

INGRID MARQUES DIAS

**EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA PROTEÍNA NÃO-ESTRUTURAL 1 (NS1)
DO ZIKA VIRUS EM *Pichia pastoris***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

D541e 2018 Dias, Ingrid Marques, 1989-
 Expressão heteróloga da proteína não-estrutural 1 (NS1) do
Zika virus em *Pichia pastoris* / Ingrid Marques Dias. – Viçosa,
MG, 2018.
 xi, 36 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Sérgio Oliveira de Paula.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 32-36.

1. Vírus da Zika. 2. Flavivírus. 3. Proteínas. 4. Leveduras.
5. Virologia. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 614.5885

INGRID MARQUES DIAS

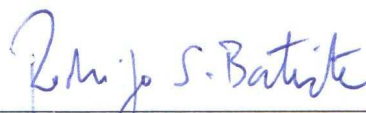
**EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA PROTEÍNA NÃO-ESTRUTURAL 1 (NS1)
DO ZIKA VIRUS EM *Pichia pastoris***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.


APROVADA: 31 de julho de 2018.



Leandro Licursi de Oliveira



Rodrigo Siqueira Batista



Abelardo Silva Junior



Sérgio Oliveira de Paula
(Orientador)

Dedico este trabalho a minha família e
meu noivo que estão presentes em
todos os momentos e me apoiam em
todas as decisões.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter iluminado meu caminho, mesmo quando este pareceu demasiadamente difícil e exaustivo. Sem Ele eu nada seria.

Aos meus pais (Aristides e Elisabete), que sempre fizeram e fazem tudo por mim, que me apoiam e auxiliam em todas as fases de minha vida, que são meu suporte, meu exemplo e que me fizeram ser quem sou hoje.

A minha irmã (Adryse), que é mais que uma irmã, é amiga, é minha gêmea linda, com quem tenho uma ligação que vai além da compreensão. Nascemos juntas, crescemos juntas e assim permaneceremos.

A meu noivo (Ricardo), que me aconselha, acalma e me faz rir nos momentos mais difíceis. Meu amigo, meu eterno namorado, obrigada por todos os momentos maravilhosos, pelo incentivo e por não me deixar desistir nunca.

Ao professor Sérgio por ter me recebido tão bem e ter me dado a oportunidade de fazer parte da equipe do laboratório.

À todos do laboratório de imunovirologia que sempre me ajudaram e tanto me ensinaram, em especial à Mariana e John que estiveram comigo desde o início me auxiliando e apoiando.

À todos os componentes da banca que aceitaram gentilmente participar deste momento tão importante.

À Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, aos professores do programa e à Universidade Federal de Viçosa, o meu muito obrigada.

À CAPES por ter financiado a pesquisa da qual fiz parte.

E a todos que contribuíram durante esta caminhada.

Muito obrigada!

BIOGRAFIA

Ingrid Marques Dias, filha de Aristides Tarcísio Dias e Elisabete Marques da Costa Dias, nasceu em Visconde do Rio Branco, Minas Gerais, no dia 18 de setembro de 1989. Iniciou a graduação em enfermagem na Universidade Federal de Viçosa-UFV/Viçosa no ano de 2011, obtendo o título de bacharela em enfermagem no ano de 2016. No segundo semestre deste mesmo ano ingressou no Programa de pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural pela Universidade Federal de Viçosa-UFV/Viçosa, nível mestrado acadêmico, submetendo-se à defesa de dissertação em 31 de Julho de 2018.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.” (Carl Jung)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Casos confirmados de microcefalia no Brasil distribuídos por estados da federação (até 20 de fevereiro de 2016) (WHO, 2016).....	2
Figura 2: Poliproteína clivada em três proteínas estruturais (PrM/M, E e C) e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) a partir do genoma do ZIKV (RASTOGI, SHARMA e SINGH, 2016).....	4
Figura 3: Vetor de clonagem pUC57. Possui gene que confere resistência ao antibiótico ampicilina, um gene que codifica a proteína NS1 do ZIKV, e os sítios de restrição para as enzimas NotI e EcoRI (Genscript™).....	9
Figura 4: Vetor de expressão pPICZαA (Invitrogen, 2010b).....	10
Figura 5: Transformação de <i>E. coli</i> competentes com pUC57_NS1ZIKV e pPICZαA..	11
Figura 6: Extração do DNA plasmidial de <i>E. coli</i> recombinantes.....	12
Figura 7: Dupla digestão dos plasmídeos pUC57_NS1ZIKV e pPICZαA com enzimas de restrição EcoRI e NotI.....	12
Figura 8: Ligaçãõ do inserto NS1ZIKV no vetor de expressão pPICZαA linearizado..	14
Figura 9: Transformação de <i>E. coli</i> competentes com o plasmídeo pPICZαA_NS1ZIKV.	14
Figura 10: Extração do DNA plasmidial de <i>E. coli</i> recombinante com pPICZαA_NS1ZIKV.....	15
Figura 11: Digestão simples do plasmídeo pPICZαA_NS1ZIKV com enzima SacI.....	16
Figura 12: Transformação de <i>P. pastoris</i> por eletroporação com o plasmídeo pPICZαA_NS1ZIKV linearizado.....	18
Figura 13: Extração do DNA genômico de <i>P. pastoris</i> KM71H recombinantes com pPICZαA_NS1ZIKV.....	19
Figura 14: Indução da expressão da proteína NS1ZIKV em <i>Pichia pastoris</i>	20
Figura 15: Digestão dupla do plasmídeo pUC57_NS1ZIKV com NotI e EcoRI. 1- digestão do pUC57_NS1ZIKV e MM- marcador molecular de 1Kb.....	23
Figura 16: Digestão dupla do plasmídeo pPICZαA com NotI e EcoRI. MM- marcador molecular de 1Kb e 1- digestão do pPICZαA.....	24
Figura 17: PCR de colônia com primer AOXs e AOXas. MM- marcador molecular 1Kb; 1- pPICZαA vazio (controle negativo) e 2-6- colônias de <i>E. coli</i> transformadas com pPICZαA_NS1ZIKV.....	24
Figura 18: Digestão dupla do plasmídeo pPICZαA_NS1ZIKV com as enzimas NotI e EcoRI. 1- digestão do pPICZαA_NS1ZIKV; MM-marcador molecular de 1Kb e MM'- marcador molecular de 100pb.....	25
Figura 19: Linearização do pPICZαA_NS1ZIKV com SacI. MM- marcador de de 100 bp e 1- pPICZαA_NS1ZIKV linear.....	25
Figura 20: PCR de DNA total da levedura <i>Pichia pastoris</i> transformada com o plasmídeo pPICZαA_NS1ZIKV. MM-Marcador molecular de 1kb. MM'-Marcador molecular de 100pb. 1- pPICZαA_NS1ZIKV (controle positivo); 2-pPICZαA vazio (controle negativo); 3-DNA genômico da levedura transformada e 4- Água.....	26
Figura 21: Western Blot em membrana de nitrocelulose da proteína NS1ZIKV expressa em <i>P. pastoris</i> . MM-Marcador molecular pré-corado. 1-Proteína NS1ZIKV.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
PAHO	Pan American Health Organization
WHO	World Health Organization
ZIKV	Zika virus

RESUMO

DIAS, Ingrid Marques, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2018. **Expressão heteróloga da proteína não-estrutural 1 (NS1) do Zika virus em *Pichia pastoris***. Orientador: Sérgio Oliveira de Paula.

O Zika virus (ZIKV) foi identificado pela primeira vez em macacos Rhesus na Uganda, em 1947. Nas Américas foram confirmados, entre 2015 e 2017, 223.336 casos de infecção pelo ZIKV. Em 1º de fevereiro de 2016, a pandemia do ZIKV foi declarada uma Emergência em Saúde Pública de Preocupação Internacional. O ZIKV contém um genoma de RNA que dá origem a uma poliproteína clivada em três proteínas estruturais (PrM/M, E e C) e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5). A proteína NS1 de flavivírus é uma glicoproteína altamente conservada cujo peso molecular varia de 46 a 55 kDa a depender da extensão de sua glicosilação. A mesma participa do ciclo replicativo viral e realiza funções imunomoduladoras interagindo com proteínas do sistema complemento e desencadeando altas concentrações de Imunoglobulina G (IgG) durante infecções primárias e secundárias. Sendo assim, desempenha papel crucial na resposta imune do hospedeiro, e tem sido utilizada em diversos estudos como marcador diagnóstico precoce para detecção de infecções por flavivírus. Portanto, este trabalho objetivou expressar de maneira heteróloga a proteína não-estrutural 1 (NS1) do ZIKV em *Pichia pastoris*, com fins diagnósticos. Para a transformação das leveduras *P. pastoris* KM71H foi utilizado um plasmídeo recombinante, o pPICZ α A_NS1ZIKV. As leveduras transformadas por eletroporação foram crescidas em meio adequado para a indução da expressão proteica. Como resultado obteve-se que o gene otimizado da proteína NS1 foi integrado ao vetor de expressão pPICZ α A, produzindo o plasmídeo recombinante pPICZ α A_NS1ZIKV que foi introduzido na levedura *Pichia pastoris* KM71H. A expressão da proteína NS1 pela levedura foi confirmada por meio de Western Blot, o que nos permite concluir que a transformação com o vetor pPICZ α A_NS1ZIKV ocorreu de maneira satisfatória. Portanto, os resultados deste trabalho nos mostram a eficiência do sistema de expressão heteróloga da proteína NS1 do ZIKV em *Pichia pastoris* e como a engenharia genética pode ser empregada para beneficiar diversos ramos da ciência.

ABSTRACT

DIAS, Ingrid Marques, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2018. **Heterologous expression of the non-structural protein 1 (NS1) of Zika virus in *Pichia pastoris***. Adviser: Sérgio Oliveira de Paula.

The Zika virus (ZIKV) was first identified in Rhesus macaques in Uganda in 1947. In the Americas, between 2015 and 2017, 223,336 cases of ZIKV infection were confirmed. On February 1, 2016, the ZIKV pandemic was declared an International Public Health Emergency of Concern. The ZIKV contains an RNA genome that gives rise to a polyprotein cleaved in three structural proteins (PrM / M, E and C) and seven non-structural proteins (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b and NS5). The flavivirus NS1 protein is a highly conserved glycoprotein whose molecular weight ranges from 46 to 55 kDa depending on the extent of its glycosylation. It participates in the viral replicative cycle and performs immunomodulatory functions interacting with proteins of the complement system and triggering high concentrations of immunoglobulin G (IgG) during primary and secondary infections. Thus, it plays a crucial role in the immune response of the host, and has been used in several studies as an early diagnostic marker for the detection of flavivirus infections. Therefore, this work aimed to express in a heterologous way the non-structural protein 1 (NS1) of ZIKV in *Pichia pastoris*, with diagnostic purposes. A recombinant plasmid, pPICZ α A_NS1ZIKV, was used for the transformation of *P. pastoris* yeasts KM71H. The yeasts transformed by electroporation were grown in a suitable medium for the induction of protein expression. As a result it was obtained that the optimized NS1 protein gene was integrated into the pPICZ α A expression vector, producing the recombinant plasmid pPICZ α A_NS1ZIKV which was introduced into the *Pichia pastoris* yeast KM71H. Expression of the NS1 protein by yeast was confirmed by means of Western Blot, which allows us to conclude that the transformation with the vector pPICZ α A_NS1ZIKV occurred satisfactorily. Therefore, the results of this work show the efficiency of the heterologous expression system of the ZIKV NS1 protein in *Pichia pastoris* and how genetic engineering can be used to benefit various branches of science.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVO.....	7
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	8
3.1	Preparação de bactérias <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) competentes.....	8
3.2	Clonagem do gene NS1ZIKV no vetor de clonagem pUC57.....	8
3.3	Clonagem do gene NS1ZIKV no vetor de expressão pPICZ α A.....	9
3.4	Transformação de <i>E. coli</i> competentes com pUC57_NS1ZIKV e pPICZ α A.....	10
3.5	Extração do DNA plasmidial de <i>E. coli</i> recombinantes.....	11
3.6	Dupla digestão dos plasmídeos pUC57_NS1ZIKV e pPICZ α A com enzimas de restrição <i>EcoRI</i> e <i>NotI</i>	12
3.7	Purificação do DNA plasmidial de <i>E. coli</i> recombinante a partir do gel de agarose.....	13
3.8	Ligação do inserto NS1ZIKV no vetor de expressão pPICZ α A linearizado.....	13
3.9	Transformação de <i>E. coli</i> competentes com o plasmídeo pPICZ α A_NS1ZIKV.....	14
3.10	PCR de colônia das bactérias (<i>E. coli</i>) recombinantes com pPICZ α A_NS1ZIKV.....	14
3.11	Extração do DNA plasmidial de <i>E. coli</i> recombinante com pPICZ α A_NS1ZIKV.....	15
3.12	Dupla digestão do plasmídeo pPICZ α A_NS1ZIKV com enzimas de restrição <i>NotI</i> e <i>EcoRI</i>	15
3.13	Digestão simples do plasmídeo pPICZ α A_NS1ZIKV com enzima <i>SacI</i> 16	16
3.14	Precipitação do DNA plasmidial pPICZ α A_NS1ZIKV linearizado.....	16
3.15	Preparo da levedura <i>P. pastoris</i> para eletroporação.....	17
3.16	Transformação de <i>P. pastoris</i> por eletroporação com o plasmídeo pPICZ α A_NS1ZIKV linearizado.....	17
3.17	Extração do DNA genômico de <i>P. pastoris</i> KM71H recombinantes com pPICZ α A_NS1ZIKV.....	18
3.18	PCR do DNA genômico de <i>P. pastoris</i> KM71H recombinantes com pPICZ α A_NS1ZIKV.....	19
3.19	Indução da expressão da proteína NS1ZIKV em <i>Pichia pastoris</i>	19
3.20	Purificação da proteína NS1ZIKV por cromatografia de afinidade....	20

