



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE HUMANA E**  
**ANIMAL**

**ILANA CARNEIRO LISBOA MAGALHÃES**

**PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DO VÍRUS ZIKA EXPRESSAS**  
**EM SISTEMA PROCARIOTO**

**FORTALEZA - CEARÁ**

**2018**

ILANA CARNEIRO LISBOA MAGALHÃES

PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DO VÍRUS ZIKA EXPRESSAS  
EM SISTEMA PROCARIOTO

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de mestre profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal.

Orientador: Prof. Dr. Eridan Orlando Pereira Tramontina Florean  
Coorientadora: Profa. Dra. Maria Izabel Florindo Guedes

FORTALEZA – CEARÁ

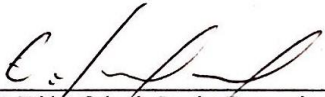
2018




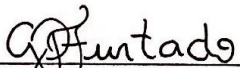
**MPBiotec**

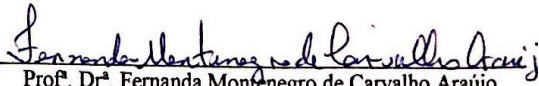
**ATA DA SESSÃO PÚBLICA PARA JULGAMENTO DA  
27ª DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE ILANA  
CARNEIRO LISBOA MAGALHÃES, DO CURSO DE  
MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA  
EM SAÚDE HUMANA E ANIMAL**

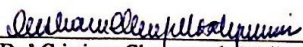
Aos décimo nono dias do mês de julho de 2018, às 09h00, reuniu-se, no auditório do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Rede - RENORBIO, da Universidade Estadual do Ceará, localizado na Av. Dr. Silas Munguba, 1700, Campus do Itaperi, Fortaleza/CE, a Banca Examinadora constituída conforme determina o Regimento Interno do Curso aprovado pela Resolução Nº 4202/2017 - CEPE, da Universidade Estadual do Ceará, tendo sido composta pelos Professores Doutores: Eridan Orlando Pereira Tramontina Florean (Universidade Estadual do Ceará, Presidente), Gilvan Pessoa Furtado (Fundação Oswaldo Cruz, Titular), Mauricio Fraga Van Tilburg (Universidade Estadual do Ceará, Titular), Fernanda Montenegro de Carvalho Araújo (Laboratório Central de Saúde Pública do Ceará (LACEN-CE), Titular), perante a qual ILANA CARNEIRO LISBOA MAGALHÃES, aluna regularmente matriculada no Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal – MPBiotec, Ponto Focal Fortaleza, defendeu, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre, sua Dissertação intitulada “**Produção de Proteínas Recombinantes do vírus Zika expressas em sistema procarioto**”. A sessão pública foi aberta pela presidente da Banca, que após as formalidades de praxe fez a apresentação da banca e das regras da sessão, passando em seguida a palavra ao pós-graduando para a apresentação de seu trabalho. Concluída a arguição às 10 h 55, a Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta para a apreciação e deliberação quanto à defesa da dissertação, decidindo, por unanimidade, que o(a) candidato(a) foi (X) **APROVADO** ( ) **REPROVADO** e sua defesa ter recebido o conceito (X) **SATISFATÓRIO** ( ) **INSATISFATÓRIO** e a nota 9,2 (*noventa e dois pontos dois*). Encerrada a sessão secreta, a Presidente da Banca Examinadora proclamou o resultado. Nada mais havendo a tratar, foi encerrada a sessão da qual eu, Eridan Orlando Pereira Tramontina Florean, que presidi a Banca de Dissertação, lavrei a presente ata, à qual assino com os demais membros da Banca Examinadora. Fortaleza, em 19 de julho de 2018.

  
Prof.º Dr.º Eridán Orlando Pereira Tramontina Florean  
(Presidente)  
UECE (Universidade Estadual do Ceará)

  
Prof.º Dr.º Mauricio Fraga Van Tilburg (Examinador)  
UECE (Universidade Estadual do Ceará)

  
Prof.º Dr.º Gilvan Pessoa Furtado (Examinador)  
FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz)

  
Prof.º Dr.º Fernanda Montenegro de Carvalho Araújo  
(Examinador)  
LACEN (Laboratório Central de Saúde Pública do Ceará)

  
Prof.ª Dr.ª Cristiane Clemente de Mello Salgueiro  
Vice Coordenadora Geral MPBiotec

À Deus e aos meus pais: Francisco  
Lisboa Magalhães e Maria Hiana Carneiro

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, pela oportunidade de cursar este mestrado e pelas oportunidades obtidas durante este período.

Agradeço ao Programa de Mestrado Profissional em Biotecnologia e Saúde Humana e Animal, que através da equipe de professores e coordenadores proporcionaram os saberes necessários para a realização deste projeto.

A minha família, por todo o apoio durante este período estressante e de realizações, por acreditarem que este sonho se tornaria realidade.

Aos meus orientadores Profa. Dra. Maria Izabel Florindo Guedes, e Dr. Eridan Orlando Pereira Tramontina Florean, por estarem prontificados a ajudar com conhecimento e competência profissional para desenvolver este projeto no Laboratório de Biotecnologia e Biologia Molecular (LBBM). Além da Profa. Dra. Rosa Amália Fireman Dutra, por ceder amostras importantes para a realização dos experimentos..

Aos meus amigos e companheiros de laboratório por sempre me ajudarem nos experimentos, com paciência e disposição e por me auxiliarem na resolução de problemas e imprevistos. De modo especial a Bruno Bezerra, Lucelina Araujo, Danielle Oliveira e Eduarda Nattaly, por se fazerem presentes durante este momento.

Por fim, a todos aqueles que participaram direta e indiretamente para o desenvolvimento deste projeto, muito obrigada!

“A verdadeira motivação vem de realização, desenvolvimento pessoal, satisfação no trabalho e reconhecimento”.

(Frederick Herzberg)

## RESUMO

A virose causada pelo Zika vírus (ZIKV) é considerada uma doença emergente desde seu primeiro grande surto no Sul do Pacífico em 2007 e mais recentemente nas Américas. Esta doença já foi previamente descrita por possuir semelhanças com outras viroses como Dengue, Febre do Nilo Ocidental, Encefalite Japonesa, Febre Amarela e, mais recentemente, Chikungunya. O alto número de pessoas infectadas durante surtos recentes chamou a atenção de agentes de saúde e pesquisadores, onde os últimos achados sobre a doença mostram que esta virose está associada com doenças severas em humanas como Microcefalia e Síndrome de Guillain-Barré. De acordo com dados do Ministério da Saúde do Brasil, em 2016 houveram quase 130.000 casos confirmados da doença no país no mesmo ano (BRASIL, 2016) e até o mês de maio de 2018 já foram confirmados mais 2.700 casos de crianças com microcefalia relacionadas à doença (BRASIL, 2018a). Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo expressão e purificação das sequências das proteínas do Capsídeo, NS1, NS3 e NS4b do vírus isolado da Bahia e verificar sua especificidade e sensibilidade por meio de testes como ELISA e *Western blot* utilizando soro de pacientes infectados com ZIKV e DENV. A expressão foi obtida utilizando cepas de *Escherichia coli* BL21 (DE3) e BL21 *Rosetta* e o resultado foi analisado por *Western blot*. As proteínas recombinantes produzidas foram especificamente reconhecidas por anticorpos produzidos em camundongos, anticorpo comercial (anti-His), por soros de pacientes e salivas de crianças e mães que tiveram a doença. Os resultados obtidos com as proteínas recombinantes apresentaram maior sensibilidade e especificidade quando comparados com o Kit comercial Novagnost®. Conclui-se que as proteínas expressas e purificadas apresentam um grande potencial para futura produção de kits de diagnóstico para a doença.

**Palavras-chave:** Zika vírus (ZIKV). Microcefalia. *Escherichia coli*. Clonagem. expressão.

## ABSTRACT

The disease caused by the Zika virus (ZIKV) has been considered an emerging disease since its first major outbreak in the South Pacific in 2007 and more recently in the Americas. This disease has previously been described as having similarities with other viruses such as Dengue, West Nile Fever, Japanese Encephalitis, Yellow Fever and, more recently, Chikungunya. The high number of people infected during recent outbreaks has caught the attention of health agents and researchers where recent findings on the disease show that this virus is associated with severe illnesses in humans such as Microcephaly and Guillain-Barre Syndrome. According to data from the Brazilian Ministry of Health, in 2016 there were almost 130,000 confirmed cases of the disease in the country in the same year (BRAZIL, 2016) and by May 2018, 2,700 cases of children with microcephaly related to disease (BRASIL, 2018a). Thus, the present work had as objective the expression and purification of the sequences of Capsid, NS1, NS3 and NS4b proteins from the virus isolated from Bahia and to verify their specificity and sensitivity by means of ELISA and Western blot tests using serum from patients infected with ZIKV and DENV. Expression was obtained using strains of *Escherichia coli* BL21 (DE3) and BL21 Rosetta and the result was analyzed by Western blot. The recombinant proteins produced were specifically recognized by antibodies produced in mice, commercial antibody (anti-His), by patient sera and saliva from children and mothers who had the disease. The results obtained with the recombinant proteins presented greater sensitivity and specificity when compared with the commercial Kit Novagnost. It is concluded that expressed and purified proteins present a great potential for future production of diagnostic kits for the disease.

**Key words:** Zika virus (ZIKV). Microcephaly. Guillain-Barré. Cloning. Expression.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Incidência de Febre pelo Zika vírus por Estado até 2016.....	17
Figura 2 -	Casos de febre pelo ZIKV, Brasil, 2016 a 2018.....	19
Figura 3 -	Estrutura Viral ZIKV.....	22
Figura 4 -	Replicação dos Flavivírus.....	24
Figura 5 -	Ciclo de vida do mosquito <i>Aedes aegypti</i> .....	25
Figura 6 -	Anatomia de um vetor de expressão.....	36
Figura 7 -	Sequências otimizadas dos insertos do Zika Vírus.....	43
Figura 8 -	Mapas dos vetores pUC57 e pET-28a.....	44
Figura 9 -	Gel de agarose demonstrando a digestão do pUC57 e insertos ZIKV.....	53
Figura 10 -	Gel de agarose demonstrando a clonagem do pET-28a com insertos em <i>E. coli</i> BL21 (DE3) e <i>Rosetta</i> .....	54
Figura 11 -	Gel de agarose demonstrando a Digestão dos Insertos em plasmídeo pET-28a.....	54
Figura 12 -	Perfil eletroforético da expressão dos insertos em <i>E. coli</i> BL21 (DE3) e BL21 <i>Rosetta</i> .....	55
Figura 13 -	Perfil eletroforético da proteína Capsídeo em SDS-Page e Western Blot.....	56
Figura 14 -	Perfil eletroforético da proteína NS1 em SDS-Page e Western Blot....	56
Figura 15 -	Perfil eletroforético da proteína NS3 em SDS-Page e Western Blott...57	
Figura 16 -	Perfil eletroforético da proteína NS4b em SDS-Page e Western Blott.....	57
Figura 17 -	Perfil eletroforético da purificação da Proteína Capsídeo.....	59
Figura 18 -	Perfil eletroforético da purificação da Proteína NS1.....	59
Figura 19 -	Perfil eletroforético e Western Blott da Purificação da Proteína NS1.....	60
Figura 20 -	Perfil eletroforético da purificação da Proteína NS3.....	60
Figura 21 -	Perfil eletroforético e Western Blot das proteínas recombinantes com soro de paciente.....	61
Figura 22 -	ELISA indireto das proteínas do Capsídeo, NS1 e NS3 com soro de pacientes infectados com ZIKV.....	62
Figura 23 -	ELISA indireto das proteínas do Capsídeo, NS1 e NS3 com soro	

	de pacientes infectados com DENV.....	63
Figura 24 -	ELISA indireto das proteínas do Capsídeo, NS1 e NS3 com saliva de pacientes com e sem ZIKV.....	63
Figura 25 -	ELISA indireto das proteínas do Capsídeo e NS1 de anticorpos monoclonais Anti-Capsídeo e Anti-NS1.....	64

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Sumário da Expressão de Proteínas/Partículas do Zika Vírus.....	38
Tabela 2 -	Informações acerca das proteínas do ZIKV.....	43
Tabela 3 -	Análise das respostas das proteínas do Capsídeo, NS1 e NS3 contra soro de pacientes com ZIKV por ELISA indireto.....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C	Capsídeo
DENV	Dengue Virus
E	Envelope
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática)
IgM	Immunoglobulin M
IgG	Immunoglobulin G
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
M	membrana
NCR	<i>non coding region</i> (regiões flanqueadoras não codificantes)
NS	não estruturais
PrM	Premembrana
ONG	Organização Não Governamental
RNA	Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucleico)
RT-PCR	Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction (Transcrição Reversa – Reação em Cadeia da Polimerase)
SDS-Page	Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis
ZIKV	Zika Vírus

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>DESENVOLVIMENTO.....</b>	<b>17</b>
2.1	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1.1	História e Epidemiologia do Zika vírus.....	17
2.1.2	Considerações Conceituais acerca do Virus Zika.....	20
2.1.3	Ciclo Reprodutivo do Zika Vírus e do mosquito Aedes.....	23
2.1.4	Sintomas da Doença do vírus Zika.....	26
2.1.5	Transmissão da Doença do vírus Zika.....	28
2.1.6	Diagnóstica da Doença do vírus Zika.....	30
2.1.7	Prevenção da Doença do vírus Zika.....	31
2.1.8	Implicações da Doença para a Sociedade.....	32
2.1.9	Expressão e Purificação de Proteína Recombinante.....	33
2.1.10	Uso de Proteínas Recombinantes para Kits Diagnósticos.....	38
2.2	OBJETIVOS.....	41
2.2.1	Objetivos Gerais.....	41
2.2.2	Objetivos Específicos.....	41
2.3	METODOLOGIA.....	42
2.3.1	Confecção das Sequências Proteicas do Zika Vírus.....	42
2.3.2	Expressão das Proteínas do ZIKAV em E. coli (BL21) e Rosetta.....	46
2.3.3	Purificação das Proteínas do ZIKAV.....	47
2.3.4	Quantificação, SDS-Page e Western Blott das proteínas do ZIKV.....	48
2.3.5	ELISA com soro de pacientes infectados com ZIKV.....	49
2.4	RESULTADOS.....	53
2.4.1	Amplificação e Clonagens.....	53
2.4.2	Expressão e Purificação das Proteínas Recombinantes.....	55
2.4.3	Sensibilidade e Especificidade das Proteínas Recombinantes.....	61
2.5	DISCUSSÃO.....	66
2.6	CONCLUSÃO.....	71
	REFERÊNCIAS.....	72

## 1 INTRODUÇÃO

O Zika Vírus (ZIKV) é um vírus da família *Flaviviridae*, gênero dos flavivírus, primariamente isolado de um macaco rhesus proveniente da floresta Zika na Uganda em 1947 (DICK et al., 1952). Historicamente, casos de infecções com o Zika Vírus eram raras até a década de 1960, onde casos esporádicos de infecção com o vírus foram relatados nos continentes Asiáticos e Africanos, até o primeiro surto ocorrido em 2007 na Micronésia (HAYES, 2009).

Possíveis epidemias de ZIKV podem ter ocorrido previamente, porém podem ter sido diagnosticadas erroneamente devido à grande similaridade desta doença com a causada por outros flavivírus tais como Dengue e a febre do Nilo Ocidental. Esta reação cruzada pode ser intensificada caso o paciente tenha sido infectado com outro flavivírus (LANCIOTTI et al., 2008). No entanto, devido ao maior surto de Febre por ZIKV, ocorrido na Polinésia Francesa em 2013, onde cerca de 11% da população procurou assistência médica reportando os sintomas da doença (MUSSO et al., 2015), a doença esteve mais em evidencia. Isto correu pela estreita relação da doença com outras complicações neurológicas, como a Síndrome de Guillain-Barré e Microcefalia além de complicações autoimunes, como Púrpura Trombocitopênica e Leucopenia, provavelmente devido à coinfeção com outras flaviviruses (AMORIM; BICALHO; ZAULI, 2016).

No Brasil, em 2014, entre 150 e 200 crianças nasceram com microcefalia devido à um surto da doença no país (WHO, 2015). Em novembro de 2015 este número aumentou para 1.248, onde o maior número de casos reportados foi em Pernambuco (Brasil, 2015). No mesmo ano, 121 casos de distúrbios neurológicos e Síndrome de Guillain-Barré foram notificados, onde todos os casos apresentaram os sintomas da doença no início do ano (ECDC, 2015).

A transmissão do vírus do Zika pode ocorrer por diversas maneiras. A mais conhecida popularmente se dá através da picada do mosquito fêmea das espécies *Aedes aegypti* e *A. albopictus*. Contudo, novas formas de contágio estão sendo estudadas, como a transmissão viral intrauterina da mãe para o feto, sendo responsável pelos principais distúrbios neuronais, através da relação sexual e transfusão de sangue (HASTINGS; FIKRING, 2017).

Os sintomas da doença do ZIKV variam de pessoa para pessoa, mas os principais são artralgia, edema das extremidades, febre moderada, dores de cabeça,

dor retro-orbital, conjuntivite não purulenta, vertigo, mialgia, distúrbios digestivos e pequenas erupções maculopapular (ZANLUCA *et al.*, 2015).

Para o diagnóstico da doença é feita a extração de RNA viral da amostra do paciente e realizado o RT-PCR como ferramenta mais rápida para a detecção de infecção viral em amostras de fase aguda em um período de 4 a 7 dias após o início dos sintomas. Além disso, apenas uma em cada cinco pessoas infectadas é sintomática (AMORIM; BICALHO; ZAULI, 2016). Com isso, a amostra é testada para diferentes arbovírus, incluindo Dengue e Chikungunya, através do teste de ELISA para a detecção de anticorpos IgM/IgG específicos contra o ZIKV com cinco a seis dias após o aparecimento dos sintomas (ZANLUCA *et al.*, 2015). As amostras para a detecção do vírus vão desde sangue, até líquido amniótico, sêmen, urina e salivares.

Até o momento não há um tratamento específico para a Febre por ZIKV, apenas o controle da febre e da dor através de medicamentos. Como não há um tratamento, a forma de prevenção se dá a partir da proteção pessoal contra o mosquito *Aedes*, também vetor da Dengue e do Chikungunya (ECDC, 2015).

Por este motivo, faz-se necessária a produção de novos biofármacos e uma vacina contra ZIKV, assim como a fabricação de novos kits diagnósticos mais precisos e acessíveis à população. Neste âmbito, com o avanço da biotecnologia, hoje é possível produzir diferentes proteínas recombinantes em quantidades suficientes para fins de pesquisa, clínica e industrial (CHOI *et al.*, 2006).

À medida que a biotecnologia se expandiu, a expressão de proteínas recombinantes nos diferentes sistemas de produção tem demonstrado diferentes características específicas a cada sistema, o que traz inúmeros desafios (ANDERSEN e KRUMMEN, 2002). Estes sistemas variam desde a utilização de bactérias (*Escherichia coli*), células de insetos (*Baculovirus Expression Vector System – BEVS*), células de mamíferos (ASSENBERG *et al.*, 2013) e plantas (LOMONOSSOFF; SAINSBURY, 2008).

Microrganismos, como a enterobactéria *Escherichia coli*, são os mais utilizados para este propósito, geralmente envolvendo plasmídeos e uma cepa adequados. Entretanto, devido a possíveis complicações celulares durante a expressão das proteínas recombinantes, como por exemplo, estresse bacteriano e acúmulo da proteína de interesse na fração insolúvel do produto (VILLAVERDE e CARRIÓ, 2003), é fundamental que diferentes estratégias sejam tomadas a fim de otimizar a expressão da proteína de interesse no sistema de expressão selecionado.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar diferentes estratégias para a expressão de proteínas recombinantes do ZIKV circulante no Brasil, utilizando plataforma bacteriana como sistema de expressão, e posteriormente avaliar a eficácia das proteínas produzidas em detectar a presença de anticorpos humanos anti-Zika produzidos por indivíduos previamente diagnosticados para a doença. Com os resultados obtidos objetiva-se a produção de kits diagnósticos mais precisos e de menor custo.



## 2 DESENVOLVIMENTO

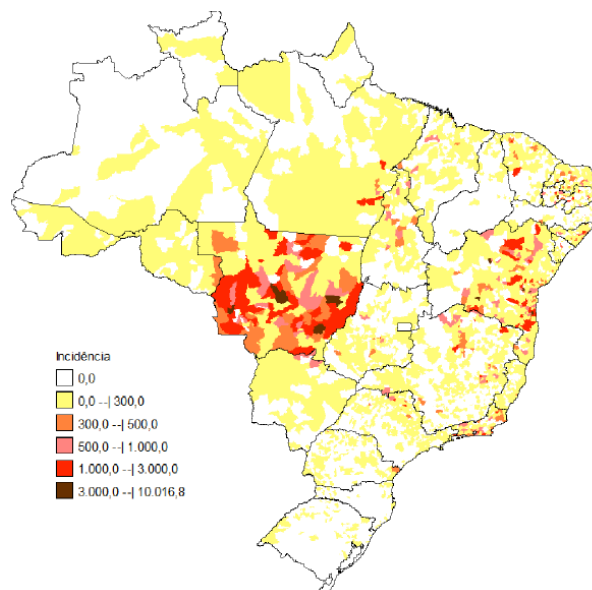
### 2.1 REVISÃO DE LITERATURA

#### 2.1.1 História e Epidemiologia do Zika vírus

Diz-se de Epidemiologia o estudo da distribuição e dos determinantes de uma doença ou condições relacionadas à saúde de uma população, incluindo vigilância, observação, pesquisa analítica e experimentação (LIMA-COSTA; BARRETO, 2003). Ela tem o propósito prático de descobrir as relações que podem oferecer possibilidades para a prevenção de doenças e as causas da mesma. Para este estudo, deve-se incluir a montagem de todos os fatos, formação e testes de hipóteses e a escolha do tipo de estudo. Por fim, dá-se a caracterização da doença de acordo com sua frequência, caracterização dos indivíduos afetados, variações em sua manifestação e a interação entre pessoa, ambiente e tempo (MACMAHON; PUGH, 1970).

No que tange ao Zika vírus (ZIKV), a epidemiologia se dá, no Brasil, por meio dos primeiros casos confirmados em abril de 2015 por pesquisadores da Universidade Estadual da Bahia (UFBA). Em maio, a Fiocruz/PR e o Instituto Adolfo Lutz/SP identificaram o vírus em seus estados (BRASIL, 2016). Na figura 1, é possível observar a incidência de febre pelo ZIKV por estado até o ano de 2016.

**Figura 1 - Incidência de febre pelo Zika vírus por Estado até 2016**



Fonte: Sinan NET, 2017.

O conhecimento do ZIKV deu-se em 18 de abril de 1947 quando um macaco *rhesus*<sup>1</sup> da Fundação Rockefeller, que havia sido colocado em uma gaiola na Floresta Zika em Uganda para pesquisas sobre a Febre Amarela, apresentou sinais de febre. Dois dias depois o macaco foi levado para um laboratório em Entebbe e seu soro inoculado em camundongos, que após 10 dias se mostraram doentes. Posteriormente, pesquisadores isolaram o vírus do cérebro dos camundongos e o denominaram Zika (HAYES, 2009).

No ano seguinte, o vírus foi isolado de mosquitos *Aedes africanus* da mesma localidade (MACNAMARA, 1954). Em 1956 estudos mostraram a transmissão artificial do vírus através do *A. aegypti* para camundongos e macacos em laboratório (BOORMAN; PORTERFIELD, 1956). O ZIKV foi isolado, então, de seres humanos durante pesquisas realizadas entre 1968 e 1975, onde 40% das pessoas testadas na Nigéria possuíam anticorpos neutralizantes para o vírus (HAYES *et al.*, 2009). Os isolados foram obtidos de crianças de até 10 anos de idade que possuísem ou não os sintomas da doença, que se resumiam até então a febre, dores de cabeça e no corpo (MOORE *et al.*, 1975).

Até o ano de 1981 infecções do ZIKV foram relatadas em outras cidades da África, como Uganda, Tanzânia e Egito, além de partes da Ásia, como Índia, Malásia e Filipinas e a partir de 2007, surtos foram detectados além do continente Africano e Asiático (HAYES, 2009). Em 2007, o vírus teve o seu primeiro surto relatado no Estado de Yap, nos Estados Federados da Micronésia, onde cerca de 73% da população com idade igual ou inferior a 3 anos tinha sido infectada. Então, surtos subsequentes ocorreram no Sudeste Asiático e no Pacífico Ocidental (HENNESSEY *et al.*, 2015).

Outro grande surto da doença se deu em outubro de 2013 e fevereiro de 2014 na Polinésia Francesa, sendo este último considerado o maior notificado até então, com 28 mil casos (cerca de 11% da população local), concomitante com a circulação do vírus Dengue de sorotipos 1 e 3. Através deste grande surto, o vírus foi capaz de emergir em novos territórios, principalmente no continente Americano, em 26 países da América do Sul e do Caribe (SAMARASEKERA; TRIUNFOL, 2016). Foi, também, durante este último surto que iniciaram-se as associações da doença

---

<sup>1</sup> Utilizado por ser uma espécie conhecida pela ciência, manuseio facilitado em cativeiro, ampla disponibilidade e proximidade anatômica e fisiológica com os seres humanos (MITRUKA *et al.*, 1976).

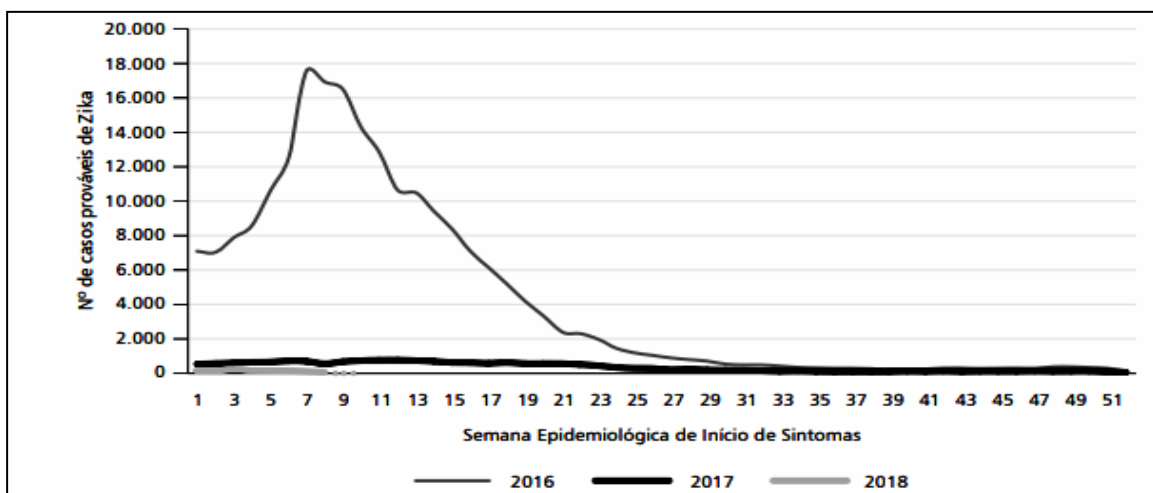
com complicações neurológicas, já que aumentaram os casos de síndrome de Guillain-Barré em mais de vinte vezes (CAO-LORMEAU *et al.*, 2016).

Em maio de 2015 houve um surto do ZIKV, começando pelo Brasil e se espalhando para parte da América Central e do Sul, que impulsionou pesquisas devido a possíveis relações do vírus com a Síndrome de Guillain-Barré e Microcefalia, respectivamente uma doença autoimune que ataca o sistema nervoso e uma doença em que bebês nascem com a caixa craniana e a estrutura cerebral anormalmente pequenas e sem desenvolvimento adequados (ZANLUCA *et al.*, 2015). Em dezembro deste mesmo ano foi estimado em mais de um milhão os casos da doença no país (HENNESSEY *et al.*, 2015).

