50µg/mL (Sigma) e incubadas a 37°C e 5% CO₂ por 24h. Após atingir a confluência de 70-90% das culturas, as células foram submetidas a transfecção por lipofecção, com meio Opti-Mem por 48h a 37°C e 5% CO₂, utilizando o reagente de transfecção Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) com os plasmídeos vacinais e os controles (Tabela 2). Como controle positivo de transfecção, o plasmídeo p43.2-eGFP foi utilizado. Foi utilizada como controle

positivo dos experimentos, a vacina de DNA que codifica as proteínas de Febre Amarela (pL/YFV), gentilmente cedidas pelo Dr. Rafael Dhalia do Departamento de Virologia, Fiocruz-IAM, além do vetor vazio pcDNA3.1 e p43.2. Como controle negativo foram utilizadas células HEK-293, BHK-21 e Vero não transfectadas.

Placa de Cultura	Mix (DNA + Lipofectamina)		Transfecção do DNA (Quantidade)	
	Volume total do meio	Volume da Diluição	DNA	Lipofectamina 2000
96 poços	100 µl	2 x 25 µl	0,2 µg	0,5 µl
24 poços	500 µl	2 x 50 µl	0,8 µg	1,0 µl
6 poços	2.5 ml	2 x 250 µl	4,0 µg	2,5 µl

Tabela 2: Transfecção dos plasmídeos vacinais e controles por lipofecção.

Fonte: o autor.

Imunofluorescência

Células HEK-293T (1×10^6 células por poço) e Células BHK-21 (1×10^5 células por poço) foram cultivadas em aderência sobre lamínulas e distribuídas em placas de 6 e 24 poços, respectivamente, com meio DMEM (GIBCO, Carlsbad, CA, EUA) e incubadas por 24h à 37°C e 5% CO₂. Posteriormente, as células foram transfectadas com os plasmídeos de interesse, utilizando o protocolo já descrito. Após 48hrs de transfecção, o meio de cultura foi retirado com o auxílio de uma bomba de vácuo e logo após, foi adicionado 1 mL de solução de fixação (PFA - Paraformaldeído 4% diluído em PBS 1X) por 1 hora. Em seguida, as células foram permeabilizadas com (0,1% de Triton 100X diluído em PBS 1X) por 15 min. 300 µL de solução (PBS 1X) foi utilizada para realizar as lavagens das lamínulas três vezes. Para a primeira etapa de bloqueio, foram utilizados 300 µL de cloreto de amônio a 50 mM e incubada por 15 min. A segunda etapa de bloqueio, 300 µL de solução de bloqueio foi usado (BSA 3% diluído em PBS 1X) e incubada por 15 min. As lamínulas foram então incubadas com anticorpo primário monoclonal 4G2 (1:1000 diluído em PBS 1X, Native Antigen) por 2h à temperatura ambiente. Posteriormente, as lamínulas foram incubadas com o anticorpo Anti-mouse IgG conjugado a FITC (1:500 diluído em PBS 1X) por 1h à temperatura ambiente. Para montagem final das lâminas, 7 µL de Prolong Gold

Antifade + DAPI foi posto em lâminas limpas e imediatamente após, cada lamínula foi posta sobre o reagente. Os resultados foram captados com o uso do microscópio Leica *DMi8* com a objetiva 63X com imersão em óleo no Instituto Aggeu Magalhães, Fiocruz-PE.

ELISA baseado em células

Células BHK-21 e Vero ($0,5 \times 10^5$ células por poço) foram distribuídas em placas de 96 poços contendo meio DMEM (GIBCO, Carlsbad, CA, EUA) e incubadas por 24h à 37°C e 5% CO₂. Posteriormente, as células foram transfectadas com os plasmídeos da segunda geração de vacinas, utilizando o protocolo já descrito. Após 48hrs de transfecção, o meio de cultura foi retirado com o auxílio de uma bomba de vácuo e logo após foi adicionado 200 µL de acetona a 80% para fixação. Em seguida, reações inespecíficas foram bloqueadas por 30 min à temperatura ambiente com adição de 300 µL de tampão de ensaio (5% leite, 1X PBS, 0.01% Tween-20). As placas posteriormente foram incubadas com soros de pacientes infectados por ZIKV na diluição de 1:50 ou incubadas com anticorpo primário monoclonal anti-Flavivírus 4G2 1:1000 (produção *in house*) em tampão de ensaio por 2h à temperatura ambiente. Para as etapas de lavagem, 200 µL de tampão de lavagem (T-PBS 1x) foram adicionados por poço, a cada lavagem, por 5 vezes. Os anticorpos anti-Zika interagindo com as células transfectadas com o DNA vacinal foram detectados pela adição de imunoglobulina G de rato anti-IgG humana conjugada à peroxidase (Sigma®) na diluição de 1:20.000 em tampão de ensaio ou imunoglobulina G de rato anti-IgG de camundongo conjugada à peroxidase (Sigma®) por 1h à temperatura ambiente. As reações foram reveladas pela adição de 100 µL do substrato da enzima peroxidase (tetrametilbenzidina – TMB, KPL) por 45 min e sua reação foi parada ao adicionar 100 µL de HCL 1N (Figura 10). A Densidade Óptica (DO) foi determinada à 450 nm em leitor de ELISA (BioRad 2550 Reader EIA®). O painel sorológico utilizado contendo amostras comprovadamente positivas para ZIKV (12 soros) foi disponibilizado pelo biorrepositório de amostras localizado no Departamento de Virologia do IAM/FIOCRUZ, sob coordenação da Dr^a Isabelle Viana. Cada DNA vacinal foi testado em oito réplicas e os valores de Densidade Óptica do branco (células não transfectadas) foram subtraídos de todos os poços anteriormente à análise dos dados.