3.21	Precipitação da proteína NS1ZIKV com TCA e quantificação por BCA	20
3.22	Western Blot da proteína NS1ZIKV.....	21
4	RESULTADOS.....	23
4.1	Transformação de <i>E. coli</i> com o plasmídeo pUC57_NS1ZIKV.....	23
4.2	Transformação de <i>E. coli</i> com o plasmídeo pPICZ α A.....	23
4.3	Transformação de <i>E. coli</i> com o plasmídeo pPICZ α A_NS1ZIKV.....	24
4.4	Digestão do pPICZ α A_NS1ZIKV com <i>SacI</i>	25
4.5	Transformação por eletroporação de <i>P. pastoris</i> com o plasmídeo pPICZ α A_NS1ZIKV linearizado.....	25
4.6	Western Blot da proteína NS1ZIKV expressa em <i>P. pastoris</i>	26
5	DISCUSSÃO.....	27
6	CONCLUSÃO.....	30
7	PERSPECTIVAS.....	31
	REFERÊNCIAS.....	32

1 INTRODUÇÃO

Os arbovírus, vírus transmitidos por artrópodes, englobam uma grande variedade de famílias virais como, Bunyaviridae, Togaviridae, Flaviviridae, Reoviridae, Rhabdovirida e Orthomyxoviridae (Rust, 2012, Weaver, 2010). São causadores das arboviroses, que representam um grande desafio aos órgãos de saúde pública e aos grupos de pesquisa mundiais, haja vista os impactos provocados na saúde das populações acometidas. A similaridade entre suas manifestações clínicas dificultam um diagnóstico diferencial precoce e eficaz para o controle de doenças como: Zika, Dengue e Chikungunya (PAHO, 2017d).

O Zika virus (ZIKV), foi identificado pela primeira vez em macacos *Rhesus* na Uganda, em 1947 (Xia et al., 2018; Hasan et al., 2018; Dick; Kitchen e Haddow, 1952). Em 1952, foram detectados os primeiros casos de infecção humana pelo ZIKV, na Uganda e República Unida da Tanzânia (WHO, 2018). Entre 1969 e 1983 o vírus foi detectado em mosquitos encontrados na Índia, Indonésia, Malásia e Paquistão (WHO, 2018). Do ano de sua descoberta até 2006 ocorreram casos isolados de infecção humana tanto na África quanto na Ásia, entretanto o primeiro surto de grande relevância foi relatado na Micronésia (Ilha Yap) em 2007 (Sironi et al., 2016).

Entre 2013 e 2014, um total de 42 pacientes, na Polinésia Francesa, foram registrados com síndrome de Guillain-Barré em decorrência da infecção viral (Cao-lormeau, 2016). Ainda em 2014, a epidemia atingiu também as Ilhas Cook, Nova Caledônia e Ilha de Páscoa, chegando à América do Sul no final de 2014 e início de 2015 (Sironi et al., 2016). Nas Américas foram confirmados, entre 2015 e 2017, 223.336 casos de infecção pelo ZIKV, dos quais 20 resultaram em óbito (PAHO, 2017c), sofrendo um acréscimo de 141 casos autóctones até janeiro de 2018 (PAHO/WHO, 2017a).

O alarmante acréscimo no quantitativo de casos de microcefalia neonatal no Brasil, entre 2015 e 2016, gerou grande preocupação às comunidades científicas mundiais. Até fevereiro de 2016, 583 casos de microcefalia neonatal foram confirmados no país (Fig. 1) (WHO, 2016), e entre 2015 e janeiro de

2018 ocorreram 137.288 casos autóctones de infecção pelo vírus, sendo 2.952 referentes à síndrome congênita e 11 óbitos não associados à síndrome de Guillain-Barré ou malformações congênitas decorrentes da infecção viral (PAHO/WHO, 2017a).

Ainda em 1º de fevereiro de 2016, a pandemia do ZIKV foi declarada uma Emergência em Saúde Pública de Preocupação Internacional (PAHO/WHO, 2016).



Figura 1: Casos confirmados de microcefalia no Brasil distribuídos por estados da federação (até 20 de fevereiro de 2016) (WHO, 2016).

A pandemia evidenciou aspectos particulares referentes à infecção por ZIKV, incluindo a rápida disseminação, o surgimento de diversos casos de microcefalia neonatal e a transmissão por via sexual (Carlson et al., 2018).

A transmissão do ZIKV pode ocorrer através de infecção vetorial, por meio da picada de mosquitos do gênero *Aedes* (Waldorf et al., 2018; Musso e Gubler, 2016), pode ser transmitido de um indivíduo a outro através de transmissão vertical, relação sexual desprotegida, (Duggal et al., 2018; Musso

e Gubler, 2016) ou transfusão sanguínea (Braack et al., 2018; Musso e Gubler, 2016).

Duggal et al. (2017) confirmaram em seu estudo a presença de partículas virais no sêmen, que mesmo em pequenas quantidades já são suficientes para a transmissão sexual ocorrer. Além disso, a presença de antígenos virais em células do sistema fagocitário, especificamente os macrófagos residentes no tecido placentário, confirma a hipótese de ocorrência de transmissão vertical do vírus (Quicke et al., 2016). Portanto, em uma possível gestação, o vírus proveniente do sêmen poderia oferecer risco não apenas para a mulher infectada como também para o feto, haja vista sua capacidade de ultrapassar as barreiras placentária (Quicke et al., 2016; Walter et al., 2017; Pettitt et al., 2017) e hematoencefálica fetal (Walter et al., 2017).

Tal fato gerou inquietações às comunidades científicas, uma vez que, ao atingir o embrião, o ZIKV é capaz de induzir a apoptose em células progenitoras neurais, causar danos em seu DNA (estresse genotóxico) e ativar genes efetores de p53 (El Ghouzzi, 2016). A infecção resulta em teratogenia fetal, o que está intrinsecamente relacionado aos casos de microcefalia congênita, (distúrbio caracterizado pela redução do perímetro cefálico ao nascer, associado a severo retardo mental, que em casos extremos pode levar à morte) (Boldescu et al., 2017).

Os efeitos deletérios nos sistemas nervoso central e periférico causados pelo ZIKV devem-se sobretudo ao tropismo viral por tais tecidos. O ZIKV é capaz de infectar e matar células-tronco neurais (progenitores neuroepiteliais, células da glia e progenitores intermediários) (Waldorf et al., 2018) enquanto neurônios estão menos susceptíveis à infecção (Pettitt et al., 2017). Isto ocorre não apenas durante o desenvolvimento fetal, mas pode se estender até a adolescência atingindo grupos de células tronco que persistem até esta fase da vida (Waldorf et al., 2018). Logo, a neurogênese alterada, não apenas no embrião, mas em crianças e adolescentes, oferece também risco para o surgimento de condições neurocognitivas e psiquiátricas precoces (Waldorf et al., 2018). Ademais, outros achados como calcificações na placa cortical em lactentes, sugerem outras características da doença, as quais não estão relacionadas apenas com a infecção de células-tronco neurais (Pettitt et al., 2017).

A infecção pelo ZIKV produz ainda outros sinais e sintomas no indivíduo acometido, como, exantema, prurido, febre baixa, rash cutâneo, conjuntivite, cefaléia, artralgia e leucopenia, os quais se assemelham à sintomatologia das demais arboviroses (PAHO, 2017d). Além disso, um estudo pioneiro constatou a ligação entre a infecção por ZIKV e o desenvolvimento da Síndrome de Guillain-Barré (doença autoimune caracterizada por polirradiculoneuropatia) em indivíduos adultos (Cao-lormeau et al., 2016).

O ZIKV é um arbovírus icosaédrico e envelopado (Hasan et al., 2018) pertencente à família *Flaviviridae* (Xia et al., 2018; Hasan et al., 2018) e ao gênero flavivírus (Hasan et al., 2018). Contém um genoma de RNA cadeia simples e polaridade positiva (Hasan et al., 2018; Xia et al., 2018) com cerca de 11.000 nucleotídeos (Xia et al., 2018). Este dá origem a uma poliproteína que é clivada em três proteínas estruturais (PrM/M, E e C) e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) (Fig. 2) (Rastogi, Sharma e Singh, 2016; Song et al., 2016; Xia et al., 2018).



Figura 2: Poliproteína clivada em três proteínas estruturais (PrM/M, E e C) e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) a partir do genoma do ZIKV (RASTOGI, SHARMA e SINGH, 2016).

A proteína não-estrutural 1 (NS1) é uma glicoproteína altamente conservada cujo peso molecular varia de 46 a 55kDa, a depender da extensão de sua glicosilação (Rastogi, Sharma e Singh, 2016). É translocada no retículo endoplasmático da célula hospedeira (Brown et al., 2016), podendo ser secretada em sua forma hexamérica (Rastogi, Sharma e Singh, 2016; Brown et al., 2016) ou ligar-se à superfície celular sob a forma monomérica ou dimérica (Rastogi; Sharma; Singh, 2016).

No meio intracelular, a NS1 participa do ciclo replicativo viral, onde juntamente com outras proteínas não-estruturais e o RNA viral formam o complexo de replicação derivado de vesículas provenientes do retículo endoplasmático (Rastogi, Sharma e Singh, 2016). Enquanto isto, sua forma secretada realiza funções imunomoduladoras interagindo com proteínas do sistema complemento (Brown et al., 2016) e desencadeando altas

concentrações de Imunoglobulina G (IgG) durante infecções primárias e secundárias (Rastogi, Sharma e Singh, 2016). Deste modo, por meio da modulação da maquinaria celular, a proteína NS1 desempenha papel estratégico na invasão e evasão do sistema imune do hospedeiro (Rastogi, Sharma e Singh, 2016).

Devido ao papel crucial da proteína NS1 na resposta imune do hospedeiro, a mesma tem sido utilizada em diversos estudos como marcador diagnóstico precoce para detecção de infecções por flavivírus (Duong et al., 2011; Antunes et al., 2015; Teoh et al., 2016; Ricciardi-jorge et al., 2017). Para tanto, é necessário o desenvolvimento de métodos que visem a produção desta proteína em grande escala e baixo custo, o que se configura como um grande desafio aos grupos de pesquisa mundiais.