Desta forma, casos da doença foram relatados em janeiro de 2016 pela Organização Panamericana de Saúde em Porto Rico e outros 19 países das Américas. Até o início de 2016 não haviam sido relatados casos da doença nos Estados Unidos, porém casos de infecções por ZIKV foram encontradas em viajantes que deixavam o país. Entretanto, em dezembro do mesmo ano foram identificadas transmissões locais da doença no sul da Flórida (CDC, 2016).

No Brasil, em 2016, foram identificados 126.395 casos confirmados de febre pelo ZIKV, destes, foram confirmados seis óbitos e mais de 10.000 casos de gestantes com a doença. Em 2017, estes números caíram para 8.703 casos confirmados, 2 óbitos e 938 casos em gestantes. Até abril de 2018 foram confirmados 197 casos (BRASIL, 2018a). Abaixo (Figura 2) se encontram dados comparativos da incidência do vírus entre os anos de 2016 a 2018 no país.

**Figura 2 - Casos de febre pelo ZIKV, Brasil, 2016 a 2018.**



Fonte: Sinan NET, 2018.

No que diz respeito ao estado do Ceará, a incidência do número de casos de ZIKV diminuiu de 2.343 no ano de 2016 para 571 no ano de 2017, concomitante com a redução no número de casos de DENV e Chikungunya. Segundo o Boletim Epidemiológico lançado pelo Governo do Estado do Ceará em 2018, a propagação do ZIKV mostrou-se mais lenta e com menor número de registro do que as demais flavivirose, não havendo número de óbitos (BRASIL, 2018b).

### 2.1.2 Considerações Conceituais acerca do Virus Zika

O ZIKV é transmitido por mosquito, fazendo parte do gênero dos flavivírus (*Flavivirus*)<sup>2</sup>, família *Flaviviridae*, e membro do Serocomplexo de Spondweni (soro complexo de *Spondweni*) formando os dois únicos membros do clado, com o seu ciclo de transmissão natural envolvendo principalmente os vetores do gênero *Aedes*, sendo estes *A. furcifer*, *A. aegypti*, *A. albopictus*, *A. taylori*, *A. africanus* e *A. luteocephalus*, além de macacos e seres humanos (FAYE *et al.*, 2014). Apresenta-se, igualmente, estreitamente relacionado com outros flavivírus de alta relevância para a saúde pública como Dengue, Febre Amarela e Vírus do Nilo Ocidental (ZANLUCA *et al.*, 2015).

O RNA viral possui 10.794 nucleotídeos que codificam 3.419 aminoácidos e consiste em uma molécula de cadeia simples e de sentido positivo, sendo relatada em três distintas linhagens, onde uma é originalmente da Ásia e duas da África (LUZ; DOS SANTOS; VIEIRA, 2015). Seu RNA possui duas regiões flanqueadoras não codificantes (do inglês NCR = *non-coding regions*) conhecidas como 5'NCR e 3'NCR. A estrutura de leitura aberta do vírus se segue como: 5'-C-PrM/M-E-NS1-NS2a-NS2b-NS3-NS4a-NS4b-NS5, que codifica para uma poliproteína posteriormente clivada em Capsídeo (C), Precursora M ou Premembrana (PrM), Glicoproteína M (M), Envelope (E) e as sete proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5) (CHAMBERS *et al.*, 1990).

Este RNA livre no citoplasma celular passa por processamentos pré e pós traducionais, através de clivagens que são realizadas tanto por proteases virais quanto do hospedeiro. As proteínas estruturais PrM e E se direcionam para o lúmen

---

<sup>2</sup> Pequenos vírus (40-60nm), envelopados e com uma fita única de RNA positivo com aproximadamente 10.000 pares de bases (CHAMBERS *et al.*, 1990).

do Retículo Endoplasmático Rugoso (RER), onde se ancoram à membrana e a proteína C e outras proteínas como a NS1 são liberadas para o citoplasma celular (LINDENBACH *et al.*, 2007).

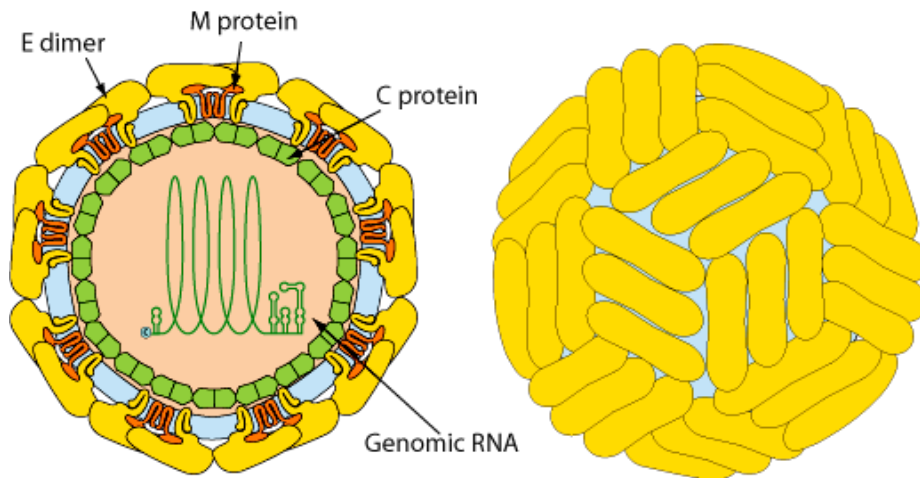
A extremidade 5' do genoma viral possui uma estrutura nucleotídica metilada utilizada para a tradução celular. Já a extremidade 3' não é poliadenilada, mas forma uma estrutura secundária em alça que leva a formação de um RNA subgenômico através da degradação do RNA genômico do hospedeiro, sendo, desta maneira, essencial para a patogenicidade e pode desempenhar papel na inibição da atividade antiviral de helicases do hospedeiro, assim como no Vírus Dengue (EXPASY, 2016).

A proteína do Capsídeo (C) é pequena e carregada positivamente, formando o principal componente estrutural do nucleocapsídeo viral (RICE *et al.*, 1986). Dentre os flavivírus, esta proteína existe em um número variado de formas devido modificações em seu N e C-terminal. A Precursora M ou Premembrana (PrM) é uma glicoproteína precursora sendo posteriormente clivada para dar origem à Glicoproteína da membrana (M), possivelmente ligadas à maturação e liberação dos vírions já que são encontradas intra e extracelularmente (CHAMBERS *et al.*, 1990).

Para espécies do gênero flavivírus, as partículas de vírus maturadas contêm 180 cópias de proteína E e proteína M em seu envelope e dispostas de forma icosaédrica, onde 90 dímeros de proteína E cobrem completamente a superfície do vírus, formando uma estrutura, o envelope viral, com cerca de 50nm de diâmetro (DAI *et al.*, 2016). Toda essa estrutura rodeia um nucleocapsídeo de aproximadamente 25-30nm de diâmetro (Figura 3). A proteína E além de compor a maior parte da superfície do vírus, ainda está ligada a entrada do vírus na célula e representa o alvo principal para anticorpos neutralizantes. A estrutura cristalizada da proteína E revelou-se semelhante à dos flavivírus com 3 distintos domínios (DENG *et al.*, 2011).

Através da microscopia Cryo-EM Sirohi *et al.* (2016), demonstrou a estrutura do ZIKV maduro que contém cerca de 380 aminoácidos, tornando-o semelhante a outros flavivírus, exceto por uma região de dez aminoácidos distintos no local de glicosilação da proteína E. Esta região foi apresentada como um local próprio e específico de glicosilação nos resíduos de aspargina154, levantando a hipótese de que esta estrutura pode contribuir para o tropismo celular de ZIKV.

**Figura 3 - Estrutura viral ZIKV.**



Fonte: Viral Zone, Swiss Institute of Bioinformatics.

Houve uma rápida evolução viral, sendo esta observada através de comparações de cepas oriundas da África e Ásia com as das Américas onde as mesmas se mostraram com perfis diferentes, provavelmente devido ao potencial patogênico adquirido pelo ZIKV que tornou o homem vulnerável ao patógeno (ENFISSI *et al.*, 2016). Porém, ainda não se sabe ao certo se essas mudanças alteraram a patogenicidade viral, ou se a alta incidência de casos da doença causada pelo vírus resultou em uma maior notabilidade das manifestações neurológicas raras (LEONHARD *et al.*, 2018).

A proteína não estrutural NS1, quando glicosilada, associa-se aos lipídios no interior da célula infectada formando homodímeros necessários para a replicação viral e tardia na infecção. Além disso, essa proteína é ainda secretada no espaço extracelular como uma partícula de lipoproteína hexamérica envolvida tanto na evasão quanto na patogênese viral, interagindo com o sistema imune inato e adaptativo, além de outros fatores do hospedeiro, como a inibição inespecífica das vias clássica e das lectinas, ligando-se ainda à proteína reguladora Fator H do complemento (SONG *et al.*, 2016).

A proteína NS1 é encontrada no soro de pacientes na fase aguda de infecções de Dengue e é utilizada como indicador para o diagnóstico da doença, onde seus altos índices estão associados com um aumento da severidade da enfermidade (BEATTY *et al.*, 2015). Acredita-se, ainda, que esta proteína é suspeita de ser o fator genético que causa consequências clínicas de infecções causadas por

flavivírus. Mas pouco ainda se conhece sobre esta proteína no ZIKV, pois esta apresenta uma patogênese diferente da dos demais flavivírus (SONG *et al.*, 2016).

As proteínas não estruturais NS2A, NS2B, NS4A e NS4B fazem parte de um pequeno grupo de pequenas proteínas hidrofóbicas, com regiões conservadas entre o grupo dos Flavivírus, sugerindo possivelmente que são proteínas associadas de membrana (RICE *et al.*, 1986). Já a proteína NS3 é a segunda maior proteína viral, sendo altamente conservada entre os flavivírus (MANDL *et al.*, 1989) e possuindo papel durante a replicação viral, sugerindo que sua posição seja citoplasmática, entretanto, ela ainda não foi definida.

A proteína NS5 é a maior proteína viral, sendo a mais conservada das proteínas entre os flavivírus (MANDL *et al.*, 1989). Seu possível papel como RNA polimerase e a formação do seu sítio N-terminal no compartimento citoplasmático sugerem que sua localização seja no citoplasma viral, entretanto possui, também, associações com membrana (CHAMBERS *et al.*, 1990).

Não existe uma vacina ou uma terapia antiviral específica que previna ou trate as infecções por ZIKV e a crescente incidência desta doença aumenta a necessidade por medidas preventivas e terapêuticas.

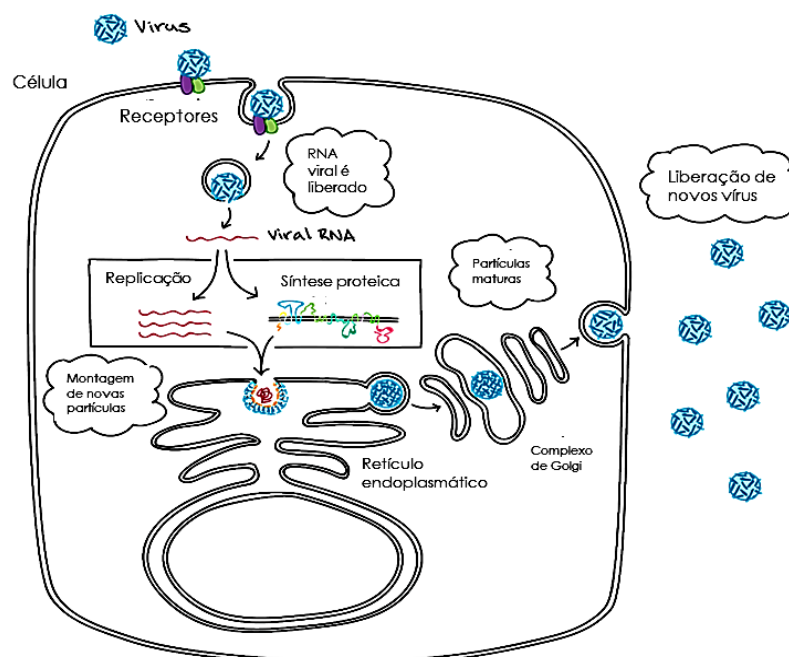
### **2.1.3 Ciclo Reprodutivo do Zika Vírus e do mosquito *Aedes***

O que se sabe sobre a replicação do ZIKV provém da replicação de outros flavivírus e seu período de incubação pode ser de vários dias. Pesquisas como a de Hayes (2009) mostram que o tempo de incubação viral em mosquitos é de aproximadamente 10 dias entre o período em que o mosquito é infectado e se torna infectivo, também chamado de período de incubação extrínseco. Este período geralmente, inicia-se com uma breve viremia e um período de latência de cerca de 12 a 16 horas (durante este período também ocorrem a síntese de RNA e proteínas virais, porém em quantidades poucos detectáveis), seguindo-se por uma mudança na estrutura celular, onde as partículas de vírus se acumulam nas células infectadas atingindo seu máximo em cerca de 24 horas. Esta replicação ocorre no citoplasma e em regiões que rodeiam o núcleo celular de uma grande variedade de vertebrados e alguns artrópodes que servem como hospedeiros primários (WESTAWAY, 1987).

Inicia-se com a ligação da proteína E do envelope viral aos receptores da célula hospedeira, podendo ser por endocitose mediada por Clatrina ou mimetismo apoptótico. Após a fusão das membranas o RNA viral é então liberado dos lisossomos para o retículo endoplasmático rugoso no citoplasma celular (BOULTON e WESTAWAY, 1976). O RNA genômico é sintetizado assimetricamente e na forma semiconservadora de uma cadeia dupla que serve como um molde para a síntese da próxima cadeia em um período de aproximadamente 20 minutos (WESTAWAY, 1987).

O RNA é traduzido na poliproteína que dá origem a todas as proteínas virais que se mantêm associadas a proteínas de membrana pesadas até o momento da clivagem, ocorrendo na superfície do retículo endoplasmático rugoso bem como sua montagem facilitada pelo canal iônico viral. A síntese de RNA viral pode ser detectada de 3-6 horas após a infecção e a liberação de novos vírions ocorrendo em até 12 horas (CHAMBERS *et al.*, 1990). Os vírions são então transportados para o aparelho de Golgi, onde a proteína PrM é incorporada aos vírios e clivada em proteína M e um resíduo não identificado a medida que os vírions deixam a célula (WESTAWAY, 1987) e são liberados por exocitose para infectar novas células (EXPASY, 2016). Na figura 04 é possível observar um esquema da replicação viral de flavivírus com ZIKV.

**Figura 4 - Replicação dos flavivírus**

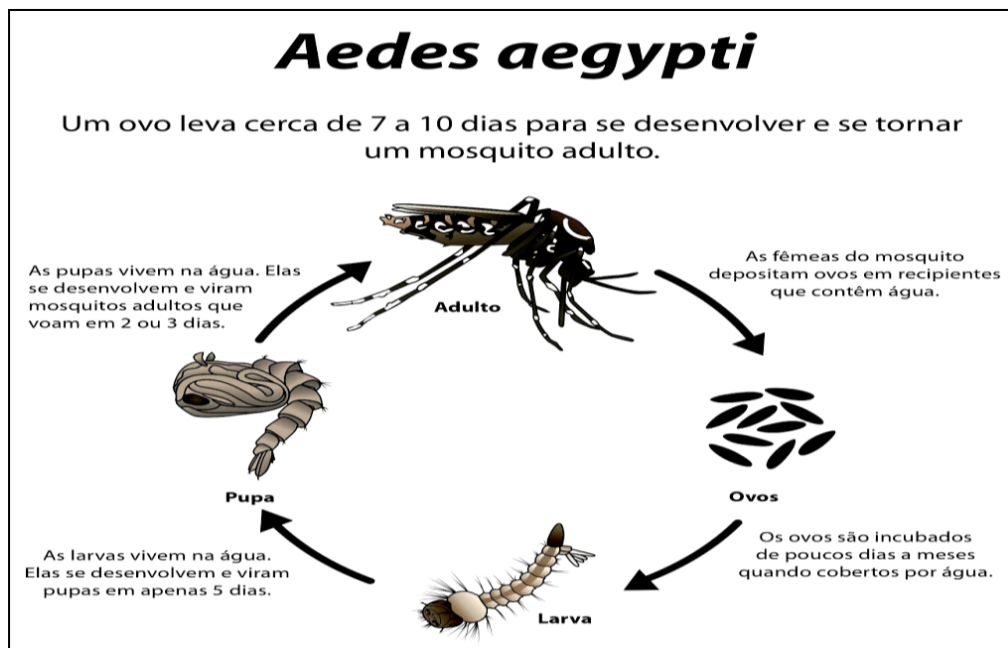




Seis proteínas não estruturais (NS) do vírus, como NS2a a NS5 formam um complexo de replicação no lado citoplasmático da membrana do retículo endoplasmático da célula infectada (SONG *et al.*, 2016). A patogenicidade do ZIKV ainda não é bem conhecida, mas os flavivírus que são transmitidos por mosquitos podem replicar-se em células dendríticas próximas da área de inoculação e posteriormente espalhar-se para os linfonodos e corrente sanguínea (HAYES, 2009). Apesar de, como descrito anteriormente, a replicação do vírus ocorrer no citoplasma celular, uma pesquisa realizada em 1988 por Buckley e Gould encontrou antígenos para o vírus nos núcleos das células infectadas.

O ciclo de vida dos flavivírus que são transmitidos por artrópodes envolvem relações muitas vezes complexas entre os vetores de insetos, os reservatórios em vertebrados, além da relação com os seres humanos e o meio ambiente (CHAMBERS, 1990). O mosquito do gênero *Aedes* é o principal da subfamília Culicinae, que compreende cerca de 1200 espécies. Estes mosquitos são holometábolos, ou seja, sofrem metamorfose completa durante o seu ciclo de vida. Até a emergência de um mosquito adulto, o estágio imaturo do *Aedes* requer um período de sete dias, que compreende o ovo, quatro estágios larvais, pupa, e por fim o mosquito adulto alado (AMARAL; DANSA-PETRETSKI, 2012).

**Figura 5 - Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*.**



Fonte: Centro Nacional de Doenças Infecciosas Emergentes e Zoonóticas (CDC).

O mosquito *Aedes* é uma espécie que possui atividade diurna, alimentando-se dentro ou fora das residências, principalmente em períodos chuvosos, com sua primeira identificação em território Brasileiro e erradicação em 1955 (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). A principal forma de transmissão das doenças relacionadas a este mosquito vetor se dá a partir da picada da fêmea, que alimenta-se de sangue 48 horas após sua emergência. Uma fêmea adulta coloca de 60 a 100 ovos na sua primeira ovoposição. Estima-se que o período de sobrevivências destes mosquitos é de 20 dias para machos e 30 dias para fêmeas (AMARAL; DANSA-PETRETSKI, 2012). Métodos para a prevenção da picada do mosquito se dá através de intervenções urbanas pelo governo e conscientização da população para medidas sanitárias com relação ao acúmulo de água parada. A figura 05 mostra de forma resumida o ciclo de vida do mosquito.

Sabe-se, com isso, que o ciclo reprodutivo do mosquito evoluiu para um comportamento intimamente ligado às condições domiciliares ofertadas pelo modo de vida da população de uma determinada região. Levando, assim, ao maior ou menor índice do mosquito, definindo a incidência da febre por ZIKV em uma dada área (BESERRA *et al.*, 2009).

#### **2.1.4 Sintomas da Febre do vírus Zika**

O primeiro relatório bem documentado da febre do ZIKV foi dado por Simpson que descreveu sua própria doença aos 28 anos (SIMPSON, 1964). Deu-se início com uma leve dor de cabeça e no dia seguinte, pequenas erupções maculopapular cobriram seu rosto, pescoço, tronco e a parte superior das mãos, dos braços e solas. Foi desenvolvida uma febre transitória, mal-estar e dores nas costas. No dia seguinte, seu estado melhorou e as erupções estavam desaparecendo. O vírus foi então isolado a partir do soro recolhido quando Simpson estava febril (HAYES *et al.*, 2009).

Outros sintomas podem aparecer como artrite/artralgia (dores articulares), edema nas extremidades (articulações menos dos pés e das mãos), dores retro-orbitárias, febre de baixo grau (entre 37,8 °C e 38,5 °C) vertigem (sensações de desmaio e fraqueza), mialgia (dores musculares), distúrbio digestivo e erupções maculopapular que muitas vezes começa na face e posteriormente se espalha para

o restante do corpo. Pode aparecer, também, conjuntivite não purulenta e cefaleia. A infecção pode, ainda, ser assintomática em determinados pacientes, onde se acredita que apenas 1 em cada 4 pacientes infectados com ZIKV possa desenvolver os sintomas. Boa parte dos pacientes se recupera completamente sem complicações severas e os números de hospitalização para a doença são baixos (ECDC, 2015; ZANLUCA *et al.*, 2015).

Até o final do ano de 2016 foram registrados, de acordo com o Boletim Epidemiológico número 03 do volume 48 de 2017 liberado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2017), 215.319 casos de febre pelo ZIKV distribuídos pelo país em 2.306 municípios e destes, 130.701 casos foram confirmados. De acordo com o mesmo boletim, foram confirmados laboratorialmente três óbitos pelo vírus, em São Luiz (MA), Benevides (PA) e Serrinha (RN).

Por ser uma doença de sintomas semelhantes à de outras viroses, a febre por ZIKV acaba por ser confundida com Dengue ou Chikungunya, fazendo com que, sua incidência real seja desconhecida. Constata-se, dessa maneira, a inexistência de testes diagnósticos laboratoriais simples e confiáveis. Como exemplo disto, é possível citar a epidemia de Yap, onde estimou-se 75% de soroprevalência para os habitantes da região, uma porcentagem superestimada devido à reação cruzada entre os anticorpos anti-Zika e outras arboviroses (OEHLER *et al.*, 2014).

Previamente ao grande surto da Polinésia Francesa, as investigações acerca da patogenicidade do ZIKV foram negligenciadas, pois parte dos indivíduos infectados eram assintomáticos ou apresentavam sintomas leves que poderiam ser facilmente confundidos com outras flaviviruses. No entanto, evidências recentes mostram um aumento nas infecções pelo vírus ligadas à microcefalia fetal e neonatal (Mlakar *et al.*, 2016), além de complicações neurológicas graves como a síndrome de Guillain-Barré (SONG, 2016). O vírus foi detectado no líquido amniótico de mulheres grávidas cujos fetos tinham microcefalia, sendo também detectado nos tecidos cerebrais destes fetos (CALVET *et al.*, 2016).

Uma possível associação entre o ZIKV e a microcefalia foi proposta no Nordeste Brasileiro, onde a incidência de crianças com microcefalia aumentou a partir do momento da entrada do vírus no país. Já foi comprovado em experimentos com animais que este vírus é capaz de migrar para o Sistema Nervoso Central (SNC) e transpassar a barreira de proteção hematoencefálica (NUNES *et al.*, 2016), o que pode causar retardo no crescimento fetal, calcificações e microcefalia, um

distúrbio que ocorre na fase de proliferação neuronal geralmente entre o 3º e 4º mês de gestação (MLAKAR *et al.*, 2016).

Durante o surto de ZIKV na Polinésia Francesa, também aumentaram-se os casos da síndrome de Guillain-Barré, sugerindo uma possível associação do ZIKV com essa doença. Ela caracteriza-se por uma neuropatia aguda, imunomediada, que geralmente ocorre após pequenas infecções virais e bacterianas. A função motora é afetada, onde os pacientes apresentam-se com fraqueza generalizada, insuficiência e graus variáveis de distúrbios sensoriais e comprometimento dos nervos cranianos, podendo aumentar com a idade. Os pacientes que possuem essa doença em associação ao ZIKV apresentam a virose de maneira assintomática (CAO-LORMEAU *et al.*, 2016). Essa síndrome se desenvolve durante a infecção com ZIKV, mas ainda é desconhecida a relação entre estas duas doenças, acreditando-se que pode ser de origem imunológica (OEHLER *et al.*, 2014).

### **2.1.5 Transmissão da Doença do vírus Zika**

Sabe-se que, desde abril de 2015 já havia a transmissão autóctone do ZIKV, ou seja, transmissão da doença dentro do próprio estado, não trazida por alguém contaminado de outra região, nos estados brasileiros. Dessa forma, já se confirmava a presença do vírus no estado e a transmissão entre a própria população (BRASIL, 2017).

A transmissão do ZIKV se dá principalmente via artrópodes, mosquitos do gênero *Aedes*. Além da transmissão por meio do mosquito é possível a transmissão intrauterina (mãe para feto) (MLAKAR *et al.*, 2016) e através do contato físico (sangue, saliva e transmissão sexual) e, mais recentemente, foram encontradas partículas virais na urina (MUSSO *et al.*, 2015). A transmissão mais frequente se dá pela picada do mosquito, mais precisamente a fêmea, que após picar uma pessoa infectada carrega o vírus sem ser afetado (segundo informações da Fiocruz, o inseto se mantém infectado por toda a vida). As picadas ocorrem principalmente durante o dia, mas também podem ocorrer no período noturno (CDC, 2017).

No caso da transmissão intrauterina, o vírus infecta, ainda, nos seres humanos, as células progenitoras neuronais corticais e atenua o seu crescimento

(TANG, 2016). Estas células atuam diretamente na formação do córtex (maior parte cerebral) e assim, infecções por ZIKV estudadas em cérebros fetais, como na pesquisa de Melo *et al.* (2016), mostraram um Sistema Nervoso Central severamente afetado devido a infecção via intrauterina do vírus. No mais, não foram encontrados vírus ou alterações patológicas em nenhum outro órgão fetal, sugerindo um forte neurotropismo do vírus (MLAKAR *et al.*, 2016).

Em uma pesquisa realizada por Besnard *et al.* (2014), utilizando mães possivelmente infectadas com ZIKV antes do nascimento dos bebês, resultou-se positivo os testes de RT-PCR para o vírus em ambas as mães e os bebês. Além disso, amostras de leite materno coletadas e testadas também por RT-PCR mostraram-se positivas. Entretanto, nenhuma partícula replicativa viral foi encontrada no leite. A transmissão perinatal de arboviroses já foi relatada tanto para DENV, quanto para Chikungunya, vírus do Nilo Ocidental e febre amarela, e a transmissão para o leite materno foi identificada para DENV e vírus do Nilo Ocidental. As possíveis rotas para a transmissão perinatal são transplacentária, durante o parto, no período de amamentação.

Pesquisas recentes mostraram que existem possíveis casos de transmissão do ZIKV de pessoa para pessoa que não ocorrem através do contato sexual, como uma pesquisa realizada por Musso *et al.* (2014) mostra, o vírus pode residir em transfusões de sangue, já que em alguns pacientes a doença se apresenta de forma assintomática, aumentando as chances de transmissão.

Neste estudo, 42 de 1.505 doadores de sangue estavam assintomáticos no momento da doação. Com isso, embora exista um alto risco de transmissão da doença via transfusão sanguínea na ausência de um teste licenciado para a detecção de ZIKV, a necessidade de continuar as doações, fez com que as autoridades de saúde da Polinésia Francesa implementassem o teste de amplificação do ácido nucleico via RT-PCR (*Transcriptase Reversa-Polymerase Chain Reaction*) em tempo real (MUSSO *et al.*, 2014).

Desde 2011 sabe-se da possibilidade da transmissão do vírus por meio de relações sexuais, entretanto, a doença do Zika era negligenciada até 2015 onde se descobriu que o ZIKV encontra-se em fluidos do organismo e pode ser transmitido de diversas formas além do mosquito. Um novo estudo foi realizado, onde descobriu-se que em coletas de sangue, urina e sêmen 2 semanas após o

diagnóstico de um paciente de 32 anos de idade, o sêmen continha 100 mil vezes mais partículas virais que nos demais coletados (MANSUY *et al.*, 2016).

Essas pesquisas mostram que, embora a transmissão mais comum seja através do mosquito *Aedes*, outras formas de contágio não podem ser negligenciadas, como fluidos corporais (sangue, sêmen e líquido amniótico). Deste modo, mais estudos deverão ser conduzidos a fim de que mais informações sejam coletadas e novos testes ofereçam à população um diagnóstico mais seguro e preciso.

