

PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE DO ENVELOPE DO VÍRUS DA ZIKA NO SISTEMA BACULOVÍRUS-CÉLULAS DE INSETO

Fernanda Maria Lessa Carvalho¹

Luana Leandro Gois²

RESUMO

A proteína do envelope (E) do vírus da Zika (ZIKV) está envolvida na ligação e fusão com receptores celulares, sendo a principal determinante do tropismo viral, auxilia na virulência e imunogenicidade. Atualmente, não há vacinas anti- ZIKV disponíveis, assim, é prioridade compreender a resposta imune contra ZIKV para controle de uma potencial pandemia. O objetivo principal deste estudo é produzir e purificar a proteína E do ZIKV nas formas de monômero (Em) e dímero (Ed) pelo método baculovírus-célula de inseto. Construções de DNA contendo uma sequência líder de nucleotídeos que codificam um peptídeo sinal do Baculovírus, a proteína precursora de membrana (prM), a proteína Em ou Ed e cauda de seis histidinas foi concebida, subclonada no plasmídeo carreador pFastBacDual e transferida para o cromossoma artificial do Baculovírus recombinante (bacmídeo). Partículas virais foram obtidas pela transfecção de células Sf-9 com o bacmídeo recombinante e usadas para determinar as melhores condições de produção da proteína recombinante em sobrenadante de células High-Five, de acordo com a multiplicidade de infecção (MOI) e tempo de infecção (TOI). As construções que codificam Em e Ed foram geradas com êxito e as condições definidas foram correspondentes a MOI 2 e TOI 72 horas para Em e MOI 5 e TOI 48 horas para Ed. A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade, obtendo-se rendimento médio de 6,17 mg por litro de cultivo. As proteínas recombinantes obtidas podem ser testadas como possíveis candidatas ao desenvolvimento de vacinas seguras e eficazes para proteger a população contra surtos de ZIKV.

Palavras-chave: Zika vírus. Proteína E. Proteína recombinante. Baculovírus.

1. INTRODUÇÃO

O vírus da Zika (ZIKV) foi isolado pela primeira vez em um primata não humano em 1947 (MUSSO; DIDIER; GUBLERB, 2016) permanecendo por quase 60 anos causando casos esporádicos na África e Ásia (MUSSO; DIDIER; GUBLERB, 2016) até ocorrência de um surto em 2007 na ilha do Pacífico Ocidental de Estados Federados da Micronésia (DUFFY et al, 2009). Em 2013-14 houve nova epidemia na Polinésia Francesa (CAO-LORMEAU *et al.*, 2014) que destacou-se pelo aumento

¹ Ensino superior completo, Universidade Católica do Salvador (UCSAL), nannda_lessa@hotmail.com.

² Doutorado, Universidade Católica do Salvador (UCSAL), luana.gois@pro.ucsal.br.

simultâneo de casos de Guillain-Barré (CAO-LORMEAU *et al.*, 2016). A infecção pelo ZIKV atraiu atenção, especialmente em 2015, após sua introdução no Brasil que culminou na maior epidemia mundial registrada até o momento, disseminando rapidamente por outros países da América do Sul e Central e Caribe, alcançando os Estados Unidos (CULJAT *et al.*, 2016). Segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde, em 2016, foram registrados 215.319 casos prováveis de infecção pelo ZIKV no Brasil, dos quais cerca de 60% foram confirmados, sendo a taxa de incidência de 105,3 casos/100 mil habitantes (SVS/MS, 2017). No mesmo período, houve um aumento de aproximadamente 20% dos casos de microcefalia em recém-nascidos na região Nordeste do país, o que foi observado concomitantemente em outros países. Sendo assim, em 2016, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a situação envolvendo o ZIKV como uma Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (ESPII) (VENTURA, 2016).

O ZIKV é um agente patogênico do gênero *Flavivirus* e família *Flaviviridae* mesma família de outros vírus importantes para a saúde pública, incluindo vírus da febre amarela (YFV) e vírus da dengue (DENV). O ZIKV possui genoma semelhante aos demais *Flavivirus*, sendo composto por um RNA fita simples sentido positivo, precursor de uma poliproteína cuja estrutura pode ser segmentada em três genes estruturais, capsídeo (C), precursores de membrana (prM), e de envelope (E), e sete genes não estruturais, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (MUSSO; DIDIER; GUBLERB, 2016; WEAVER *et al.*, 2016; SHAN *et al.*, 2016; SHAN *et al.*, 2017).

A proteína E consiste em quatro domínios conhecidos como: domínio transmembranar do caule, responsável por ancorar a proteína na membrana, e os domínios I, II e III que correspondem ao domínio terminal (DI), um domínio de dimerização (DII) e um domínio semelhante a Ig de carboxi-terminal (DIII) (KOSTYUCHENKO *et al.*, 2016; SIROHI *et al.*, 2016). O DI está relacionado a organização estrutural do envelope, enquanto DII e DIII estão envolvidos com interação dos monômeros e à ligação ao receptor e fusão, respectivamente (BRESSANELLI *et al.*, 2004; YE *et al.*, 2016). Regiões finais específicas do DII interagem com o endossomo e sua ligação com DI é fundamental para ativar o mecanismo de fusão do vírus com a célula. Já o complexo DI e DIII forma a estrutura rígida em dobradiça quando em pH neutro (REY *et al.*, 1995). Pesquisas quanto a