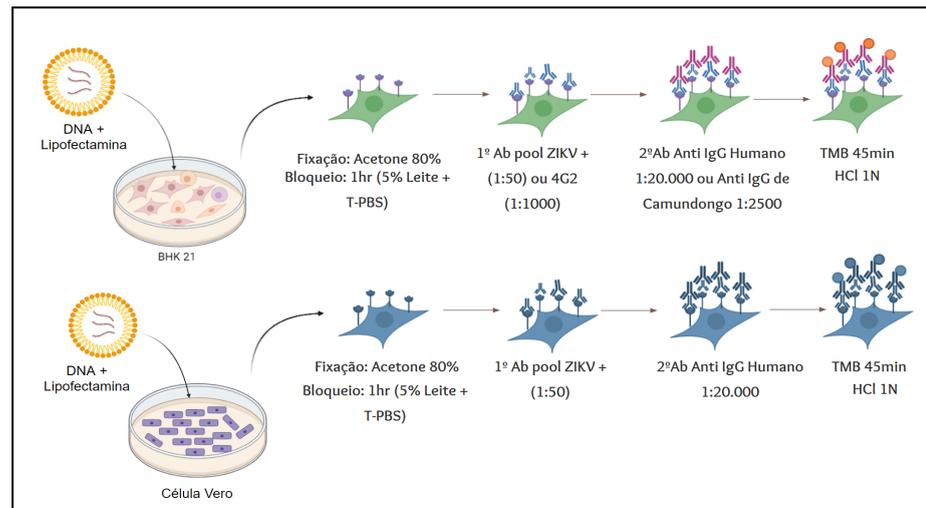


Figura 10: Representação esquemática da técnica de ELISA baseado em células. Células pós transfecção foram submetidas ao protocolo de ELISA baseado em células a fim de detectar a expressão das proteínas vacinais inseridas no plasmídeo de interesse.

Fonte: O autor.

Análise de dados

As análises estatísticas foram feitas através do software GraphPad Prism 7 Mac OS. Os valores mostrados nos gráficos correspondem à média das amostras e seu desvio padrão.

Referências

A.N. ZELENSKY, J.E. GREASY. The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J.*, 272 (2005), pp. 6179-6217, 10.1111/j.1742-4658.2005.05031.x

ABBINK, P. et al. Rapid cloning of novel rhesus adenoviral vaccine vectors. *J. Virol.* 92, e01924-17 (2018).. *J. Virol.* 92 , e01924-17 (2018).

ABBINK, P. Zika virus vaccines. *Nat Rev Microbiol* 16, 594–600 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0039-7>

ADRIEN, et al.. Pyridoxal kinase and poly(ADP-ribose) affect the immune microenvironment of locally advanced cancers. *Oncolmmunology*. Volume 10, 2021, Issue 1. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2021.1950954>

ALMERINDA AGRELLI, RONALD RODRIGUES DE MOURA, SERGIO CROVELLA, LUCAS ANDRÉ CAVALCANTI BRANDÃO. ZIKA virus entry mechanisms in human cells. *Infection, Genetics and Evolution*, Volume 69, 2019, Pages 22-29, ISSN 1567-1348, <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.01.018>

AUBRY F, et al. Recent African strains of Zika virus display higher transmissibility and fetal pathogenicity than Asian strains. *Nat Commun.* 2021 Feb 10;12(1):916. doi: 10.1038/s41467-021-21199-z.

B DE SAINT-VIS, et al. A Novel Lysosome-Associated Membrane Glycoprotein, DC-LAMP, Induced upon DC Maturation, Is Transiently Expressed in MHC Class II Compartment. *Immunity*, Volume 9, Issue 3, 1998, Pages 325-336, ISSN 1074-7613, [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80615-9](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80615-9).

BABA SS, FAGBAMI AH, OJEH CK. Preliminary studies on the use of solid-phase immunosorbent techniques for the rapid detection of Wesselsbron virus (WSLV) IgM by haemagglutination-inhibition. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 1999 Jan; 22(1):71-9.

BAI, H., et al. Cytoplasmic transport and nuclear import of plasmid DNA. 2017, *Biosci. Rep.* 37: BSR20160616. doi: 10.1042/bsr20160616.

BARRETO, M. L.; BARRAL-NETTO, M.; STABELI, R.; ALMEIDA-FILHO, N. et al. Zika virus and microcephaly in Brazil: a scientific agenda. *Lancet*, 387, n. 10022, p. 919-921, Mar 5 2016.

BEUTLER, B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 430, 257–263, 2004.

BO WHEN, et al. Signal peptide replacements enhance expression and secretion of hepatitis C virus envelope glycoproteins, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, Volume

43, Issue 2, February 2011, Pages 96–102, <https://doi.org/10.1093/abbs/gmq117>

BRASIL, P.; CALVET, G. A.; SIQUEIRA, A. M.; WAKIMOTO, M. et al. Zika Virus Outbreak in Rio de Janeiro, Brazil: Clinical Characterization, Epidemiological and Virological Aspects. *PLoS Negl Trop Dis*, 10, n. 4, p. e0004636, Apr 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico. Monitoramento dos casos de dengue, febre chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 23, Brasília, DF: Ministério da Saúde, v. 23, 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico. Monitoramento integrado de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionados à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas, até a Semana Epidemiológica 45, Brasília, DF: Ministério da Saúde, v. 49, n. 54, 2018.