Diversos organismos vem sendo utilizados para a produção heteróloga de proteínas, como por exemplo a levedura *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) que é empregada para a expressão de proteínas recombinantes (Cregg et al., 2009; Macauley-Patrick et al., 2005; Invitrogen, 2010a). Sua eficiência na síntese destas proteínas alcança até 30% do conteúdo protéico total produzido pela célula (Brown, 2010).

A levedura *P. pastoris* possui dois genes (AOX1 e AOX2) essenciais para a síntese de proteínas heterólogas, os quais codificam a enzima álcool oxidase (Invitrogen, 2010a). Esta enzima, fundamental para o metabolismo do metanol, permite a utilização deste álcool como única fonte de carbono e energia para a levedura (Macauley-Patrick et al., 2005; Invitrogen, 2010a). Geralmente os níveis de expressão de proteínas heterólogas controladas pelo promotor AOX1 são muito elevadas em relação ao promotor AOX2 e por este motivo o primeiro é mais amplamente empregado (Macauley-Patrick et al., 2005).

Há três fenótipos disponíveis de *P. pastoris* no que concerne sua capacidade de utilização do metanol: o tipo selvagem Mut⁺ que possui ambos os genes AOX e requer altas taxas de metanol, o fenótipo Mut^s onde há deleção do gene AOX1, e Mut⁻ em que ambos os genes AOX estão ausentes (Macauley-Patrick et al., 2005; Barrigon, Valero e Montesinos, 2015).

Para a expressão de um gene heterólogo em *P. pastoris* são necessárias três etapas básicas: Inserção do gene em um vetor de expressão, introdução

do vetor de expressão no hospedeiro (*P. pastoris*) e análise das cepas para a expressão do gene heterólogo (Macauley-Patrick et al., 2005).

O uso de *P. pastoris* como organismo para expressão heteróloga de proteínas é vantajoso pois não requer meio de crescimento complexo, é relativamente fácil de manipular geneticamente e possui uma via para síntese de proteínas eucarióticas (Macauley-Patrick et al., 2005). Além disso, por ser um organismo eucarioto possui a capacidade de processar proteínas (dobramento e modificação pós-traducional) sendo um dos sistemas que fornece níveis mais altos de expressão protéica (Invitrogen, 2010a).

Em suma, no que tange o desafio de se obter um diagnóstico diferencial para as diversas arboviroses, a utilização da proteína NS1 do ZIKV torna-se uma [estratégia](#) promissora para detecção específica desta enfermidade. Portanto, a relevância deste estudo baseia-se na obtenção deste antígeno viral, em grande escala e baixo custo, o qual posteriormente poderá ser empregado pelas comunidades científicas na produção de medidas de diagnose precoce. Tais medidas por sua vez poderão impactar significativamente na saúde das populações, possibilitando aos profissionais de saúde uma intervenção mais eficiente e eficaz na promoção da saúde e prevenção de agravos relativos à infecção pelo ZIKV.

2 OBJETIVO

Expressar de maneira heteróloga a proteína não-estrutural 1 (NS1) do ZIKV em *Pichia pastoris*, para fins de diagnóstico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Preparação de bactérias *Escherichia coli* (E. coli) competentes

Bactérias *E. coli* foram pré-inoculadas em 5 mL de meio LB líquido (1% Triptona, 0,5% Extrato de levedura e 1% Cloreto de Sódio, pH 7,0) e permaneceram por 12-16 horas sob 37 °C e agitação de 200 rpm. O pré-inóculo foi transferido para um frasco contendo 500 mL de LB líquido permanecendo sob agitação de 200 rpm e temperatura de 37 °C até atingir a densidade ótica (DO) de 0,3. O inóculo foi incubado em gelo por 5 minutos e posteriormente as células foram centrifugadas a 1600 x g a 4 °C por 10 minutos. O precipitado formado foi cuidadosamente solubilizado em 100 mL de tampão Cálcio/Glicerol e novamente centrifugadas sob as mesmas condições anteriores por 10 minutos, ambos os passos foram novamente realizados. O frasco contendo as células foi incubado em gelo durante 30 minutos e então centrifugado a 1600 x g e 4 °C por 5 minutos. O precipitado foi solubilizado em 12 mL de tampão Cálcio/Glicerol gelado e então distribuídos em tubos com 250-500 µL da solução. As células foram estocadas a -80°C.

3.2 Clonagem do gene NS1ZIKV no vetor de clonagem pUC57

O vetor de clonagem pUC57_NS1ZIKV sintetizado junto a empresa Genscript™ (Fig. 3) apresenta 3790 pares de base e inclui: um gene que confere resistência ao antibiótico ampicilina; um gene que codifica a proteína NS1 do ZIKV; e os sítios de restrição para as enzimas *NotI* e *EcoRI*. O vetor foi utilizado para transformação de bactérias *E. coli* competentes.

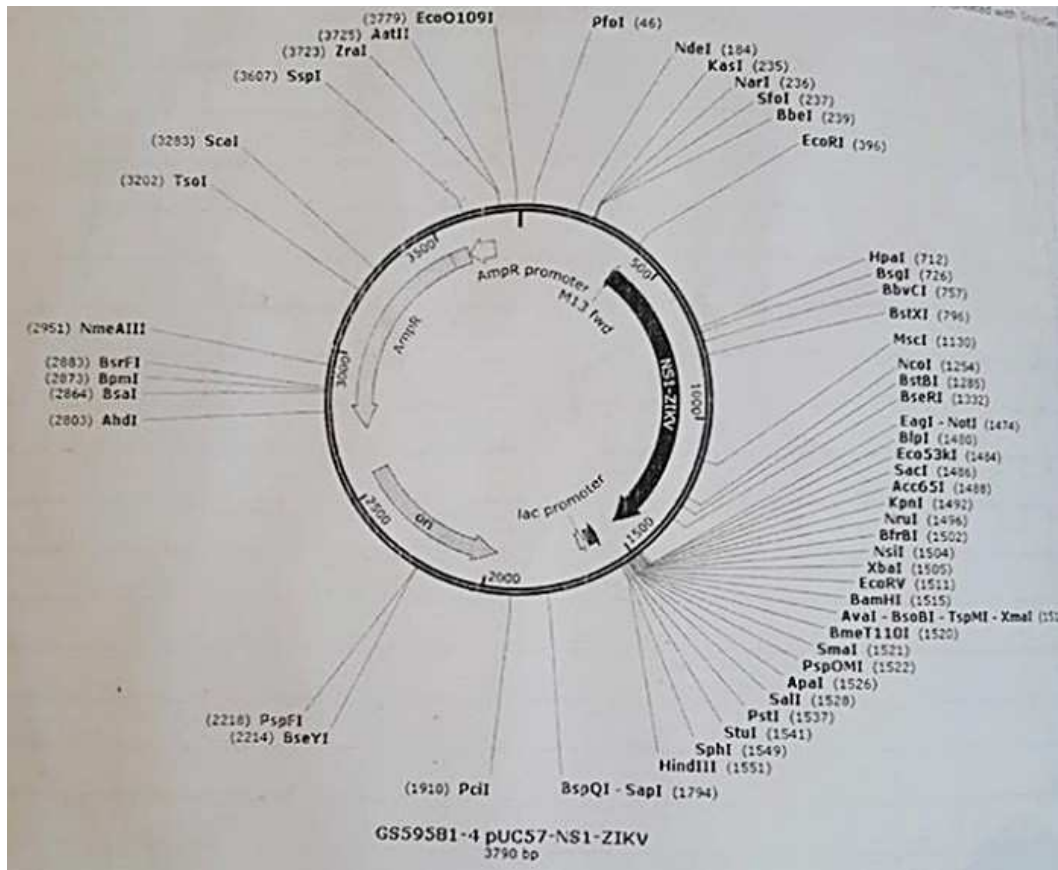


Figura 3: Vetor de clonagem pUC57. Possui gene que confere resistência ao antibiótico ampicilina, um gene que codifica a proteína NS1 do ZIKV, e os sítios de restrição para as enzimas NotI e EcoRI (Genscript™)

3.3 Clonagem do gene NS1ZIKV no vetor de expressão pPICZαA

O vetor de expressão pPICZαA foi adquirido através da empresa Invitrogen™ (Fig. 4). O mesmo possui 3600 pares de base e inclui: um gene de resistência ao antibiótico zeocin para seleção em *P. pastoris* e *E. coli*; um fragmento contendo o promotor de AOX; um fragmento com sinal de secreção fator α para direcionar a expressão da proteína recombinante; um peptídeo C-terminal contendo o epítipo c-myc e uma cauda de polihistidina para detecção e purificação da proteína recombinante; e os sítios de restrição para as enzimas *NotI* e *EcoRI* (Invitrogen, 2010b). O vetor foi clonado tanto em bactérias *E. coli* competentes quanto em leveduras *P. pastoris*.

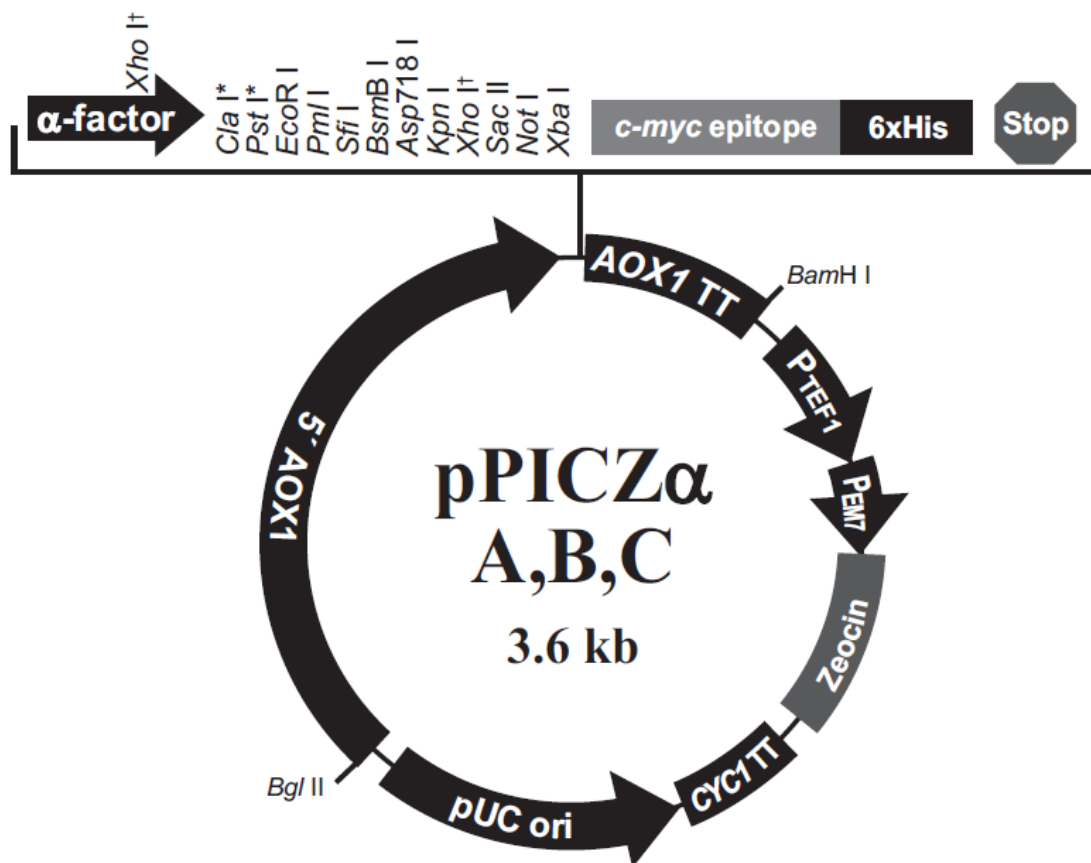


Figura 4: Vetor de expressão pPICZ α A (Invitrogen, 2010b).