funcionalidade dessas estruturas virais, bem como mapeamento de epítomos presentes na forma homodimérica, apontam que esses três domínios são antigênicos e reconhecidos por anticorpos neutralizantes específicos, capazes de intervir no processo de entrada do vírus na célula saudável do indivíduo infectado (KOSTYUCHENKO *et al.*, 2016). Portando a forma dimérica da proteína pode ser útil para o desenvolvimento de vacinas e métodos diagnósticos. Atualmente, não há medicamentos antivirais contra o ZIKV ou vacinas para a prevenção de epidemias. O desenvolvimento destas vacinas é o foco dos centros de pesquisa, principalmente devido aos resultados satisfatórios da produção de vacinas para outros Flavivírus, como a vacina contra o YFV (ASIF *et al.*, 2017) e mais recentemente o DENV (GUTIÉRREZ-ROBLEDO *et al.*, 2017). Deste modo, a proteína E poderia ser uma excelente candidata para a composição destas vacinas.

A tecnologia para produzir proteína recombinante progrediu devido à revolução das ferramentas de produção através de sistemas biológicos. Logo, o interesse industrial pelo uso de microrganismos com rapidez e simplicidade de multiplicação, facilidade manipulação genética e economia de produção ganhou impulso em detrimento do uso de plantas e animais para este fim bom como em outras áreas. Atualmente existem inúmeros de sistemas que podem ser utilizados e sua escolha é determinada por vários fatores que melhor atendam a demanda e os interesses de produção (MAKRIDES, 1996).

Os Baculovírus (família: Baculoviridae) são vírus de DNA que infetam insetos, muito conhecidos devido ao seu potencial e a versatilidade de aplicações biotecnológicas, podendo ser utilizado, por exemplo, no controle biológico de pragas agrícolas (HAASE; SCIOCCO-CAP; ROMANOWSK, 2015), vetores para a transdução em células de mamíferos e vetores para expressão de proteínas heterólogas (CLEM; PASSARELLI, 2013).

Visando avaliar os efeitos imunológicos desencadeados pela exposição da proteína E em pacientes infectados com o ZIKV, no presente trabalho, foram propostas a produção e purificação proteína do envelope recombinante do ZIKV nas formas de monômero e dímero, através do sistema de expressão em Baculovírus-célula de inseto (BEVS).

2. DESENVOLVIMENTO E APRESENTAÇÃO DE RESULTADOS

2.1 Material e Métodos

A pesquisa consistiu em um estudo analítico, no qual foi avaliada a produção *in vitro* da proteína do envelope recombinante do vírus da Zika pelo sistema de expressão baseado em Baculovírus, conforme descrito no manual *Bac-to-Bac Baculovirus Expression Systems* (INVITROGEN, 2015).

2.1.1 Produção da proteína E recombinante

Os segmentos de DNA foram definidos com base em trabalhos anteriormente publicados que mostraram que a secreção da proteína E de Flavivírus depende da expressão da prM. Assim, foram elaboradas construções de DNA com sequências codificantes das proteínas prM e E de isolados virais circulantes no Brasil obtidas no Genbank. Para ambas as proteínas foram elaboradas construções contendo peptídeo sinal e cauda de histidina nas extremidades amina e carboxila, respectivamente, através de modelagem molecular. Os códons foram otimizados pela GenScript (Piscataway, EUA) para garantir a expressão em células de inseto. Adicionalmente, o DNA codificante da proteína E foi sintetizado com duas mutações para favorecer a produção da proteína na forma de dímero.

Os segmentos de DNA foram clonados no plasmídeo pFastBac dual (Invitrogen, EUA) visto que este comporta sítios de reconhecimento para os dois insertos de interesse. A clonagem gerou as construções pFastBac dual-prM-Em, para produção do monômero, e pFastBac dual-prM-Ed, para produção do dímero. A presença destes insertos foi avaliada através de digestão com enzimas de restrição Sall e NotI (Thermo Fisher Scientific, EUA) e eletroforese em gel de agarose a 0,5%. A transposição dos insertos (prM-Em e prM-Ed) das construções plasmidiais pFastBac dual-prM-Em e pFastBac dual-prM-Ed para o cromossoma artificial do baculovírus AcMNPV (*Autographa californica*) foi realizada pela transformação de *Escherichia coli* (*E. coli*) da linhagem DH10AcBac Δ CC para aquisição dos clones

DH10AcBac Δ CC-ZikvEmBacZikvprMBac e DH10AcBac Δ CC-ZikvEdBacZikvprMBac, respectivamente.

Para a produção da proteína recombinante, o cromossoma artificial do baculovírus com o inserto prM-Em e prM-Ed foi purificado a partir de *E. coli* DH10AcBac Δ CC para transfectar células de inseto da linhagem Sf9, usando-se lipofectamina conforme recomendações do fabricante (Invitrogen, EUA), sendo obtidos os bacmídeos recombinantes Bac- Δ CC-ZikVEm e Bac- Δ CC-ZikVEd. Em seguida, o estoque viral (P1) foi titulado, pelo método da diluição limitante, descrito previamente (O'REILLY *et al.*, 1994), amplificado (P2) e titulado novamente a fim de obter maior diluição do estoque viral.