BURNY, W. et al. Different adjuvants induce common innate pathways that are associated with enhanced adaptive responses against a model antigen in humans. *Front. Immunol.* 8, 943, 2017.

C. CRUZ-OLIVEIRA, et al. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiol. Rev.*, 39 (2015), pp. 155-170, 10.1093/femsre/fuu004

CALABRO, S. et al. Vaccine adjuvants alum and MF59 induce rapid recruitment of neutrophils and monocytes that participate in antigen transport to draining lymph nodes. *Vaccine* 29, 1812–1823 (2011).

CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis*, v. 21, n. 10, p. 1885-6, Oct 2015.

CASILLAS-ITUARTE, N. N. et al. Amino acid polymorphisms in the fibronectin-binding repeats of fibronectin-binding protein A affect bond strength and fibronectin conformation. *J Biol Chem*, 292, n. 21, p. 8797-8810, May 26 2017.

CASKEY, M. et al. Synthetic double-stranded RNA induces innate immune responses similar to a live viral vaccine in humans. *J. Exp. Med.* 208, 2011.

Chapman BS, Thayer RM, Vincent KA, Haigwood NL (1991) Effect of intron A from human cytomegalovirus (Towne) immediate-early gene on heterologous expression in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 2019.

CHEN, H. et al. Immunization with electroporation enhances the protective effect of a DNA vaccine candidate expressing prME antigen against dengue virus serotype 2 infection. *Clin. Immunol.*, 171 (2016), pp. 41-49

CHISTIYAKOV, D., KILLINGSWORTH, M., MYASOEDOVA, V. et al. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Lab Invest* 97, 4–13 (2017).

COELHO, D. F.; FERRAZ, M. V. F.; MARQUES, E. T. A.; LINS, R. D. et al. The influence of biotinylation on the ability of a computer designed protein to detect B-cells producing anti-HIV-1 2F5 antibodies. *J Mol Graph Model*, 93, p. 107442, Aug 27 2019.

COHNEN A, CHIANG SC, STOJANOVIC A et al,. Surface CD107a/LAMP-1 protects natural killer cells from degranulation-associated damage. *Blood* 2013;122:1411–1418.

COMBES, A., CAMOSSETO, V., N'GUESSAN, P. et al. BAD-LAMP controls TLR9 trafficking and signalling in human plasmacytoid dendritic cells. *Nat Commun* 8, 913 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00695-1>

D'ORTENZIO E, et al. Evidence of sexual transmission of Zika virus. *N. Engl. J. Med.*, 374 (2016), pp. 2195-2198

DAN H et al. Prospects for a Zika Virus Vaccine. *Immunity*. Volume 46, Issue 2, 2017, Pages 176-182, ISSN 1074-7613

DAVIS, B. S. et al. West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Virol.* 75, 4040–4047 (2001).

DAVIS, Heather L.; MCCLUSKIE, Michael J. DNA vaccines for viral diseases. *Microbes and Infection*, v. 1, n. 1, p. 7-21, 1999.

DE DUVE C. The lysosome turns fifty. *Nat Cell Biol*, 2005, 7: 847–849. DOI: 10.1038/ncb0905-847.

DE SAINT-VIS B, VINCENT J, VANDENABEELE S ET AL. A novel lysosome-associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment. *Immunity* 1998;9:325–336.

DICK GW, KITCHEN SF, HADDOW AJ. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1952 Sep; 46(5):509-20.

DONNELLY JJ, Ulmer JB, Shiver JW, Liu MA. DNA vaccines. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:617-48. doi: 10.1146/annurev.immunol.15.1.617.

DOWD, K.A, et al. Rapid development of a DNA vaccine for Zika virus. *Science*, 354 2016, pp. 237-240.

DUFFY MR, et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *NEJM.* 2009 Jun 11; 360(24):2536-43.

EEVA-LIISA ESKELINEN. Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and

autophagy. *Molecular Aspects of Medicine* 27 (2006) 495–502.

EKINS, S., et al. Illustrating and homology modeling the proteins of the Zika virus. *F1000Research*, 2016, 5, 275. <https://doi.org/10.12688/f1000research.8213.2>

ENGELKE, L. et al. Recent insights into cutaneous immunization: how to vaccinate via the skin. *Vaccine*, 33 (2015), pp. 4663-4674

ESTER M. PEREIRA, et al. Lysosome-associated protein 1 (LAMP-1) and Lysosome-associated protein 2 (LAMP-2) in a larger family carrier of Fabry disease. *Gene*, Volume 536, Issue 1, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.11.063>.

FAUCI AS, MORENS DM. Zika Virus in the Americas-Yet Another Arbovirus Threat. *N Engl J Med*. 2016 Feb 18; 374(7):601-4.

FAYE, O. et al. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20(th) century. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 8, n. 1, p. e2636, 2014.

FÉLIX, VANESSA PEREIRA DA SILVA RODRIGUES; FARIAS, APONIRA MARIA DE. Microcephaly and family dynamics: fathers' perceptions of their children's disability. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 34, n. 12, jan. 2019.

FRITZ, Richard et al. The unique transmembrane hairpin of flavivirus fusion protein E is essential for membrane fusion. *Journal of virology*, v. 85, n. 9, p. 4377-4385, 2011.

FUKUDA, M. Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. *J. Biol. Chem.* 1991, 266, 21327–21330.