3.4 Transformação de *E. coli* competentes com pUC57_NS1ZIKV e pPICZ α A

O processo de transformação foi realizado por meio de choque térmico (Fig. 5). Foram aliqüotados 0,5 μ L do plasmídeo pUC57_NS1ZIKV em 50 μ L de *E. coli* competentes, e 0,5 μ L do plasmídeo pPICZ α A em 50 μ L de *E. coli* competentes. Ambos permaneceram por 15-20 minutos a 4 °C, em seguida mantidos em banho seco a 42 °C por 1 minuto e retornados ao gelo, onde então foi adicionado 110 μ L de meio SOC. As bactérias foram crescidas por 30 minutos a 37 °C e 150 rpm. Após, bactérias contendo o plasmídeo pUC57_NS1ZIKV foram plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina e aquelas contendo o vetor pPICZ α A foram plaqueadas em meio LB sólido contendo zeocin, a fim de selecionar os transformantes.

As colônias foram isoladas e crescidas em 50 mL de meio LB líquido contendo ampicilina ou zeocin, respectivamente, para o crescimento de

bactérias contendo pUC57_NS1ZIKV e pPICZαA, sob agitação de 200 rpm a 37°C. As bactérias foram estocadas com glicerol (25%) e então armazenadas a -80°C.

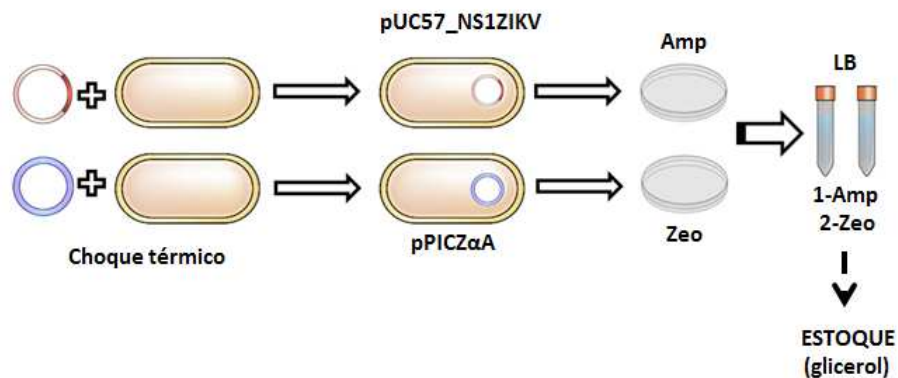


Figura 5: Transformação de *E. coli* competentes com pUC57_NS1ZIKV e pPICZαA.

3.5 Extração do DNA plasmidial de *E. coli* recombinantes

Os plasmídeos foram extraídos pelo método de lise alcalina que compreendeu os seguintes passos (Fig. 6): Um clone de bactérias contendo pUC57_NS1ZIKV foi inoculado em meio LB líquido com antibiótico ampicilina e outro clone de bactérias contendo pPICZαA foi inoculado em meio LB líquido com antibiótico zeocin, e assim permaneceram por 18 horas, sob agitação de 200 rpm e 37°C. Cada clone então foi sedimentado por 2 minutos a 11.000 x g. O precipitado formado foi suspenso em 200 µL de TE (10 mM Tris HCl e 1 mM EDTA). Foram adicionados 360 µL de solução contendo 2 M de NaOH e 10% de SDS e os tubos de microcentrifuga foram incubados a temperatura ambiente por 5 minutos. Foi adicionado 300 µL de uma segunda solução (5 M acetato de potássio e 11,5% ácido acético glacial) e após prosseguiu-se com incubação no gelo por 5 minutos. Os tubos foram centrifugados a 11.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo onde foi adicionado 750 µL de isopropanol, que passou por nova centrifugação a 11.000 x g durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado suspenso em 200 µL de TE com RNase. Os tubos foram transferidos para o banho seco a 37 °C por 20 minutos, para então adicionar 110 µL de Acetato de amônio (7,5M). Outra centrifugação foi realizada a 11.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e

adicionado 750 μL de etanol 100% gelado e então submetido à centrifugação a 11.000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e lavado com 750 μL de etanol 70% gelado, para então realizar uma última centrifugação a 11.000 x g por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco em temperatura ambiente, para então ser suspenso em 30 μL de água estéril.

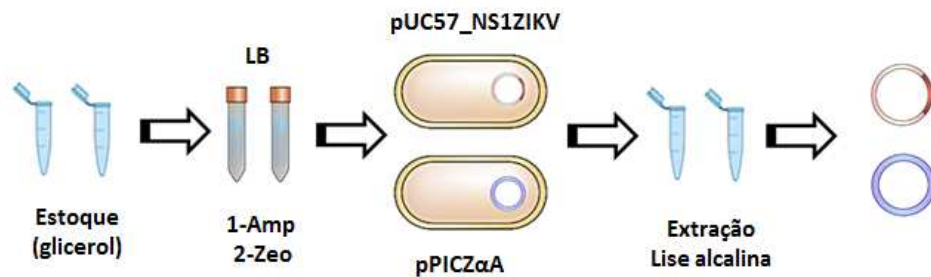


Figura 6: Extração do DNA plasmidial de *E. coli* recombinantes.

3.6 Dupla digestão dos plasmídeos pUC57_NS1ZIKV e pPICZ α A com enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI*

Os plasmídeos pUC57_NS1ZIKV e pPICZ α A foram submetidos separadamente ao processo de dupla digestão com as enzimas *NotI* e *EcoRI* (Fig. 7). Para cada reação foram adicionados 10 μL de plasmídeo, 5 μL de buffer D, 0,6 μL de BSA (100x), 1 μL de enzima *EcoRI*, 1 μL da enzima *NotI* e água até completar o volume de 50 μL . A reação foi incubada em banho seco a 37 °C por 3 horas.

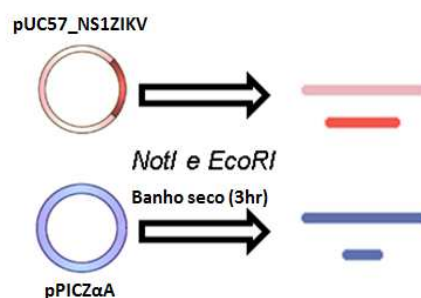


Figura 7: Dupla digestão dos plasmídeos pUC57_NS1ZIKV e pPICZ α A com enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI*.

3.7 Purificação do DNA plasmidial de *E. coli* recombinante a partir do gel de agarose

Realizou-se uma eletroforese em gel de agarose 1% de ambas as reações de digestão supracitadas. As bandas de DNA contendo NS1ZIKV e outra contendo pPICZαA foram excisadas do gel e em seguida purificadas separadamente utilizando-se o kit QIAquick® Gel Extraction (QIAGEN™) com o protocolo subsequente: Foi adicionado 350 µL de buffer QG na amostra que então foi incubada por 10 minutos em banho maria a 50 °C até dissolver todo o gel. Foi acrescentado 150 µL de isopropanol na amostra que foi passada através de uma coluna fornecida no kit. Após, foi centrifugada por 1 minuto a 11.000 x g e o tampão que passou através da coluna foi descartado. O último passo foi realizado novamente, adicionado 750 µL de buffer PE e centrifugado por 1 minuto a 11.000 x g. O líquido restante foi descartado e a amostra centrifugada por 1 minuto a 11.000 x g. Por fim foi adicionado 30 µL de buffer EB e centrifugado por 1 minuto a 11.000 x g.

3.8 Ligação do inserto NS1ZIKV no vetor de expressão pPICZαA linearizado

O gene codificante da proteína NS1 do ZIKV, foi ligado ao vetor de expressão pPICZαA para que o mesmo possa ser introduzido posteriormente em leveduras *P. pastoris*.

Para o cálculo da quantidade em nanogramas do inserto (NS1_ZIKV) foi utilizado a seguinte razão:

$$\frac{\text{Vetor (ng)}}{\text{Kb vetor}} \times \text{kb inserto} \times \frac{\text{Razão molar inserto}}{\text{Vetor}} = \text{ng inserto}$$

Posto isto, foi adicionado à reação além do inserto, o pPICZαA linearizado, enzima T4 ligase, buffer da ligase (10x) e água até completar o volume total da reação para 10 µL. A amostra permaneceu por 1 hora em banho seco a 25°C. O produto da ligação foi o plasmídeo recombinante pPICZαA_NS1ZIKV (Fig. 8).

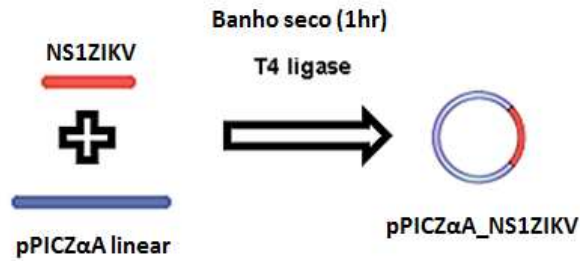


Figura 8: Ligação do inserto NS1ZIKV no vetor de expressão pPICZαA linearizado.

3.9 Transformação de *E. coli* competentes com o plasmídeo pPICZαA_NS1ZIKV

Foi seguido o mesmo protocolo já descrito no item 3.4 para a transformação de *E. coli* por choque térmico (Fig. 9). Entretanto neste caso, as bactérias foram transformadas com o plasmídeo pPICZαA_NS1ZIKV.

As colônias foram cultivadas em placas de petri contendo meio LB sólido e zeocin. Posteriormente foram isoladas e crescidas em 5 mL de meio LB líquido em baixa concentração de sal, contendo o mesmo antibiótico, sob agitação de 200 rpm a 37°C. As bactérias transformadas foram estocadas com glicerol (25%) e armazenadas a -80°C.

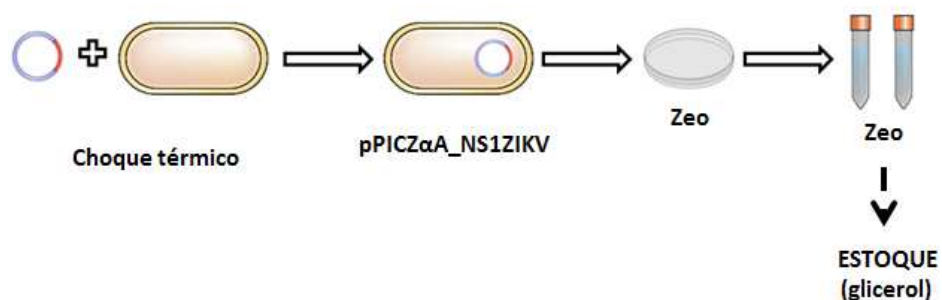


Figura 9: Transformação de *E. coli* competentes com o plasmídeo pPICZαA_NS1ZIKV.

3.10 PCR de colônia das bactérias (*E. coli*) recombinantes com pPICZαA_NS1ZIKV

Foi realizada uma reação em cadeia da polimerase (PCR) das colônias cultivadas, a fim de confirmar a reação de ligação (entre pPICZαA e NS1ZIKV)

e a transformação de *E. coli* com o inserto. Foram utilizados primers sense (5' AGTACCATCCTGACTCCCC 3') e antisense (5' CGATCAGATGGGCCCTCTTC 3').

Para isto foi necessário preparar uma solução contendo: 0,25 µL de enzima Go Taq Polimerase, 5 µL de tampão da Taq, 6 µL de MgCl₂, 1 µL de primer AS (antisense), 1 µL de primer S (sense), 1 µL de mix com desoxirribonucleotídeos fosfatados (Adenina, Citosina, Guanina e Timina), 3 µL de colônia crescida em LB e completar com água até o volume de 25µL.

Os resultados do PCR foram obtidos por meio de eletroforese em gel de agarose 1%.

3.11 Extração do DNA plasmidial de *E. coli* recombinante com pPICZαA_NS1ZIKV

Foi seguido o mesmo protocolo citado anteriormente no item 3.5 para extração do DNA plasmidial de *E. coli* recombinante (Fig. 10). O produto da extração foi utilizado para realizar dupla digestão do plasmídeo recombinante pPICZαA_NS1ZIKV.