### 2.1.6 Diagnóstica da Doença do vírus Zika

O diagnóstico da doença se dá, mais precisamente, mediante o teste de PCR (Polymerase Chain Reaction – Reação em cadeia da polimerase) para a detecção do RNA viral, além de testes adicionais para a detecção de anticorpos (IgM) em soros de pacientes. Como o período de viremia da doença é considerado curto, os testes para a detecção direta do vírus ocorrem durante os três a cinco primeiros dias da infecção (ECDC, 2015). O teste de PCR deve ser realizado dentro de 10 dias do início da doença, e para um melhor diagnóstico, a detecção de anticorpos nas amostras de soro deve ser realizada o mais cedo possível e um segundo teste em até três semanas. Entretanto, ainda é possível o falso resultado a partir de reação cruzada com Dengue, Febre Amarela, Encefalite Japonesa, e Vírus do Nilo Ocidental. Este resultado se tonava mais comum entre os pacientes que já adquiriram estas doenças em outros momentos, do que entre os pacientes com infecção primária por ZIKV (HAYES, 2009).

Ensaio para a análise sequencial do vírus através de *primers* degenerados também podem ser utilizados para um possível método de rastreamento alternativo para a infecção do flavivírus. A saliva mostra-se como um método alternativo de confirmação da detecção durante a fase aguda da doença (durante a primeira semana de sintomas), através de um *swab*, podendo ser utilizado quando amostras de sangue não estão disponíveis, porém não é um método utilizado para um período prolongado de detecção, além de não substituir outros métodos para a confirmação da doença (MUSSO *et al.*, 2015b; PATEL *et al.*, 2013).

Outra amostra que se mostrou eficiente para a detecção prolongada do vírus em pacientes infectados foi a de urina, pois tem-se relatado o desaparecimento do genoma viral do soro em alguns casos de pacientes na fase inicial da doença sintomática. Devido à variedade dos métodos e amostras biológicas para detecção do vírus, estes podem ser testados concomitantemente em laboratórios de análise clínica para uma confirmação mais precisa da doença (MUSSO *et al.*, 2015b).

Em países tropicais, tais como Polinésia Francesa e Brasil, durante o período chuvoso, tornam-se de difícil administração os testes diagnósticos para as viroses, incluindo Dengue e Zika, pois realizar diagnóstico em pacientes infectados para ambas as doenças é um procedimento caro. Além disso, testes adicionais devem ser feitos em doadores de sangue (MUSSO *et al.*, 2014).

Além da detecção viral através de PCR, os anticorpos IgM/IgG nos pacientes infectados podem ainda ser identificados por ELISA (do inglês = *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), um teste imunoenzimático para a detecção de anticorpos específicos, através da interação antígeno-anticorpo.

Porém deve ser considerado que poderá haver reação cruzada com anticorpos de DENV ou outros flavivírus, como já documentado em trabalho realizado por Lanciotti *et al.* (2008) a partir de análises em vítimas da epidemia na Micronésia em 2007. Deve ser levada em consideração, também, a reação cruzada originada da vacinação de grande parte da população contra a Febre Amarela, onde anticorpos reagem com epítopos que são conservados entre os flavivírus (MANSFIELD, 2011; MEDEIROS, 2017).

### **2.1.7 Prevenção da Doença do vírus Zika**

Até o momento, não há vacinas ou terapias disponíveis para tratar ou prevenir infecções por ZIKV. Para isso, são necessários esforços para o desenvolvimento de vacinas ou terapias antivirais a partir do conhecimento sobre a patogênese e a base molecular viral (SONG *et al.*, 2016).

Os possíveis tratamentos são sintomáticos e de suporte, incluindo o repouso do paciente e a administração de acetaminofeno ou paracetamol para aliviar a febre, além do uso de anti-histamínicos para controlar o prurido dependendo do nível associado ao sintoma maculopapular. A utilização de aspirina não é

aconselhada para crianças menores de 12 anos devido ao risco de hemorragia e o possível desenvolvimento da Síndrome de Reye (doença grave e de rápida progressão que acomete o cérebro e o fígado, relacionada ao uso de salicilatos em infecções virais).

Aos pacientes, é recomendada ainda, a reposição de líquidos perdidos pela sudorese ou vômitos. É recomendado também o isolamento do paciente para não ocorrer uma possível transmissão da doença para outras pessoas ao redor, seja pela picada do mosquito ou contato direto de pessoa para pessoa através da relação sexual (PAHO/WHO, 2015). Em pesquisa realizada por Barrows (2016), foram encontrados mais de 20 compostos que inibiram infecção por ZIKV e isto pode auxiliar na formulação de fármacos que cheguem a evitar infecções por flavivírus.

Tendo em vista a falta de medidas para tratar a doença é imprescindível a participação intersetorial em todas as esferas governamentais, sejam elas da saúde, educação e meio ambiente, desenvolvimento social e agências de turismo. Além disso, a participação de organizações não-governamentais (ONGs) e organizações privadas juntamente com a população devem atuar com programas de controle ao mosquito, sendo este o principal vetor para a transmissão dos flavivírus causadores das principais viroses como Dengue, Febre Amarela, Chikungunya, Ecnfalite Japonesa, Zika, dentre outras. A comunidade também deve ser envolvida através de campanhas de comunicação que forneçam informações claras e de qualidade acerca das doenças transmitidas pelo *Aedes*, afim da redução de sua densidade (PAHO/WHO, 2015).

### **2.1.8 Implicações da Doença para a Sociedade**

Por ser uma doença facilmente confundida com outras flavivirozes, o reconhecimento da disseminação do ZIKV, principalmente dos continentes Africano e Asiático, exigirá a colaboração entre clínicos, funcionários da saúde pública e laboratórios de referência de alta qualidade. Além de ser confundida com Dengue e Chikungunya, o ZIKV pode ainda estar amplamente presente despercebidamente durante os surtos (HAYES, 2009). A transmissão da doença através de viajantes nas áreas de risco, principalmente Ásia e Américas, se tornou uma possibilidade que foi analisada (ECDC, 2015). Além disto, outra grande forma para o alastramento de



uma virose para outros continentes é através dos ventos, onde já foram estudados os papéis do clima e dos ventos para a propagação de arbovírus por meio do movimento de artrópodes infectados (MACKENZIE, LINDSAY e DANIELS, 2000).

Uma das grandes preocupações das autoridades em 2016 foram as Olimpíadas e os Jogos Paraolímpicos que foram sediados no Rio de Janeiro no mesmo ano, atraindo, assim, milhares de viajantes nacionais e internacionais, aumentando o risco de contaminação com doenças locais e doenças trazidas de outros continentes (RIO, 2016). No dia 01 de fevereiro de 2016 a OMS (Organização Mundial de Saúde) declarou que o surto de Zika constituía uma emergência de saúde pública e de interesse internacional, constituindo risco para outros estados através da propagação nacional e internacional de doenças e exigindo uma resposta internacional coordenada devido aos Jogos Olímpicos (BOGOCH *et al.*, 2016; WHO, 2016).

Esta propagação pode estar associada a grande urbanização das últimas décadas, o estabelecimento de favelas periurbanas e a falta de sistemas de água e esgoto, além de um sistema de transporte internacional de pessoas e mercadorias. Com isso, é aumentado o potencial de reprodução do mosquito *Aedes*, que podem também ser facilmente transportados em carros e bagagens a partir do movimento dos viajantes. O controle do mosquito vetor continua sendo um problema de saúde global que juntamente com a falta de inovações na pesquisa para novos e ambientalmente seguros inseticidas, além de programas de controle não financiados resultou em programas ineficazes para contenção dos mosquitos na maioria dos países nos últimos anos (MACKENZIE, GUBLER e PETERSEN, 2004).

### **2.1.9 Expressão e Purificação de Proteína Recombinante**

As proteínas são a matéria-prima para a construção da vida e são sintetizadas por todas as formas vivas como parte do seu metabolismo. Dentre suas diversas funções estão as biocatalizadoras, estruturais do citoesqueleto e reguladores do ciclo celular, sendo comercialmente produzidas em indústrias com o auxílio da Engenharia genética e Engenharia de Proteínas (RASALA e MAYFIELD, 2015). Além disso, a produção de proteínas recombinantes movimentou um mercado que em 2009 atingiu o valor de \$99 bilhões (WALSH, 2010).

Em um mundo cada dia mais globalizado e industrializado, faz-se necessário o aprimoramento de técnicas de melhoramento genético e produção de vacinas, anticorpos e testes diagnósticos para as doenças. Com isso, organismos vivos estão sendo utilizados para converter matéria-prima em produtos desejados, como por exemplo, cerveja, vinho e pão. Os avanços na Engenharia Genética e Biotecnologia durante os últimos 50 anos ampliaram a produção de bioprodutos permitindo o uso de organismo geneticamente modificado (principalmente procaríotos) para a produção de proteínas recombinantes e pequenas moléculas (DEMAIN e VAISHNAV, 2009).

Atualmente, os principais organismos utilizados para a produção de proteínas recombinantes incluem bactérias, leveduras, linhas celulares extraídas de insetos, plantas, linhas celulares de mamíferos e animais transgênicos, cada uma destas plataformas de produção possui limitações e metodologias específicas (RASALA e MAYFIELD, 2015). Desde a emergência do setor biofarmacêutico nos anos de 1850, a bactéria *Escherichia coli* foi a plataforma prevalente para a produção destas proteínas, onde seguiu-se a implementação da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, ambos atendendo diferentes demandas de produção (FERRER-MIRALLES *et al.*, 2009). A utilização de células de mamíferos está tornando-se cada vez mais comum, trazendo a habilidade de fazer modificações pós-traducionais importantes à formação das proteínas (Zhu, 2012). Apesar desta vantagem, cerca de 30% da produção de proteínas recombinantes do mercado biofarmacêutico ainda são feitas em *E. coli* (OVERTON, 2014).

Para a expressão destas proteínas é necessário um planejamento correto que vise à identificação e a localização do gene de interesse, sua inserção em um vetor com promotores adequados que aumentem a transcrição do gene e sua inserção em um hospedeiro designado para a expressão deste gene (FRANCIS e PAGE, 2010).

Como já mencionado, a bactéria *E. coli* é muito utilizada para a produção de proteína recombinante, principalmente por ser um organismo pequeno, estruturalmente simples e genoma conhecido (JOENSEN *et al.*, 2014). Dentre as linhagens conhecidas, estão a *E. coli* BL21 (DE3), altamente utilizada por serem eficientes na clonagem e expressão das proteínas recombinantes, (FERRER-MIRALLES *et al.*, 2009), sendo de fácil manipulação genética e rendimento proteico alto em um só dia (FRANCIS e PAGE, 2010). Entretanto, também existem algumas

desvantagens na utilização deste sistema de produção, como por exemplo, a incapacidade destas bactérias em realizar certas modificações pós-traducionais, sua alta densidade na produção pode resultar em toxicidade celular e a formação de corpos de inclusão que podem dificultar os métodos de purificação das proteínas de interesse (DEMAIN e VAISHNAV, 2009).

Para contornar este problema, outros sistemas de produção de proteínas recombinantes são utilizados, como células animais e plantas, porém problemas na produção de proteínas heterólogas nestes sistemas também precisam ser contornados em termos de aumento no rendimento da produção, melhora e autenticidade da glicoproteína produzida, além de questões de biossegurança e aceitação das substâncias expressas (MA, DRAKE; CHRISTOU, 2003).

Para o sucesso da produção de proteínas recombinantes vários fatores são essenciais. A escolha adequada do hospedeiro, assim como o vetor de expressão e replicon, ou seja, uma origem de replicação que controla o número de cópias do plasmídeo, são também fundamentais (GUPTA e SHUKLA, 2015; ROSANO e CECCARELLI, 2014). Existem inúmeros vetores de expressão procarióticos, dentre eles o mais utilizado para *E. coli* é o pET (15-60 cópias por célula), onde consegue-se alcançar uma produção de proteína recombinante de interesse de até 50% das proteínas totais celulares (ROSANO e CECCARELLI, 2014). No vetor também, outro elemento essencial é a presença do promotor, que auxilia na transcrição proteica. Dentro os inúmeros promotores existentes, o mais utilizado é o *lac*, que é induzido pela presença da lactose e o T7, que está presente em grande parte dos vetores pET e é popular na expressão de proteínas recombinantes (GRAUMANN e PREMSTALLER, 2006).

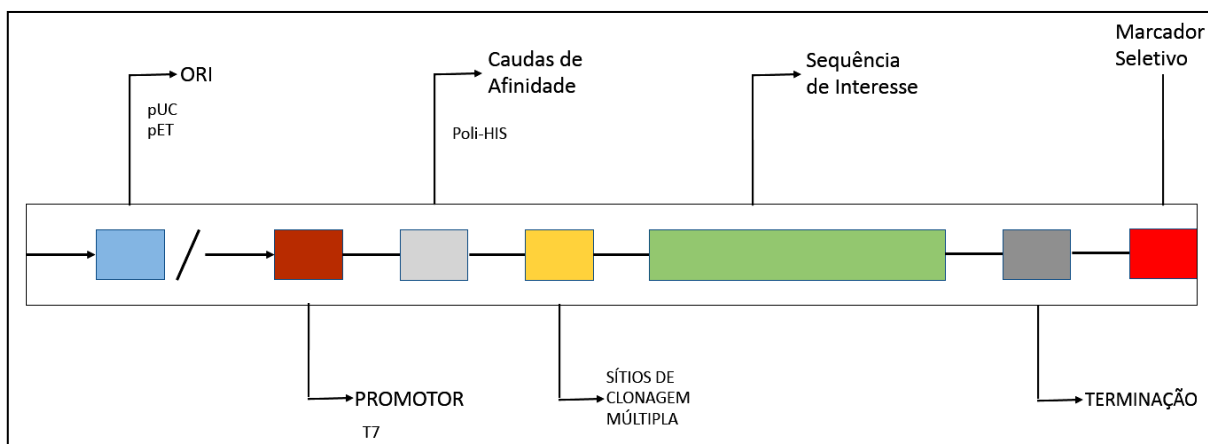
Para a expressão do gene de interesse de uma forma controlada, muitos vetores de indução, como alternativa à lactose, são induzidos com IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside), reagente molecular utilizado como indutor artificial cujo mecanismo de ação se dá a partir da indução da transcrição de genes da região *lac operon* do plasmídeo celular. Na presença deste reagente, o repressor *LacI* não pode ligar-se ao *lac* operador, havendo assim, um aumento na quantidade da enzima T7 RNA polimerase, a qual liga-se ao promotor T7, iniciando a transcrição do cDNA de interesse (Sørensen e Mortensen, 2005).

Um dos grandes problemas que precisam ser contornados na purificação de proteínas recombinantes é o fato de que grande parte destas proteínas,

principalmente as de origem eucarióticas, expressadas em *E. coli* são insolúveis e formam agregados, chamados corpos de inclusão, que dificultam a sua purificação e análise por concentrar a proteína na fração insolúvel (WIDMANN e CHRISTEN, 2000). Porém existem estratégias que vão desde a desnaturação para a solubilização, até sua purificação e re-enovelamento (WINGFIELD, 2015). A utilização de caudas de afinidade (geralmente associadas às regiões C ou N-terminal) fornece protocolos padrões para a purificação da proteína de interesse (YOUNG, 2012), além de permitir uma detecção mais específica da proteína de interesse por técnicas como a do *Western blot* (ROSANO e CECCARELLI, 2014). Dentre as caudas de afinidade (c-Myc, FLAG, ELP, HFB, etc.), a mais utilizada é a Poli-histidina (*His-tag*) contendo pelo menos seis cópias de resíduo desse aminoácido, que por ter tamanho relativamente pequeno, não afeta a integridade proteica e nem compromete os ensaios imunológicos como ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), e ainda permite a purificação da proteína através de resinas que possuam afinidade a esta cauda (WOOD, 2014).

As principais características para a utilização da *His-tag* são o seu tamanho reduzido que permite a sua inserção em ambas as regiões terminais, baixo custo e efeito mínimo ou nenhum efeito na estrutura e na função da proteína de interesse (LICHTY et al., 2005). Além disso, a sua purificação é facilitada por apenas uma etapa, onde o lisado celular é purificado por cromatografia de afinidade a metal ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  ou  $\text{Ni}^{2+}$ ) (PUHL, 2008).

**Figura 6 - Anatomia de um vetor de expressão.**



Fonte: Adaptação de ROSANO; CECCARELLI, 2014.

A utilização das caudas de afinidade não se restringe apenas a purificação das proteínas, mas também são utilizadas para detecção por *Western blot* quando os níveis de produção ainda não estão otimizados (ROSANO e CECCARELLI, 2014). Esta é uma técnica de detecção rápida, simples e independente de atividade biológica e sensível o suficiente para medir pequenas quantidades de proteína. Além disso, esta é uma técnica comum durante a rotina laboratorial, bastante estudada e com constante aperfeiçoamento, sendo a técnica inicial para uma variedade de experimentos (DIXON e HILL, 1984).

A técnica consiste na transferência das proteínas do gel de poliacrilamida para uma membrana absorvente de nitrocelulose (KURIEN e SCOFIELD, 2006). É formado um “sanduíche” com filtros de papel absorvente molhadas em tampão para a transferência (contendo mais comumente Tris, acetato de sódio, EDTA e metanol), o gel de poliacrilamida após a corrida eletroforética e com as proteínas e a membrana de nitrocelulose (TOWBIN *et al.*, 1979). Após a transferência, sítios inocuados por proteínas são bloqueados utilizando leite sem gordura e a membrana é incubada por algumas horas com anticorpos anti-cauda de afinidade ou proteína recombinante (KURIEN e SCOFIELD, 2006). Os resultados podem ser observados através de colorações orgânicas, fluorescência, coloração com nitrato de prata ou outras partículas como ouro, cobre, prata ou zinco (MERRIL *et al.*, 2000).

Outra técnica bastante utilizada a partir da produção de proteínas recombinantes é o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática ELISA, que detecta anticorpos anti-proteína recombinante e utiliza principalmente a enzima peroxidase que catalisa a reação (HAMBLIN *et al.*, 1986). O resultado é analisado por densidade ótica e dos controles positivos e negativos, além dos resultados serem sensíveis, específicos e podem ser obtidos em um dia (TORANE e SHASTRI, 2008). O antígeno é aderido a uma microplaca, geralmente contendo 96 poços, que após a adição dos antígenos, é também bloqueada utilizando leite livre de gorduras, os soros a serem testados e um segundo anticorpo conjugado com a peroxidase, que posteriormente confere a coloração a cada soro testado. O resultado é medido a partir de um equipamento leitor das placas de ELISA por densidade ótica em espectrofotômetro (THIHA e IBRAHIM, 2015).

### 2.1.10 Uso de Proteínas Recombinantes para Kits Diagnósticos

A linha de evolução da produção de biofármacos começou com a primeira vacina de proteínas produzida em 1796 para a varíola bovina e a utilização da fermentação apareceu nos anos de 1900 (DEMAIN e VAISHNAV, 2009). A primeira proteína farmacologicamente produzida foi a Insulina, por Banting e Best em 1922 (LOWE; GUPTA, 2001) e a descoberta da Penicilina em 1927 (FLEMING, 1944). Por fim, a biotecnologia moderna começou em 1971, a aprovação em 2002 de 155 biofármacos e o desenvolvimento de vacinas (DEMAIN e VAISHNAV, 2009).

O processo de descoberta e desenvolvimento de drogas passa por um extensivo processo de produção de proteínas recombinantes. Estas proteínas possuem aplicações que variam desde a produção de novas drogas, até a produção de kits diagnóstico que proporcionem melhores resultados do que os já existentes no mercado. No que se refere à produção das proteínas recombinantes do ZIKV, pesquisas recentes já mostram resultados significativos. Na tabela a seguir (Tab. 01) encontram-se alguns trabalhos que relatam a produção de proteínas recombinantes ou partículas virais a partir de sequências do ZIKV disponíveis.

**Tabela 1 - Sumário da Expressão de Proteínas/Partículas do Zika Vírus.**

PROTEÍNA/ PARTÍCULA	ORGANISMO	VETOR	NÍVEL DE EXPRESSÃO	REFERÊNCIA
Cryo-EM	Células Vero	-	-	(Sirohi <i>et al.</i> , 2016)
Proteína E80_E (SPH2015)	<i>E. coli</i> BL21	pET-30a	10ug/mL	(Liang <i>et al.</i> , 2018)
Proteína E80_S (SPH2015)	<i>E. coli</i> BL21	pET-30a	18ug/mL	(Liang <i>et al.</i> , 2018)
Proteína E (AHL43505.1)	Células HEK-293T	pVAX1	-	(Mossenta <i>et al.</i> , 2017)
Proteína E (KU365777)	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pET-21a	-	(Dai <i>et al.</i> , 2016)
Proteínas E (EDIII) e NS1 (N terminal) (FP-25013-18)	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pET-28a	-	(Viranaicken <i>et al.</i> , 2017)
NS1 (MR766)	Células Sf9	-	-	(Brown <i>et al.</i> , 2016)

NS1 (KU509998.3)	Células HEK-293T	pLV-eGFP-ZIKV-NS1	-	(Liu <i>et al.</i> , 2017)
NS1 (AMA12085)	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pET-21a	10mg/mL	(Song <i>et al.</i> , 2016)
NS1 (FP-25013-18)	<i>ClearColi</i> BL21 (DE3)	pET-28a		(Viranaicken <i>et al.</i> , 2017)
NS2B-NS3 (AEN75265.1/K126TGKR130)	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pET-15b pETDUET-1	40mg/mL	(PHOO <i>et al.</i> , 2016)
NS2B-NS3 (KU729217.2)	<i>E. coli</i>	-	-	(Lei <i>et al.</i> , 2016)
NS4-A e NS4-B (MR766/H/PF/2013)	Células Vero C6/36	-	-	(Liang <i>et al.</i> , 2016)
NS5 (KJ776791.2)	<i>E. coli</i> T7 Express lq	pQE30	-	(Coloma <i>et al.</i> , 2016)

Fonte: Elaborada pelo autor

Grande parte dos trabalhos delimitados pela tabela, expressam proteínas estruturais e não estruturais ou partículas virais a fim de estudos mais aprofundados acerca da estrutura das mesmas (SIROHI *et al.*, 2016; MOSENTA *et al.*, 2017; DAI *et al.*, 2016; LEI *et al.*, 2016; LIANG *et al.*, 2016; COLOMA *et al.*, 2016). As expressões ocorrem todas de acordo com literaturas já mencionadas, utilizando como plataforma principal de expressão a bacteriana com cepas de *E. coli* BL21 (DE3). Porém, nenhum dos trabalhos até agora citados possuem como objetivo a formulação de um kit diagnóstico que supere o já existente no mercado.

Uma das maiores dificuldades em realizar testes diagnósticos em doenças causadas por vírus durante épocas de surto é a validação da qualidade dos testes e a disponibilidade dos mesmos (CHARREL *et al.*, 2016). A utilização de técnicas como ELISA tornou-se mundialmente utilizada devido à sua simplicidade, baixo custo e bom desempenho em especificidade e sensibilidade aos antígenos utilizados (SILVEIRA *et al.*, 2001).

Embora a utilização de ELISA para a detecção de ZIKV seja um dos meios de diagnóstico mais predominante, novas técnicas vêm sendo desenvolvidas, mostrando uma maior especificidade antigênica e uma menor reação cruzada com anticorpos do vírus da dengue e outras flaviviruses (HUZLY *et al.*, 2016). Devido a

estas reações cruzadas, os testes mais específicos para detecção entre os flavivírus são os testes de neutralização virais (CLETON *et al.*, 2012).

Testes serológicos para a NS1-ZIKV já existentes no mercado são utilizados para a identificação de anticorpos IgM e IgG, que são sensíveis e são considerados não-específicos e requerem um ensaio de neutralização que consome tempo e não é facilmente executado em laboratórios (LANDRY e ST GEORGE, 2017). Foi mostrado, também, que testes para a detecção de IgM para NS1 são úteis até o primeiro mês após o aparecimento dos sintomas e de IgG em 8 dias, para garantir uma máxima sensibilidade no teste (LUSTIG *et al.*, 2017).

Atualmente existem inúmeros tipos de testes de detecção para ZIKV no mercado, dentre eles estão MyBioSource Inc. (San Diego, USA) para detecção de IgM e IgG; Biocan Diagnostics Inc. (Coquitlam, Canada) que oferece uma detecção para as proteínas NS1 e Envelope; Euroimmun AG (Lübeck, Germany) utilizado para ensaios de imunofluorescência e ELISA para IgM e IgG para ZIKV, Chincungunya e os 4 sorotipos da dengue. Os ELISAs feitos a partir de proteína recombinante NS1 são os que garantem uma redução em reações cruzadas com as outras flaviviruses (CHARREL *et al.*, 2016).

Testes de imunodiagnóstico são constantemente aprimorados para possuírem maior eficácia e substituir testes já utilizados existentes no mercado. Kits como Novagnost® Zika Virus IgM-capture da Alemanha saíram de mercado no ano de 2018. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), pelos menos dois tipos de testes diagnósticos devem ser realizados para obter-se um resultado ainda mais preciso do diagnóstico para a doença (WHO, 2016). Contudo, existem variações na reprodução e confiança destes testes. Para contornar este problema, novos antígenos são constantemente purificados, testados e possuem resultados melhores comparados aos existentes no mercado, como os mencionados acima (CHARREL *et al.*, 2016).

Desta forma, este trabalho explorou a expressão e a purificação de antígenos estruturais e não estruturais de sequências do ZIKV circulante no nordeste brasileiro, para o desenvolvimento de kits diagnósticos mais precisos e de custo mais baixo em relação ao existente no mercado.



## 2.2 OBJETIVOS

### 2.2.1 Objetivos Gerais

Expressar as proteínas recombinantes do Zika Vírus em plataforma procariota para o desenvolvimento de kits diagnósticos.

### 2.2.2 Objetivos Específicos

- Selecionar, em bancos de dados, as proteínas do Zika Vírus circulantes no Brasil.
- Expressar e purificar proteínas recombinantes do Zika Vírus produzidas em bactéria *Escherichia coli*.
- Analisar a antigenicidade das proteínas recombinantes através de *Western Blot* e ELISA com soros de pacientes imunizados.

## 2.3 METODOLOGIA

### 2.3.1 Confeção das Sequências Proteicas do Zika Vírus

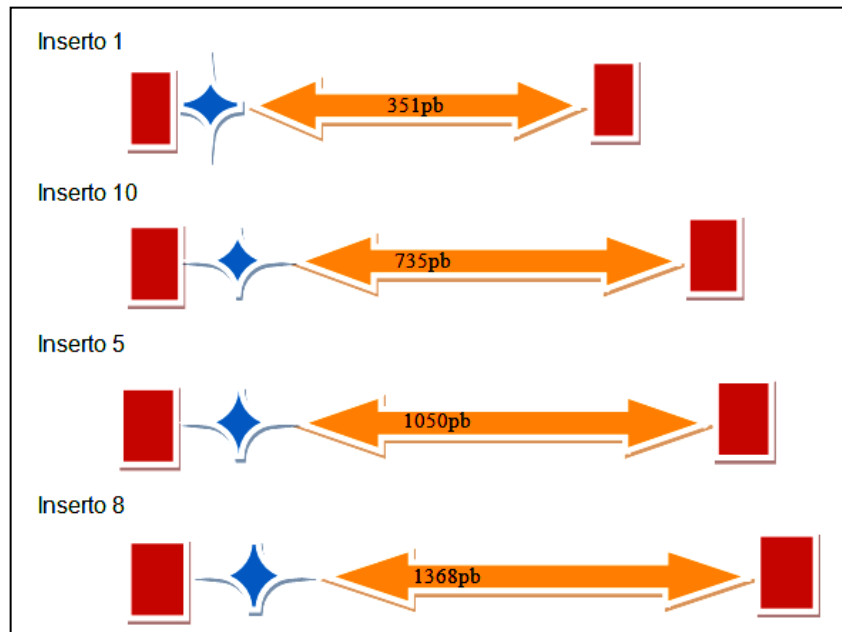
Os procedimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia e Biologia Molecular (LBBM) da Universidade Estadual do Ceará (UECE), sendo primeiramente realizada uma pesquisa abundante em bancos de dados, como NCBI e Genbank, acerca das sequências das proteínas do ZIKV mais utilizadas por autores de trabalhos na expressão das mesmas para fins científicos. Utilizou-se como base o artigo de Calvet *et al.* (2016), onde foi disponibilizado no Genbank a sequência das proteínas do ZIKV circulante no Brasil, extraído a partir do líquido amniótico de duas grávidas.