GARCON, N. et al. Development of an AS04-adjuvanted HPV vaccine with the adjuvant system approach. *BioDrugs* 25, 217–226 (2011).

GEORGE, G, et al. A novel DNA platform designed for vaccine use with high transgene expression and immunogenicity. *Vaccine*, Volume 39, Issue 49, 2021, Pages 7175-7181, ISSN 0264-410X, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.10.008>.

GRUENBERG, J. AND STENMARK, H. The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004, 5, 317-323.

GUPTA, R. K.; SIBAER, G. R. Adjuvants for human vaccines-current status, problems and future prospects. *Vaccine*, 1995, vol. 13, n. 14, p. 1263-1276.

HAMEL. R., et al. Biology of ZIKA virus infection in human skin cells. *J. Virol.*, 89 (2015), pp. 8880-8896, [10.1128/JVI.00354-15](https://doi.org/10.1128/JVI.00354-15);

HANIF, S. N. M.; AL-ATTIYAH, R.; MUSTAFA, A. S. DNA Vaccine Constructs Expressing Mycobacterium tuberculosis-Specific Genes Induce Immune Responses. *Scandinavian journal of immunology*, v. 72, n. 5, p. 408-415, 2010.

HARVEY, W.T., CARABELLI, A.M., JACKSON, B. et al. SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nat Rev Microbiol* 19, 409–424 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00573-0>

HAYES, E. B. Zika virus outside Africa. *Emerg Infect Dis*, v. 15, n. 9, p. 1347-50, Sep 2009. ISSN 1080- 6059 (Electronic)

HE, Q.; MITCHELL, A. R.; JOHNSON, S. L.; WAGNER-BARTAK, C.; MORCOL, T.; BELL, S. J. D. Calcium Phosphate Nanoparticle Adjuvant. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, Nov 2000, vol. 7, n 6, p. 899-903.

HERMIDA, MICELY D' EL-REI. Fagocitos mononucleares inflamatórios potencialmente envolvidos no transporte de Leishmania em hospedeiros vertebrados. *Dissertação de Mestrado, UFBA, 2007*

HO, N. I., et al. Adjuvants enhancing cross-presentation by dendritic cells: the key to more effective vaccines? *Front. Immunol.* 9, 2874, 2018.

HOLLISTER, Kristin et al. The role of follicular helper T cells and the germinal center in HIV-1 gp120 DNA prime and gp120 protein boost vaccination. *Human vaccines & immunotherapeutics*, v. 10, n. 7, p. 1985-1992, 2014.

IN, Hyun Ju et al. Enhanced effect of modified zika virus e antigen on the immunogenicity of DNA vaccine. *Virology*, v. 549, p. 25-31, 2020.

IOOS S, MALLETT HP, GOFFART IL, GAUTHIER V, CARDOSO T, HERIDA M. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Med Mal Infect.* 2014, 44: 302-307.

JARJANAZI, Hamdi et al. Biological implications of SNPs in signal peptide domains of human proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, v. 70, n. 2, p. 394-403, 2008.

JOHNSON, AG. Molecular adjuvants and immunomodulators: new approaches to immunization. *Clinical Microbiology Reviews*, 2021, vol. 7 No. 3. doi: 10.1128/CMR.7.3.277

KASTURI, S. P. et al. Programming the magnitude and persistence of antibody responses

with innate immunity. *Nature* 470, 543–547, 2011.

KAUFMANN, B., M.G. ROSSMANN. Molecular mechanisms involved in the early steps of flavivirus cell entry. *Microbes Infect.*, 13, 2012, pp. 1-9, 10.1016/j.micinf.2010.09.005.Molecular

KAWAI, T. & AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* 11, 373–384, 2010.

KAZUE TERASAWA, et al. Lysosome-associated membrane proteins-1 and -2 (LAMP-1 and LAMP-2) assemble via distinct modes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Volume 479, Issue 3, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.09.093>.

KIM, E. H. et al. Squalene-based adjuvants stimulate CD8 T cell, but not antibody responses, through a RIPK3-dependent pathway. *eLife* 9, e52687 (2020).

KLEMA, V. J.; PADMANBHAN, R.; CHOI, K. H. Flaviviral Replication Complex: Coordination between RNA Synthesis and 5'-RNA Capping. *Viruses*, v. 7, n. 8, p. 4640-56, Aug 13 2015. ISSN 1999-4915.

KLUMPERMAN, SAFTIG, P. J. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nature Reviews*, v. 10, p. 623 – 635. 2009.

KONISHI, E.; TERAZAWA, A.; FUJII, A. Evidence for antigen production in muscles by dengue and Japanese encephalitis DNA vaccines and a relation to their immunogenicity in mice. *Vaccine*, 21, n. 25-26, p. 3713-3720, Sep 8 2003.

KOOL, M. et al. Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J. Exp. Med.* 205, 869–882 (2008).

KOOL, M. et al. Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome. *J. Immunol.* 181, 3755–3759, 2008.

KORHONEN EM, HUHTAMO E, SMURA T, KALLIO-KOKKO H, RAASSINA M, VAPALAHTI O. Zika virus infection in a traveller returning from the Maldives, June 2015. *Euro Surveill.* 2016; 21(2).

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

KOU Y, et al. Tissue plasminogen activator (tPA) signal sequence enhances immunogenicity of MVA-based vaccine against tuberculosis. *Immunol Lett.* 2017 Oct;190:51-57. doi: 10.1016/j.imlet.2017.07.007. Epub 2017 Jul 17. PMID: 28728855.