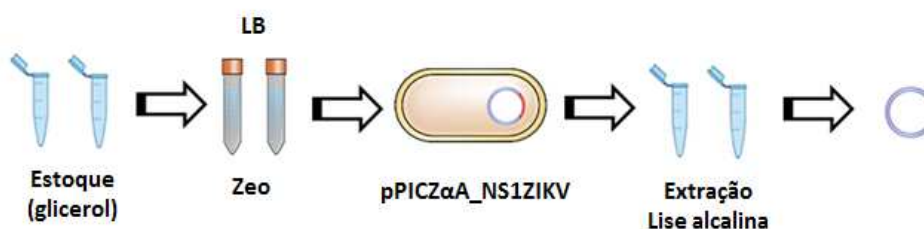


Figura 10: Extração do DNA plasmidial de *E. coli* recombinante com pPICZαA_NS1ZIKV.

3.12 Dupla digestão do plasmídeo pPICZαA_NS1ZIKV com enzimas de restrição *NotI* e *EcoRI*

A dupla digestão foi realizada com o intuito de confirmar a reação de ligação entre pPICZαA e NS1ZIKV. Para tal utilizou-se 5 µL de pPICZαA_NS1ZIKV, 3 µL de buffer D, 0,3 µL de BSA, 0,5 µL de enzima *EcoRI*, 0,5 µL de enzima *NotI*, e água até completar 30µL de reação. A reação foi mantida em banho seco a 37 °C por 3 horas.

O resultado da digestão foi obtido por meio de eletroforese em gel de agarose 1%.

3.13 Digestão simples do plasmídeo pPICZ α A_NS1ZIKV com enzima *SacI*

O plasmídeo pPICZ α A_NS1ZIKV foi submetido ao processo de digestão simples utilizando-se a enzima *SacI*, objetivando linearizar o mesmo para futuramente introduzi-lo em leveduras *P. pastoris* (Fig. 11). Para a digestão foi utilizado 4 μ L de plasmídeo, 5 μ L de enzima *SacI*, 3 μ L de buffer J, 0,3 μ L de BSA, e o restante de água até completar o volume de 30 μ L da reação final. O preparado foi submetido a banho seco a 37 °C durante 19 horas.

A digestão foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1%.



Figura 11: Digestão simples do plasmídeo pPICZ α A_NS1ZIKV com enzima *SacI*.

3.14 Precipitação do DNA plasmidial pPICZ α A_NS1ZIKV linearizado

O produto da digestão com *SacI* foi submetido a precipitação do DNA com acetato de sódio, para remoção do sal da amostra. O volume da solução de DNA foi ajustado para 300 μ L com água milli Q e foram adicionados 30 μ L de acetato de sódio (3M e pH 7). Em seguida foram adicionados 660 μ L de etanol 100% gelado, e a solução homogeneizada e incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. Na sequência foi incubada a -80 °C por 30 minutos. Seguiu-se com uma centrifugação a 11.000 x g por 30 minutos e após foi descartado o sobrenadante. Foi adicionado 750 μ L de etanol 70% e novamente centrifugado a 11.000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e a

amostra foi seca em temperatura ambiente. Esta foi suspensa em 20 μ L de água pura.

3.15 Preparo da levedura *P. pastoris* para eletroporação

Foi preparado um pré-inóculo contendo 100 μ L de *P. pastoris* em 5 mL de meio YPD líquido (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% dextrose) a 180 rpm e 30 °C por 24 horas. O pré-inóculo foi vertido em 300 mL de meio YPD e mantido a 30 °C e 180 rpm, até atingir a DO de 1,3-1,5. Após, realizou-se centrifugação a 1500 x g por 5 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi solubilizado em 50 mL de água gelada, centrifugado a 1500 x g por 5 minutos a 4 °C e descartado o sobrenadante. Foi realizada outra solubilização em 25 mL de água gelada, seguida de centrifugação a 1500 x g por 5 minutos a 4 °C e descarte do sobrenadante. Foi utilizado 12 mL de água gelada com sorbitol 1M para solubilizar o precipitado, seguido de centrifugação a 1500 x g por 5 minutos a 4 °C e descarte do sobrenadante. Por fim, o precipitado foi suspenso em 700 μ L de água gelada com sorbitol 1M e transferido para um tubo de microcentrífuga.

3.16 Transformação de *P. pastoris* por eletroporação com o plasmídeo pPICZ α A_NS1ZIKV linearizado

Ao plasmídeo linearizado foi adicionado 80 μ L de *P. pastoris* competentes (Fig. 12), o conteúdo foi transferido para uma cubeta e incubada no gelo por 5 minutos. Pós incubação a mesma foi submetida a eletroporação (2500 V, 25 μ F e 200 W). Imediatamente após o pulso foi adicionado 1 mL de água com sorbitol 1M em temperatura ambiente. O conteúdo foi transferido para um tubo de 15 mL e incubado na estufa, sem agitação, por 1-2 horas a 30°C. A amostra foi plaqueada em meio YPDS (1,5 % extrato de levedura, 3% peptona, 3% ágar, 27,33% sorbitol, 3% dextrose) contendo zeocin (100 μ g/mL) e incubado por no mínimo 3 dias a 30 °C sem agitação.

As colônias crescidas foram isoladas e cultivadas em 5 mL de meio YPD líquido contendo zeocin, a 150 rpm, 30 °C durante 24 horas. Posteriormente as células foram armazenadas com glicerol (25%) a -80°C.

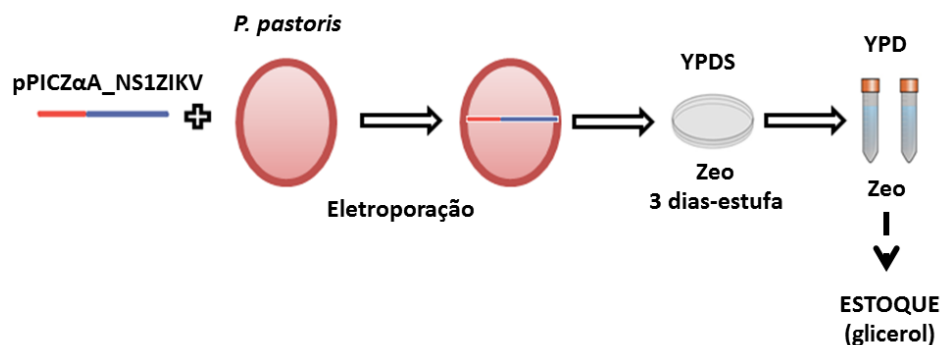


Figura 12: Transformação de *P. pastoris* por eletroporação com o plasmídeo pPICZαA_NS1ZIKV linearizado.

3.17 Extração do DNA genômico de *P. pastoris* KM71H recombinantes com pPICZαA_NS1ZIKV

Após a inserção do plasmídeo pPICZαA_NS1ZIKV no genoma da levedura, foi necessário extrair o DNA total da mesma (Fig. 13). Para isto, foram cultivados 100 µL de *P. pastoris* em 5 mL de meio YPD por 24 horas a 30 °C e 200 rpm. O conteúdo foi centrifugado por 5 minutos a 11.000 x g e o sobrenadante descartado. O precipitado foi então solubilizado em 400 µL de tampão de extração (2% triton (100x), 10% SDS, 10% NaCl 1M, 0,01% Tris, 0,1% EDTA) somado a 0,3 g de beads de vidro. O conteúdo resultante foi vortexado durante 2 minutos para que as células fossem lisadas e então liberassem o DNA no meio. A amostra foi centrifugada por 10 minutos a 11.000 x g e o sobrenadante coletado foi transferido para outro tubo. Foi adicionado 200 µL de fenol-clorofórmio (100 µL de fenol, 96µL de clorofórmio e 4µL de álcool isopropílico), centrifugado por 10 minutos a 11.000 x g e coletada a face superior do sobrenadante que foi transferida a um novo tubo. O volume foi precipitado com acetato de potássio em um volume de 1/10 e 2 volumes de etanol gelado, deixando por 2 minutos em temperatura ambiente. A amostra foi novamente centrifugada a 11.000 x g por 5 minutos, o precipitado resultante foi lavado com 1 mL de etanol 70% e centrifugado a 11.000 x g por 5 minutos. Por

fim a amostra permaneceu em temperatura ambiente para secagem, foi suspensa em 20 µL de TE com RNase e incubada a 37 °C por 30 minutos em banho seco.

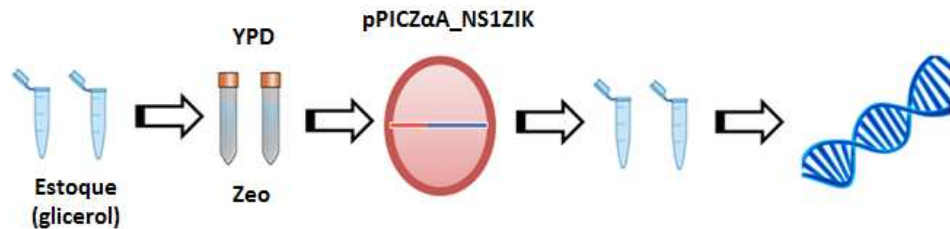


Figura 13: Extração do DNA genômico de *P. pastoris* KM71H recombinantes com pPICZαA_NS1ZIKV.

3.18 PCR do DNA genômico de *P. pastoris* KM71H recombinantes com pPICZαA_NS1ZIKV

Foi realizada uma PCR a fim de confirmar a transformação de leveduras *P. pastoris* com o plasmídeo pPICZαA_NS1ZIKV. Para isto foi necessário preparar um mix contendo: 0,25 µL de enzima Go Taq Polimerase, 10 µL de buffer (5x), 1 µL de primer AS (antisense), 1 µL de primer S (sense), 12 µL de MgCl₂ 1 µL de mix com desoxirribonucleotídeos fosfatados (Adenina, Citosina, Guanina e Timina), 3 µL de plasmídeo e completar com água até o volume de 50 µL.

Os resultados do PCR foram obtidos por meio de eletroforese em gel de agarose 1%.

3.19 Indução da expressão da proteína NS1ZIKV em *Pichia pastoris*

Após a confirmação da transformação, as leveduras recombinantes foram utilizadas para expressão da proteína NS1 do ZIKV seguindo o protocolo presente no manual “*Pichia* Expression Kit For expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*” (Invitrogen, 2014).

Foi realizado um pré-inóculo adicionando 500 µL de *Pichia pastoris* transformada em 25 mL de meio YPD, permanecendo por 24 horas a 30 °C e

180 rpm. Após 24 horas o pré-inóculo foi vertido em 500 mL de meio BMG (10% Fosfato de Potássio, 10% YNB, 0,2% Biotina, 10% Glicerol), para preparo do inóculo, que permaneceu a 30 °C e 250 rpm até atingir a OD=2-6. O meio BMG contendo levedura foi centrifugado a 3000 x g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, suspenso em água e novamente centrifugado. Seguiu-se então dois processos de lavagem com água. Após as lavagens as células foram ressuspensas e adicionadas a 250 mL de meio BMM (20% Fosfato de Potássio, 20% YNB, 20% Ácido Casamino, 1% Metanol e 0,4% Biotina) que foi então distribuído em Erlen Meyers ocupando até 20% de sua capacidade, por 24 horas, 20 °C e 250 rpm.

Para a etapa de indução (Fig. 14), foi adicionado 0,5% de Metanol a cada 12 horas durante 5 dias. O produto da indução foi centrifugado a 7000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C.

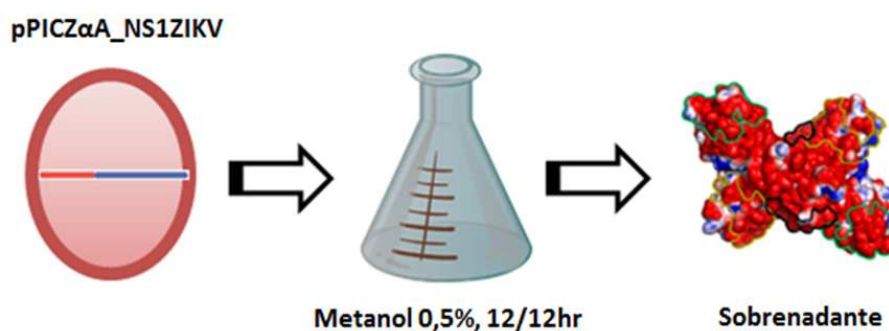


Figura 14: Indução da expressão da proteína NS1ZIKV em Pichia pastoris.