Os ensaios de otimização da expressão da proteína presente nos estoques virais dos bacmídeos Bac- Δ CC-ZikVEm e Bac- Δ CC-ZikVEd foram realizados em células High-Five (células BTI-TN-5B1-4) em meio Express-Five completo com diferente multiplicidade, (MOI) (2, 5 e 10), e tempo de infecção, (TOI) (24, 48 e 72 horas). Os sobrenadantes e os sedimentos foram coletados para a padronização das melhores condições da expressão das proteínas recombinantes (MOI e TOI). A presença da proteína recombinante na forma de monômero ou dímero foi confirmada por Dot-blot no sobrenadante, utilizando o anticorpo anti-his C-terminal (Invitrogen, EUA) e como anticorpo secundário anti-Ig mouse-fosfatase alcalina (Invitrogen, EUA), e SDS-Page no sedimento. A purificação da proteína recombinante foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel e confirmada por SDS-Page corado com azul de Coomassie.

2.2 Resultados

2.2.1 Transposição de inserto para bacmídeo

A transposição dos inserto advindo do plasmídeo carreador, pFastBac Dual, contendo os genes de interesse prM-Em e prM-Ed para o cromossoma artificial do Baculovírus ocorreu por transformação de bactérias *E. Coli* DH10Bac Δ CC quimicamente competentes. Como controle negativo foi utilizada uma amostra de bacmídeo obtido pela transformação de *E. Coli* com o plasmídeo pFastBac1 vazio.

Colônias cuja transposição dos insertos para o bacmídeo foi eficiente tem coloração branca devido a inativação do gene lacZ que codifica a produção da enzima β -galactosidase promovida pela inserção do DNA estranho no sítio de clonagem. Colônias azuis representam clones cujo processo de transposição não ocorreu, visto que, sem o inserto, este gene continua ativo.

2.2.2 Extração dos bacmídeos

Para avaliar se a purificação dos bacmídeos recombinantes ocorreu de forma positiva foi feita uma corrida em gel de agarose a 0,5% e a PCR (Figura 1). Na imagem do gel é possível observar as bandas, sem degradação, correspondentes ao tamanho das amostras de interesse de acordo com peso molecular padrão (Figura 1A). O resultado da PCR (Figura 1B) foi, igualmente, analisado por eletroforese por gel de agarose a 0,5%. As bandas obtidas foram encontradas na faixa de 4.700 pb que corresponde ao esperado dos elementos da construção dos bacmídeos.

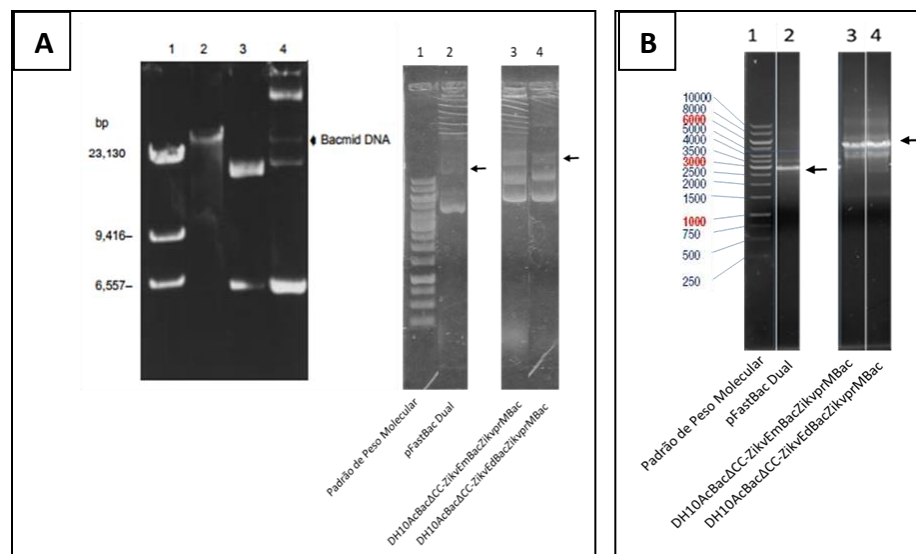


Figura 1. Análise dos bacmídeos por eletroforese em gel de agarose a 0,5%. (A) I. Imagem do gel de agarose da purificação dos bacmídeos recombinantes utilizada como referência. Fonte: Manual Bacto-Bac). II. Imagem do gel de agarose preparado para confirmar a extração dos bcmídeos DH10AcBac Δ CC-ZikvEdBacZikvprMBac (II2) e DH10AcBac Δ CC-ZikvEmBacZikvprMBac (II3). A seta indica a banda cujo peso molecular é correspondente aos bacmídeos recombinantes, contendo as construções gênicas de interesse. (B) Produto da reação de PCR. Imagem do gel de agarose da PCR realizada para confirmar a transposição dos insertos prM-Em e prM-Ed para o bacmídeo onde encontrou-se uma banda na faixa de 4.700 pares de base (seta, na raia 2 é o controle negativo), uma banda correspondente ao peso do bacmídeo vazio (sem insertos) e nas raias 3 (DH10AcBac Δ CC-ZikvEmBacZikvprMBac) e 4 (DH10AcBac Δ CC-ZikvEdBacZikvprMBac) estão

indicadas bandas de mesmo tamanho em que pode-se afirmar serem correspondentes aos bacmídeos com os insetos. Fonte: Acervo da autora (2017)

2.2.3 Transfecção em células Sf9

Após confirmar a presença dos insetos, foi realizado um ensaio de transfecção de células da linhagem Sf9 com os bacmídeos recombinantes produzidos, Bac- Δ CCZikVEm e Bac- Δ CC-ZikVEd. Pelas imagens obtidas dos controles positivo e negativo, atestamos que a transfecção foi bem-sucedida, visto que, no controle negativo não foram identificados sinais de infecção (Figura 2A) enquanto que no controle positivo (Figura 2B) observa-se a expressão da proteína e GFP.