KROL, Ewelina; BRZUSKA, Gabriela; SZEWCZYK, Boguslaw. Production and biomedical application of flavivirus-like particles. *Trends in biotechnology*, v. 37, n. 11, p. 1202-1216, 2019.

KUNDI, M. New hepatitis B vaccine formulated with an improved adjuvant system. *Expert Rev. Vaccines* 6, 133–140 (2007).

KUNDRA R, KORNFELD S. Asparagine-linked oligosaccharides protect Lamp-1 and Lamp-2 from intracellular proteolysis. *J Biol Chem* 1999;274:31039–31046.

KUNO, G.; CHANG, G. J. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Arch Virol*, v. 152, n. 4, p. 687-96, 2007. ISSN 0304-8608

LAL, H. et al. Efficacy of an adjuvanted herpes zoster subunit vaccine in older adults. *N. Engl. J. Med.* 372, 2087–2096 (2015).

LAMBRECHT, B. N.; KOOL, M.; WILLART, M.; HAMMAD, H. Mechanism of action of clinically approved adjuvants. *Current opinion in Immunology*, 2009, 21:1-7.

Larocca, R., et al. Vaccine protection against Zika virus from Brazil. *Nature* 536, 474–478 (2016). <https://doi.org/10.1038/nature18952>

LECOUTURIER, Valérie et al. Immunogenicity and protection conferred by an optimized purified inactivated Zika vaccine in mice. *Vaccine*, v. 37, n. 20, p. 2679-2686, 2019.

LEITNER WW, YING H, Restifo NP. DNA and RNA-based vaccines: principles, progress and prospects. *Vaccine*. 1999;18(9-10):765-777. doi:10.1016/s0264-410x(99)00271-6

LI, A, et al. Vesicular Stomatitis Virus and DNA Vaccines Expressing Zika Virus Nonstructural Protein 1 Induce Substantial but Not Sterilizing Protection against Zika Virus Infection. *J Virol*. 2020 Aug 17;94(17):e00048-20. doi: 10.1128/JVI.00048-20. PMID: 32554698; PMCID: PMC7431813.

LI L, PETROVSKY. N. Molecular mechanisms for enhanced DNA vaccine immunogenicity. *Expert Rev Vaccines*. 2016; 15(3):313-29. doi: 10.1586/14760584.2016.1124762. Epub 2015 Dec 28. PMID: 26707950; PMCID: PMC4955855.

LI Z, Howard A, Kelley C, Delogu G, Collins F, Morris S (1999) Immunogenicity of DNA vaccines expressing tuberculosis proteins fused to tissue plasminogen activator signal sequences. *Infect Immun* 67(9):4780–4786

LI, Anzhong et al. Vesicular stomatitis virus and DNA vaccines expressing Zika virus nonstructural protein 1 induce substantial but not sterilizing protection against Zika virus infection. *Journal of virology*, v. 94, n. 17, p. e00048-20, 2020.

LI, L.; PETROVSKY, N. Molecular Adjuvants for DNA Vaccines. MDPI and ACS Style. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2017, 22, 17-40. <https://doi.org/10.21775/cimb.022.017>

LI, Zhongming et al. Immunogenicity of DNA vaccines expressing tuberculosis proteins fused to tissue plasminogen activator signal sequences. *Infection and immunity*, v. 67, n. 9, p. 4780-4786, 1999.

LINDENBACH, B. D. RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res*, v. 59, p. 23-61, 2003. ISSN 0065-3527

LIU, JIE, et al. Immunogenicity of Varicella Zoster Virus DNA Vaccines Encoding Glycoprotein E and Immediate Early Protein 63 in Mice. *Viruses*, v. 14, n. 6, p. 1214, 2022.

LÒPPEZ-CAMACHO, et al. Rational Zika vaccine design via the modulation of antigen membrane anchors in chimpanzee adenoviral vectors. *Nat Commun* 9, 2441 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04859-5>

LOPEZ-CAMACHO, C.; ABBINK, P.; LAROCCA, R. A.; DEJNIRATTISAI, W. et al. Rational Zika vaccine design via the modulation of antigen membrane anchors in chimpanzee adenoviral vectors. *Nat Commun*, 9, n. 1, p. 2441, Jun 22 2018.

LU, Y.; RAVIPRAKASH, K.; LEAO, I. C.; CHIKHLIKAR, P. R. et al. Dengue 2 PreM-E/LAMP chimera targeted to the MHC class II compartment elicits long-lasting neutralizing antibodies. *Vaccine*, 21, n. 17-18, p. 2178-2189, May 16 2003.

LUNARDELLI, V.A.S.; J.S. APOSTOLICO, E.R. FERNANDES, D. Santoro Rosa. Zika virus-an update on the current efforts for vaccine development. *Hum. Vaccines Immunother.* 2020, pp. 1-5.

LUO, M, et al.. Immunization with plasmid DNA encoding influenza A virus nucleoprotein fused to a tissue plasminogen activator signal sequence elicits strong immune responses and protection against H5N1 challenge in mice. *J Virol Methods*. 2008 Dec;154(1-2):121-7. doi: 10.1016/j.jviromet.2008.08.011. Epub 2008 Sep 27. PMID: 18789973.

MACIEL, M., JR.; CRUZ, FDA, S.; CORDEIRO, M. T.; DA MOTTA, M. A. et al. A DNA vaccine against yellow fever virus: development and evaluation. *PLoS Negl Trop Dis*, 9, n. 4, p. e0003693, Apr 2015.