3.20 Purificação da proteína NS1ZIKV por cromatografia de afinidade

O sobrenadante da cultura foi diluído com tampão de ligação (Fosfato de sódio 20mM com Imidazol 40mM, em pH=7,4) e purificada por meio de cromatografia de afinidade, utilizando coluna His Trap™ Fast Flow Crude de 5mL acoplada ao sistema de purificação AKTA Prime Plus. O produto da purificação foi coletado e armazenado a -80°C.

3.21 Precipitação da proteína NS1ZIKV com TCA e quantificação por BCA

As proteínas purificadas passaram por processo de precipitação com TCA. A cada 1 mL de proteína foi adicionado 125 µL de TCA 100% (Ácido Tricloroacético). A mistura foi mantida 30 minutos no gelo, após foi centrifugada a 10.000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, o produto lavado com 500 µL de acetona 100% foi centrifugado nos mesmos parâmetros anteriores (realizado duas vezes). O sobrenadante foi descartado, o precipitado foi seco e solubilizado em tampão Tris-HCl (pH=8,8, 150mM) e armazenado a -20 °C.

Foi realizada uma curva padrão com BSA (albumina de soro bovino) a fim de quantificar a proteína purificada. Na placa de 96 poços foi adicionado BSA nas seguintes concentrações: 1000 µg/mL; 500 µg/mL; 250 µg/mL; 125 µg/mL; 62,5 µg/mL; 31,25 µg/mL; 15,625 µg/mL; 0 µg/mL. A proteína de interesse (NS1 do ZIKV) foi pipetada em um dos poços. Acrescentou-se solução reagente contendo BCA (ácido bicinconínico) e sulfato de cobre a todos os poços da placa que continham BSA e a proteína de interesse. Esta foi incubada a 37 °C por 30 minutos e então realizada sua leitura a 562 nm.

3.22 Western Blot da proteína NS1ZIKV

Foi preparado um gel de poliacrilamida 12% para realização de eletroforese a fim de separar as biomoléculas proteicas. Para preparo da amostra a ser pipetada no gel foi utilizado tampão de amostra com β-mercaptoetanol (6x) que age como redutor de pontes dissulfeto em ensaios de eletroforese de proteínas.

Após a corrida eletroforética a proteína contida no gel foi transferida para uma membrana de nitrocelulose por meio de processo envolvendo corrente elétrica em que foi utilizado tampão de transferência (0,3% Tris, 1,44% Glicina, 20% Metanol P.A.).

A membrana de nitrocelulose, para a qual foi transferida a proteína, foi submetida a imunomarcagem com anticorpos, seguindo as seguintes etapas: uma solução de bloqueio com gelatina 3% foi depositada sobre a membrana

durante 30 minutos; foi realizada lavagem com tampão TBS-T (0,8% Cloreto de sódio, 0,02% Cloreto de potássio, 0,3% Tris, 0,05% Tween 20); foi utilizado anticorpo primário Anti-Zika virus (IgM positivo) proveniente do soro de pacientes, que permaneceu sobre a membrana durante aproximadamente 12 horas; foi realizada a lavagem com tampão TBS-T; o anticorpo secundário Anti-Human IgM fosfatase alcalina foi adicionado sobre a membrana permanecendo assim durante 2 horas; uma última lavagem com tampão TBS-T foi realizada; por fim procedeu-se com a revelação da membrana utilizando substrato para fosfatase alcalina.

4 RESULTADOS

4.1 Transformação de *E. coli* com o plasmídeo pUC57_NS1ZIKV

O vetor de clonagem pUC57_NS1ZIKV foi utilizado para transformação de bactérias *E. coli* competentes que posteriormente foram submetidas a extração do DNA plasmidial. Para a confirmação da transformação o plasmídeo foi digerido por meio de enzimas de restrição: *NotI* e *EcoRI*. O resultado da digestão foi obtido através de eletroforese em gel de agarose 1% (Fig. 15). Em seguida, o fragmento correspondente ao gene NS1ZIKV (banda inferior) foi excisado do gel e purificado com kit QIAquick® Gel Extraction (QIAGEN™).

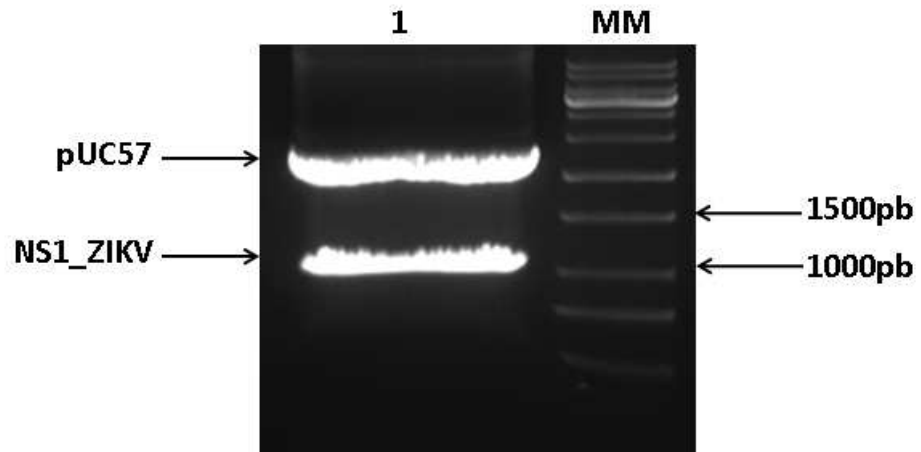


Figura 15: Digestão dupla do plasmídeo pUC57_NS1ZIKV com *NotI* e *EcoRI*. 1- digestão do pUC57_NS1ZIKV e MM- marcador molecular de 1Kb.

4.2 Transformação de *E. coli* com o plasmídeo pPICZ α A

O vetor de expressão pPICZ α A foi utilizado para transformação de bactérias *E. coli* competentes que posteriormente foram submetidas a extração do DNA plasmidial. Para a confirmação da transformação o plasmídeo foi digerido por meio de enzimas de restrição: *NotI* e *EcoRI*. O resultado da digestão foi obtido através de eletroforese em gel de agarose 1% (Fig. 16). Em seguida, o fragmento correspondente ao pPICZ α A linearizado foi excisado do gel e purificado com kit QIAquick[®] Gel Extraction (QIAGEN[™]).

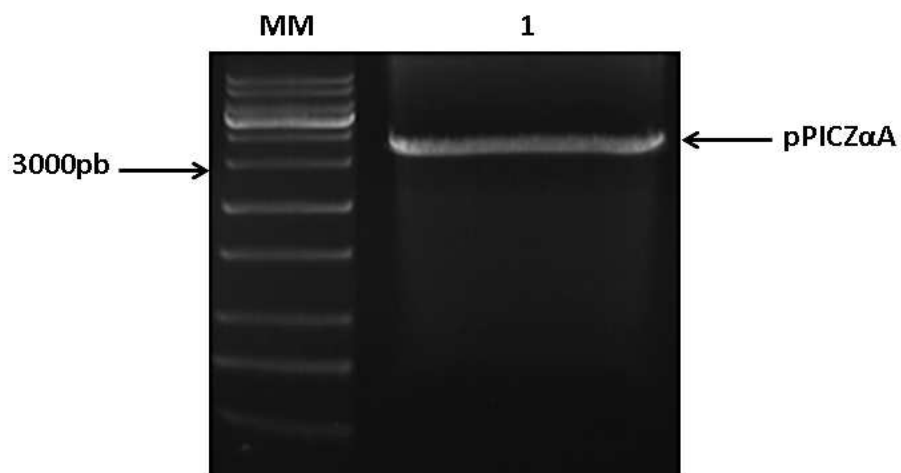


Figura 16: Digestão dupla do plasmídeo pPICZ α A com *NotI* e *EcoRI*. MM- marcador molecular de 1Kb e 1- digestão do pPICZ α A.

4.3 Transformação de *E. coli* com o plasmídeo pPICZ α A_NS1ZIKV

O plasmídeo linearizado pPICZ α A e o gene NS1ZIKV excisados dos géis foram ligados através de uma reação utilizando a enzima T4 ligase. O produto da ligação (pPICZ α A_NS1ZIKV) foi utilizado para transformação de bactérias *E. coli* posteriormente crescidas em meio adequado para extração do DNA plasmidial. A confirmação de ambos, ligação e transformação, ocorreu por meio de PCR de colônia (Fig. 17) e digestão dupla com as enzimas *NotI* e *EcoRI* (Fig. 18).

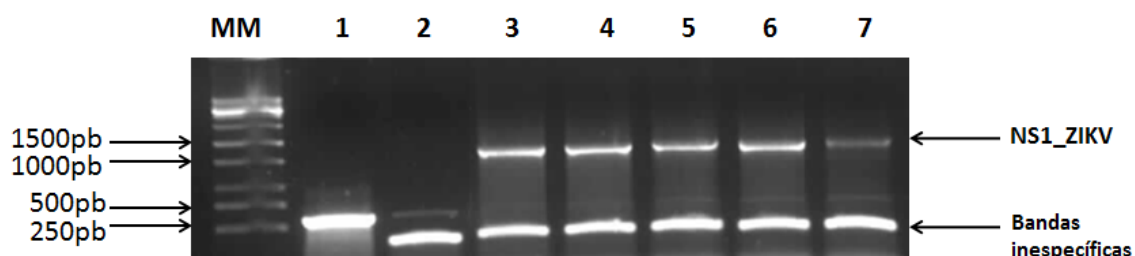


Figura 17: PCR de colônia com primer AOXs e AOXas. MM- marcador molecular 1Kb; 1- pPICZ α A vazio (controle negativo) e 2-6- colônias de *E. coli* transformadas com pPICZ α A_NS1ZIKV.

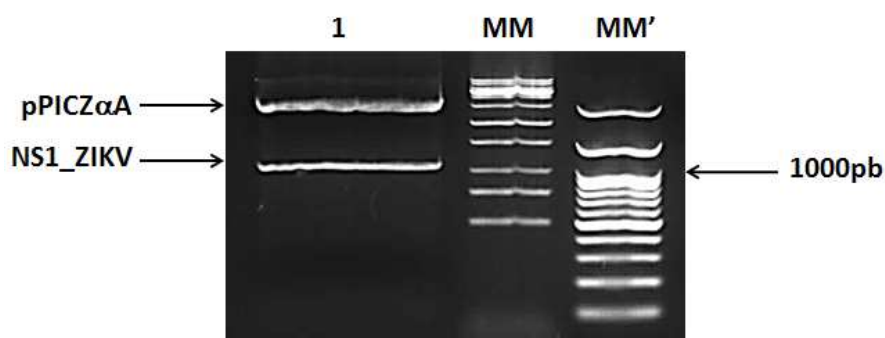


Figura 18: Digestão dupla do plasmídeo pPICZ α A_NS1ZIKV com as enzimas *NotI* e *EcoRI*. 1- digestão do pPICZ α A_NS1ZIKV; MM-marcador molecular de 1Kb e MM'-marcador molecular de 100pb.

4.4 Digestão do pPICZ α A_NS1ZIKV com *SacI*

O plasmídeo recombinante pPICZ α A_NS1ZIKV foi linearizado utilizando-se a enzima *SacI* (Fig. 19), para que posteriormente o mesmo pudesse ser inserido no organismo de expressão protéica (levedura *P. pastoris*).