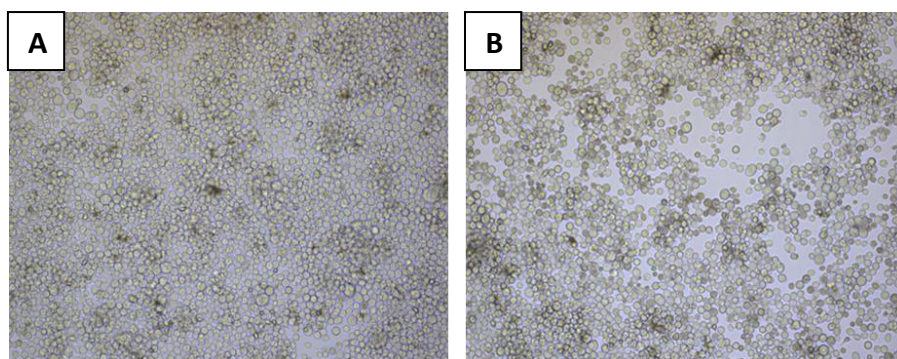


Figura 2. Transfecção em células SF-9. (A) Controle negativo. Transfecção com bacmídeo pFastBac Dual em que não há sinal de infecção. (B) Controle positivo. Transfecção com bacmídeo que expressa GFP em que é possível observar sinais citopatológicos de infecção, como formação de aro perinuclear, arredondamento e aumento do tamanho da célula em comparação com a célula não infectada e parada de crescimento celular. Imagens obtidas em campo claro. Fonte: Acervo da autora (2018).

2.2.4 Titulação e amplificação dos estoques virais

Posteriormente à transfecção das células Sf9 com os bacmídeos recombinantes Bac- Δ CC-ZikVEm e Bac- Δ CC-ZikVEd, foi realizada a titulação do estoque viral P1. A partir do resultado da titulação viral do P1 e P2, constatamos que a transfecção com Bac- Δ CC-ZikVEm foi bem-sucedida, pois o título encontrado foi de 1×10^7 e $3,85 \times 10^8$ pfu/mL, respectivamente. Com relação ao título do P1 obtido na amostra da transfecção com Bac- Δ CC-ZikVEd obteve-se títulos baixos. Sendo

assim, o sobrenadante do estoque viral de P1 foi amplificado para gerar estoque viral P2, e deste o P3, cujo título obtido foi satisfatório (Tabela 1).

	P1 (pfu/mL)	Volume (mL)	P2 (pfu/mL)	Volume (mL)	P3 (pfu/mL)	Volume (mL)
Bac-ΔCC-ZikVEm	1×10^7	1,8	$3,85 \times 10^8$	46	NR	NR
Bac-ΔCC-ZikVEd	$4,85 \times 10^4$	1,5	$6,9 \times 10^7$	2,8	$1,04 \times 10^8$	100

Tabela 1. Titulação dos estoques virais das construções Bac-ΔCC-ZikVEm e Bac-ΔCC-ZikVEd. NR: Não realizado

2.2.5 Produção da proteína

Com relação a construção para produção da proteína Em (Bac-ΔCC-ZikVEm), foi possível observar no dot blot que não houve sinais expressivos de produção da proteína no sobrenadante das células infectadas (Figura 3.1A). No SDS-Page foi observada uma banda presente nas raias contendo a amostras teste que não é encontrada nas raias contendo os controles negativos, e que possui peso molecular de aproximadamente 45 kDa, equivalente ao peso esperado da proteína (Figura 3.1B). As condições determinadas para a produção da proteína Em foram MOI 2 e TOI 72h.

Sobre a construção para produção da proteína Ed (BacΔCC-ZikVEd), houve detecção no dot blot. Não foram observadas diferenças significativas entre os sinais correspondentes aos MOI 2, 5 e 10 nos TOI de 48h e 72h (Figura 3.2A), assim como no SDS-Page (Figura 3.2B). Portanto, a condição escolhida para produção foi a intermediária, MOI (MOI 5) e TOI (TOI 48h).