O genoma viral completo possui 10.793 nucleotídeos e está disponível no Genbank com o número de acesso KU497555. As sequências foram separadas em Capsídeo, Proteína Pr, Glicoproteína M, Proteína E (Proteínas Estruturais), NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5 (Proteínas Não Estruturais).

Às regiões codificadoras de cada proteína foram adicionadas regiões de corte para as enzimas de restrição *BamHI* (G\*GATC\*C) e *EcoRI* (G\*AATC\*C). Foram adicionadas, também, a sequência para a formação de uma cauda a partir da repetição seis vezes do aminoácido Histidina na região 3' para o processo de purificação das proteínas, que fica localizada na região N-terminal.

As sequências contendo os elementos citados foram, então, encaminhadas para a empresa BioBasic Gene Syntesis (Canada) para otimização e síntese. É possível observar na figura 07, o esquema das sequências otimizadas dos insertos do ZIKV utilizadas neste trabalho.

A numeração utilizada para identificação de cada inserto durante o projeto, juntamente com as informações adicionais para cada um, está descrita na Tabela 02. Proteína E e proteína NS5 não possuem informações por não ter sido possível suas confecções durante o projeto. Posteriormente (Fig. 08) encontram-se os mapas dos vetores utilizados neste trabalho, pUC57 enviado pela empresa de síntese dos insertos e pET-28a utilizado na expressão das proteínas.

**Figura 7 - Sequências otimizadas dos insertos do Zika Vírus.**

Legenda: Esquema da disposição das sequências de cada um dos insertos. Em vermelho, a sequência para clonagem em plasmídeo bacteriano; em azul, o códon de iniciação ATG; em laranja a sequência da proteína de interesse.

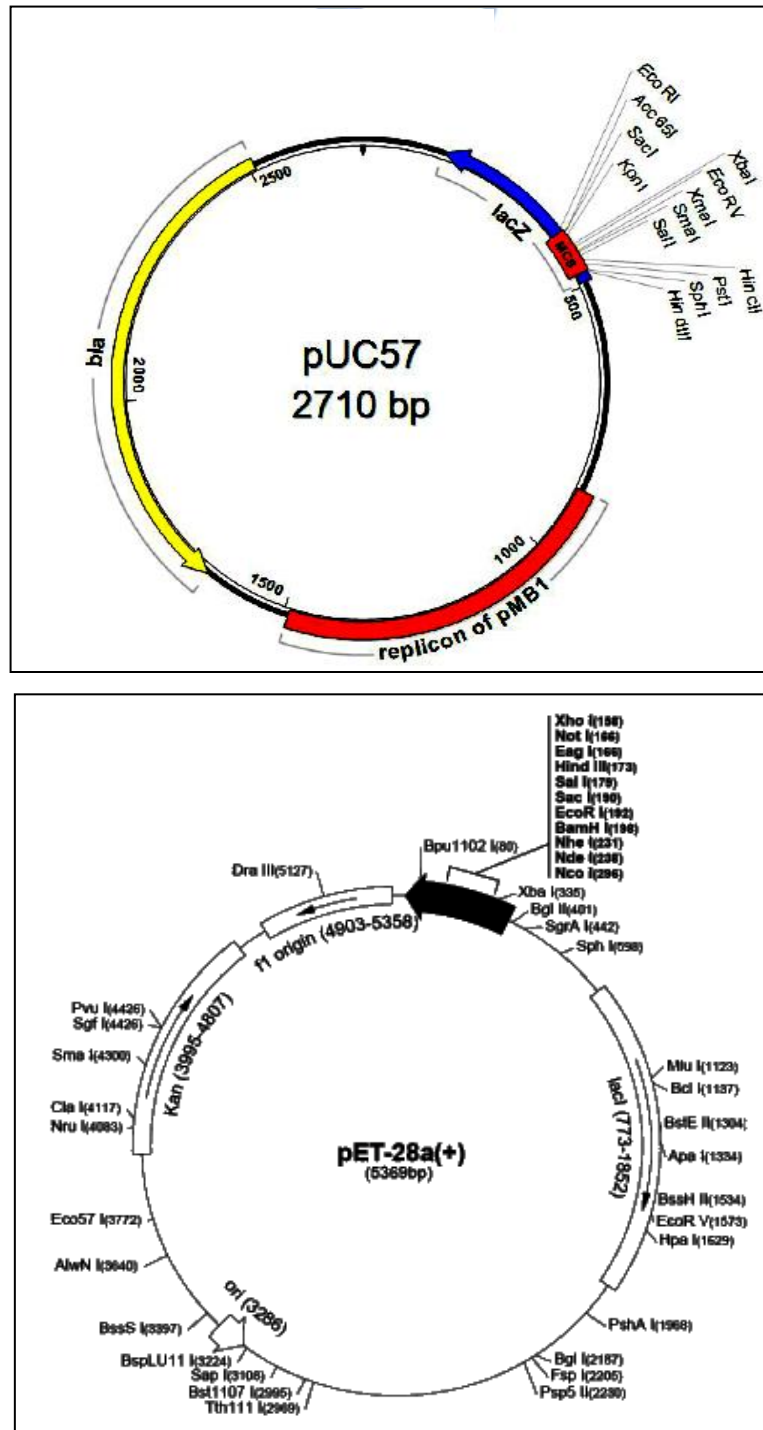
Fonte: Elaborada pelo autor.

**Tabela 2 - Informações acerca das proteínas do ZIKV**

PROTEÍNA	IDENTIFICAÇÃO	PARES DE BASES	PESO MOLECULAR
Capsídeo	1	351 pb	19.1 kDa
Proteína Pr	2	267 pb	
Glicoproteína M	3	225 pb	14.8 kDa
Proteína E	4	-	-
NS1	5	1050 pb	46.6 kDa
NS2a	6	645 pb	29.1 kDa
NS2b	7	381 pb	19.8 kDa
NS3	8	1368 pb	56.7 kDa
NS4a	9	432 pb	21.9 kDa
NS4b	10	735 pb	32.7 kDa
NS5	11	-	-

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 8 - Mapas dos vetores pUC57 e pET-28a.



Fonte: pUC57 (Bio Basic Gene Synthesis); pET-28a (Novagen).

As sequências sintetizadas pela empresa BioBasic Gene Synthesis chegaram em plasmídeo de *delivery* pUC57 que contém sítios para o corte de diversas enzimas de restrição e resistência ao antibiótico Ampicilina. Estas sequências foram primeiramente clonadas em *E. coli* DH10b para multiplicação plasmidial e uma alíquota estocada em freezer -80 °C.

Como protocolo de transformação do plasmídeo na cepa bacteriana utilizou-se 1  $\mu\text{L}$  (concentração de 100  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) do plasmídeo pUC-57 com o inserto para transformar células bacterianas de *E. coli* DH10b quimicamente competentes por Cloreto de Cálcio ( $\text{CaCl}_2^{2+}$ ) e estocadas em *freezer* a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ . As células foram descongeladas em gelo e, após ter adicionado o plasmídeo, foram incubados em uma sequência de gelo por 10 minutos, banho-maria a  $42\text{ }^\circ\text{C}$  por 40 segundos e em gelo por mais 10 minutos.

Após este período foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de meio de cultura LB (Luria-Bertani, Kasvi) sem antibiótico e as células foram incubadas a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  por uma hora com agitação de 180 rpm (rotações por minuto) para permitir a expressão do gene de resistência ao antibiótico presente do vetor (Ampicilina). As células foram plaqueadas em placas de Petri contendo meio de cultura LB sólido com 50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de Ampicilina para a seleção das bactérias clonadas, e incubadas *overnight* a  $37\text{ }^\circ\text{C}$ .

Das placas onde foram observados crescimentos de colônias, foram selecionadas colônias isoladas e estas transferidas para 2mL de LB caldo para posterior lise e purificação plasmidial para confirmar a correta clonagem. Após o cultivo das bactérias, plasmídeos foram purificados das células utilizando o *Kit Wizard Plus Sv Minipreps DNA Purification System* (Promega), para confirmação dos clones positivos através de digestão enzimática (GELANEW; POOLE-SMITH; HUNSPERGER, 2015).

O processo de digestão dos plasmídeos contendo os insertos de interesse deu-se com a utilização das enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI* para posterior análise em gel de agarose a 1% dissolvida em tampão TAE (Tris-Acetato e EDTA). A corrida de eletroforese foi realizada a 80 Volts, 300 mA por 30 minutos, as amostras de DNA foram coradas com *Sybr<sup>TM</sup> Green Master Mix* e visualizadas utilizando o transiluminador ultravioleta (HEROLAB). Os insertos foram purificados em *kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System* da Promega<sup>TM</sup> de acordo com as informações fornecidas pelo fabricante. O plasmídeo pET-28a passou pelo mesmo procedimento para a obtenção da sua linearização.

Os insertos já purificados foram ligados no vetor pET-28a (Novagem), com um grupo N-terminal His-tag para facilitar o processo de purificação proteica. A ligação deu-se utilizando a enzima T4 DNA ligase (Promega<sup>TM</sup>), utilizando o protocolo de acordo com o fabricante, para um volume 100 ng de DNA total, destes 50 ng são de plasmídeo linearizado em 10  $\mu\text{L}$  de reação, incubada por 1h a

temperatura ambiente. Destes, 5  $\mu$ L foram utilizados para transformação em bactéria *E. coli* DH10b, utilizando a metodologia previamente mencionada.

Para confirmação das colônias que foram positivas para a clonagem utilizou-se a técnica Reação em Cadeia de Polimerase (do inglês PCR = *Polymerase Chain Reaction*) utilizando primers T7 (5´d[TAATACGACTCACTATAGGG]3´) e os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% dissolvida em tampão TAE (Tris-Acetato e EDTA). Para o PCR utilizou-se: DNA (1  $\mu$ L); MgCl<sub>2</sub> (0,4  $\mu$ L); Tampão 10x da *Taq* (1  $\mu$ L); dNTP (0,2  $\mu$ L); Primers T7 Forward e Reverse (0,8  $\mu$ L); *GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase* (Promega) e água livre de DNase/RNase para completar o volume para 10  $\mu$ L por reação.

As condições utilizadas para uma melhor amplificação dos insertos foram com uma temperatura inicial para desnaturação de 94 °C por 1 minuto e a denaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento de 60 °C por 1 minuto e uma temperatura de extensão de 72 °C 1 minuto, repetidas por 30 ciclos, e 72 °C por 10 minutos para finalização. O resultado foi visualizado no transiluminador ultravioleta (HEROLAB).

Os clones positivos foram utilizados para estocagem do material (pET-28a e inserto), multiplicação e purificação dos plasmídeos já contendo o inserto. Estes plasmídeos foram clonados em cepas de *E. coli* BL21 (DE3) (Invitrogen) e BL21 *Rosetta* para a expressão das proteínas de interesse. Foram utilizadas duas cepas para a expressão para avaliar o melhor rendimento possível.

As colônias que se mostraram positivas por PCR foram utilizadas para a expressão da proteína recombinante de interesse. Além disso, parte das colônias que se mostraram positivamente clonadas no vetor foram estocadas em glicerol 15% em freezer a -80 °C.

### **2.3.2 Expressão das Proteínas do ZIKV em *E. coli* BL21 (DE3) e BL21 Rosetta**

Primeiramente foram realizados testes em pequena escala utilizando protocolos descritos por Sambrook *et al.* (1989), onde as bactérias transformadas foram induzidas em 1 mL de meio de cultura com antibiótico Canamicina (50  $\mu$ g/ $\mu$ L) e incubado *overnight* com agitação constante a 37 °C. Posteriormente, as mesmas foram induzidas em 10 mL de meio LB com antibiótico Canamicina para BL21 (DE3) e Canamicina e Cloranfenicol (50  $\mu$ g/ $\mu$ L) para *Rosetta* na proporção de 1  $\mu$ L de

cultura para 25  $\mu$ L de LB, para crescimento por 1 hora e 30 minutos sob agitação constante de 240 rpm, a 37°C.

Após o período de crescimento (até atingir a fase exponencial entre  $0.6 < A_{600 \text{ nm}} < 0.8$ , medidas em espectrofotometro Ultrospec 2100 Pro Amersham Biosciences), as bactérias foram submetidas a diferentes concentrações de IPTG (SIGMA-ALDRICH) nas diferentes concentrações de 0,1 mM, 0,5 mM e 1mM, com temperaturas de 20 °C, 28 °C e 37 °C por um período de 3 horas, para protocolar os maiores rendimentos na expressão. Estas mesmas células foram lisadas, seguindo o protocolo proposto por Sambrook e Russell (2001). As células foram lisadas utilizando tampão de lise (Tris-HCl 20mM pH=8.0, NaCl 200mM, Lisozima 0,2 mg/mL, PMSF 2mM e Triton-100x 1%) e incubadas em gelo por 15 minutos.

Duas técnicas para otimização da lise foram utilizadas: na primeira as células foram transferidas para tubos criogênicos (WHATON) para sofrerem choque térmico com ciclos repetidos entre N<sub>2</sub> líquido e água fervente; na segunda as células foram lisadas com Sonicador (Qsonica Q55), a 45 W, com 15 ciclos alterados de 20' na sonicação e 40' em descanso no gelo. Os resultados das frações solúveis e insolúveis foram analisados em SDS-Page 15%, com condições de corrida em sistema de eletroforese vertical com aparelho da Major Science com 200 V e 80 mA por 1h30 min. A confirmação das proteínas na fração solúvel ou insolúvel deu-se por análise de *Western Blot*, técnica descrita posteriormente.

Após o choque térmico, as células foram centrifugadas a 9000 x g por 15 minutos e o sobrenadante desprezado. O *pellet* contendo as proteínas de interesse foi ressuspenso em tampão de solubilização (Tris-HCl 20mM pH=8.0, NaCl 500 mM, 8 M uréia e 10% glicerol), para a retirada dos corpos de inclusão, e incubado em *shaker* a 250 x rpm, a 37 °C por 2 horas. As proteínas foram, por fim, centrifugadas nas mesmas condições citadas anteriormente e utilizadas para purificação. Todas foram armazenadas em *freezer* a -20 °C.

### 2.3.3 Purificação das Proteínas do ZIKV

A solução de solubilização contendo as proteínas foi inserida no sistema de purificação ÄKTA™ (GE Healthcare Life Sciences), utilizando colunas HisTrap HP embaladas com resina de afinidade Ni<sup>2+</sup> *Sepharose High Performance* (HP) (GE Healthcare Life Sciences). Foi aplicado no aparelho uma solução de equilíbrio que

consistia no tampão de solubilização com 20 mM de Imidazol. Em seguida utilizou-se o mesmo tampão para a lavagem e retirada de ligações de proteínas inespecíficas. Por fim, as proteínas do Capsídeo, NS1, NS3 e NS4b foram eluídas em tampão de solubilização com 8 M ureia e contendo 500 mM de Imidazol.

#### **2.3.4 Quantificação, por SDS-Page e Western Blot das proteínas do ZIKV**

O protocolo utilizado para *Western Blott* seguiu o proposto por Towbin, Staehelin e Gordon (1979), onde as proteínas foram submetidas a gel de SDS-Page. O “stacking” gel de concentração 4% (duas placas) foi preparado com 3,68 mL de água destilada, 0,65 mL de bis-acrilamida (30%), 0,63 mL de Tris-HCl 1 M pH 6,8, 50 µL de SDS 10% (p/v), 5 µL de Tetramethilenodiamine-(Temed) e 25 µL de persulfato de amônio 10% (p/v). O gel de separação a 12 % foi composto de 1,45 mL de água destilada, 2,5 mL tampão Tris-HCl 1,5M pH 8,8, 100 µL de SDS 10% (p/v), 5,83 mL de bis-acrilamida (30%), 8,5 µL de (Temed) e 85 µL de Persulfato de amônio (10%).

As amostras proteicas foram preparadas a partir de uma concentração de 5 µg de amostra, as quais foram adicionadas em “ependorf” contendo 4 µL de tampão da amostra Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8; SDS 10% (p/v); glicerol 20% (v/v); β-mercaptoetanol 4% (v/v) e Azul de Bromofenol 2% (p/v) seguindo aquecimento a 100°C durante 2 min. A eletroforese transcorreu à temperatura ambiente de 25 °C em tampão Tris-glicina pH 8,0 (glicina 250 mM; Tris-base 25 mM; SDS 0,1 % (p/v), a 150 volts e 40 mA (constante), até que o azul de bromofenol ficasse aproximadamente 2 cm do final do gel separador. Foi utilizada uma fonte regulável de corrente contínua da BioRAD. Para visualização das bandas, o gel foi corado, por imersão, em uma solução contendo 0,25 % de “Comassie Brilliant Blue R-250” (SIGMA), 40 % de metanol, 10 % de ácido acético e água destilada durante 15 min. O descoramento do gel foi realizado com uma solução contendo 7 % de ácido acético, 30 % de metanol e água destilada.

As proteínas foram, então, transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham™ Protran™ GE Healthcare) com 0,2 µm de espessura em cuba de eletro transferência Semi-dry com tampão de transferência (glicina 39 mM, SDS 0,0375 % (m/v) e metanol 20 % (v/v) em tampão Tris 48 mM pH=8.0), sob amperagem constante de 300 mA por 1 hora.



Após a transferência, as membranas foram incubadas com uma solução tampão de PBS com 5 % de leite desnatado, em geladeira, por aproximadamente 18 h, para bloqueio dos sítios ativos livres da membrana.

Após a incubação, as membranas foram lavadas quatro vezes por 15 min., com a solução tampão PBS-Tween20 sob leve agitação. A membrana lavada foi imersa em tampão PBS contendo anticorpo anti-His6 na diluição de 1:3000 por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente a membrana passou por três processos de lavagem com PBS-Tween20 0,05% por 10 minutos, para a retirada dos anticorpos que não se ligaram, e incubada com segundo anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (SIGMA) na diluição de 1:80000 por uma hora sob leve agitação em temperatura ambiente. As membranas foram novamente submetidas a três lavagens de 15 minutos em PBS-Tween20 e foram colocadas em uma solução reveladora, com substrato para peroxidase, composta de diaminabenzidina (DAB) 0,1 g/mL e Cloreto de Níquel (NiCl<sub>2</sub>) 0,4 g/mL em tampão Tris-HCl 100 mM pH 7,2, sendo adicionado 12,5 µL de Peróxido de Hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30V, sendo mantidas no escuro à temperatura ambiente por aproximadamente 30 min., quando então a reação foi interrompida com a lavagem da membrana com água destilada. As membranas foram secas, envolvidas em filme de PVC e posteriormente fotografadas.

As concentrações das proteínas obtidas foram determinadas pelo método de Bradford (1976), utilizando Albumina de Soro Bovino (BSA) como proteína padrão, em aparelho de ELISA. As quantificações foram realizadas em aparelho de espectrofotômetro NanoDrop™ (Thermo Scientific™).

### **2.3.5 Western blot e ELISA com soro de pacientes infectados com Zika vírus**

Para a análise dos testes de antigenicidade das proteínas do capsídeo, NS1 e NS3 recombinantes, foram utilizadas 10 amostras de soros de pacientes previamente avaliadas como positivas para ZIKV através de testes IgM e IgG, sendo confirmadas por PCR. Foram testadas ainda, 3 amostras de soros de pacientes que possuíam anticorpos específicos para ZIKV, além de quatro amostras de salivas: criança com microcefalia (1) cuja mãe contraiu a infecção durante a gravidez (2), criança sem microcefalia (3), onde a mãe contraiu a doença previamente a gravidez

(4). Além disso, também foram testadas as reações das proteínas para pacientes DENV positivos e negativos.

As amostras foram cedidas pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Ceará (LACEN/CE) e compunham parte da soroteca do ano de 2017, sendo certificadas pelo Comitê de Ética Profissional (CEP) n° 913.484.

Previamente a análise por ELISA, as proteínas recombinantes Capsídeo, NS1 e NS3 do vírus Zika foram analisadas pela técnica de Western blot para confirmação do reconhecimento das mesmas pelos soros dos pacientes infectados por ZIKV. As proteínas foram, então, submetidas a uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare Life Sciences), com poros de 0,2 µm em sistema semi-dry com tampão de transferência contendo glicina 30 mM, SDS 0,0375 % (m/v), metanol 20 % (v/v) e Tris 48 mM pH 7,2; sob amperagem constante de 300 mA, 1h. Em seguida, a membrana foi bloqueada com PBS-leite desnatado 5%, por 1h. Após o bloqueio, a membrana foi lavada três vezes (10 min / cada) com PBS-Tween 20 (0,05%), sob agitação constante. A membrana foi, então, incubada com soro de paciente positivado para Zika (anticorpo primário), diluído 1:100 em tampão PBS pH 7,4, a 37 °C por 1h. A membrana foi lavada conforme descrito anteriormente. Posteriormente, a membrana foi incubada com anticorpo anti-IgG humano conjugado a enzima peroxidase (anticorpo secundário) (Sigma) diluído 1:5000 em tampão PBS pH 7,4, a 37 °C por 1h. Procedeu-se, uma nova lavagem da membrana conforme acima descrito. Por fim, a membrana foi revelada com solução composta de 0,1 g/mL diaminabenzidina (DAB) e 100 µL de Peróxido de Hidrogênio (30 V) diluído em 30 mL de tampão PBS (TOWBIN *et al.*, 1979).

Para a análise da resposta gerada pelas proteínas recombinantes, as mesmas foram submetidas a teste de ELISA indireto (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Para esse ensaio, as placas (U96-POLYSORP-NUNC-IMMUNO PLATE BATH 016181) foram sensibilizadas com 1 µg/orifício das proteínas recombinantes diluídas em tampão carbonato/bicarbonato (pH 9,6), incubadas à 4 °C, *overnight*. Em seguida, a placa foi lavada três vezes com PBS-Tween 20 (0,05%) e, posteriormente, a placa foi bloqueada com PBS-leite desnatado 5%, por 1h.

Foram realizados testes iniciais para a padronização da concentração de soro de paciente que obtivesse resposta para as proteínas. Para estabelecer a

concentração foram realizadas diluições seriadas das amostras de soro em tampão PBS (pH= 7,4). Partiu-se de uma concentração inicial de 1:8 para os soros de pacientes positivos e negativos para Zika e Dengue (anticorpo primário) e 1:100 para as amostras de saliva (anticorpo primário), de forma seriada sendo, posteriormente, incubados a 37 °C, por 1h. A placa foi lavada três vezes com PBS-Tween 20 (0,05%) e incubadas nas mesmas condições acima utilizando anti-IgG e anti-IgM humano (SIGMA) conjugado à peroxidase (anticorpo secundário), na diluição de 1:5000.

As placas foram novamente lavadas com mesma solução descrita anteriormente e, em seguida, revelada durante 15 minutos em temperatura ambiente com adição de 100uL de 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) (Life Technology) por poço. A reação foi lida em leitora de microplacas, em duas etapas: a primeira sem parar a reação utilizando comprimento de onda de 650nm e a segunda, parando a reação com ácido sulfúrico 3M, com utilizando comprimento de onda de 450nm (SYNERGY 2) (FLORINDO et al., 2002). As mesmas amostras foram testadas em Kit Diagnóstico Novagnost® Zika Virus IgM -capture com objetivo de comparação com os resultados encontrados com as proteínas expressas, seguindo as instruções do fabricante.

A partir dos resultados obtidos, foram determinadas a sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) do ELISA, que são parâmetros fundamentais para a definição de um teste diagnóstico de qualidade. Para tanto, foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$$S = (a / a + c); E = (d / b + d); VPP = (a / a + b) \text{ e } VPN = (d / c + d)$$

S = probabilidade de reconhecer os verdadeiros positivos, E = probabilidade de reconhecer os verdadeiros negativos, VPP = a proporção de verdadeiros positivos com teste positivo, VPN = a proporção de verdadeiros negativos com teste negativo, a = pacientes verdadeiramente positivos, b = pacientes falsos positivos, c= pacientes falsos negativos e d = pacientes verdadeiramente negativos (SILVA et al., 2011).

Os valores preditivos estão diretamente ligados a prevalência da doença na população, não influenciando na sensibilidade e especificidade do teste (DERCKSEN et al., 2000). A determinação do cut-off deu-se a partir da utilização de 10 amostras de soros de pacientes sabidamente negativos para ZIKV e DENV.

Resumidamente, foram calculadas as médias das absorbâncias dos soros e somadas com três vezes o valor do desvio padrão das amostras. Assim, foram considerados positivos os soros que apresentaram valores de absorbâncias acima deste limiar, indicativo do reconhecimento das proteínas nos soros de pacientes (SILVA et al., 2011). Neste estudo, utilizou-se o programa Graphpad PRISM (Versão 5.03 GraphPad Software, Inc.) para análise de todos os resultados.

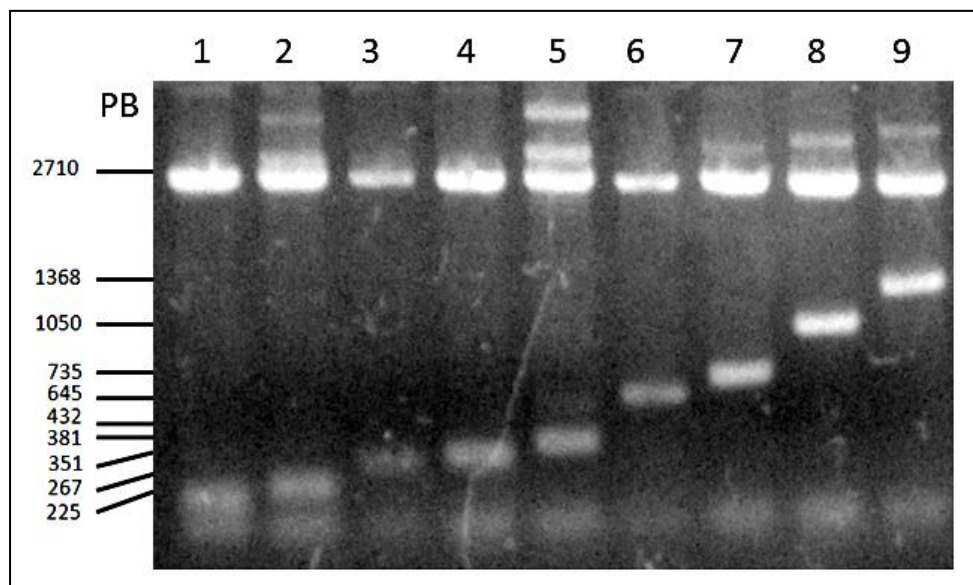
## 2.4 RESULTADOS

### 2.4.1 Amplificação e Clonagens

Os plasmídeos contendo os insertos para as 9 proteínas do ZIKV sintetizados pela empresa foram clonados em *E. coli* DH10b e plaqueadas em meio LB ágar com ampicilina (50 mg/mL). Foram escolhidas colônias crescidas isoladas das placas e colocadas para crescer em LB líquido com antibiótico para extração do plasmídeo por lise alcalina (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) e pelo *Kit Wizard Plus Sv Minipreps DNA Purification System*, de acordo com as orientações do fabricante.