MACNAMARA, FN. Zika virus: a report on three cases of human infection during an

epidemic of jaundice in Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1954 Mar; 48(2):139-45.

MARINHO, FÁTIMA ET AL., Microcefalia no Brasil: prevalência e caracterização dos casos a partir do Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos (Sinasc), 2000-2015. *Epidemiologia e Serviços de Saúde, Brasília, DF, v. 25, n. 4, p. 701-712, 2016.*

MARONGIU, L, GORNATI, L, ARTUSO, I, ZANONI, I, GRANUCCI, F. Below the surface: The inner lives of TLR4 and TLR9. *J Leukoc Biol.* 2019; 106: 147– 160. <https://doi.org/10.1002/JLB.3MIR1218-483RR>.

MARQUES, A, et al. De Novo Design and Biophysical Characterization of an Affinity-Enhanced Protein Displaying the Structure of the Broadly Neutralizing HIV-1 2F5 Antibody Epitope. *Biophysical Journal*, 110, p. 346a, 2016.

MARSTON, J.O.; C.M.R. LACERDA. Characterization of jet injection efficiency with mouse cadavers. *J. Contr. Release : Off. J. Contr. Rel. Soc.*, 305 (2019), pp. 101-109

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. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 65, n. 6, p. 159-160, 2016.

MCKEE, A. S. et al. Alum induces innate immune responses through macrophage and mast cell sensors, but these sensors are not required for alum to act as an adjuvant for specific immunity. *J. Immunol.* 183, 4403–4414, 2009.

MELLO, ALEXANDRE SILVA DE. Efeito da criopreservação de linfócitos B transformados pelo vírus Epstein-Barr sobre a atividade de hidrolases lisossômicas. Tese Doutorado, UFRGS, 2010.

MIDHA, S; BHATNAGAR, R. (2009) Anthrax protective antigen administered by DNA vaccination to distinct subcellular locations potentiates humoral and cellular immune responses. *Eur J Immunol* 39(1):159–177

MINER, Jonathan J.; DIAMOND, Michael S. Zika virus pathogenesis and tissue tropism. *Cell host & microbe*, v. 21, n. 2, p. 134-142, 2017.

Ministério da Saúde. Dengue, Chikungunya e Zika. Disponível online: <http://combateaedes.saude.gov.br/en/epidemiological-situation>, 2018.

MLERA L, MELIK W, BLOOM ME. The role of viral persistence in flavivirus biology. *Pathog Dis.* 2014 Jul; 71(2):137-63.

MOHARIR A, PECK SH, BUDDEN T, LEE SY. The Role of N-Glycosylation in Folding, Trafficking, and Functionality of Lysosomal Protein CLN5. *PLoS ONE*, 2013 8(9): e74299. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074299>

MOMIN, Taufik et. al. Safety and Immunogenicity of a DNA SARS-CoV-2 vaccine

(ZyCoV-D): Results of an open-label, non-randomized phase I part of phase I/II clinical study by intradermal route in healthy subjects in India, *EClinicalMedicine*, Volume 38, 2021, 101020, ISSN 2589-5370, <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2021.101020>.

MONATH, T. P. et al. Chimeric live, attenuated vaccine against Japanese encephalitis (ChimeriVax-JE): phase 2 clinical trials for safety and immunogenicity, effect of vaccine dose and schedule, and memory response to challenge with inactivated Japanese encephalitis antigen. *J. Infect. Dis.* 188, 1213–1230 (2003).

MUTHUMANI, K, et al. Immunogenicity of novel consensus-based DNA vaccines against Chikungunya virus. *Vaccine*. 2008 Sep 19;26(40):5128-34. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.03.060. Epub 2008 Apr 14. PMID: 18471943; PMCID: PMC2582145.

NAKAYA, H. I. et al. Systems biology of immunity to MF59-adjuvanted versus nonadjuvanted trivalent seasonal influenza vaccines in early childhood. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 113, 1853–1858 (2016).

NÓBREGA, MARTHA ELIZABETH BRASIL DA; et al. Outbreak of Guillain-Barré syndrome possibly related to prior Zika virus infection, Metropolitan Region of Recife, Pernambuco, Brazil, 2015. *Epidemiol. serv. saúde* ; 27(2): e2017039, 2018.

NOWAKOWSKI, T. J. et al. Expression analysis highlights AXL as a candidate Zika virus entry receptor in neural stem cells. *Cell Stem Cell* 18, 591–596 (2016).

O'HAGAN, D. T., et al. The history of MF59® adjuvant: a phoenix that arose from the ashes. *Expert Rev. Vaccines* 12, 13–30 (2013).

O'HAGAN, D. T., et al. The mechanism of action of MF59 — an innately attractive adjuvant formulation. *Vaccine* 30, 4341–4348 (2012)

O'HAGAN, D. T., et al. Towards an evidence based approach for the development of adjuvanted vaccines. *Curr. Opin. Immunol.* 47, 93–102 (2017).

ÓLAFSDÓTTIR, G. et al. In vitro analysis of expression vectors for DNA vaccination of horses: the effect of a Kozak sequence. *Acta Vet Scand* 50, 44 (2008). <https://doi.org/10.1186/1751-0147-50-44>

PALMA, M. L.; DUANGKHAE, P.; DOURADINHA, B.; VIANA, I. F. T. et al. Development of potent class II transactivator gene delivery systems capable of inducing de novo MHC II expression in human cells, in vitro and ex vivo. *Gene Ther*, 24, n. 6, p. 342-352, Jun 2017.