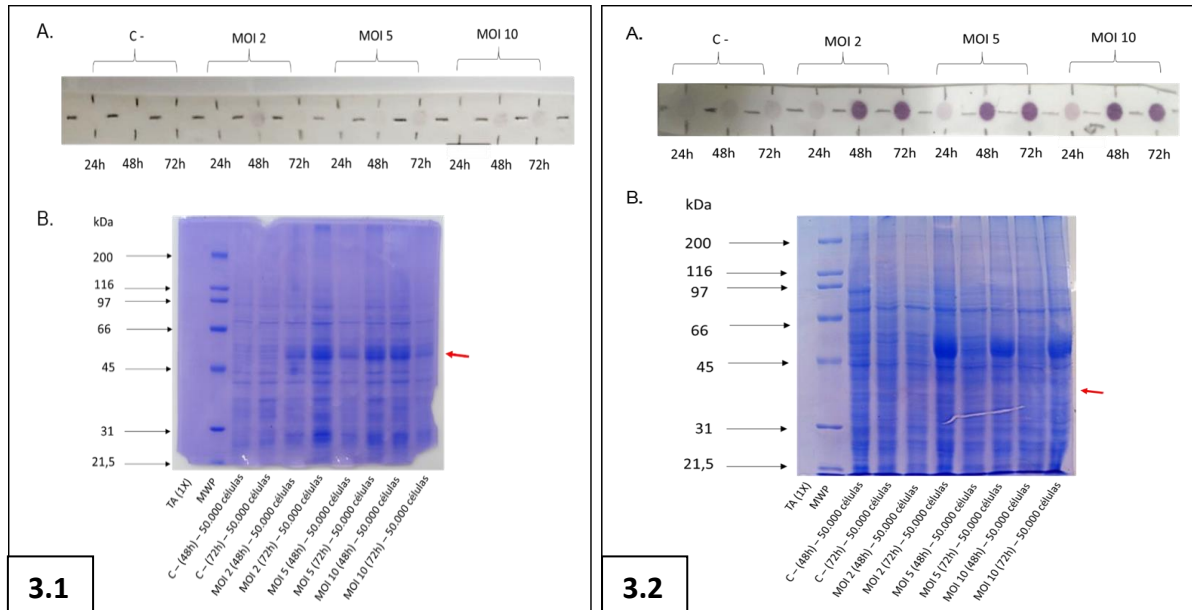


Figura 3. Ensaio de otimização da expressão de Em em células High-five infectadas pelo baculovírus recombinante BA-Δ-CC-ZIKVEm (3.1) e BA-Δ-CC-ZIKVEd (3.2). (3.1A) Os sobrenadantes de cultura de células High-five infectadas com baculovírus AcBacΔCC-pFastBac1 (controle negativo) com MOI 10 e BA-Δ-CC-ZIKVEm com MOI 2, 5 ou 10 no tempo de infecção de 24, 48 ou 72 h foram avaliados na membrana de nitrocelulose por dot blot. A membrana foi incubada com anticorpo anti-histidina na região c-terminal, conjugado a fosfatase alcalina e revelada com substrato da peroxidase. A revelação expressa sinais da proteína o sobrenadante. (3.2B) SDS-Page realizado por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% com as amostras de sedimento de células High-five, obtidas a partir dos ensaios de otimização. A presença de uma banda acima de 45 kDa, apresentada pela seta, indica que há presença da proteína recombinante na forma monomérica retida nas células. (3.2A) Os sobrenadantes de cultura de células High-five infectadas com baculovírus AcBacΔCC-pFastBac1 (controle negativo) com MOI 10 e BA-Δ-CC-ZIKVEd com MOI 2, 5 ou 10 no tempo de infecção de 24, 48 ou 72 h foram avaliados na membrana de nitrocelulose por dot blot. A membrana foi incubada com anticorpo anti-histidina na região c-terminal, conjugado a fosfatase alcalina e revelada com substrato da peroxidase. A revelação expressa que há sinais de proteína o sobrenadante. (3.2B) SDS-Page realizado por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% com as amostras de sedimento de células High-five, obtidas a partir dos ensaios de otimização. A presença de uma banda acima de 45 kDa, apresentada pela seta, indica que também há presença da proteína recombinante na forma dimérica retida nas células. Fonte: Acervo da autora (2018)

2.2.6 Purificação da proteína

Para a produção da proteína recombinante Ed, células High-five cultivadas em suspensão foram inoculadas com partículas virais no MOI 5 e por 48h e, em

seguida, o sobrenadante, produto deste processo, foi submetido a diálise contra PBS. A proteína recombinante de interesse, presente no sobrenadante dialisado, foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna Sepharose-níquel. A avaliação das frações obtidas após eluir a proteína da coluna, realizada por SDS-PAGE e gel corado por azul de Coomassie, mostrou uma banda com peso molecular de aproximadamente 45 kDa, correspondente ao tamanho da proteína. A fração representada no gel foi dialisada contra PBS e quantificada pelo método do BCA, estimando-se assim um rendimento de 2,8 mg de proteína Ed do ZIKV recombinante para cada litro de cultura de células High-five infectadas com o baculovírus Bac-Delta-CC-ZIKVEd.

2.3 Discussão

Os resultados demonstraram que o sistema Baculovírus-Célula de Inseto permitiu a produção da proteína E recombinante do vírus da Zika na forma monomérica e dimérica. A proteína Ed foi produzida e purificada com sucesso a partir de células de inseto infectadas com o baculovírus recombinante, enquanto que Em está em processo de produção.

Dadas as inovações da biotecnologia, existe uma gama de sistemas de expressão heteróloga de proteínas recombinantes, seja de origem procariota ou eucariota (DEMAIN; VAISHNAV, 2009; ROSANO; CECCARELLI, 2014), o qual a escolha depende diretamente de inúmeros fatores, como localização celular para expressão do produto (intra ou extracelular), solubilidade e qualidade da proteína, condições nutricionais e técnicas para manter o sistema de expressão, modificação pós-traducional e custo (MAKRIDES, 1996).