O resultado da digestão dos plasmídeos com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI* pode ser observado abaixo (Fig. 09). É possível notar que os insertos possuem os tamanhos esperados

**Figura 9 - Gel de agarose 1% mostrando a digestão do pUC57 e insertos ZIKV.**

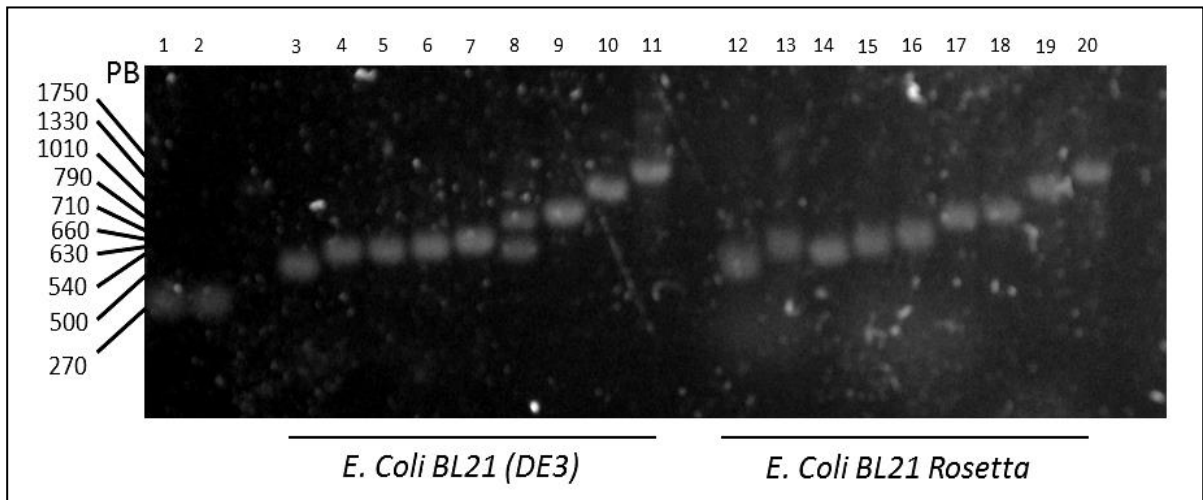


Legenda: Insertos dispostos por pares de bases (PB): 1-Glicoproteína M (3); 2- Proteína Pr (2); 3- Capsídeo (1); 4- NS2b (7); 5- NS4a (9); 6- NS2a (6); 7- NS4b (10); 8- NS1 (5); 9- NS3 (8). Superior aos insertos digeridos pelas enzimas está o plasmídeo pUC57 e bandas inespecíficas mostram insertos no plasmídeo que não foram digeridos pela enzima.

Fonte: Elaborada pelo autor

Após a confirmação dos tamanhos corretos dos fragmentos digeridos pelas enzimas, os mesmos foram purificados do gel utilizando o *kit Wizard SV Gel* e ligados em plasmídeo pET-28a seguindo protocolo já descrito anteriormente. O plasmídeo já com os insertos foi clonado em cepas de *E. coli* BL21 (DE3) e BL21 *Rosetta* e podem ser observados a seguir (Fig 10).

**Figura 10 – Gel de agarose 1% mostrando a clonagem do pET-28a com insertos em *E. coli* BL21 (DE3) e *Rosetta*.**

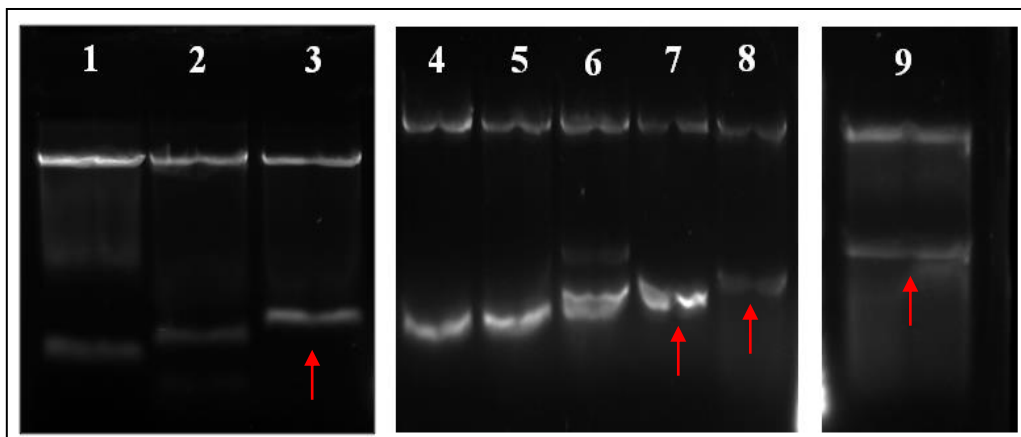


Legenda: Linha 1- *E. coli* BL21 (DE3) + pET28-a sem inserto; Linha 2- *E. coli* BL21 *Rosetta* + pET28-a sem inserto; Linhas 3 a 11- *E. coli* BL21 (DE3) + pET28-a com insertos em ordem crescente de tamanho; Linhas 12 a 20- *E. coli* BL21 *Rosetta* + pET28-a com insertos em ordem crescente de tamanho.

Fonte: Elaborada pelo autor

Para dar continuidade aos experimentos, foram escolhidos para a expressão os insertos que já possuíam registros na literatura ou sua expressão foi confirmada previamente. Foram escolhidos, então os insertos para as proteínas do Capsídeo, NS1, NS3 e NS4b que foram submetidos a uma dupla digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI*, verificando a correta ligação dos insertos ao vetor de expressão pET-28a e o resultado pode ser observado abaixo.

**Figura 11 - Gel de agarose demonstrando a Digestão dos Insertos em plasmídeo pET-28a.**



Legenda: Digestão organizada por tamanho evidenciando proteínas do Capsídeo (3), NS4b (7), NS1 (8) e NS3 (9).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na figura 11, a banda superior representa o plasmídeo pET28-a com 5.369 pb e, 351 pb (Capsídeo), 735 pb (NS4b), 1.050 pb (NS1) e 1.368 pb (NS3).

#### 2.4.2 Expressão e Purificação das Proteínas Recombinantes

As bactérias da cepa BL21 (DE3) e BL21 *Rosetta* confirmadas positivas para os plasmídeos contendo os genes de interesse foram cultivadas em LB-Canamicina-Cloranfenicol nas concentrações já mencionadas e induzidas a expressar as proteínas recombinantes com IPTG na concentração de 0,5mM e analisadas sob condições desnaturantes utilizando gel de poliacrilamida a 12%, como mostrada na figura abaixo (Figura 12).

Nas figuras a seguir (Fig. 13 a 16) observa-se, através da eletroforese a expressão confirmada das quatro proteínas com o tamanho esperado. Todas as induções e análises em gel de poliacrilamida e *Western Blot* foram realizadas seguindo os mesmos procedimentos já descritos.

**Figura 12 – Perfil eletroforético da expressão dos insertos em *E. coli* BL21 (DE3) e BL21 *Rosetta*.**

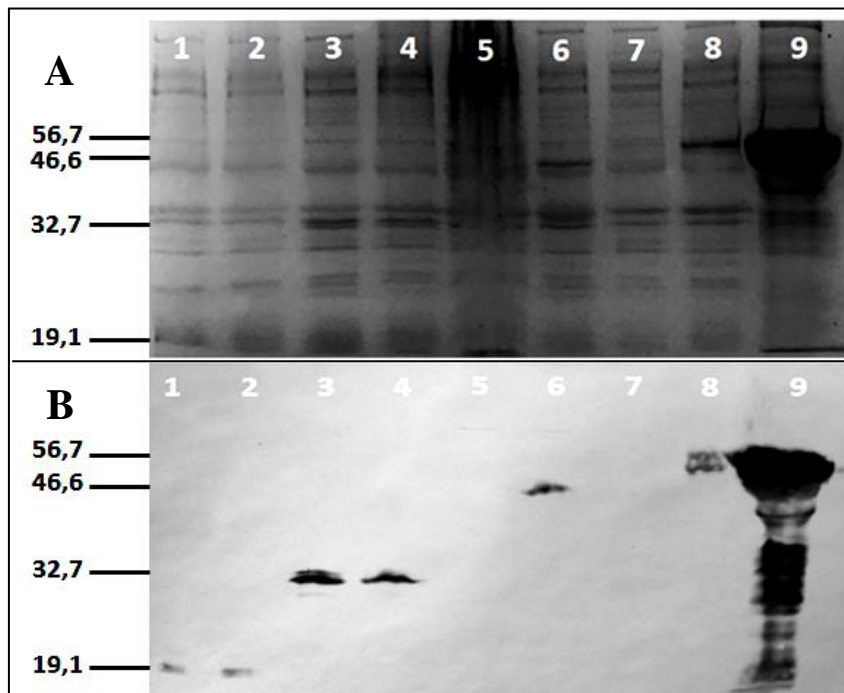


Figura A: Perfil eletroforético das proteínas do Capsídeo, NS1, NS3 e NS4b nas duas cepas de bactérias (*E. coli* BL21 e *Rosetta*), no extrato bruto das frações insolúveis em SDS-PAGE a 12%: Linha 1 (Cap. BL21); Linha 2 (Cap Ros); Linha 3 (NS4b BL21); Linha 4 (NS4b Ros); Linha 5 (NS1 BL21); Linha 6 (NS1 Ros); Linha 7 (NS3 (BL21); Linha 8 (NS3 Ros); Linha 9 (C+). Figura B: Western Blot das mesmas amostras. Fonte: Elaborada pelo autor

**Figura 13 – Perfil eletroforético da proteína Capsídeo em SDS-Page e Western Blot.**

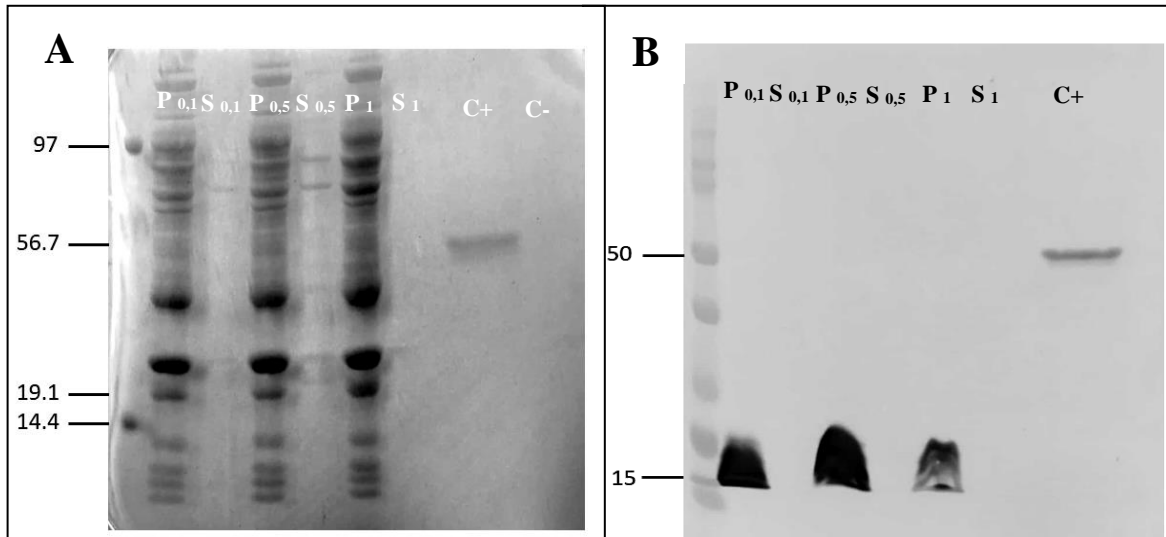


Figura A: Perfil eletroforético da Proteína do Capsídeo em *E. coli* BL21 (DE3) em SDS-PAGE a 12% em três diferentes concentrações de IPTG P<sub>0,1</sub> (Pellet com indução a 0,1mM); S<sub>0,1</sub> (Sobrenadante com indução a 0,1mM); P<sub>0,5</sub> (Pellet com indução a 0,5mM); S<sub>0,5</sub> (Sobrenadante com indução a 0,5mM); P<sub>1</sub> (Pellet com indução a 1mM); S<sub>1</sub> (Sobrenadante com indução a 1mM); C- (Controle negativo – *E. coli* induzida sem inserto); C+ (Controle positivo). Figura B: Western Blot das mesmas amostras.

Fonte: Elaborada pelo autor

**Figura 14 - Perfil eletroforético da proteína NS1 em SDS-Page e Western Blot.**

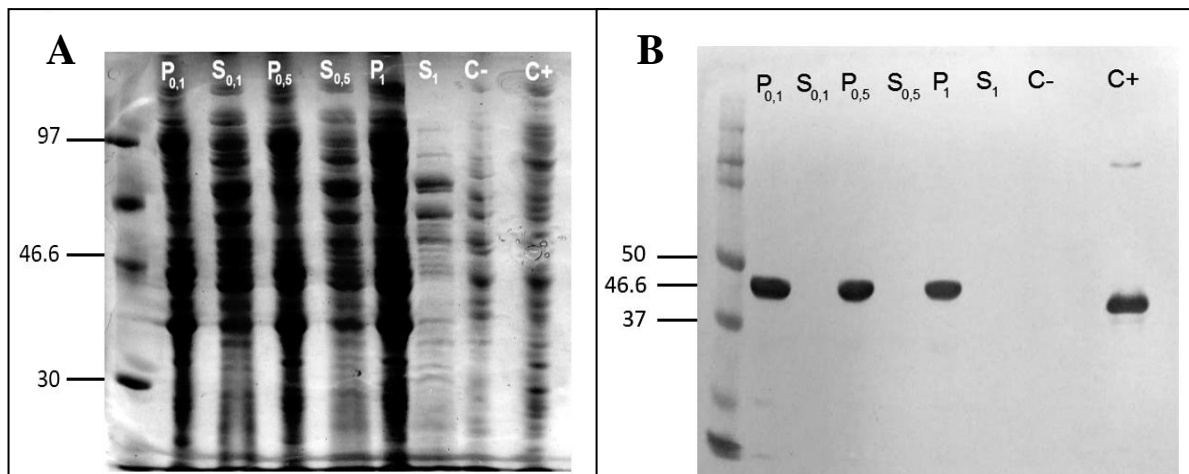


Figura A: Perfil eletroforético da indução da Proteína NS1 em *E. coli* BL21 (DE3) em SDS-PAGE a 12% em três diferentes concentrações de IPTG P<sub>0,1</sub> (Pellet com indução a 0,1mM); S<sub>0,1</sub> (Sobrenadante com indução a 0,1mM); P<sub>0,5</sub> (Pellet com indução a 0,5mM); S<sub>0,5</sub> (Sobrenadante com indução a 0,5mM); P<sub>1</sub> (Pellet com indução a 1mM); S<sub>1</sub> (Sobrenadante com indução a 1mM); C- (Controle negativo – *E. coli* induzida sem inserto); C+ (Controle positivo). Figura B: Western Blot das mesmas amostras.

Fonte: Elaborada pelo autor.



**Figura 15 - Perfil eletroforético da proteína NS3 em SDS-Page e Western Blott.**

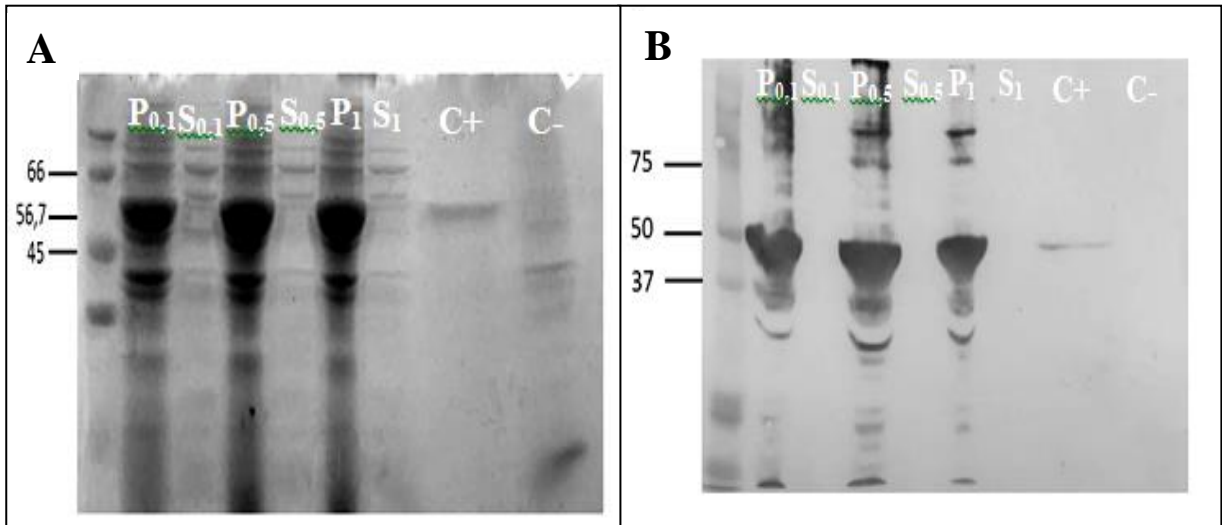


Figura A: Perfil eletroforético da indução da Proteína NS3 em *E. coli* BL21 Rosetta em SDS-PAGE a 12% em três diferentes concentrações de IPTG P0,1 (Pellet com indução a 0,1mM); S0,1 (Sobrenadante com indução a 0,1mM); P0,5 (Pellet com indução a 0,5mM); S0,5 (Sobrenadante com indução a 0,5mM); P1 (Pellet com indução a 1mM); S1 (Sobrenadante com indução a 1mM); C+ (Controle positivo); C- (Controle negativo - *E. coli* induzida sem inserto). Foto B: Western Blott das mesmas amostras.

Fonte: Elaborada pelo autor.

**Figura 16 - Perfil eletroforético da proteína NS4b em SDS-Page e Western Blot.**

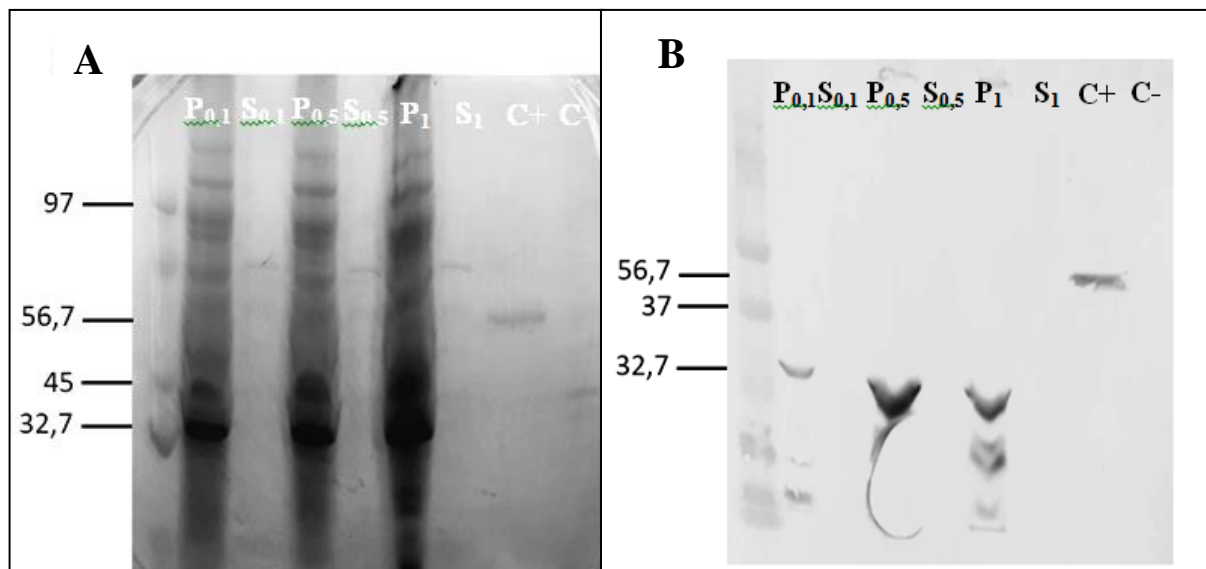


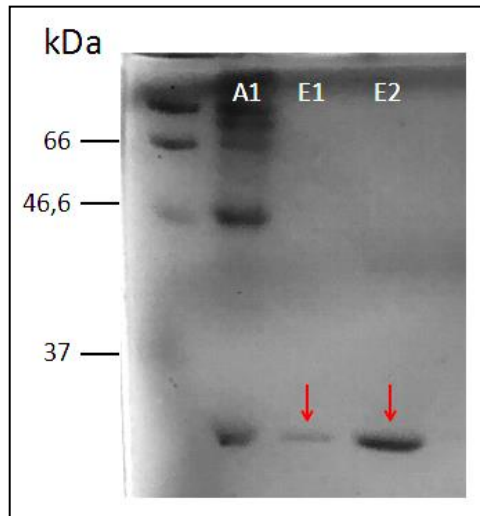
Figura A: Perfil eletroforético da indução da Proteína NS4b em *E. coli* BL21 Rosetta em SDS-PAGE a 12% em três diferentes concentrações de IPTG P0,1 (Pellet com indução a 0,1mM); S0,1 (Sobrenadante com indução a 0,1mM); P0,5 (Pellet com indução a 0,5mM); S0,5 (Sobrenadante com indução a 0,5mM); P1 (Pellet com indução a 1mM); S1 (Sobrenadante com indução a 1mM); C+ (Controle positivo); C- (Controle negativo - *E. coli* induzida sem inserto). Figura B: Western Blot das mesmas amostras.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A partir do resultado das análises utilizando diferentes concentrações do indutor nas culturas bacterianas foi utilizada, assim, a menor concentração de IPTG para induzir a expressão de todas as proteínas até o final dos experimentos. As proteínas do Capsídeo, NS1, NS3 e NS4b mostraram-se viáveis nas condições utilizadas no experimento. As demais proteínas, embora tenham sido utilizadas as mesmas condições de concentrações de IPTG e de temperatura, não foram detectadas. Após a confirmação da presença das proteínas por *Western Blot*, foi realizada a purificação das mesmas em coluna de cromatografia por afinidade ao íon  $Ni^{2+}$ . Esta purificação deu-se com a adição da proteína na coluna previamente carregada com níquel e realizadas lavagens com diferentes concentrações de imidazol para a posterior eluição desta proteína purificada.

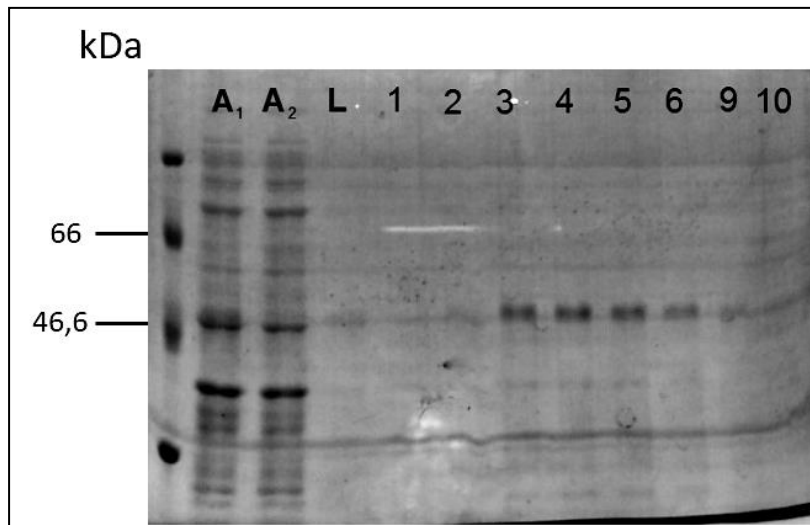
A figura 18 mostra a confirmação da purificação da proteína NS1, com a presença da proteína nas alíquotas 3 a 9. Na figura 19, é possível observar no gel de poliacrilamida e *Western blot* a proteína NS1 antes do processo de purificação, após o processo de purificação, as lavagens e a proteína purificada reconhecida pelos anticorpos anti-His tag e anti-IgG mouse. O mesmo processo foi repetido para as demais proteínas do Capsídeo, NS3 (Figura 20) e NS4b, porém, a purificação da proteína NS4b não foi possível utilizando as condições previamente estabelecidas. Após o processo de purificação, algumas amostras permaneceram por 48 horas no liofilizador para obtenção de uma amostra mais concentrada, enquanto outras proteínas foram concentradas utilizando tubos de 15mL (Amicon - Millipore) com filtros de 3 MWCO que não permitiam a passagem das proteínas de interesse.

**Figura 17 - Perfil eletroforético da purificação da Proteína Capsídeo.**



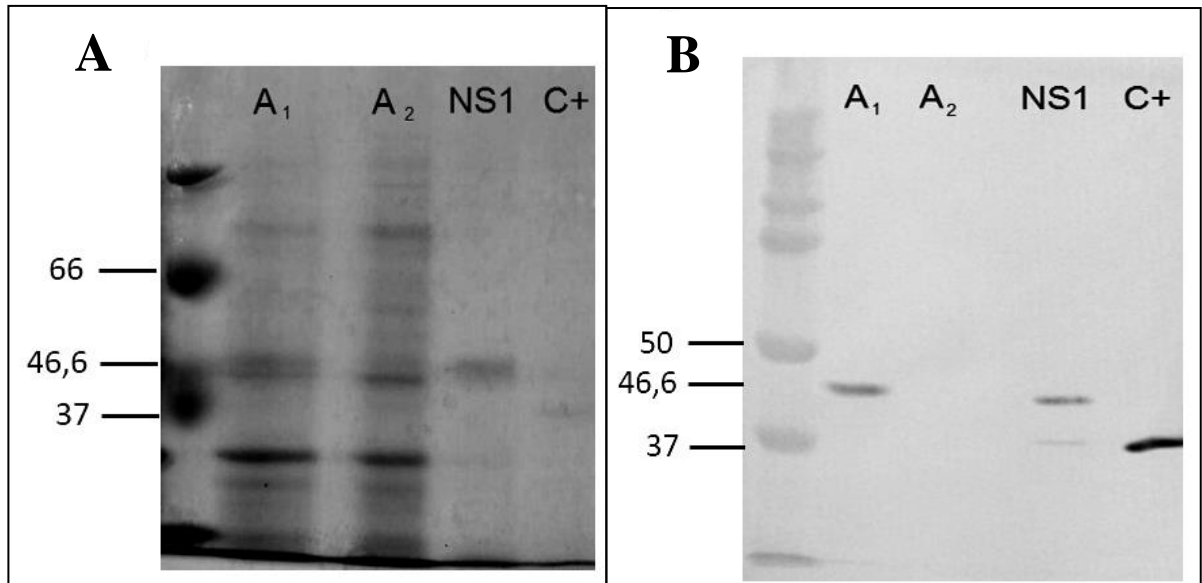
Legenda: Perfil eletroforético da purificação da Proteína Capsídeo (Insero 1) em Coluna de Cromatografia por afinidade ao metal níquel em SDS-PAGE a 12%. A1 (Amostra original); E1 (Eluição 1 da amostra original após passar pelo equipamento de purificação); E2 (Eluição 2). Fonte: Elaborada pelo autor

**Figura 18 - Perfil eletroforético da purificação da Proteína NS1.**



Legenda: Perfil eletroforético da purificação da Proteína NS1 (Insero 3) em Coluna de Cromatografia por afinidade ao metal níquel em SDS-PAGE a 12%. A1 (Amostra original); A2 (Amostra original após passar pelo equipamento de purificação); L (Lavagens); 1-10 (Eluição com proteína NS1 purificada). Fonte: Elaborada pelo autor

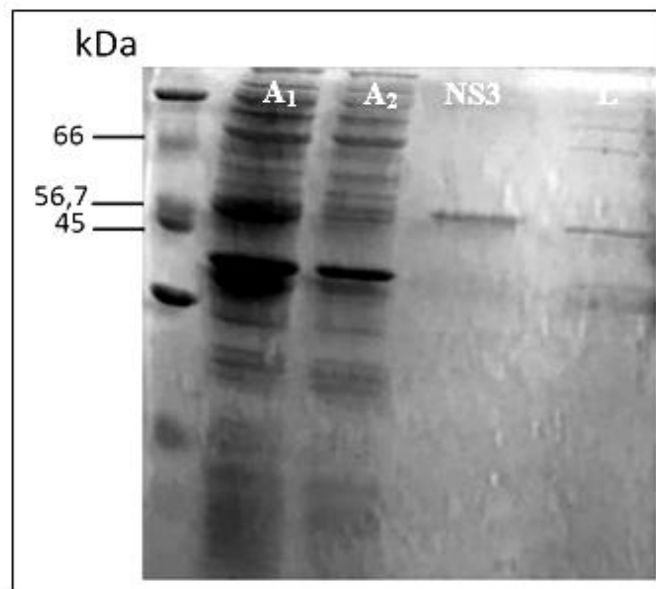
**Figura 19 – Perfil eletroforético e *Western Blot* da Purificação da Proteína NS1.**



Legenda: Perfil eletroforético da purificação da Proteína NS1 em SDS-PAGE a 12% (A) e *Western Blot* (B) da Expressão e Purificação da Proteína NS1 (Insero 3): A<sub>1</sub> (Amostra original); A<sub>2</sub> (Amostra original após passar pelo equipamento de purificação); NS1 Proteína Purificada); C+ (Controle Positivo).