PARKINSON-LAWRENCE EJ, DEAN CJ, CHANG M, HOPWOOD JJ, MEIKLE PJ, BROOKS DA. Immunochemical analysis of CD107a (LAMP-1) *Cell Immunol.* 2005;236:161–166.

PATTNAIK, A; SAHOO, BR. Current Status of Zika Virus Vaccines: Successes and Challenges. *Vaccines* (Basel). 2020;8(2):266. Published 2020 May 31. doi:10.3390/vaccines8020266

PEARCE, EJ & EVERTS, B. Dendritic cell metabolism. *Nat. Rev. Immunol.* 15 , 18–29 (2015).

PERERA RM, et al.. Transcriptional control of autophagy-lysosome function drives pancreatic cancer metabolism. *Nature*, 2015 524: 361–365

PERERA-LECOIN, L. MEERTENS, X. CARNEC, A. AMARA. Flavivirus entry receptors: an update .*Viruses*, 6 (2014), pp. 69-88, 10.3390/v6010069

PÉREZ-VÉLEZ, MARIEI E. et al. Induction of neutralization antibodies in mice by Dengue-2 envelope DNA vaccines. *Puerto Rico health sciences journal*, v. 28, n. 3, p. 239, 2009.

PERSAUD, M. , A. MARTINEZ-LOPEZ, C. BU, S.A. PORCELLI, F. DIAZ-GRI. Infection by ZIKA viruses requires the transmembrane protein AXL, endocytosis and low pH. *Virology* 518, 2018, pp. 301-312, 10.1016/j.virol.2018.03.009

POLAND, GA. et al. Zika Vaccine Development: Current Status. *Mayo Clin Proc.* 2019 Dec;94(12):2572-2586. doi: 10.1016/j.mayocp.2019.05.016. PMID: 31806107; PMCID: PMC7094556.

POLAND, GA, et al. Development of vaccines against Zika virus. *Lancet Infect. Dis.* 2018 Jul;18(7):e211-9. doi:10.1016/S1473-3099(18)30063-X.

PULENDRAN, B. e AHMED, R. Immunological mechanisms of vaccination. *Nat. Immunol.* 12, 509–517 (2011).

PULENDRAN, B. The varieties of immunological experience: of pathogens, stress, and dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 33, 563–606 (2015).

PULENDRAN, B., S. ARUNACHALAM, P. & O'HAGAN, D.T. Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants. *Nat Rev Drug Discov* 20, 454–475, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00163-y>

PUTNAK, R. et al. Development of a purified, inactivated, dengue-2 virus vaccine prototype in vero cells: immunogenicity and protection in mice and rhesus monkeys. *J.*

Infect. Dis. 174, 1176–1184 (1996).

QIN FURONG, et al. A Guide to Nucleic Acid Vaccines in the Prevention and Treatment of Infectious Diseases and Cancers: From Basic Principles to Current Applications. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, Vol. 9, 2021, DOI=10.3389/fcell.2021.633776

QIU, JT, et al. (2000) Enhancement of primary and secondary cellular immune responses against human immunodeficiency virus type 1 gag by using DNA expression vectors that target Gag antigen to the secretory pathway. *J Virol* 74(13):5997–6005

QUAST I, LÜNEMANN JD. Fc glycan-modulated immunoglobulin G effector functions. *J Clin Immunol* 2014;34 (Suppl 1):S51–S55.

QUEREC, T. et al. Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity. *J. Exp. Med.* 203, 413–424, 2006.

RAJCÁNI J, Mosko T, Rezuchová I. Current developments in viral DNA vaccines: shall they solve the unsolved? *Rev Med Virol.* 2005.

RAVIDRAN, M., et al. Opportunistic intruders: how viruses orchestrate ER functions to infect cells. *Nat Rev Microbiol* 14, 407–420 (2016). <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.60>

ROTH A, et al. Euro Surveill. Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections - an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012-2014. 2014 Oct 16; 19(41).

RUDD PM, WORMALD MR, STANFIELD RL et al., Roles for glycosylation of cell surface receptors involved in cellular immune recognition. *J Mol Biol* 1999;293:351–366.

SABBAGHI A., Ghaemi A. Molecular Adjuvants for DNA Vaccines: Application, Design, Preparation, and Formulation. *DNA Vaccines. Methods in Molecular Biology*, 2021, vol 2197. Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0872-2_5

SALAUN, B., et al. Cloning and characterization of the mouse homologue of the human dendritic cell maturation marker CD208/DC-LAMP. *Eur. J. Immunol.*, 2003, 33: 2619-2629. <https://doi.org/10.1002/eji.200324175>

SANTOS, ALANNA RACHEL ANDRADE DOS. Avaliação da atividade lisossomal de células de cérebro e fígado de gerbis (*Meriones unguiculatus*) infectados “in vitro” com *Neospora caninum*. Monografia, UFRB 2010.

SCHINJS, V. E. J. C. Mechanism of Vaccine Adjuvant Activity: initiation and regulation of immune response by vaccine adjuvants. *Vaccine*, v. 21, p. 829-831, 2003.

SHAFATI, Maryam et al. A brief review on DNA vaccines in the era of COVID-19. *Future Virology*, v. 17, n. 1, p. 49-66, 2022.