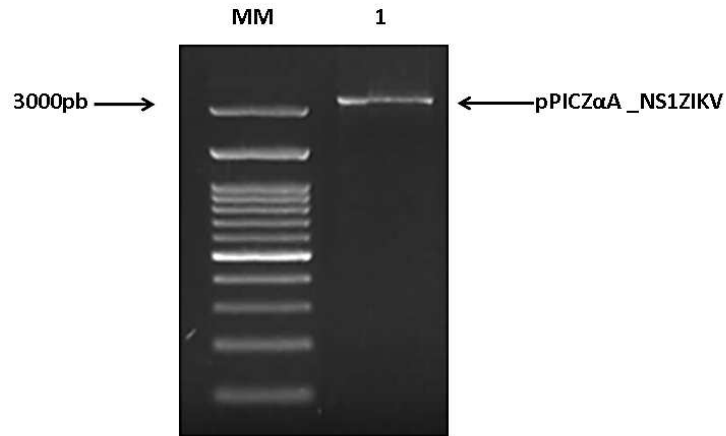


Figura 19: Linearização do pPICZ α A_NS1ZIKV com *SacI*. MM- marcador de de 100 bp e 1- pPICZ α A_NS1ZIKV linear.

4.5 Transformação por eletroporação de *P. pastoris* com o plasmídeo pPICZ α A_NS1ZIKV linearizado

A transformação das leveduras *P. pastoris* com o plasmídeo recombinante (pPICZ α A_NS1ZIKV) foi realizada por meio da técnica de eletroporação. Após a extração do DNA genômico da levedura foi realizado uma PCR a fim de confirmar a transformação (Fig. 20).

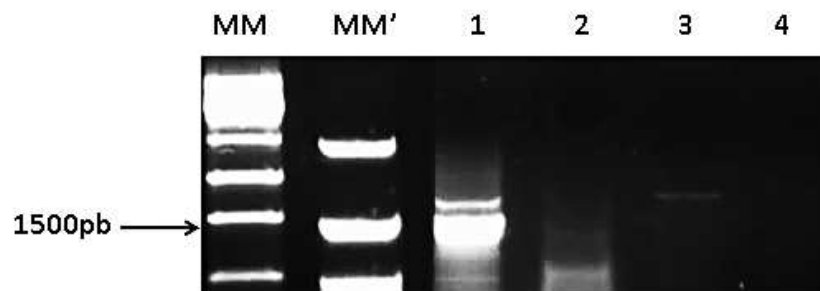


Figura 20: PCR de DNA total da levedura *Pichia pastoris* transformada com o plasmídeo pPICZ α A_NS1ZIKV. MM-Marcador molecular de 1kb. MM'-Marcador molecular de 100pb. 1- pPICZ α A_NS1ZIKV (controle positivo); 2-pPICZ α A vazio (controle negativo); 3-DNA genômico da levedura transformada e 4- Água.

4.6 Western Blot da proteína NS1ZIKV expressa em *P. pastoris*

A levedura transformada foi crescida em meio adequado para a indução da expressão da proteína recombinante NS1ZIKV. As proteínas coletadas do sobrenadante da cultura foram então purificadas, precipitadas e quantificadas. O rendimento do sistema de expressão foi de 164 µg/mL. Posteriormente a técnica de Imunoblotting foi utilizada para confirmar a expressão da proteína NS1 do ZIKV pela levedura *P. pastoris* (Fig. 21).

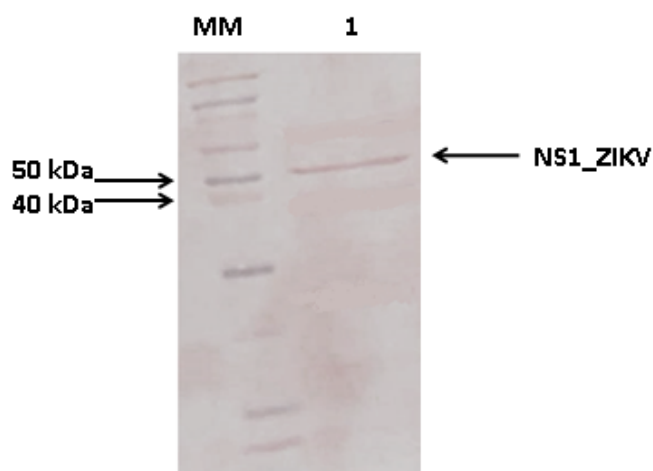


Figura 21: Western Blot em membrana de nitrocelulose da proteína NS1ZIKV expressa em *P. pastoris*. MM-Marcador molecular pré-corado. 1-Proteína NS1ZIKV.

5 DISCUSSÃO

Diversos organismos vem sendo utilizados para a expressão heteróloga de inúmeras proteínas. Tais organismos vão desde bactérias (*E. coli*) expressando proteínas de outras bactérias (Radha Arumugam e Gummadi, 2018; Anu et al., 2018), até algas unicelulares como a *Chlamydomonas reinhardtii* (Weiner et al., 2018), leveduras como a *Yarrowia lipolytica* (Madzak, 2015), *Saccharomyces cerevisiae* (Limura, Sonoki e Habe, 2018), *Pichia pastoris* (Gandier e Master, 2018), e uma infinidade de outros seres uni e pluricelulares.

A levedura *Pichia pastoris* empregada neste trabalho para a expressão da proteína NS1 do ZIKV, vem sendo aplicada em outros estudos envolvendo

proteínas virais. A mesma já foi utilizada para expressão da proteína E (envelope) do vírus Dengue tipo 1 (Poddar et al., 2016), tipo 2 (Mani et al., 2013), tipo 3 (Tripathi et al., 2015) e tipo 4 (Khetarpal et al., 2017). Outros pesquisadores expressaram de maneira heteróloga a proteína não estrutural 1 (NS1) do vírus Dengue tipo 2, em plantas, com o objetivo de produzir kits diagnósticos (Amaro, 2013; Xisto, 2015).

No que tange a clonagem do gene de interesse, outros autores desenvolveram metodologias semelhantes àquelas utilizadas no presente estudo. Poddar et al. (2016) clonaram genes sintéticos (proteína E do vírus Dengue 1) utilizando o vetor pPICZ-A, nas regiões dos sítios de ligação correspondentes às enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI*. O plasmídeo resultante, do mesmo modo, foi linearizado com a enzima *SacI* e eletroporado juntamente com *P. pastoris* da cepa KM71H. Por fim a proteína de interesse foi expressa, com uso de metanol, sob o controle do promotor AOX1 e posteriormente purificada pelo método de cromatografia por afinidade em coluna de níquel. Mani et al. (2013), desenvolveram trabalho semelhante ao clonarem o gene E do vírus Dengue 2 também sob o controle do promotor AOX1 do vetor pPICZ-A, que foi integrado ao genoma de *P. pastoris* da cepa KM71H.

Nos resultados deste trabalho, na figura 15, referente à transformação de *E. coli* com o plasmídeo pUC57_NS1ZIKV, observa-se a presença de duas bandas no gel de agarose: uma banda superior relacionada ao restante do plasmídeo pUC57 digerido com as enzimas de restrição *NotI* e *EcoRI* e uma banda inferior localizada na altura entre 1000 e 1500 pares de bases, portanto, corresponde ao gene de interesse NS1ZIKV. Através deste resultado foi possível confirmar a transformação de bactérias *E. coli* com o vetor pUC57_NS1ZIKV.

A figura 16, confirma a transformação de bactérias *E. coli* com o plasmídeo pPICZαA. Por meio da digestão dupla com as enzimas de restrição *NotI* e *EcoRI*, foi possível visualizar em gel de agarose a presença do referente plasmídeo cujo tamanho é superior a 3000 pares de bases.

A reação de ligação entre pPICZαA e NS1ZIKV gerou um plasmídeo recombinante, o pPICZαA_NS1ZIKV. Este plasmídeo foi inserido em bactérias *E. coli*, o que foi confirmado através de PCR de colônia (Fig. 17) e digestão

dupla com as enzimas de restrição *NotI* e *EcoRI* (Fig. 18). O gel referente ao PCR de colônia (Fig. 17) revelou em todas as amostras de colônias utilizadas (2-6) a presença do gene NS1ZIKV, na altura entre 1000 e 1500 pares de bases, comprovando a transformação bacteriana. Além disso, a presença de bandas inespecíficas em todas as colônias (2-6) evidencia, provavelmente, o uso em excesso de primer na reação. Quanto à digestão dupla observa-se a presença de duas bandas no gel de agarose, uma banda superior relativa ao pPICZ α A com aproximadamente 3000 pares de bases e uma banda inferior com altura aproximada entre 1000 e 1500 pares de bases, reafirmando o processo de transformação.

Na figura 19, o plasmídeo recombinante pPICZ α A_NS1ZIKV linearizado com a enzima *SacI* foi visualizado no gel como uma banda superior a 3000 pares de bases, confirmando portanto o êxito do processo de linearização. Deste modo foi possível realizar a etapa seguinte de transformação por eletroporação de *P. pastoris*.

Esta etapa foi confirmada por meio de PCR do DNA total da levedura transformada com o plasmídeo pPICZ α A_NS1ZIKV (Fig. 20). Foram utilizados como controle o plasmídeo pPICZ α A vazio, o pPICZ α A_NS1ZIKV e água. Foi possível visualizar a amplificação do gene NS1ZIKV na altura correspondente a 1500 pares de base, tanto no controle positivo (pPICZ α A_NS1ZIKV) quanto na levedura transformada. Já nos controles negativos (água e pPICZ α A vazio) não houve amplificação, como esperado. Com isto ficou comprovada a transformação das leveduras com o pPICZ α A_NS1ZIKV.

Sendo assim, após a etapa de indução da expressão proteica, o sobrenadante coletado foi purificado, precipitado e quantificado. A proteína obtida foi utilizada para a realização do Western Blot (Fig. 21) a fim de caracterizar por meio da interação antígeno-anticorpo a expressão da proteína NS1ZIKV pela levedura. Tal fato ficou confirmado por uma banda visível na membrana de nitrocelulose na altura entre 40 e 50 kDa, que corresponde à proteína NS1ZIKV. Este resultado está em conformidade com outros autores, que realizaram Western blot utilizando a proteína recombinante NS1 do vírus dengue, cujo peso molecular foi de aproximadamente 46kDa (Das et al., 2009).

Brault et al. (2017) desenvolveram uma estratégia de vacina alternativa utilizando a proteína NS1 do ZIKV, em que os autores encontraram, através de Western blot, uma proteína cujo peso molecular é de aproximadamente 45 kDa, o que mais uma vez reitera o resultado do presente trabalho.

O desenvolvimento deste sistema de expressão proteica é um exemplo de como a engenharia genética pode ser empregada para beneficiar diversos ramos da ciência, principalmente a área da saúde. Sua finalidade consiste na produção de um antígeno viral em grande escala, tornando possível o uso do mesmo para o desenvolvimento de kits diagnósticos com um custo mais baixo.

Estudos desenvolvidos com a proteína NS1 mostraram que a mesma está presente em altas concentrações na circulação durante a fase inicial da doença viral (entre primeiro e nono dia de surgimento dos sintomas) (Das et al., 2009). Este fato justifica a relevância de sua produção laboratorial em grande escala, haja vista seu potencial para fins diagnósticos baseados na interação entre o antígeno presente no kit e o anticorpo presente no soro de pacientes.

Em suma, a detecção precoce de uma doença pode determinar o sucesso ou fracasso de um tratamento. Sendo assim, os kits diagnósticos desempenham papel crucial no processo saúde-doença enquanto objeto de auxílio para identificação diferencial e antecipada de uma determinada doença.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos através deste trabalho nos permite concluir que: o gene otimizado da proteína NS1 foi integrado ao vetor de expressão pPICZ α A; bactérias *E. coli* crescidas e selecionadas continham o plasmídeo pPICZ α A com o gene de interesse; leveduras *Pichia pastoris* KM71H foram transformadas de maneira satisfatória com o vetor pPICZ α A contendo o gene de interesse; e o western blot confirmou a expressão da proteína NS1 e portanto a eficiência do sistema de expressão heteróloga em *Pichia pastoris*.

7 PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos através deste trabalho são de grande relevância, uma vez que apontam para a viabilidade de produção em grande escala da proteína NS1ZIKV. Esta mostra-se como um potencial antígeno a ser empregado no desenvolvimento posterior de kits diagnósticos para o ZIKV, como ensaios ELISA e o teste de imunocromatografia de fluxo lateral. Além disso, a proteína poderá ser utilizada, eventualmente, para a produção de imunobiológicos.