Fonte: Elaborada pelo autor.

**Figura 20 - Perfil eletroforético da purificação da Proteína NS3.**



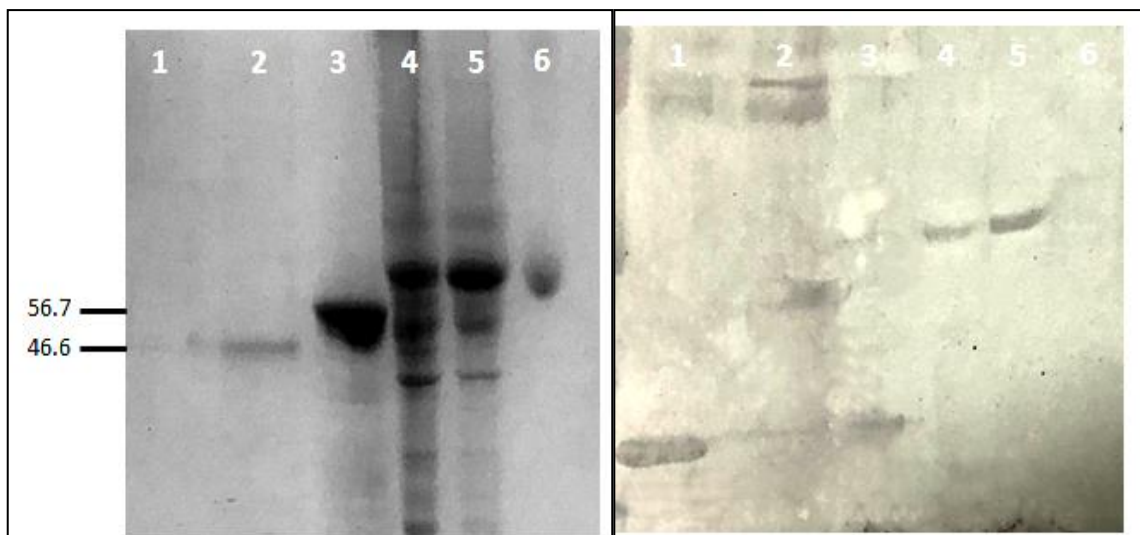
Legenda: Perfil eletroforético da Proteína NS3 em SDS-PAGE a 12% da Expressão e Purificação da Proteína NS3 (Insero 3): A<sub>1</sub> (Amostra original); A<sub>2</sub> (Amostra original após passar pelo equipamento de purificação); NS3 Proteína Purificada; L (Lavagens).

Fonte: Elaborada pelo autor

### 2.4.3 Sensibilidade e Especificidade das Proteínas Recombinantes

Para iniciar os testes de imunogenicidades das proteínas recombinantes, realizou-se uma análise por *Western Blot* para observar se havia reconhecimento das proteínas pelo soro de pacientes positivos para ZIKV (N=10 amostras) cedidas pelo LACEN. No teste, foram utilizados 5ug de proteína purificada por poço das amostras do capsídeo, NS1 e NS3. Foram utilizados 2uL de extrato de cérebro de camundongo contendo o ZIKV e 2uL de extrato de cérebro de camundongo contendo o vírus da Dengue, para testar o reconhecimento destes soros com outro flavivírus. Como controle negativo do teste, foi utilizado 5ug da proteína BSA que não gera nenhuma reação com soro de humanos.

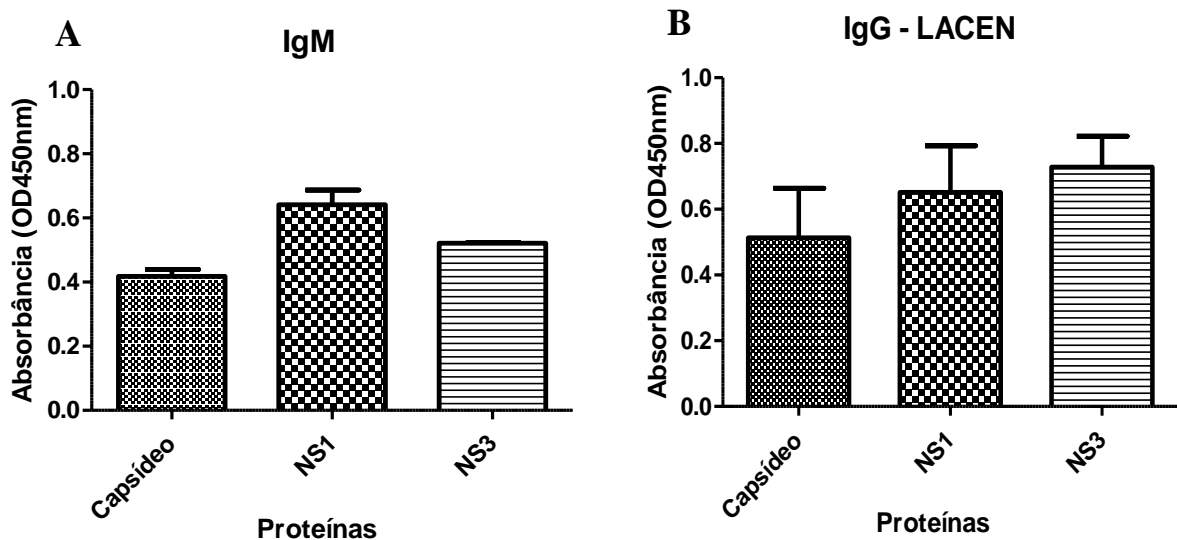
**Figura 21 - Perfil eletroforético e *Western Blot* das proteínas recombinantes com soro de paciente.**



Legenda: Figura à esquerda mostra a análise em SDS-Page das três proteínas purificadas do ZIKV contra soro de pacientes diagnosticados para a doença. Linha 1 (Capsídeo); Linha 2 (NS1); Linha 3 (NS3); Linha 4 (Extrato cerebral de camundongo com ZIKV); Linha 5 (Extrato cerebral de camundongo com vírus dengue); Linha 6 (Proteína BSA). Figura à direita mostra reconhecimento específico por *Western blot* das proteínas recombinantes do ZIKV por anticorpos presentes em soro de pacientes (IgM e IgG) que foram infectados com o ZIKV na diluição de 1:100.  
Fonte: Elaborada pelo autor

As proteínas do Capsídeo, NS1, e NS3 foram avaliadas como possíveis candidatas para a utilização em imunodiagnóstico por ELISA para a detecção de uma resposta imunológica com soros de pacientes.

**Figura 22 – ELISA indireto das proteínas do Capsídeo, NS1 e NS3 com soro de pacientes infectados com ZIKV.**



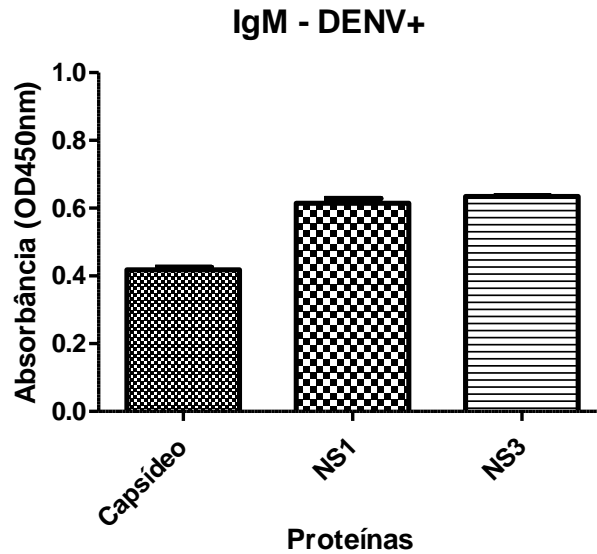
Legenda: Método de *Enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) indireto das proteínas purificadas com soros de pacientes com ZIKV. Em (A) a resposta produzida por pacientes na diluição de 1:100 confirmados com infecções apenas por ZIKV e em (B) a resposta de pacientes confirmados pelo LACEN com infecções por ZIKV, mas sem informações adicionais para as demais flaviviruses. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) para os pacientes em cada grupo. Fonte: Elaborada pelo autor.

Avaliação da imunogenicidade das proteínas recombinantes expressas (Figura 22), tanto os pacientes com infecção confirmada apenas para ZIKV quanto pacientes diagnosticados pelo LACEN/CE com resposta na diluição de 1:100. A proteína NS3 obteve maior resposta, não havendo diferenças consideradas entre a resposta às proteínas NS1 e NS3 em relação aos pacientes com infecção apenas para ZIKV.

Resposta similar encontrada para o *pool* de pacientes de infecção confirmada para DENV (Figura 23) e proteína NS3 com maior resposta. A resposta dos pacientes positivos para ZIKV em relação aos pacientes de DENV aumentou 20% para a proteína do Capsídeo, 5% para NS1 e 13% para a proteína NS3.

Também foram analisadas as respostas das proteínas quanto a saliva de duas crianças, uma com microcefalia, cuja mãe contraiu ZIKV durante a gravidez e uma sem microcefalia, onde a mãe possuíam a doença antes da gravidez.

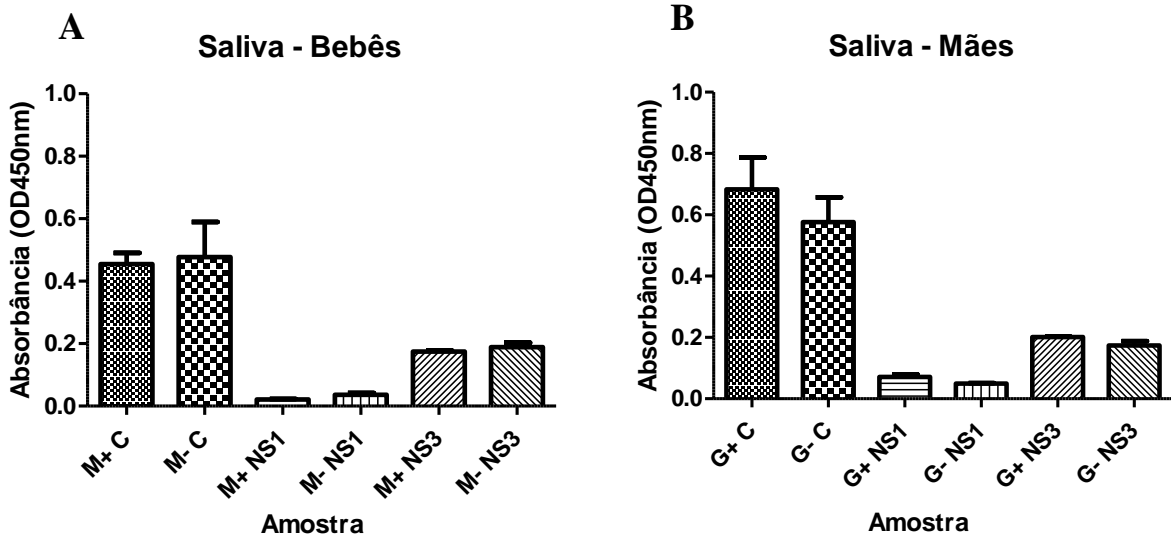
**Figura 23 – ELISA indireto das proteínas do Capsídeo, NS1 e NS3 com soro de pacientes infectados com DENV.**



Legenda: Método de *Enzyme linked immunossorbent assay* (ELISA) para análise das respostas de pacientes confirmados com infecções para DENV com as três proteínas purificadas. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) para 10 pacientes em cada proteína.

Fonte: Elaborada pelo autor.

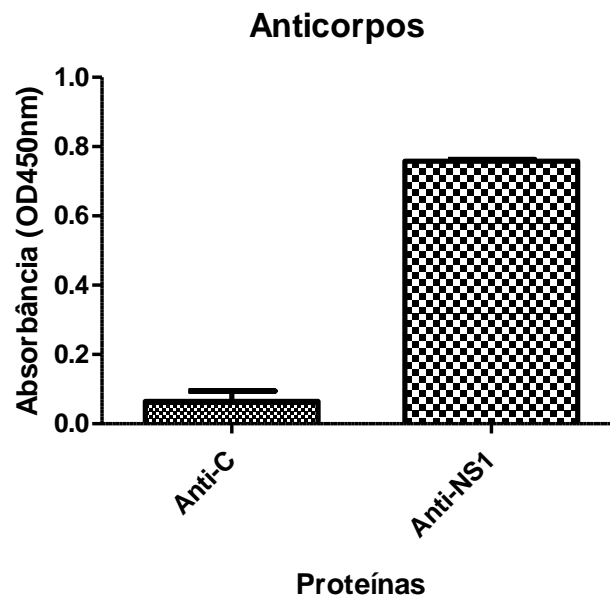
**Figura 24 – ELISA indireto das proteínas do Capsídeo, NS1 e NS3 com saliva de pacientes com e sem ZIKV.**



Legenda: Análise por método de ELISA das proteínas purificadas com salivas de quatro pacientes. Em (A), a reação de uma criança com microcefalia (M+) e uma sem microcefalia (M-) e em (B) a saliva da mãe que contraiu ZIKV durante a gravidez (G+) e mãe que contraiu a doença previamente à gravidez (G-). Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) para os pacientes em cada grupo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

**Figura 25 – ELISA indireto das proteínas do Capsídeo e NS1 de anticorpos monoclonais Anti-Capsídeo e Anti-NS1.**



Legenda: Teste Enzyme linked immunossorbent assay (ELISA) para análise das respostas de anticorpos monoclonais Anti-Capsídeo e Anti-NS1 na diluição de 1:100 com 1 $\mu$ g das proteínas recombinantes. Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) para duplicatas de cada anticorpo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Foram analisadas, por fim, a resposta das proteínas quanto aos anticorpos monoclonais Anti-Capsídeo e Anti-NS1 produzidos em coelho, não havendo resposta significativa no reconhecimento da proteína do capsídeo, porém a proteína NS1 obteve ótimo reconhecimento pelo anticorpo.

Para análise comparativa com o Kit diagnóstico da Novagnost® Zika Virus IgM  $\mu$ -capture, as amostras de pacientes confirmadas pelo LACEN/CE foram também testadas no kit, além de 10 pacientes positivos por ELISA para DENV, para a análise da sensibilidade e especificidade do kit. As mesmas amostras foram testadas para as três proteínas recombinantes.



**Tabela 3 – Análise das respostas das proteínas do Capsídeo, NS1 e NS3 contra soro de pacientes com ZIKV por ELISA indireto.**

<b>Imunoglobulina</b>	<b>Proteínas</b>	<b>Sensibilidade</b>	<b>Especificidade</b>
<b>IgM</b>	Novagnost®	30%	83%
	Capsídeo	83%	76%
<b>IgG</b>	NS1	100%	50%
	NS3	60%	62,5%

Legenda: Foram analisadas as respostas de 30 soros para o Kit comercial de diagnóstico IgM da Novagnost®, com comparativo para as proteínas recombinantes do capsídeo viral, NS1 e NS3 expressas.

Os resultados mostram que para o kit comercial da Novagnost® há uma sensibilidade de apenas 30%, embora apresente especificidade de 83%. As amostras testadas haviam sido confirmadas por PCR antes de utilizar no kit. Já para as proteínas recombinantes, o resultado apresentou valores de 83%, 100% e 60% de sensibilidade para as proteínas do Capsídeo, NS1 e NS3, respectivamente e de 76%, 50% e 62,5% de especificidade. Esses valores demonstraram superioridade quando comparada a sensibilidade das proteínas, embora tenha sido observada uma redução na especificidade. Entretanto, no geral, a proteína do Capsídeo viral demonstrou o melhor resultado.

Desta maneira, a probabilidade de que cada amostra positiva seja realmente positiva (VPP) para o kit comercial é de 60% e a probabilidade de as amostras negativas serem de pessoas saudáveis (VPN) é de 58%. Estes mesmos valores para a proteína do Capsídeo são de 77% e 76%, respectivamente, para a proteína NS1 são de 50% e 100% e para a NS3 são 50% e 71%. Novamente a proteína do Capsídeo demonstrou o melhor resultado dentre as demais.

## 2.5 DISCUSSÃO

Com o objetivo de produzir novos antígenos para a indústria de diagnóstico, neste trabalho foi explorada a expressão das proteínas recombinantes do capsídeo (C), NS1 (não-estrutural 1), NS3 (não-estrutural 3) e NS4b (não-estrutural 4b) do vírus Zika, isolado da Bahia, em vetores plasmidiais de expressão em procaríotos. Diversos autores também utilizaram cepas de bactéria *E. coli* como a BL21 (DE3) e a BL21 *Rosetta* para a produção de proteínas recombinantes, sendo o sistema baseado no sistema de expressão T7 do pET (comercializado pela NOVAGEM) o mais utilizado em mais de 90% dos sistemas de preparação proteicas em 2003 (SØRENSEN; MORTENSEN, 2005). Estas cepas de bactérias são as mais utilizadas por possuírem baixos níveis de produção de proteases, fazendo com que a proteína de interesse não seja degradada rapidamente e permitindo a alta produção de proteínas recombinantes (STUDIER, *et al.*, 1990).

A confirmação da expressão das proteínas recombinantes deu-se através da análise da eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% e *Western blot* utilizando como anticorpos primário e secundário, respectivamente anti-His tag e Anti-IgG de camundongo. Utilizando-se destas análises foi possível constatar o sucesso na produção das proteínas recombinantes do ZIKV e que as mesmas apresentaram tamanhos condizentes aos das proteínas do vírus descritas na literatura: Capsídeo (19.1 kDa), NS1 (46.6kDa), NS3 (56.7 kDa) e NS4b (32.7 kDa). Após a purificação, o rendimento final das proteínas expressadas foi de 160mg/mL da proteína do Capsídeo, 100mg/mL da NS1 e 500mg/mL da NS3.

Dentre as nove sequências que traduzem proteínas do ZIKV, apenas quatro obtiveram expressão satisfatória. Isto pode ocorrer devido às condições de expressão de um gene não necessariamente funcionarem para outros genes (TEGEL, 2010). Além disso, a quantidade de códons raramente utilizados no microrganismo pode causar uma tradução e terminação prematura, ou a incorporação incorreta dos aminoácidos, alterando assim o bom rendimento da expressão (GERCHMAN; GRAZIANO; RAMAKRISHNAN, 1994; KANE, 1995).

Na figura 12 foi possível observar um comparativo da expressão das quatro proteínas, em pequena escala, nas duas cepas de bactérias mais comumente utilizadas na produção de proteína recombinante, *E. coli* BL21 (DE3) e BL21 *Rosetta*. Como as condições de indução utilizadas no experimento foram as

mesmas para todas as proteínas nestes dois sistemas de expressão, os resultados obtidos mostraram que para a expressão das proteínas do Capsídeo e NS4b não há diferença significativa entre as duas cepas. Porém para as proteínas não-estruturais 1 e 3 observou-se que os melhores níveis de expressão para essas proteínas recombinantes podem ser obtidos utilizando a cepa *Rosetta*. Sabe-se que a porção N-terminal da sequência nucleotídica é a mais sensível ao uso de códons raros em bactéria (KIM; LEE, 2006). Para superar este problema, pode-se utilizar uma otimização de códons (HATFIELD; ROTH, 2007) ou expressar a sequência de interesse com *Rosetta*, que compensa para os principais códons raros não utilizados por *E. coli* (FU *et al.*, 2007).

Estes dados são confirmados pelo trabalho realizado por Tegel (2010) a partir de um comparativo entre estas duas cepas de *E. coli* mais corriqueiramente utilizada na expressão de proteínas, encontrou-se que proteínas com alta expressão em BL21 (DE3) possuíam uma expressão mais reduzida em *Rosetta*, porém as proteínas que não atingem um nível significativo em BL21 (DE3) possuem uma expressão maior em *Rosetta*. Os resultados apresentados aqui corroboram com este achado, como foi demonstrado a expressão em pequena escala das proteínas NS1 e NS3 (Fig. 12– Fig. 16). Este resultado pode estar relacionado aos diferentes códons que traduzem para as diferentes proteínas do ZIKV, onde certas proteínas podem possuir códons mais raros em *E. coli*.

A expressão das proteínas NS1 e NS3, além das proteínas E e NS5 virais, já foram obtidas por outros autores em condições similares as utilizadas neste trabalho com plataforma de expressão procariota e eucariota (MOSSENTA *et al.*, 2017; SONG *et al.*, 2016; VIRANAICKEN *et al.*, 2017; LEI *et al.*, 2016; COLOMA *et al.*, 2016), mas para fins de conhecimentos estruturais. Porém, ainda não possuem trabalhos descritos na literatura acerca da expressão da proteína do Capsídeo em nenhum sistema de expressão.

A análise da expressão das proteínas NS3 e NS4b individuais e em larga escala mostram, por *Western Blot*, a presença de diversas bandas em tamanhos menores. A proteína NS3, que apresentou maior nível de expressão, demonstrou um maior número de bandas. Resultado similar foi previamente obtido por outros autores que expressaram proteínas oriundas de flavivírus (AMORIM *et al.*, 2010) e mostram que este fato acontece possivelmente devido a presença de proteases bacterianas ou por atividades catalíticas das próprias proteínas (Figura 20), além de

uma possível terminação prematura da tradução das mesmas, já que as sequências codificadoras não são oriundas da bactéria e podem ser pouco frequentes (OLIVEIRA, 2013). Entretanto, pode-se observar a expressão destas proteínas no tamanho esperado pela utilização dos anticorpos específicos durante o *Western blot*.

A proteína NS1 é uma proteína altamente conservada entre os flavivírus, onde já é reconhecida na literatura por possuir potencial para ser utilizada como antígeno para detectar anticorpos em soros de pacientes infectados com flaviviruses. Com isso, essa proteína pode ser utilizada para a fabricação de anticorpos monoclonais para serem utilizados em kits diagnósticos para a identificação da mesma durante a fase aguda da doença (PAL *et al.*, 2014; YOUNG *et al.*, 2000).

A proteína NS3 possui inúmeras funções, como a atuação no processo de replicação do RNA, na RNA helicase, juntamente com a proteína NS2B e M forma um complexo que serve como cofator na atividade proteolítica das proteínas não estruturais (NS) e, por fim, atua na atividade do nucleotídeo trifosfatase (MONTEIRO, 2016). Desta forma, acredita-se que não só a NS1, mas também as demais proteínas deste trabalho possam ser utilizadas para a formulação de kit diagnóstico.

A prática do desenvolvimento de antígenos com a finalidade de produção de testes de imunodiagnóstico é benéfica na detecção rápida e precisa de flaviviruses para intervenção terapêutica precoce (CLARK e ADAMS, 1976). Entretanto, apesar da existência de métodos para o diagnóstico rápido e precoce do ZIKV, por ser uma doença relativamente recente, ainda existe uma necessidade acerca do desenvolvimento de novas abordagens que não só combinem o baixo custo, a sensibilidade e a especificidade, mas que também sejam úteis na detecção de infecções primárias e secundárias por flavivírus com precisão nos estágios iniciais da doença (BARZON *et al.*, 2016; HUZLY *et al.*, 2016).

As proteínas aqui produzidas foram solubilizadas e purificadas e, então, utilizadas para análises primárias de reconhecimento por anticorpos presentes no soro de pacientes que haviam contraído ZIKV, coletados pelo LACEN e confirmados por *PCR*. Como teste inicial, foi feito *Western blot* utilizando como anticorpo primário um *pool* dos soros de pacientes, tanto IgM quanto IgG na concentração de 1:100, por ser esta a concentração utilizada nos kits diagnósticos para a doença (Figura

22). Estudos como este já foram realizados utilizando o vírus dengue (WAHALA *et al.*, 2009) e podem ser usados como base para testes com ZIKV.

Além das proteínas, para este teste primário foram utilizadas, também, amostras dos vírus de Zika e Dengue, pois se sabe da homologia estrutural das proteínas destes dois flavivírus, o que causa reações cruzadas nos principais testes utilizando soros de pacientes (DEJNIRATTISAI, 2016; PRIYAMVADA *et al.*, 2016). Os resultados apresentados aqui demonstraram que houve o reconhecimento das proteínas do Capsídeo, NS1 e NS3, bem como as amostras para ZIKV e DENV, confirmando a reação cruzada existente entre estes dois flavivírus.

Este resultado foi confirmado por ELISA, onde foi verificado o reconhecimento das proteínas do Capsídeo, NS1 e NS3 com soros de três pacientes previamente confirmados por PCR de possuírem anticorpos apenas para infecção com ZIKV, além de pacientes que possuíram infecções para dengue vírus e uma análise utilizando anticorpos monoclonais para as proteínas do Capsídeo e NS1.

Os resultados mostram que houve reconhecimento em todas as amostras testadas, diminuindo de acordo com o aumento da diluição de soro utilizado. De acordo com uma pesquisa realizada por Priyamvada *et al* (2016), foi demonstrado que os anticorpos presentes tanto em soro de pacientes infectados com dengue, quanto anticorpos monoclonais para DENV tanto se ligam, quanto neutralizam fortemente o ZIKV *in vitro*. Isto pode explicar o reconhecimento das proteínas pelo soro de pacientes infectados com DENV.

Apesar das amostras de soros de pacientes cedidas pelo LACEN terem sido testadas apenas para infecções com ZIKV, acredita-se que parte destes pacientes possui infecções secundárias com DENV, devido a casos de ZIKV geralmente ocorrem em áreas que foram previamente expostas ao DENV (DEJNIRATTISAI, 2016; PRIYAMVADA *et al.*, 2016). Anticorpos para DENV também reconhecem fortemente epítomos do próprio ZIKV, mostrando a possível utilização de anticorpos de DENV para práticas terapêuticas para infecções com ZIKV (DEJNIRATTISAI, 2016; PRIYAMVADA *et al.*, 2016; STETTLER, 2016). Por outro lado, também foi demonstrado, *in vitro*, o fenômeno de exacerbação da infecção pelo ZIKV através da ligação da fração Fc da imunoglobulina (PRIYAMVADA *et al.*, 2016)

Na detecção de anticorpos nos soros de pacientes com infecção apenas para ZIKV, as proteínas obtiveram resultados satisfatórios, sendo a proteína NS1 a

com maior absorvência para os três pacientes testados. Quanto às amostras cedidas pelo LACEN/CE, as proteínas NS1 e NS3 mostraram uma resposta maior (Figura 22), porém, as respostas se mostraram proporcionais quando testadas com pacientes positivos para infecções com DENV (Figura 23). As proteínas também foram testadas para o reconhecimento de anticorpos presentes em quatro amostras de salivas, sendo três presentes em infecções de ZIKV e uma sadia. Não houve resultados significativos, pois a amostra de saliva da paciente sadia possuiu uma absorvência maior. Análises utilizando saliva das mães com ZIKV positivo se mostraram inconclusivas (Figura 24).