A expressão da proteína E de *Flavivirus* já foi estudada por Liang e colaboradores (2018) utilizando o método de produção em bactérias *E. coli*. De acordo com Terpe (2006), tal bactéria é, dentre as diversas opções de expressão procarionte disponíveis, a mais utilizada na produção de proteínas recombinantes, pois permite a produção de alta quantidade de proteínas com elevado grau de pureza e solubilidade. Além disso, outras vantagens apresentadas pela *E. coli* a fazem ser eleita como hospedeira heteróloga, como o fato de sua caracterização

genética e bioquímica ser bem conhecida, facilitando a possibilidade de manipulação experimental (DEMAIN; VAISHNAV, 2009). Contudo, este sistema compreende um conjunto de complicações que podem gerar uma produção limitada das proteínas de interesse, como não possibilitar que ocorram modificações pós-traducionais, necessárias para a correta conformação e funcionalidade de algumas proteínas (YIN et al, 2007), desajuste na utilização de códons das sequências que as codificam. Destaca-se também a possível alteração de funções inerentes ao hospedeiro de expressão interferem na proliferação e homeostasia de *E. coli*, acarretando diminuição da taxa de crescimento/densidade e/ou lise celular (DOHERTY et al., 1993; DONG et al., 1995; ROSANO; CECCARELLI, 2014). Além disto, gera altas taxas de endotoxinas de LPS, que contaminam a proteína, e é preciso adicionar um detergente à coluna de purificação (MAGALHÃES, 2007).

Contrapondo esses fatores, o método escolhido para a expressão da proteína E na forma secretada foi o Sistema Baculovírus-célula de Inseto. Baculovírus são vírus pertencentes a família *Baculoviridae* que tem ótima propagação em células de inseto, especialmente de lagartas *Spodoptera frugiperda* (Sf-9) e mariposas *Trichoplusia ni* (High-Five) (DE CASTRO et al., 1999; KOST; CONDREAY; JARVIS, 2005; ROHRMANN, 2013). Um dos componentes genômicos do Baculovírus é o gene da poliedrina, que é expresso na fase tardia do processo de infecção pelo vírus selvagem em células de inseto. O método Baculovírus-células de inseto desenvolvido em laboratório, consiste, então, em utilizar o promotor da poliedrina (polh) para codificar o gene de interesse que foi inserido no lugar do gene da poliedrina, propriamente dito, e assim desencadear a produção da proteína recombinante (MILLER et al., 1983).

Para Barros (2007), os Baculovírus apresentam uma gama de utilidades em estudos voltados para a saúde dos seres humanos, pois, apesar de serem vírus provenientes de insetos, apresentam ínfimos riscos biológicos em virtude da sua incapacidade replicação em células de mamíferos. Com isso é possível obter um vetor de fácil manuseio, com elevada especificidade, segurança e com titulações satisfatórias.

Nesse trabalho, o plasmídeo carreador, contendo as construções de DNA que codificam prM-Em e prM-Ed foi usado para transformar *E. coli* da cepa

DH10Bac Δ CC o qual a transposição dos segmentos de DNA de interesse para cromossoma artificial do baculovírus ocorreu com sucesso, baseado na observação de colônias brancas de *E. coli* em comparação às colônias azuis não transformadas. Outros resultados significativos são do gel de agarose realizado após a mini-prep dos bacmídeo e o produto da PCR realizada com uma amostra do bacmídeo purificado de uma das colônias brancas. Foi possível observar a presença de bandas de DNA com ~4.700 pares de base, compatíveis com o esperado da transposição.

O bacmídeo recombinante obtido foi utilizado para transfectar células de inseto para produção de estoques de Baculovírus e amplificação viral mostrou-se bastante eficaz, dado que foi possível produzir, a partir de 1,8 mL de baculovírus gerados após transfecção (P1), com título TCID₅₀ de 1×10^7 pfu/mL, 46 mL de um estoque viral amplificado (P2) com $3,85 \times 10^8$ pfu/mL para Em e a partir de 1,5 mL de P2 com título TCID₅₀ de $6,9 \times 10^7$ pfu/mL foi possível produzir 100 mL de um estoque viral amplificado, denominado P3, com $1,04 \times 10^8$ pfu/mL para Ed.

Além das construções para expressão de ambas as proteínas conterem uma sequência líder, o cromossoma artificial do baculovírus da cepa de *E. coli* utilizada é desprovido dos genes da quitinase (chi) e catepsina (cath), para, em princípio, favorecer a secreção de proteínas em células de inseto e contribuir para a integridade da proteína produzida. No entanto, a análise do Dot Blot realizado com amostras do ensaio de otimização para Em não revelou expressão da proteína no sobrenadante e por isso foi avaliado por SDS-Page 10%, utilizando tampão de lise, que a mesma encontrava-se retida nas células. O passo seguinte foi verificar se a proteína estava na fração insolúvel do extrato celular ou na fração solúvel através do teste de solubilidade. Neste ensaio foi possível obter a proteína solúvel somente quando o lisado celular era tratado com tampão PBS 1x contendo uréia 8M, comprovando assim que a proteína de interesse forma corpo de inclusão. Em relação a Ed, o Dot Blot foi favorável, indicando que havia expressão da proteína no sobrenadante das amostras do ensaio de otimização, mas, ainda assim, a avaliação por SDS-Page 10% também demonstrou que uma parcela estava sendo retida nas células.