REFERÊNCIAS

AMARO, Marilane de Oliveira Fani. **Expressão heteróloga da proteína não-estrutural (ns1) do vírus dengue-2 visando a produção de antígenos para kits diagnósticos**. 2013. 52 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biologia Celular e Estrutural, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

ANTUNES, Paula et al. Quantification of NS1 dengue biomarker in serum via optomagnetic nanocluster detection. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.1-10, 5 nov. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/srep16145>.

ANU, Prasannan V. et al. Heterologous Expression, Purification and Characterization of an Oligopeptidase A from the Pathogen *Leptospira interrogans*. **Molecular Biotechnology**, [s.l.], v. 60, n. 4, p.302-309, 3 mar. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12033-018-0073-8>.

BARRIGON, José Manuel; VALERO, Francisco; MONTESINOS, José Luis. A macrokinetic model-based comparative meta-analysis of recombinant protein production by *Pichia pastoris* under AOX1 promoter. **Biotechnology And Bioengineering**, [s.l.], v. 112, n. 6, p.1132-1145, 17 jun. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.25518>.

BOLDESCU, Veaceslav et al. Broad-spectrum agents for flaviviral infections: dengue, Zika and beyond. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s.l.], v. 16, n. 8, p.565-586, 5 maio 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd.2017.33>.

BRAACK, Leo et al. Mosquito-borne arboviruses of African origin: review of key viruses and vectors. *Parasites & Vectors*, [s.l.], v. 11, n. 1, p.1-26, 9 jan. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-017-2559-9>.

BRAULT, Aaron C. et al. A Zika Vaccine Targeting NS1 Protein Protects Immunocompetent Adult Mice in a Lethal Challenge Model. *Scientific Reports*, [s.l.], v. 7, n. 1, p.1-11, 7 nov. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-15039-8>.

BROWN, Terence, A. **Gene cloning and DNA analysis: an introduction**. 6. ed. Manchester: Wiley & Sons, 2010. 336 p.

BROWN, W Clay et al. Extended surface for membrane association in Zika virus NS1 structure. **Nature Structural & Molecular Biology**, [s.l.], v. 23, n. 9, p.865-867, 25 jul. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.3268>.

CAO-LORMEAU, Van-mai et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. **The Lancet**, [s.l.], v. 387, n. 10027, p.1531-1539, abr. 2016. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(16\)00562-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(16)00562-6).

CARLSON, Colin J. et al. Consensus and conflict among ecological forecasts of Zika virus outbreaks in the United States. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.1-15, 21 mar. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-22989-0>.

CREGG, James M. et al. Chapter 13 Expression in the Yeast *Pichia pastoris*. **Methods In Enzymology**, [s.l.], p.169-189, 2009. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s0076-6879\(09\)63013-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0076-6879(09)63013-5).

DAS, Dipankar; MONGKOLAUNGKON, Sunundha; SURESH, Mavanur R.. Super induction of dengue virus NS1 protein in *E. coli*. **Protein Expression And Purification**, [s.l.], v. 66, n. 1, p.66-72, jul. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2009.02.003>.

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**, [s.l.], v. 46, n. 5, p.509-520, set. 1952. Oxford University Press (OUP). [http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(52\)90042-4](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(52)90042-4).

DUGGAL, Nisha K. et al. Frequent Zika Virus Sexual Transmission and Prolonged Viral RNA Shedding in an Immunodeficient Mouse Model. **Cell Reports**, [s.l.], v. 18, n. 7, p.1751-1760, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.056>.

DUGGAL, Nisha K. et al. Sexual transmission of Zika virus enhances in utero transmission in a mouse model. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.1-8, 14 mar. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-22840-6>.

DUONG, Veasna et al. Clinical and Virological Factors Influencing the Performance of a NS1 Antigen-Capture Assay and Potential Use as a Marker of Dengue Disease Severity. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [s.l.], v. 5, n. 7, p.1-10, 19 jul. 2011. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001244>.

EL GHOZZI, Vincent, et al. "ZIKA virus elicits P53 activation and genotoxic stress in human neural progenitors similar to mutations involved in severe forms of genetic microcephaly and p53." *Cell death & disease* 7.10 (2016): e2440.

GANDIER, Julie-anne; MASTER, Emma. *Pichia pastoris* is a Suitable Host for the Heterologous Expression of Predicted Class I and Class II Hydrophobins for Discovery, Study, and Application in Biotechnology. **Microorganisms**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.1-20, 5 jan. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms6010003>.

HASAN, S. Saif et al. Structural biology of Zika virus and other flaviviruses. **Nature Structural & Molecular Biology**, [s.l.], v. 25, n. 1, p.13-20, jan. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/s41594-017-0010-8>.

IIMURA, Yosuke; SONOKI, Tomonori; HABE, Hiroshi. Heterologous expression of *Trametes versicolor* laccase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Protein Expression And Purification**, [s.l.], v. 141, p.39-43, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2017.09.004>.

INVITROGEN. **EasySelect™ Pichia Expression Kit: For Expression of Recombinant Proteins Using pPICZ and pPICZα in *Pichia pastoris***. 2010. Available: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/easyselect_man.pdf>. Access: 01 jun. 2018a.

INVITROGEN. **Pichia Expression Kit: For expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris***. 2014. Available: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/pich_man.pdf>. Access: 10 dez. 2017.

INVITROGEN. **PPICZα A, B, and C: Pichia expression vectors for selection on zeocin™ and purification of secreted, recombinant proteins**. 2010. Available: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/ppiczalpha_man.pdf>. Access: 20 apr. 2018b.

KHETARPAL, Niyati et al. Recombinant Dengue Virus 4 Envelope Glycoprotein Virus-Like Particles Derived from *Pichia pastoris* are Capable of Eliciting Homotypic Domain III-Directed Neutralizing Antibodies. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, [s.l.], v. 96, n. 1, p.126-134, 7 nov. 2016. American Society of Tropical Medicine and Hygiene. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.16-0503>.

MACAULEY-PATRICK, Sue et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, [s.l.], v. 22, n. 4, p.249-270, 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/yea.1208>.

MADZAK, Catherine. Yarrowia lipolytica: recent achievements in heterologous protein expression and pathway engineering. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 99, n. 11, p.4559-4577, 7 maio 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-015-6624-z>.

MANI, Shailendra et al. *Pichia pastoris*-Expressed Dengue 2 Envelope Forms Virus-Like Particles without Pre-Membrane Protein and Induces High Titer Neutralizing Antibodies. **Plos One**, [s.l.], v. 8, n. 5, p.1-10, 23 maio 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0064595>.

Musso D, Gubler DJ. Zika virus. *Clin Microbiol Rev* 29:487–524, 2016. doi:[10.1128/CMR.00072-15](https://doi.org/10.1128/CMR.00072-15).

Pan American Health Organization (PAHO). Tool for the diagnosis and care of patients with suspected arboviral diseases. Washington, D.C. : PAHO; 2017. Available: <http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/33895/9789275119365_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Access: 14 apr 2018d.

Pan American Health Organization / World Health Organization. Timeline of the emergence of Zika virus in the Americas, April 2016. Washington, D.C.: PAHO/WHO; 2016 Pan American Health Organization • www.paho.org • © PAHO/WHO, 2016.

Pan American Health Organization / World Health Organization. Zika suspected and confirmed cases reported by countries and territories in the Americas Cumulative cases, 2015-2017. Updated as of 04 January 2018. Washington, D.C.: PAHO/WHO; 2017; Pan American Health Organization • www.paho.org • © PAHO/WHO, 2017a.

Pan American Health Organization / World Health Organization. Zika suspected and confirmed cases reported by countries and territories in the Americas Cumulative cases, 2015-2017. Updated as of 21 December 2017. Washington, D.C.: PAHO/WHO; 2017; Pan American Health Organization • www.paho.org • © PAHO/WHO, 2017b.

PETITT, Matthew et al. Zika virus infection of first-trimester human placentas: utility of an explant model of replication to evaluate correlates of immune protection ex vivo. **Current Opinion In Virology**, [s.l.], v. 27, p.48-56, dez. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2017.11.008>.

PODDAR, Ankur et al. Virus-like particles derived from *Pichia pastoris*-expressed dengue virus type 1 glycoprotein elicit homotypic virus-neutralizing envelope domain III-directed antibodies. **Bmc Biotechnology**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.1-10, 14 jun. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12896-016-0280-y>.

QUICKE, Kendra m. et al. Zika Virus Infects Human Placental Macrophages. **Cell Host & Microbe**, [s.l.], v. 20, n. 1, p.83-90, jul. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2016.05.015>.

RADHA, Remya; ARUMUGAM, Nagarajan; GUMMADI, Sathyanarayana N.. Glutaminase free I -asparaginase from *Vibrio cholerae*: Heterologous expression, purification and biochemical characterization. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 111, p.129-138, maio 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.165>.

RASTOGI, Meghana; SHARMA, Nikhil; SINGH, Sunit Kumar. Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein. **Virology Journal**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.1-10, 29 jul. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12985-016-0590-7>.

RICCIARDI-JORGE, Taissa et al. Development of a quantitative NS1-capture enzyme-linked immunosorbent assay for early detection of yellow fever virus infection. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.1-9, 24 nov. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-16231-6>.

RUST, Robert S.. Human Arboviral Encephalitis. **Seminars In Pediatric Neurology**, [s.l.], v. 19, n. 3, p.130-151, set. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.spen.2012.03.002>.

SIRONI, Manuela et al. Nonstructural Proteins Are Preferential Positive Selection Targets in Zika Virus and Related Flaviviruses. **Plos Neglected**

Tropical Diseases, [s.l.], v. 10, n. 9, p.1-18, 2 set. 2016. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0004978>.

SONG, Hao et al. Zika virus NS1 structure reveals diversity of electrostatic surfaces among flaviviruses. **Nature Structural & Molecular Biology**, [s.l.], v. 23, n. 5, p.456-458, 18 abr. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.3213>.

TEOH, Boon-teong et al. The Use of NS1 Rapid Diagnostic Test and qRT-PCR to Complement IgM ELISA for Improved Dengue Diagnosis from Single Specimen. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.1-8, 9 jun. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/srep27663>.

TRIPATHI, Lav et al. *Pichia pastoris*-expressed dengue 3 envelope-based virus-like particles elicit predominantly domain III-focused high titer neutralizing antibodies. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 6, p.1-10, 23 set. 2015. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.01005>.

WALDORF, Kristina M Adams et al. Congenital Zika virus infection as a silent pathology with loss of neurogenic output in the fetal brain. **Nature Medicine**, [s.l.], v. 24, n. 3, p.368-374, 5 fev. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.4485>.

WALTER, Lais Takata et al. Evaluation of Possible Consequences of Zika Virus Infection in the Developing Nervous System. **Molecular Neurobiology**, [s.l.], v. 55, n. 2, p.1620-1629, 11 fev. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-017-0442-5>.

WEAVER, Scott C.; REISEN, William K.. Present and future arboviral threats. **Antiviral Research**, [s.l.], v. 85, n. 2, p.328-345, fev. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.10.008>.

WEINER, Iddo et al. Enhancing heterologous expression in *Chlamydomonas reinhardtii* by transcript sequence optimization. **The Plant Journal**, [s.l.], v. 94, n. 1, p.22-31, 12 mar. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/tbj.13836>.

[World Health Organization](http://www.who.int/emergencies/zika-virus/situation-report/26-february-2016/en/) (WHO). 2016. Available: <<http://www.who.int/emergencies/zika-virus/situation-report/26-february-2016/en/>> Acess: 05/09/2018

[World Health Organization](http://www.who.int/emergencies/) (WHO). 2018. Available: <<http://www.who.int/emergencies/>> Acess: 05/09/2018.

XIA, Hongjie et al. An evolutionary NS1 mutation enhances Zika virus evasion of host interferon induction. **Nature Communications**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.1-13, 29 jan. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-02816-2>.

XISTO, Mariana Fonseca. **Expressão heteróloga da proteína não-estrutural 1 (ns1) do vírus dengue-2 em *Arabidopsis thaliana***. 2015. 41 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Celular e Estrutural, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.