Devido ao seu alto nível de sensibilidade e ser de fácil reprodutibilidade, o método de imunodiagnóstico ELISA tornou-se o método de escolha para análise de diferentes amostragens, e neste estudo demonstrou-se a possibilidade de expressar proteínas recombinantes virais do Capsídeo, NS1, NS3 e NS4b de forma eficiente em *E. coli*, onde a maioria possui potencial imunogênico e é capaz de reagir com anticorpos de humanos que foram previamente expostos ao ZIKV.

Testes de sensibilidade e especificidade realizados mostraram que o Kit diagnóstico Novagnost® não se mostrou satisfatório no reconhecimento das amostras positivas, porém resultado satisfatório foi encontrado no que diz respeito a uma redução na reação cruzada com pacientes que continham anticorpos para DENV. Dentre as três proteínas recombinantes utilizadas no teste, a proteína do Capsídeo se mostrou com o melhor resultado de sensibilidade e especificidade, a proteína NS1 recombinante, apesar de ser uma das mais utilizadas para a formulação de kits de diagnóstico, não se mostrou específica no reconhecimento de anticorpos para o ZIKV, juntamente com a proteína NS3 (Tabela 03).

Desta forma, quanto maior for a especificidade de um teste, maior a capacidade deste de indicar como positivo o paciente que contraiu a doença, reduzindo a probabilidade de um falso positivo (GREINER; GARDNER, 2000). Os resultados aqui obtidos se mostraram satisfatórios, indicando que as proteínas aqui produzidas são reconhecidas por anticorpos anti-ZIKV e podem, possivelmente, ser utilizadas para a produção de um kit diagnóstico mais preciso que o existente no mercado.

## 2.6 CONCLUSÃO

Com a produção deste trabalho, podemos concluir que as proteínas recombinantes do Capsídeo, NS1, NS3 e NS4b foram clonadas e expressadas com êxito em bactérias *Escherichia coli* cepa BL21 (DE3) e BL21 *Rosetta*, na presença de concentrações mínimas de 0,5mM do agente indutor IPTG e sendo solubilizadas com agente desnaturante utilizando protocolo com altas concentrações de ureia (8M) e obtendo elevado rendimento quando comparado com os resultados já presentes na literatura.

Estas se mostraram positivas quando analisadas por *Western blot* utilizando anticorpos Anti-His tag e Anti-IgG de camundongo, como teste inicial de expressão. Posteriormente foi detectada a reação das proteínas do Capsídeo, NS1 e NS3 quando expostas a soro de pacientes previamente infectados com ZIKV a partir de *Western blot* e ELISA, mostrando que estas proteínas têm potencial para serem utilizadas na fabricação de métodos de diagnóstico sorológico mais precisos do que os existentes no mercado atual.

Entretanto, devido a altos níveis de reação cruzada com pacientes que já foram previamente infectados com DENV, mais estudos devem ser realizados para uma análise mais profunda da sensibilidade e especificidade destas proteínas na detecção de antígenos para o Zika vírus em soro de pacientes com suspeita clínica da doença.

## REFERÊNCIAS

- AMARAL, R. J. V.; DANSA-PETRETSKI, M. Interação Patógeno-Vetor: Dengue. In:\_\_. **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular**. Rio de Janeiro: INCTEM, Cap. 14, 2012.
- AMORIM, E. G.; BICALHO, S. N.; ZAULI, D. **Boletim Técnico**: Atualização e Diagnóstico Laboratorial da Febre por Zika Vírus. Hermes Pardini, ano 4, n. 16, 2016.
- AMORIM, J. H.; PORCHIA, B. F. M. M.; BALAN, A.; CAVALCANTE, R. C. M.; COSTA, S. M.; ALVES, A. M. B.; FERREIRA, L. C. S. Refolded dengue virus type 2 NS1 protein expressed in *Escherichia coli* preserves structural and immunological properties of the native protein. **Journal of Virological Methods**, v. 167, n. 2, p.186-192, 2010.
- ASSENBERG, R.; WAN, P. T.; GEISSE S.; MAYR, L. M. Advances in recombinant protein expression for use in pharmaceutical research. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 23, n. 3, p.393-402, 2013.
- BARROWS, N.J.; *et al.* A Screen of FDA-approved drugs for inhibitors of Zika virus infection. **Cell Host Microbe**, v. 20, n. 2, p. 259–270, 2016.
- BARZON, L. *et al.* Isolation of infectious Zika virus from saliva and prolonged viral RNA shedding in a traveller returning from the Dominican Republic to Italy, January 2016. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 10, p.1-5, 2016.
- BEATTY, P. R. *et al.* Dengue virus NS1 triggers endothelial permeability and vascular leak that is prevented by NS1 vaccination. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 304, p.1-11, 2015.
- BESERRA, E. B.; FREITAS, E. M. D.; SOUZA, J. T. D.; FERNANDES, C. R. M.; SANTOS, K. D. Ciclo de vida de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera, Culicidae) em águas com diferentes características. **Iheringia**, v. 99, p. 281-285, 2009.



BESNARD, M. *et al.* Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. **Eurosurveillance**, v. 19, issue 13, p. 1-4, 2014.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Dengue, Chikununya e Zika. **Boletim Epidemiológico**, v. 47, n.38, 2016.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Dengue, Chikununya e Zika. **Boletim Epidemiológico**, v. 48, n.03, 2017.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Dengue, Chikununya e Zika. **Boletim Epidemiológico**, v. 49, n.14, 2018a.

\_\_\_\_\_. Dengue, Chikungunya e Zika. **Boletim Epidemiológico**. 2018b. Disponível em: <<http://www.saude.ce.gov.br/index.php/boletins?download=3501%3Aboletim-epidemiologico-arboviroses--27-de-fevereiro-de-2018>>. Acesso em: 14 ago. 2017.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. **Ministério da Saúde divulga novos dados de microcefalia**. 2015. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/oministerio/principal/secretarias/svs/noticias-svs/21020-ministerio-da-saude-divulga-novos-dados-demicrocefalia>>. Acesso em: 26 out. 2017.

BOGOCH, I. I., *et al.* Anticipating the international spread of Zika Virus from Brazil. **The Lancet**, v. 387, n. 10016, p. 335-336, 2016.

BOORMAN J.P.; PORTERFIELD J.S. A simple technique for infection of mosquitoes with viruses; transmission of Zika virus. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 50, p. 238–242, 1956.

BOULTON, R. W., AND WESTAWAY, E. G. Replication of the flavivirus Kunjin: Proteins, glycoproteins and maturation associated with cell membranes. **Virology**, v. 69, p. 416-430, 1976.

BROWN, W C. *et al.* Extended surface for membrane association in Zika virus NS1 structure. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 23, n. 9, p.865-867, 2016.

BUCKLEY A.; GOULD E. A. Detection of virus-specific antigen in the nuclei or nucleoli of cells infected with Zika or Langkat virus. **Journal of General Virology**, v. 69, p. 1913–1920, 1988.

CALVET, G.; *et al.* Detection and Sequencing of Zika Virus from Amniotic Fluid of Fetuses with Microcephaly in Brazil: a case Study. **The Lancet**, v. 16, 2016.

CAO-LORMEAU V.M.; *et al.* Dengue virus type-3, South Pacific Islands, 2013. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 6, p. 1034-1036, 2014.

CAO-LORMEAU V. M.; *et al.* Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. **The Lancet**, v. 387, p. 1531-1539, 2016.

CARRIO, M. M.; VILLAVERDE, A. Localization of Chaperones DnaK and GroEL in Bacterial Inclusion Bodies. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 10, p. 3599-3601, 2005.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Advice for people living in or traveling to South Florida**. 2016. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/zika/intheus/florida-update.html>>. Acesso em: 19 jan. 2017.

\_\_\_\_\_. **Transmissão e Riscos**, 2017. Disponível em: <<https://portugues.cdc.gov/zika/transmission/index.html>>. Acesso em: 2 mar. 2017.

CHAMBERS, T. J.; *et al.* Flavivirus Genome Organization, Expression, and Replication. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 44, p. 649-88, 1990.

CHARREL, R. N.; *et al.* Background review for diagnostic test development for Zika virus infection. **Bulletin of The World Health Organization**, v. 94, n. 8, p.574-584, 2016.

CHOI, J. H.; KEUM, K. C.; LEE, S. Y. Production of Recombinant Proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. **Chemical Engineering Science**, v. 61, p. 876-885, 2006.

CLARK, M. F.; ADAMS, A. N. Characteristics of the Microplate Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. **Journal of General Virology**, v. 34, p. 475-483, 1977.

CLETON N.; KOOPMANS M.; *et al.* Come fly with me: review of clinically important arboviruses for global travelers. **Journal of Clinical Virology**, v. 55, n.3, p. 191–203. 2012.

COLOMA, J.; *et al.* Structures of NS5 Methyltransferase from Zika Virus. **Cell Reports**, v. 16, n. 12, p. 3097-3102, 2016.

CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 228p, 1994.

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

DEJNIRATTISAI, W. *et al.* Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. **Nature Immunology**, v. 17, n. 9, p.1102-1108, 2016.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of Recombinant Proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 297-306, 2009.

DENG, Y.Q.; *et al.* A broadly flavivirus cross-neutralizing monoclonal antibody that recognizes a novel epitope within the fusion loop of E protein. **PLoS ONE**, n. 6, 2011.

DERCKSEN, D. P. *et al.* A comparison of four serological tests for the diagnosis of caseous lymphadenitis in sheep and goats. **Veterinary Microbiology**, n.75, p.167-175, 2000.

DICK, G.W.A; KITCHEN, S.F; HADDOW, A.J. 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.

ENFISSI, A.; *et al.* Zika virus genome from the Americas. **The Lancet**, v. 387, n. 10015, p. 227–228, 2016.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. **Rapid risk assessment.** Zika virus epidemic in the Americas: Potential Association with microcephaly and Guillain-Barré Syndrome – Dec 2015.

EXPASY BIOINFORMATICS RESOURCE PORTAL. **Viral zone**, 2016. Disponível em: <[http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_protein/6756.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_protein/6756.html)>. Acesso em: 20 jan. 2017.

FAYE O.; *et al.* Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, 2014.

FERRER-MIRALLES, N.; *et al.* Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. **Microbial Cell Factories**, v. 8, n. 17, 2009.

FLEMING, A. The Discovery of Penicillin. **British Medical Bulletin**, v. 2, n. 1, p. 4-5, 1944.

FLORINDO, M.I.G.; *et al.* Immune response induced in mice by oral immunization with cowpea severe mosaic virus. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.35, p. 827–835, 2002.

FRANCIS, D. M.; PAGE, R. Strategies to Optimize Protein Expression in *E. coli*. **Current Protocols in Protein Science**, v. 5, n. 24, p. 1-29, 2010.

FU, W.; LIN, J.; CEN, P. 5-Aminolevulinate production with recombinant *Escherichia coli* using a rare codon optimizer host strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 4, p.777-782, 2007.

GERCHMAN, S. E.; GRAZIANO V.; RAMAKRISHNAN, V. Expression of chicken linker histones in *E. coli*: sources of problems and methods for overcoming some of the difficulties. **Protein Expression and Purification**, v. 5, issue 3, p. 242-251, 1994.

GRAUMANN, K.; PREMSTALLER, A. Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems. **Biotechnology Journal**, v. 1, p. 164–186, 2006.

GREINER, M.; GARDNER, I. A. Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic tests. **Preventive Veterinary Medicine**, n.45, p.3-22, 2000.

GUPTA, S. K.; SHUKLA, P. Advanced technologies for improved expression of recombinant proteins in bacteria: perspectives and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 6, p. 1089-1098, 2015.

HATFIELD, G. W.; ROTH, D. A. Optimizing scaleup yield for protein production: Computationally Optimized DNA Assembly (CODA) and Translation Engineering™. **Biotechnology Annual Review**, v. 13, p. 27-42, 2007.

HAYES, EDWARD B. Zika Virus Outside Africa. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 9, 2009.

HENNESSEY M.; FISCHER M.; STAPLES J.E. Zika Virus Spreads to New Areas - Region of the Americas. **Morbidity and Mortal Weekly Report**, v. 65, n. 3, p. 55–58; 2016. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/wr/mm6503e1.htm#suggestedcitation>>. Acesso em: 19 jan. 2017.

Huzly D.; *et al.* High specificity of a novel Zika virus ELISA in European patients after exposure to different flaviviruses. **Euro Surveill**, v. 21, issue 16, 2016.

JOENSEN, K. G.; *et al.* Real-Time Whole-Genome Sequencing for Routine Typing, Surveillance, and Outbreak Detection of Verotoxigenic *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 1501-1510, 2014.

KANE, J. F. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 6, issue 5, p. 494-500, 1995.

KIM, S.; LEE, S. B. Rare codon clusters at 5' -end influence heterologous expression of archaeal gene in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 50, n. 1, p. 49-57, 2006.

KURIEN, B; SCOFIELD, R. Western blotting. Methods. **Elsevier BV**, v. 38, n. 4, p.283-293, 2006.

KUSNADI, A. R.; NIKOLOV, Z. L.; HOWARD, J. A. Production of Recombinant Proteins in Transgenic Plants: Practical Considerations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 56, issue 5, p. 473-484, 1997.

LANCIOTTI, R. D.; *et al.* Genetic and Serologic Properties of Zika virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 8. 2008.

LANDRY M.L.; ST GEORGE K. 2017. Laboratory Diagnosis of Zika Virus Infection. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 141, n. 1, p. 60-67, 2017.

LEI, J.; *et al.* Crystal structure of Zika virus NS2B-NS3 protease in complex with a boronate inhibitor. **Science**, v. 353, n. 6298, p.503-505, 2016.

LEITE, A.; *et al.* Produção do Hormônio do Crescimento Humano Recombinante em planta de tabaco transgênico. **Sínteses**: Revista Eletrônica do SIMTEC, n. 1, p. 62, 2016.

LEONHARD, S. E.; *et al.* Zika virus infection in the returning traveller: what every neurologist should know. **Practical Neurology**, p. 1-7, 2018.

LIANG, H.; *et al.* Recombinant Zika virus envelope protein elicited protective immunity against Zika virus in immunocompetent mice. **Plos One**, p. 1-18, 2018.

LIANG, Q.; *et al.* Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Deregulate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy. **Cell Stem Cell**, v. 19, n. 5, p. 663-671, 2016.

LICHTY J.J.; *et al.* Comparison of affinity tags for protein purification. **Protein Expression and Purification**, v. 41, p. 98-105, 2005.

LINDENBACH, B. D.; *et al.* **Flaviviridae**: the Viruses and their replication. 5<sup>th</sup> edition, Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 2007.

LIMA-COSTA, M. F.; BARRETO, S. M. Tipos de estudos epidemiológicos: conceitos básicos e aplicações na área do envelhecimento. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 12, n. 4, p. 189-201, 2003.

LIU, J.; *et al.* Construction and Identification of Recombinant HEK293T Cell Lines Expressing Non-structural Protein 1 of Zika Virus. **International Journal of Medical Sciences**, v. 14, n. 11, p. 1072-1079, 2017.

LOMONOSSOFF, G. P.; SAINSBURY, F. Extremely High-Level and Rapid Transient Protein Production in Plants without the Use of Viral Replication. **American Society of Plant Biologists**, v. 148, p. 1212-1218, 2008.

LUSTIG, Y.; *et al.* Sensitivity and Kinetics of an NS1-Based Zika Virus Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in Zika Virus-Infected Travelers from Israel, the Czech Republic, Italy, Belgium, Germany, and Chile. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 6, p.1894-1901, 2017.

LOWE, C. R.; LOWE, A. R.; GUPTA, G. New developments in affinity chromatography with potential application in the production of biopharmaceuticals. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 49, n. 1-3, p. 561-574, 2001.

LUZ, G.K.; DOS SANTOS, G.I.V.; VIEIRA, R.M. Febre pelo Vírus Zika. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 24, n. 4, 2015.

MA, J. K.; DRAKE, P. M. W.; CHRISTOU, P. The Production of Recombinant Pharmaceutical Proteins in Plants. **Nature**, v. 4, 2003.

MACKENZIE, J. S.; GUBLER, D. J.; PETERSEN, L. R. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. **Nature Medicine Supplement**, v. 10, n. 12, p. 98-109, 2004.

MACKENZIE, J. S.; LINDSAY, M. D.; DANIELS, P. W. The effect of climate on the incidence of vector-borne viral diseases: the potential value of seasonal forecasting, in *Applications of Seasonal Climate Forecasting in Agriculture and Natural Ecosystems—The Australian Experience*. Kluwer Academic Publishers, p. 429–452, 2000.

MACMAHON, B.; PUGH T. F. **Epidemiology: Principles and Methods**. Boston: Little Brown & Co. 376p. 1970.



MACNAMARA F. N. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, p. 139–145, 1954.

MANDL, C. W.; *et al.* Genome sequence of tick-borne encephalitis virus (Western subtype) and comparative analysis of nonstructural proteins with other flaviviruses. **Virology**, v. 173, p. 291-301, 1989.

MANSFIELD, K. L.; *et al.* Flavivirus-induced antibody cross-reactivity. **Journal of General Virology**, v. 92, n. 12, 2011.

MANSUY, J. M.; *et al.* Zika Virus: High Infectious Viral Load in Semen, a New Sexually Transmitted Pathogen? **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 4, p. 405, 2016.

MEDEIROS, D. P. **Construção e Expressão do Antígeno do Multiepitopo Zika Vírus com o Sistema Baculovírus para fins de Diagnóstico Sorológico**. 2017. 28 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Faculdade de Ciências da Educação e Saúde, Brasília, 2017.

MELO, A. S. O.; *et al.* Zika Virus Intrauterine Infection causes Fetal Brain Abnormality and Microcephaly: Tip of the Iceberg? **Ultrasound in Obstetrics & Gynaecology**, v. 47, p. 6-7. 2016.

MERRIL, C. APUD: CHRAMBACH A.; DUNN M.; RADOLA, B. Advances in Electrophoresis. **VCH Verlagsgesellschaft**, Weinheim, v. 1, 1987, p. 111, 2000.

MITRAKI, A. *et al.* Global suppression of protein folding defects and inclusion body formation. **Science**, v. 253, n. 5015, p. 54-58, 1991.

MITRUKA, B. M.; RAWNSLEY, H. M.; VADEHRA, D. V. **Animals for Medical Research: Models for the Study of Human Disease**. New York: Wiley & Sons, 591p., 1976.

MLAKAR J.; KORVA M.; TUL N, et al. Zika virus associated with microcephaly. **The New England Journal of Medicine**, v. 374, p. 951–958, 2016.

MONTEIRO, J.D. **Epidemiologia molecular dos vírus dengue e Zika no Estado do Rio Grande do Norte, no período de junho de 2014 a maio de 2015**. Dissertação de Pós-Graduação (Mestrado em Biologia Parasitária) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, p. 120, Natal, 2016.

MOORE D.L.; *et al.* Arthropod-borne viral infections of man in Nigeria, 1964–1970. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 69, p. 49–64, 1975.

MOSENTA, M.; MARCHESE S.; POGGIANELLA M.; CAMPOS J. L. S.; BURRONE O. R. Role of N-glycosylation on Zika virus E protein secretion, viral assembly and infectivity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 492, n. 4, p.579-586, 2017.

MUSSO D.; *et al.* Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. **Euro Surveillance**, v. 19, 2014.

\_\_\_\_\_. Potential Sexual Transmission of Zika Virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, 2015a.

\_\_\_\_\_. Detection of Zika virus in saliva. **Journal of Clinical Virology**, v. 68, p. 53-55. 2015b.

NUNES, M. L.; *et al.* Microcephaly and Zika virus: a clinical and epidemiological analysis of the current outbreak in Brazil. **Jornal de Pediatria**, v. 92, n. 3, p. 230-240, 2016.

OEHLER E.; *et al.* Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome – case report, French Polynesia, December 2013. **Euro Surveillance**, v. 19, 2014. Disponível em: <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20720>>. Acesso em: 19 jan. 2017.

OLIVEIRA, A. S. Clonagem e Expressão das Proteínas Recombinantes NS1 e NS3 do vírus da Dengue tipo 3. **Dissertação** (Mestrado em Biociências Aplicadas à Farmácia). Ribeirão Preto, 2013.

OVERTON TW. Recombinant protein production in bacterial hosts. **Drug Discovery Today**, v. 19, p. 590–601, 2014.

PAL, S.; *et al.* Evaluation of Dengue NS1 Antigen Rapid Tests and ELISA Kits Using Clinical Samples. **Plos One**, v. 9, n. 11, p.1-8, 2014.

PALMER, I.; WINGFIELD, P. T. Preparation and Extraction of Insoluble (Inclusion-Body) Proteins from Escherichia coli. **Current Protocols in Protein Science**, p.6.3.1 - 6.3.20, 2012.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION / WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Zika virus infection**. Washington: Regional Office for the Americas of the World Health Organization, 2015. Disponível em: <[http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&Itemid=270&gid=30075&lang=en](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=30075&lang=en)>. Acesso em: 29 ago. 2017.

PATEL, P.; *et al.* Development of one-step quantitative reverse transcription PCR for the rapid detection of flaviviruses. **Virology Journal**, 2013.

PETERNEL, Š.; KOMEL, R. Isolation of biologically active nanomaterial (inclusion bodies) from bacterial cells. **Microbial Cell Factories**, v. 9, n. 1, p.1-16, 2010.

PEYRET, H.; LOMONOSSOFF, G. P. The pEAQ vector series: the easy and quick way to produce recombinant proteins in plants. **Plant Molecular Biology**, v. 83, p. 51-58, 2013.

PHOO, W. W. *et al.* Structure of the NS2B-NS3 protease from Zika virus after self-cleavage. **Nature Communications**, v. 7, p.1-8, 2016.

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

PUHL, A. C. **Obtenção de um biocatalisador da protease TEV para a remoção de caudas de histidinas de proteínas recombinantes**. 81 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

RASALA, B. A.; MAYFIELD, S. P. Photosynthetic biomanufacturing in green algae: production of recombinant proteins for industrial, nutritional, and medical uses. **Photosynthesis Research**, v. 123, p. 227-239, 2015.

RICE, C. M.; STRAUSS, E. G.; STRAUSS, J. H. Structure of the flavivirus genome. **The Togaviridae and Flaviviridae**, p. 279-326, 1986.

RIO. **The official website of the 2016 Rio Olympic Games**. 2016. Disponível em: <<http://www.rio2016.com/en/olympic-game>>. Acesso em: 07 fev. 2017.

ROTHWELL, L.; HAMBLIN, A.; KAISER, P. Production and characterisation of monoclonal antibodies specific for chicken interleukin-2. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 83, n. 3-4, p.149-160, 2001.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 172, 2014.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning**: A laboratory manual. 2<sup>nd</sup> edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SAMARASEKERA U.; TRIUNFOL M. Concern over Zika virus grips the world. Special Report. **The Lancet**, v. 387, p. 521–524, 2016.

SILVA, F. G. *et al.* Avaliação de kits comerciais para detecção de antígenos NS1-dengue - São Paulo. **Boletim Epidemiológico Paulista**, São Paulo, v. 8, n. 91,

2011. Disponível em:  
<[http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1806-42722011000700003&lng=en&nrm=iso](http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-42722011000700003&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 28 jun. 2018.

SILVEIRA, J. F.; UMEZAWA, E. S.; LUQUETTI, A. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 6, p.286-291, 2001.

SINGH, A. et al. Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. **Microbial Cell Factories**, v. 14, n. 1, p.1-10, 2015.

SIROHI, D.; et al. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. **Science**, v. 352, n. 6284, p.467-470, 2016.

SØRENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 115, n. 2, p.113-128, 2005.

SONG, H.; et al. Zika Virus NS1 Structure Reveals Diversity of Electrostatic Surfaces Among Flaviviruses. **Nature, Structural & Molecular Biology**, v. 23, n. 5, 2016.

STETTLER, K.; et al. Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. **Science**, v. 353, n. 6301, p.823-826, 2016.

STUDIER, F. W.; et al. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. **Methods in Enzymology**, v. 185, p. 60-89, 1990.

TANG, H.; et al. Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates their Growth. **Cell Stem Cell**, v. 18, p. 587-590; 2015.

TEGEL, H.; et al. Increased levels of recombinant human proteins with the *Escherichia coli* strain Rosetta (DE3). **Protein Expression and Purification**, v. 69, n. 2, p.159-167, 2010.

THIHA, A.; IBRAHIM, F. A Colorimetric Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Detection Platform for a Point-of-Care Dengue Detection System on a Lab-on-Compact-Disc. **Sensors**, v. 15, n. 5, p.11431 - 11441, 2015.

TORANE, V.; SHASTRI, J. Comparison of Elisa and Rapid Screening Tests for the Diagnosis of HIV, Hepatitis B and Hepatitis C among Healthy Blood Donors in a Tertiary Care Hospital in Mumbai. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 26, n. 3, p. 284–285. 2008.

TOWBIN, J.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

VILLAVERDE, A.; CARRIÓ, M. M. Protein Aggregation in Recombinant Bacteria: biological role of inclusion bodies. **Biotechnology letters**, v. 25, p. 1385-1395, 2003.

VIRANAICKEN, W.; *et al.* ClearColi BL21(DE3)-based expression of Zika virus antigens illustrates a rapid method of antibody production against emerging pathogens. **Biochimie**, v. 142, p. 179-182, 2017.

WAHALA, W.M.P.B. et al. Dengue virus neutralization by human immune sera: Role of envelope protein domain III-reactive antibody. **Virology**, v. 392, n. 1, p.103-113, 2009.

WALSH, G. Biopharmaceutical Benchmarks 2010. **Nature America**, v. 28, n. 09, p. 917-924, 2010.

WESTAWAY, E. G. Flavivirus Replication Strategy. **Advances in Virus Research**, v. 33, p. 45-90, 1987.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO statement on the first meeting of the International Health Regulations.** 2005. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/news/statements>>. Acesso em: 07 fev. 2017.

\_\_\_\_\_. **Neurological syndrome, congenital malformations, and Zika virus infection.** 2015. Disponível em: <[http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_download&Itemid=&gid=32405&lang=en](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_download&Itemid=&gid=32405&lang=en)>. Acesso em: 26 out. 2017.

\_\_\_\_\_. **Laboratory testing for Zika Virus infection.** 2016. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204671/WHO\\_ZIKV\\_LAB\\_16.1\\_eng.pdf?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204671/WHO_ZIKV_LAB_16.1_eng.pdf?sequence=1)>. Acesso em: 11 jun. 2018.

WIDMANN, M.; CHRISTEN P. Comparison of folding rates of homologous prokaryotic and eukaryotic proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 18619- 18622, 2000.

WINGFIELD, P.T. Overview of the Purification of Recombinant Proteins. **Current Protocols in Protein Science**, v. 80, p. 6.1.1 - 6.1.35, 2015.

WOOD, D. W. New trends and affinity tag designs for recombinant protein purification. **Current opinion in Structural Biology**, v. 26, p. 54-61, 2014.

YOUNG, P. R.; *et al.* An Antigen Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Reveals High Levels of the Dengue Virus Protein NS1 in the Sera of Infected Patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 1053-1057, 2000.

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

ZANLUCA C.; *et al.* First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 569–572, 2015.

ZHU J. Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1158–1170, 2012.

## **Expression of Capsid, NS1 e NS3 proteins**

### **From Zika Virus in *Escherichia coli***

**Ilana Magalhães<sup>1</sup>, Eridan Florean<sup>2\*</sup>.**

<sup>1</sup> Professional Master's Degree in Biotechnology in Human and Animal Health, State University from Ceara, Brasil.

<sup>2</sup>Greenbean Biotechnology, State University from Ceara, Brasil.

\*Correspondence to Ilana Magalhães e Eridan Florean: ilanamagalhaes@hotmail.com; eridanpereira@gmail.com.