Visando facilitar o processo de purificação por cromatografia de afinidade, as proteínas foram produzidas com uma cauda contendo 6 histidinas (his) na extremidade carboxila, pois esta possui afinidade pelo níquel da coluna de purificação, garantindo que apenas as proteínas de interesse serão retidas. Apenas o sobrenadante de cultura de células High-five infectadas com baculovirus recombinante Bac- Δ -CC-ZikVEd foi submetido a purificação. Depois de dialisado contra PBS e submetido a purificação por cromatografia de afinidade, a avaliação por SDS-PAGE em gel a 10% revelou bandas de proteína com peso molecular de ~45 kDa, conforme esperado.

A Zika é uma doença infecciosa altamente relevante, pois seu agente patogênico demonstrou capacidade de originar surtos de grandes proporções, principalmente regiões tropicais cujo clima é favorável para a reprodução do seu principal vetor, o mosquito *Aedes aegypti*, além de estar associada a complicações neurológicas graves, como a síndrome congênita da ZIKV e à GBS (CAO-LORMEAU *et al.*, 2016). Mesmo com o investimento em estudos para compreender o mecanismo deste vírus ao interagir com o hospedeiro, pouco se sabe a respeito. Portanto, pesquisas que visem aprofundar as descobertas sobre o ZIKV e que viabilizem a elaboração de testes diagnósticos e medidas de prevenção, como vacinas, são necessárias. Como forma de responder a estas questões, a produção de proteínas recombinantes virais permite o desenvolvimento de estudos que busquem a produção de anticorpos específicos para profilaxia e testes diagnósticos.

A glicoproteína E do ZIKV é a principal proteína de superfície dos flavivírus, pois permite a fusão do invólucro viral com a membrana endossomal, liberando a nucleocápside no citoplasma (Perera *et al.*, 2008; Lindenbach *et al.*, 2013). Devido a sua característica antigênica induz a produção de anticorpos neutralizantes tendo um papel importante na proteção contra o patógeno (Heinz e Stiasny, 2012). Além disso, estudos recentes, através do mapeamento de epitopos em modelos de camundongos, sugerem que a proteína E estimula respostas de células T e B, reforçando a importância da proteína E para o desenvolvimento da vacina Zika (Ngono *et al.*, 2017; Pardy *et al.*, 2017).

3. CONCLUSÃO OU CONSIDERAÇÕES FINAIS

As proteínas recombinantes Em e Ed do vírus da Zika foram expressas no sistema baculovírus célula de inseto, a partir do vetor de expressão pFastBac Dual – ZikV –prM – ZikV-Em e pFastBac Dual – ZikV –prM – ZikV-Ed, demonstrando que este é um processo seguro, eficiente e promissor. A proteína de interesse Ed foi purificada com êxito por cromatografia de afinidade com Sepharse-níquel, na medida que Em será purificada sob condições desnaturantes, pois está presente na fração insolúvel do lisado celular. A produção desta proteína recombinante poderá ser aplicada no desenvolvimento de vacina, estratégias terapêuticas e teste de imunodiagnóstico. Pode ainda contribuir para estabelecer o papel dos anticorpos anti-proteína E na proteção e/ou desenvolvimento das doenças e complicações causadas pelo ZIKV.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Fundação Oswaldo Cruz- Bahia (FIOCRUZ), pela estrutura que possibilitou o desenvolvimento deste estudo, em especial ao Laboratório de Patologia Estrutural e Molecular (LAPEM). Também ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) pela concessão da bolsa.

REFERÊNCIAS

- ASIF, A. et al. Zika Virus: Immune Evasion Mechanisms, Currently Available Therapeutic Regimens, and Vaccines. *Viral immunology*, v. 30, n. 10, p. 682-90, Dez. 2017.
- BARROS, M. C. E. S. Expressão de proteínas do vírus da dengue em células de inseto utilizando o sistema Baculovírus de expressão. Dissertação (Mestrado). Departamento de Pós-Graduação em Patologia molecular. Faculdade de Medicina - Universidade de Brasília, DF. 2007.
- BRESSANELLI, S. et al. Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. *EMBO Journal*, v. 23, n. 4, p. 728–738, Fev. 2004.
- CAO-LORMEAU, V. M. et al. Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerging infectious diseases*, v. 20, n. 6, p. 1085-86, Jun. 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, n. 10027, p. 1531–1539, Abr. 2016.
- CLEM, R. J.; PASSARELLI, A. L. Baculoviruses: Sophisticated Pathogens of Insects. *PLoS Pathogens*, v. 9, n. 11, p. 11–14, Nov. 2013.