SHUHEI, NAKAMURA, TAMOTSU, YOSHIMORI; New insights into autophagosome-lysosome fusion. *J Cell Sci* 1 April 2017; 130 (7): 1209-1216. doi: <https://doi.org/10.1242/jcs.196352>

STIASNY, K, et al. . The membrane-proximal "stem" region increases the stability of the flavivirus E protein postfusion trimer and modulates its structure. *J Virol*. 2013 Sep;87(17):9933-8. doi: 10.1128/JVI.01283-13. Epub 2013 Jun 26. PMID: 23804648; PMCID: PMC3754098.

SUN, Yawei et al. Genomic Characteristics and E Protein Bioinformatics Analysis of JEV Isolates from South China from 2011 to 2018. *Vaccines*, v. 10, n. 8, p. 1303, 2022.

SUN, Yuanjie et al. Preparation of antibodies against TXR1 and construction of a new DNA tumor vaccine. *International Immunopharmacology*, v. 103, p. 108505, 2022.

SUSCHAK JJ, et al. Advancements in DNA vaccine vectors, non-mechanical delivery methods, and molecular adjuvants to increase immunogenicity. *Hum Vaccin Immunother*. 2017 Dec 2;13(12):2837-2848. doi: 10.1080/21645515.2017.1330236.

T.C. PIERSON, M.S. DIAMOND. Degrees of maturity: the complex structure and biology of flaviviruses. *Curr. Opin. Virol.*, 2 (2013), pp. 168-175, 10.1016/j.coviro.2012.02.011.Degrees

TAN, T. Y. et al. Capsid protein structure in Zika virus reveals the flavivirus assembly process. *Nat. Commun.* 11, 895, 2020.

Tan, T.Y., Fibriansah, G., Kostyuchenko, V.A. et al. Capsid protein structure in Zika virus reveals the flavivirus assembly process. *Nat Commun* 11, 895 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14647-9>

TANG, D., et al. The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Res*. 29, 347-364 (2019).

TANG, Jianming et al. Therapeutic DNA Vaccines against HPV-Related Malignancies: Promising Leads from Clinical Trials. *Viruses*, v. 14, n. 2, p. 239, 2022.

TEIXEIRA, Franciane Mouradian Emidio et al. LAMP-1 Chimeric to HIV-1 p55Gag in the Immunization of Neonate Mice Induces an Early Germinal Center Formation and AID Expression. *Vaccines*, v. 10, n. 8, p. 1246, 2022.

TOGNARELLI J, et al. A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South

Pacific, 2014. *Virology*. 2016 Mar; 161(3):665-8.

TSUJI, S. et al. Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette–Guérin: involvement of Toll-like receptors. *Infect. Immun.* 68, 6883–6890, 2000.

VALENTE, AP; MORAES, AH. Zika virus proteins at an atomic scale: how does structural biology help us to understand and develop vaccines and drugs against Zika virus infection? *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2019 Aug 29;25:e20190013. doi: 10.1590/1678-9199-JVATITD-2019-0013. PMID: 31523227; PMCID: PMC6727858.

VAN-MAI, et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *The Lancet*, Paris, v. 387, n. 10027, 2016.

VASILAKIS, N.; WEAVER, S. C. Flavivirus transmission focusing on Zika. *Curr Opin Virol*, v. 22, p. 30-35, Feb 2017. ISSN 1879-6265 (Electronic);

VATAKIS, DN, et al. CD4+ T cell epitope affinity to MHC II influences the magnitude of CTL responses elicited by DNA epitope vaccines, *Vaccine*. Volume 23, Issue 20, 2005, Pages 2639-2646, ISSN 0264-410X, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.10.039>.

VIANA, I. F. T.; SOARES, T. A.; LIMA, L. F. O.; MARQUES, E. T. A. et al. De novo design of immunoreactive conformation-specific HIV-1 epitopes based on Top7 scaffold. *Rsc Advances*, 3, n. 29, p. 11790-11800, 2013.

VON HEIJNE, Gunnar. The signal peptide. *The Journal of membrane biology*, v. 115, n. 3, p. 195-201, 1990.

Wang S, et al. (2006) Relative contributions of codon usage, promoter efficiency and leader sequence to the antigen expression and immunogenicity of HIV-1 Env DNA vaccine. *Vaccine* 24(21):4531–4540

Wang, JY., Song, WT., Li, Y. et al. Improved expression of secretory and trimeric proteins in mammalian cells via the introduction of a new trimer motif and a mutant of the tPA signal sequence. *Appl Microbiol Biotechnol* 91, 731–740 (2011). <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3297-0>

WANGHENG HOU, et al. Molecular cloning and characterization of the genes encoding the proteins of Zika virus. *Gene*, Volume 628, 2017, Pages 117-128, ISSN 0378-1119. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.07.049>

WILKE, S., KRAUSZE, J. & BÜSSOW, K. Crystal structure of the conserved domain of the DC lysosomal associated membrane protein: implications for the lysosomal glycoalyx. *BMC Biol* 10, 62 (2012). <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-62>

WWEAVER, S. C. et al. Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. *Antiviral Res*, v. 130, p. 69-80, Jun 2016. ISSN 1872-9096 (Electronic)

XIA, S. et al. Safety and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine, BBIBP-CorV: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 trial. Lancet Infect. Dis. 21, 39–51, 2021.

ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 2015, 110, 569–572.

ZHONG, Z, et ai. Imunogenicidade e eficácia de proteção de uma vacina de vírus Zika baseada em mRNA auto-replicante nua. Vacinas 2019 , 7 , 96.

ZHOU, K. et al N. Current Progress in the Development of Zika Virus Vaccines. Vaccines 2021, 9, 1004. <https://doi.org/10.3390/vaccines9091004>