#### **Abstract**

Fever caused by the Zika virus (ZIKV) has been considered an emerging disease since its first major outbreak in the South Pacific in 2007 and more recently in the Americas. The high number of people infected during recent outbreaks has caught the attention of health agents and researchers, where recent findings on the disease show that this virus is associated with severe human diseases such as Microcephaly and Guillain-Barre syndrome, but this association needs to be better understood. Thus, the present work aimed to clone sequences from the virus isolated from Bahia, to produce and purify the recombinant viral proteins and to verify their immunogenicity by means of ELISA and Western blot tests using serum from patients infected with ZIKV and Dengue virus (DENV). To this end, previously selected gene sequences were successfully cloned into a prokaryotic production system. Expression was obtained using strains of *Escherichia coli* BL21 (DE3) and BL21 (DE3) *Rosetta* and the result was analyzed by Western blot. Experiments showed that recombinant proteins had greater sensitivity and specificity than



recombinant proteins when compared to the commercial Novagnost® Kit. It is concluded that expressed and purified proteins present a great potential for future production of diagnostic kits for the disease.

**Keywords:** Zika virus (ZIKV), Microcephaly, Guillain-Barré, cloning, expression.

## **Introduction**

Zika Virus (ZIKV) is a virus of the Flaviviridae family primarily isolated from a rhesus monkey from the Zika forest in Uganda in 1947 (DICK et al., 1952). Historically, cases of Zika virus infections were rare until the 1960s, where sporadic cases of virus infection were reported in Asian and African continents, until the first outbreak in Micronesia in 2007 (HAYES, 2009). Possible ZIKV epidemics may have occurred previously but may have been misdiagnosed due to the great similarity of this disease to that caused by other flaviviruses such as Dengue and West Nile. This cross-reaction can be intensified if the patient has been infected with another flavivirus (LANCIOTTI et al., 2008).

In 2014, due to a new outbreak of the disease occurred in Brazil, between 150 and 200 children were born with microcephaly (WHO, 2015). In November of 2015 this number increased to 1,248 suspected cases, where the highest number of cases reported was in Pernambuco (Brazil, 2015). In the same year, 121 cases of neurological disorders and Guillain-Barré Syndrome were reported, where all cases presented symptoms of the disease at the beginning of the year (ECDC, 2015).

Transmission of this disease can occur in several ways. The most popular is known through the bite of the female mosquito *Aedes aegypti* and *A. albopictus*. However, new forms of contagion are being studied (HASTINGS; FIKRING, 2017). The symptoms of ZIKV disease vary from person to person, but the main ones are arthralgia, edema of the extremities, moderate fever,

headache, retro-orbital pain, nonpurulent conjunctivitis, vertigo, myalgia, digestive disorders and small maculopapular eruptions (ZANLUCA et al., 2015).

In order to diagnose the disease, viral RNA is extracted from the patient's sample and RT-PCR is performed as a faster tool for the detection of viral infection in acute phase samples in a period of 4 to 7 days after the onset of symptoms. In addition, only one in five infected people is symptomatic (AMORIM; BICALHO; ZAULI, 2016). Thus, the sample is tested for different flaviviruses, including Dengue and Chikungunya, through the ELISA test for the detection of specific IgM / IgG antibodies against ZIKV five to six days after the onset of symptoms (ZANLUCA et al., 2015). Samples for the detection of the virus range from blood, amniotic fluid, semen and saliva.

So far there is no specific treatment for fever by ZIKV. For this reason, it is necessary to produce new biopharmaceuticals and a vaccine against ZIKV, as well as the manufacture of new diagnostic kits that are more accurate and accessible to the population. In this context, with the advancement of biotechnology, it is now possible to produce different recombinant proteins in sufficient amounts for research, clinical and industrial purposes (CHOI et al., 2006).

Thus, the present work had as objective to evaluate different strategies for the expression of recombinant Capsid, NS1 and NS3 proteins of the circulating ZIKV in Brazil, using bacterial platform as expression system, and later to evaluate the effectiveness of proteins produced in detecting the presence of human anti-Zika antibodies produced by previously diagnosed positive individuals for the disease. The results obtained could potentially be used in the production of more accurate and lower cost diagnostic kits.

## **Results**

### **Cloning of the proteins of interest in *Escherichia coli***

Plasmids containing the inserts for ZIKV Capsid, NS1 and NS3 proteins sent by gene synthesis company were cloned into *E. coli* DH10b and plated on LB agar medium with ampicillin (50 mg / ml). The inserts were subjected to a double digestion with the restriction enzymes *EcoRI* and *BamHI*, verifying the correct attachment of the inserts to the pET-28a expression vector. The plasmids containing the inserts were cloned into strains of *Escherichia coli* BL21 (DE3) and BL21 (DE3) *Rosetta* (Figure 1).

### **Expression and purification of the proteins of interest in *Escherichia coli***

The BL21 (DE3) and BL21 *Rosetta* positive bacteria confirmed for the plasmids containing the genes of interest were cultured in LB-kanamycin and LB-kanamycin-chloramphenicol, respectively, and induced to express the recombinant proteins with IPTG at concentration of 0.5 mM analyzed under denaturing conditions using 12% polyacrylamide gel (Figure 2).

Capsid, NS1 and NS3 proteins were shown to be viable under the conditions used in the experiment. After confirmation of the presence of the proteins by Western Blot, the purification of the same in column of Ni<sup>2+</sup> ion affinity chromatography was performed. This purification occurred with the addition of the protein in the column previously charged with nickel and performed washes with different concentrations of imidazole for the subsequent elution of this purified protein.

After the purification process, some samples remained for 48 hours in the lyophilizer to obtain a more concentrated sample, whereas other proteins were concentrated using 15mL tubes (Amicon-Millipore) with 3 MWCO filters that did not allow the passage of the proteins of interest .

### **Immunogenicity analysis of proteins**

For initial tests of the immunogenicity tests of the recombinant proteins, a Western Blot analysis was performed to determine whether the proteins were recognized by the serum of patients with IgM and IgG antibodies to ZIKV (N = 10 samples) given by the Central Laboratory of

Public Health Ceará (LACEN). In the test, 5µg of purified protein per well of the capsid, NS1 and NS3 samples were used. 2µL of mouse brain extract containing ZIKV and 2µL of mouse brain extract containing the Dengue virus were used to test the recognition of these sera with another flavivirus. As a negative control of the test, 5µg of the BSA protein was used which does not generate any reaction with human sera. Capsid, NS1, and NS3 proteins were evaluated as possible candidates for use in ELISA immunodiagnosis for the detection of an immune response with sera from patients.

Evaluation of the immunogenicity of expressed recombinant proteins, both patients with confirmed infection only for ZIKV and patients diagnosed by LACEN / CE with a 1: 100 dilution response. The NS3 protein obtained a higher response, with no difference between the response to NS1 and NS3 proteins compared to patients with ZIKV infection alone. Similar response found for the pool of confirmed infection patients for DENV and NS3 protein with higher response (Figure 3).

For comparative analysis with the Novagnost® Zinc Virus IgM µ-capture Diagnostic Kit, the patient samples confirmed by LACEN / CE were also tested in the kit, in addition to 10 DENV-positive patients, to analyze the sensitivity and specificity of the kit (Table 1). The same samples were tested for the three recombinant proteins. The results show that for the Novagnost® commercial kit there is a sensitivity of only 30%, although it has a specificity of 83%. The samples tested had been confirmed by PCR before using the kit. As for the recombinant proteins, the results showed 83%, 100% and 60% sensitivity for Capsid, NS1 and NS3, respectively and 76%, 50% and 62,5% of specificity. These values demonstrated superiority when compared to protein sensitivity, although a reduction in specificity was observed. However, overall, the viral capsid protein showed the best result.

## Discussion

In order to produce new antigens for the diagnostic industry, the expression of the recombinant C proteins of the capsid, NS1 (non-structural 1) and NS3 (non-structural 3) of the Zika virus, isolated from Bahia, in expression vectors in prokaryotes. Several authors have also used strains of *E. coli* bacteria such as BL21 (DE3) and BL21 (DE3) *Rosetta* for the production of recombinant proteins, the system being based on the T7 expression system of pET (marketed by NOVAGE) more than 90% of protein preparation systems in 2003 (SØRENSEN; MORTENSEN, 2005).

It was possible to observe a comparison of the expression of the three proteins, on a small scale, in the two strains of bacteria most commonly used in the production of recombinant protein, *E. coli* BL21 (DE3) and BL21 (DE3) *Rosetta*. As the induction conditions used in the experiment were the same for all proteins in these two expression systems, the results obtained showed that for expression of the Capsid protein there is no significant difference between the two strains. However for the non-structural proteins 1 and 3 it was observed that the best expression levels for these recombinant proteins can be obtained using the *Rosetta* strain. It is known that the N-terminal portion of the nucleotide sequence is the most sensitive to the use of rare codons in bacteria (KIM; LEE, 2006). To overcome this problem, one can use a codon optimization (HATFIELD; ROTH, 2007) or express the sequence of interest with *Rosetta*, which compensates for the main rare codons not used by *E. coli* (FU et al., 2007).

The NS3 protein, which presented a higher level of expression, demonstrated a greater number of bands. A similar result was previously obtained by other authors who expressed proteins derived from flavivirus (AMORIM et al., 2010) and show that this fact possibly happens due to the presence of bacterial proteases or by catalytic activities of the proteins themselves, besides a possible premature termination of the since the coding sequences do not originate from the bacterium and may be infrequent (OLIVEIRA, 2013). However, one can observe the

expression of these proteins in the size expected by the use of the specific antibodies during the Western blot.

NS1 protein is a highly conserved protein among flaviviruses, where it is already recognized in the literature because it has the potential to be used as an antigen to detect antibodies in sera from patients infected with flaviviruses. Thus, this protein can be used for the manufacture of monoclonal antibodies to be used in diagnostic kits for its identification during the acute phase of the disease (PAL et al., 2014; YOUNG et al., 2000). In this way, it is believed that not only the NS1, but also the other proteins of this work can be used for the formulation of diagnostic kits.

The NS3 protein has a number of functions, such as the RNA replication process in RNA helicase, together with the NS2B and M protein, which serves as a cofactor in the proteolytic activity of non-structural proteins (NS) and, finally, acts on the nucleotide triphosphatase activity (MONTEIRO, 2016). In this way, it is believed that not only the NS1, but also the other proteins of this work can be used for the formulation of diagnostic kits.

There are no reports of tests using recombinant proteins as antigen for the development of kits and serum use of patients who had ZIKV in Brazil. However, studies such as this have already been carried out using the dengue virus (WAHALA et al., 2009) and can be used as a basis for testing with ZIKV. In addition to proteins, Zika and Dengue virus samples were also used for this primary test, since the structural homology of the proteins of these two flaviviruses is known, which causes cross-reaction in the main tests using sera from patients (DEJNIRATTISAI, 2016; PRIYAMVADA et al., 2016). The results presented here demonstrated the recognition of Capsid, NS1 and NS3 proteins, as well as the samples for ZIKV and DENV, confirming the existing cross-reaction between these two flaviviruses.

Due to its high level of sensitivity and easy reproducibility, the ELISA immunodiagnostic method became the method of choice for the analysis of different samples, and in this study the

possibility of expressing recombinant Capsid, NS1 and NS3 viral proteins efficiently in *E. coli*, where most have immunogenic potential and are able to react with antibodies from humans that were previously exposed to ZIKV.

Sensitivity and specificity tests performed showed that the Novagnost® Diagnostic Kit was not satisfactory in the recognition of positive samples, but a satisfactory result was found regarding a reduction in the cross-reaction with patients who had antibodies to DENV. Among the three recombinant proteins used in the test, Capsid protein was shown to have the best result of sensitivity and specificity, the recombinant NS1 protein, although one of the most used for the formulation of diagnostic kits, was not specific in the recognition of antibodies to ZIKV, together with the NS3 protein. The results obtained herein have proved to be satisfactory, indicating that the proteins produced herein are recognized by anti-ZIKV antibodies and may possibly be used for the production of a more accurate diagnostic kit than the one on the market. However, new studies and tests must be performed in order to improve the results.

## **Materials and Methods**

The procedures were carried out at the Laboratory of Biotechnology and Molecular Biology (LBBM) of the State University of Ceará (UECE), and an abundant research was first carried out in databases such as NCBI on the sequences of ZIKV proteins most used by authors of works in the expression for scientific purposes. The article by Calvet et al. (2016), where the sequence of the circulating ZIKV proteins in Brazil was extracted from the amniotic fluid of two pregnant women. The complete viral genome has 10,793 nucleotides and is available from Genbank under accession number KU497555.

To the coding regions of each protein were added cut-off regions for restriction enzymes BamHI (G \* GATC \* C) and EcoRI (G \* AATC \* C). The sequence for tail formation was also added from the six-fold repetition of the amino acid Histidine in the 3' region for the protein purification process, which is located in the N-terminal region. Sequences containing the above elements were then forwarded to BioBasic Gene Synthesis (Canada) for optimization and synthesis. The sequences were cloned into plasmid pET-28a (Novagen).

As a protocol for transforming the plasmid into the bacterial strain 1  $\mu\text{L}$  (concentration of 100 ng /  $\mu\text{L}$ ) of the plasmid pET-28a with the insert was used to transform chemically competent *E. coli* BL21 (DE3) and BL2 (DE3) bacterial cells by Calcium Chloride ( $\text{CaCl}_2$  +). Cells were thawed on ice and, after adding the plasmid, were incubated in an ice sequence for 10 minutes, a water bath at 42 ° C for 40 seconds and on ice for another 10 minutes. After this time 200  $\mu\text{L}$  of LB culture medium (Luria-Bertani, Kasvi) without antibiotic was added and the cells were incubated at 37 ° C for one hour with shaking at 180 rpm (RPM) to allow expression of the resistance gene to the present antibiotic vector (Ampicillin). Cells were plated in Petri dishes containing solid LB culture medium with 50  $\mu\text{g}$  /  $\mu\text{L}$  of Ampicillin for selection of the cloned bacteria, and incubated overnight at 37 ° C.

To confirm the colonies that were positive for cloning the PCR technique was used using T7 primers and the products were submitted to 1% agarose gel electrophoresis dissolved in TAE buffer (Tris-Acetate and EDTA). PCR was used: DNA (1  $\mu\text{L}$ );  $\text{MgCl}_2$  (0.4  $\mu\text{L}$ ); 10x Taq Buffer (1  $\mu\text{L}$ ); dNTP (0.2  $\mu\text{L}$ ); T7 Forward and Reverse primers (0.8  $\mu\text{L}$ ); GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase (Promega) and DNase / RNase free water to make up the volume to 10  $\mu\text{L}$  per reaction. Colonies that were positive by PCR were used for the expression of the recombinant protein of interest.

The bacteria were induced in 10 mL of LB medium with antibiotic Kanamycin for BL21 (DE3) and Kanamycin and Chloramphenicol (50  $\mu\text{g}$  /  $\mu\text{L}$ ) for Rosetta BL21 (DE3) in the ratio of 1  $\mu\text{L}$  culture to 25  $\mu\text{L}$  LB, for growth by 1 hour and 30 minutes under constant stirring at 240 rpm at



37 ° C until reaching the exponential phase between 0.6 <math>A\_{600\text{ nm}}</math> <math><0.8</math>. These same cells were lysed, following the protocol proposed by Sambrook and Russell (2001). The cells were then lysed with Sonicador (Qsonica Q55) at 45 W with 15 altered 20 'cycles in sonication and 40' resting on ice. The results were analyzed in SDS-Page 15. Proteins underwent solubilization protocol. The solubilization solution containing the proteins was inserted into the ÄKTA <sup>TM</sup> purification system (GE Healthcare Life Sciences) using HP HisTrap columns packed with Ni<sup>2+</sup> + Sepharose High Performance (HP) affinity resin (GE Healthcare Life Sciences).

For the analysis of the antigenicity tests of recombinant capsid proteins, NS1 and NS3, 10 samples of sera of patients previously evaluated as positive for ZIKV through IgM and IgG tests were used and confirmed by PCR. The samples were provided by the Central Laboratory of Ceará (LACEN / CE) and comprised part of the sera of the year 2017, and were certified by the Professional Ethics Committee (CEP) n ° 913.484.

For the antigenicity analysis of the recombinant proteins, they were submitted to indirect ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). From the results obtained, the sensitivity (S), specificity (E), positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of the ELISA were determined, which are fundamental parameters for the definition of a quality diagnostic test. For this purpose, the following formulas were used:  $S = (a / a + c)$ ;  $E = (d / b + d)$ ;  $VPP = (a / a + b)$  and  $VPN = (d / c + d)$ . The cut-off was determined using 10 samples of sera from patients known to be negative for ZIKV and DENV. Briefly, the means of the absorbances of the sera were calculated and summed with three times the value of the standard deviation of the samples. Thus, sera that had absorbance values above this threshold, indicative of protein recognition in sera of patients (Silva et al., 2011) were considered positive. In this study, the Graphpad PRISM program (Version 5.03 GraphPad Software, Inc.) was used to analyze all the results.

### **Acknowledgements**

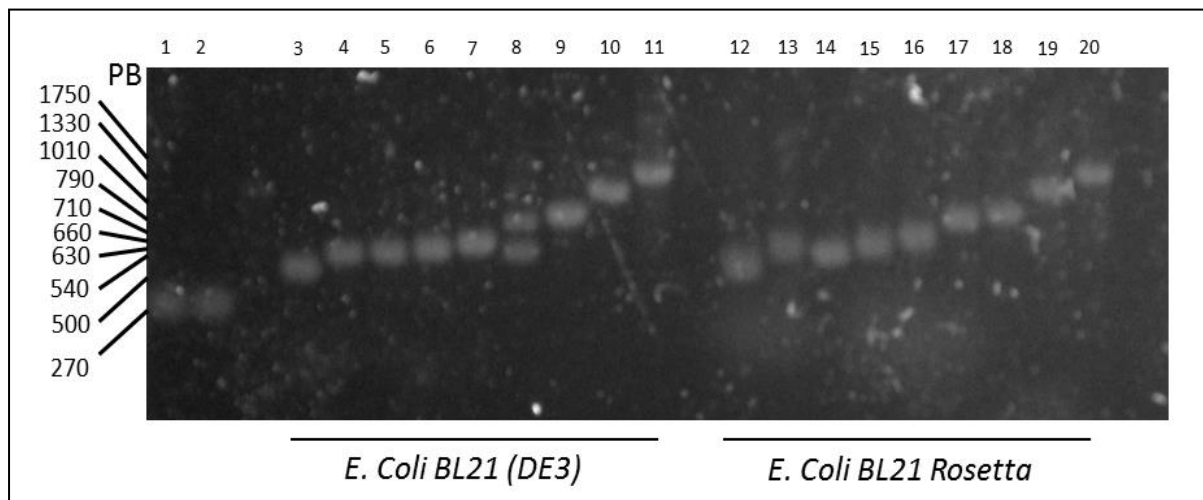
We thank the staff from Biotechnology and Molecular Biology Laboratory Facility for technical assistance with the experiments. We are grateful to Professor Izabel Florindo Guedes from Renorbio for the support and the State University from Ceara for the assistance given.

### Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

### Figures

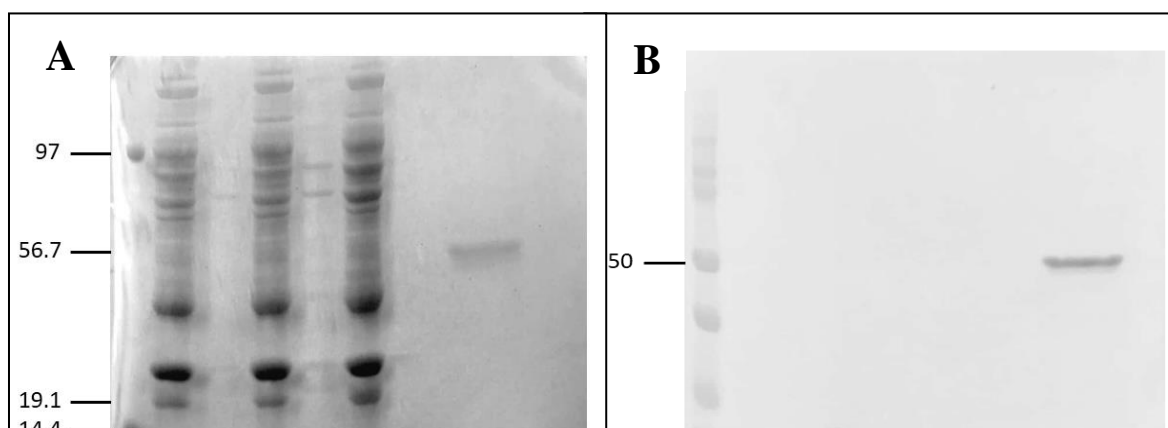
**Figure 1. Agarose gel demonstrating the cloning of pET-28a with inserts in *E. coli* BL21 (DE3) and Rosetta.**



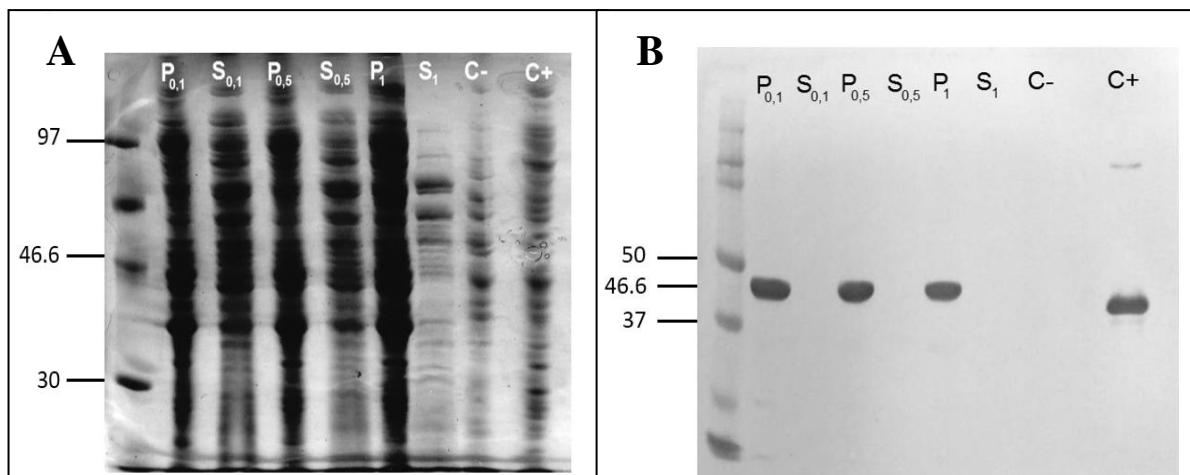
**Legend:** Line 1 *E. coli* BL21 (DE3) + pET28-a without insert; Line 2 *E. coli* BL21 Rosetta + pET28-a without insert; Lines 3 to 11- *E. coli* BL21 (DE3) + pET28-a with inserts in increasing order of size; Lines 12 to 20- *E. coli* BL21 Rosetta + pET28-a with inserts in increasing order of size.

**Figure 2. SDS-PAGE of the expression of Capsid, NS1 and NS3 proteins in *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta.**

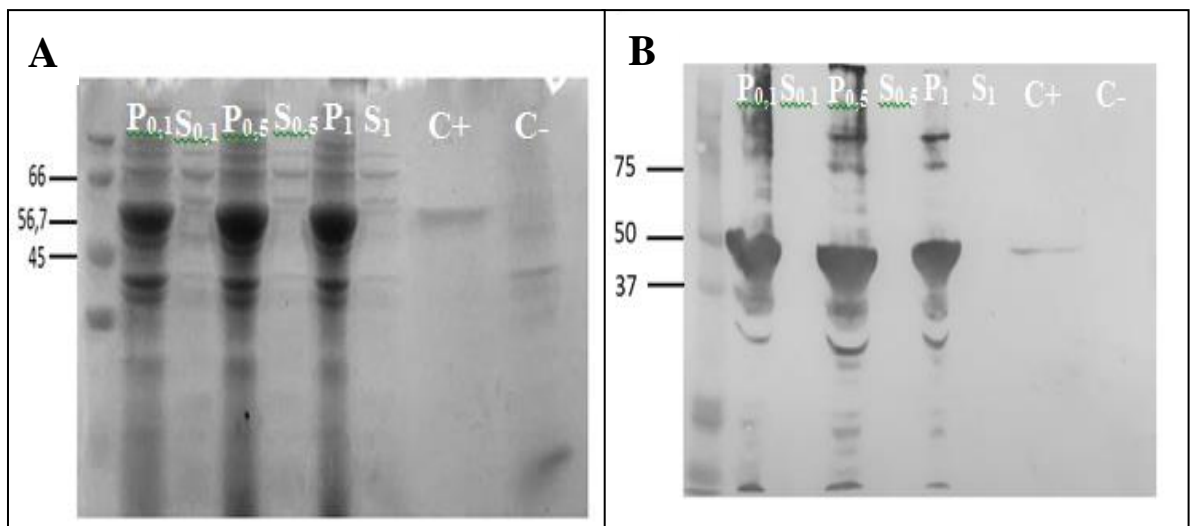
### Capsid



## NS1

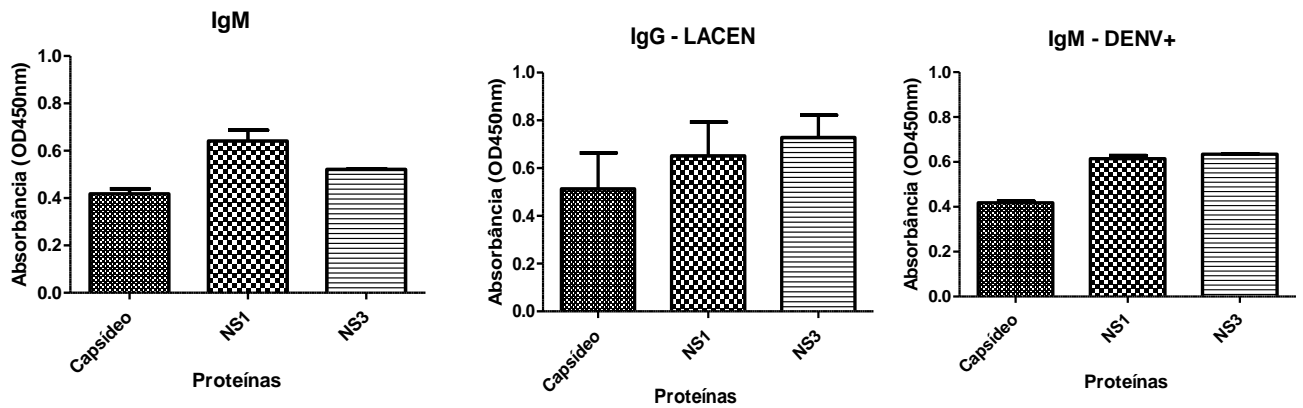


## NS3



**Legend:** SDS-PAGE of Capsid, NS1 and NS3 Proteins in *E. coli* BL21 (DE3) on 12% at three different concentrations of IPTG P0.1 (Pellet with 0.1mM induction); S0.1 (0.1mM induction supernatant); P0.5 (0.5mM induction pellet); S0.5 (0.5mM induction supernatant); P1 (Pellet with 1mM induction); S1 (1mM induction supernatant); C<sup>-</sup> (Negative control - *E. coli* induced without insert); C<sup>+</sup> (positive control). Figure B: Western blot of the same samples.

**Figure 3. Indirect ELISA of Capsid, NS1 and NS3 proteins with serum from patients infected with ZIKV.**



**Legend:** Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) method of purified proteins with sera from patients with ZIKV and DENV. The response produced by patients at the dilution of 1: 100 confirmed with ZIKV infections alone and the response of patients confirmed by LACEN with ZIKV and DENV infections. Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (EPM) for patients in each group.

**Table 1. Analysis of Capsid, NS1 and NS3 proteins responses against sera from patients with ZIKV by indirect ELISA**

Imunoglobulin	Proteins	Sensitivity	Specificity
<b>IgM</b>	Novagnost®	30%	83%
	Capsid	83%	76%
<b>IgG</b>	NS1	100%	50%
	NS3	60%	62,5%

**Legend:** The responses of 30 sera to the commercial Novagnost® IgM Diagnostic Kit comparing to the recombinant viral capsid proteins, NS1 and NS3, were analyzed.