- CULJAT, M. et al. Clinical and Imaging Findings in an Infant with Zika Embryopathy. *Clinical Infectious Diseases*, v. 63, n. 6, p. 805–811, Set. 2016.
- DE CASTRO, M. E. B. et al. Biologia molecular de baculovírus e seu uso no controle biológico de pragas no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 34, n. 10, p. 1733–1761, Out. 1999.
- DEMAIN, A. L. ; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, v. 27, n 3, p. 297-306, Mai–Jun. 2009.
- DOHERTY, A. J.; CONNOLLY B. A.; WORRALL, A. F. Overproduction of the toxic protein, bovine pancreatic DNaseI, in *Escherichia coli* using a tightly controlled T7promoterbased vector. *Gene*, v. 136, n. 1-2, p. 337-340, Dez. 1993.
- DONG, H.; NILSSON, L.; KURLAND, C. G. Gratuitous overexpression of genes in *Escherichia coli* leads to growth inhibition and ribosome destruction. *Journal of Bacteriology*, v. 177, n. 6, p. 1497–1504, Mar. 1995.
- DUFFY, M. et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *New England Journal of Medicine*, v. 360, n. 24, p. 2536–43, Jun. 2009.
- ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control. Rapid risk assessment: Zika virus epidemic in the Americas: potential association with microcephaly and Guillain-Barré syndrome. 10 December 2015.
- GUTIÉRREZ-ROBLEDO, L. M. et al. Resultados del primer consenso mexicano de vacunación en el adulto. *Gaceta Medica de Mexico*, v. 153, n. 2, p. 190–204, 2017. HAASE, S.; SCIOCCO-CAP, A.; ROMANOWSKI, V. Baculovirus insecticides in Latin America: historical overview, current status and future perspectives. *Viruses*, v. 7, p. 22302267, Abr. 2015.
- HEINZ, F. X.; STIASNY, K. Flaviviruses and their antigenic structure. *Journal of Clinical Virology*, v. 55, n. 4, p. 289-295, Dez. 2012,
- INVITROGEN. Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System. Life Technologies Corporation. 2015
- KOST, T. A.; CONDREAY, J. P.; JARVIS, D. L. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature Biotechnology*, v. 23, n. 5, p. 567–575, Mai. 2005.
- KOSTYUCHENKO, V. A. et al. Structure of the thermally stable Zika virus. *Nature*, v. 533, n. 7603, p. 425–428, Mai. 2016.
- LIANG, H. et al. Recombinant Zika virus envelope protein elicited protective immunity against Zika virus in immunocompetent mice. *PLoS ONE*, Mar, 2018.
- LINDENBACH B.D.; MURRAY C.L.; THIEL H.J.; RICE C.M. Flaviviridae. In: Knipe D.M., Howley P.M., ed. *Fields Virology*, 6th. v. 1, p. 712–746. Lippincott William & Wilkins; Philadelphia: 2013.
- MAKRIDES, S. C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.*, v. 60, n. 3, p. 512–38, Set. 1996.
- METZ, S.W. In Vitro Assembly and Stabilization of Dengue and Zika Virus Envelope Protein Homo-Dimers. *Sci. Rep.* v. 7, n. 1, Jul, 2017.
- MILLER, L. K. et al. A temperature sensitive mutant of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus defective in an early function required for further gene expression. *Virology*, v. 126, n. 1, p. 376-80, Abr. 1983.

- MLAKAR, J. et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. *New England Journal of Medicine*, v. 374, n. 10, p. 951–958, Mar. 2016.
- MUSSO, DIDIER; GUBLER, D. J. Zika Virus. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 29, n. 3, p. 487–524, Jul. 2016.
- Ngono A, Vizcarra EA, Tang WW, Sheets N, Joo Y, Kim K, et al. Mapping and Role of the CD8+ T Cell Response During Primary Zika Virus Infection in Mice. *Cell Host Microbe*, v. 21, n. 1, p. 35–46, Jan. 2017.
- O'REILLY, D. R.; MILLER, L. K.; LUCKOW, V. A. *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*, New York: Oxford University Press. 1994.
- PARDY, R. D. et al. Analysis of the T Cell Response to Zika Virus and Identification of a Novel CD8+ T Cell Epitope in Immunocompetent Mice. *PLoS Pathogens*, v. 13, n. 2. Fev. 2017.
- PERERA, R.; KHALIQ, M.; KUHN, R. J. Closing the door on flaviviruses: entry as a target for antiviral drug design. *Antiviral Research*, v. 80, n. 1, p. 11-22, Out. 2008.
- REY, F. A. et al. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature*, v. 375, n. 6529, p. 291–298, Mai. 1995.
- ROHRMANN, G. F. *Baculovirus Molecular Biology* [Internet]. Ed. 3, cap. 1, pag. 124. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2013.
- ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front. Microbiol*, v. 5, n. 172, Apr. 2014.
- SHAN, C. et al. A single-dose live-attenuated vaccine prevents Zika virus pregnancy transmission and testis damage. *Nature Communications*, v. 8, n. 1, Set. 2017.
- SHAN, C. et al. Zika Virus: Diagnosis, Therapeutics, and Vaccine. *ACS Infectious Diseases*, v. 2, n. 3, p. 170–172, Mar. 2016.
- SIROHI, D. et al. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science*, v. 352, n. 6284, p. 467-470, Mar. 2016.
- SVS/MS – Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde. 2017. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 4, 2017. *Boletim Epidemiológico*, v. 48, n. 5. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/fevereiro/17/Monitoramentodos-casos-de-dengue--febre-de-chikungunya-e-febre-pelo-v--rus-SemanaEpidemiologica-4-2017.pdf>. Acesso em: 12 nov. 2018
- TAN, J. J. L. et al. Persistence of Zika virus in conjunctival fluid of convalescence patients. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, Set. 2017.
- TERPE, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 72, n. 2, p. 211-22, Jun. 2006.
- VENTURA, D. From Ebola to Zika: international emergencies and the securitization of global health. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 32, n. 4. Abr. 2016.
- WEAVER, S. C. et al. Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. *Antiviral Research*, v. 130, p. 69-80, Jun. 2016.
- YE, Q. et al. Genomic characterization and phylogenetic analysis of Zika virus circulating in the Americas. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 43, p. 43–49, Set. 2016.



YIN, J. t al. Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *Journal of Biotechnology*, v. 127, n. 3, p. 335-347, Jan.