

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

FABIANA MARTINS COSTA FONTES

**CLONAGEM DA SEQUÊNCIA DA POLIPROTEÍNA ESTRUTURAL DO
VÍRUS MAYARO PARA PRODUÇÃO DE *VIRUS-LIKE PARTICLES* EM
*Komagataella phaffii***

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

FABIANA MARTINS COSTA FONTES

**CLONAGEM DA SEQUÊNCIA DA POLIPROTEÍNA ESTRUTURAL DO
VÍRUS MAYARO PARA PRODUÇÃO DE *VIRUS-LIKE PARTICLES* EM
*Komagataella phaffii***

Relatório final, apresentado à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências para a obtenção do
título de Bacharel em Biologia.

Orientador: Sérgio Oliveira de Paula

VIÇOSA - MINAS GERAIS

2025

FABIANA MARTINS COSTA FONTES


**CLONAGEM DA SEQUÊNCIA DA POLIPROTEÍNA ESTRUTURAL DO
VÍRUS MAYARO PARA PRODUÇÃO DE *VIRUS-LIKE PARTICLES* EM
*Komagataella phaffii***

Relatório final, apresentado à Universidade Federal de
Viçosa, como parte das exigências para a obtenção do
título de Bacharel em Biologia.


Orientador: Sérgio Oliveira de Paula

APROVADA: 20 de janeiro de 2025

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 **SERGIO OLIVEIRA DE PAULA**
Data: 27/01/2025 16:30:57-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Dr. Sérgio Oliveira de Paula – Orientador
(UFV)**

Documento assinado digitalmente
 **FABIANA MARTINS COSTA FONTES**
Data: 25/01/2025 18:42:07-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Fabiana Martins Costa Fontes – Orientada
(UFV)**

Dedico esse trabalho os meus
pais Fernando do Carmo Fontes
e Soraia Martins Costa Fontes.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Sérgio Oliveira de Paula pela orientação, acolhimento, ensinamentos e suporte ao longo desses anos de graduação.

À querida Dra. Luciana de Souza Fernandes que fez o possível e o impossível para me auxiliar e coorientar durante o desenvolvimento deste trabalho. Em meio a todos os desafios que envolvem fazer pesquisa e ciência no Brasil, a Luciana foi um raio de luz em minha vida sempre muito paciente e atenciosa. Seu suporte e amizade foram imprescindíveis para que eu chegasse até aqui e serei eternamente grata por todo apoio.

À Camilla que me acolheu e ajudou no começo dessa aventura chamada “fazer ciência”.

Aos meus amigos do Laboratório de Imunovirologia Molecular (LIVM), Flávia, Adrielle, José, Thalya, Pedro, Arthur, Paloma e Carlos por toda ajuda na pesquisa e pelos momentos de descontração.

Ao Dr. Roberto Sousa Dias pelas sugestões e auxílio ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais, Fernando e Soraia, por todo suporte, amor e confiança ao longo desses anos de graduação. Vocês foram as pessoas que sempre me incentivaram a seguir o caminho da educação, que me mostraram como os estudos podem transformar vidas e sem esse apoio que não seria capaz de chegar até aqui.

Ao meu irmão Igor, que esteve ao meu lado nos momentos difíceis e sempre me ajudou em tudo que pode.

Ao meu namorado João Victor, por todo carinho, atenção, assistência, paciência durante a pesquisa e escrita deste trabalho.

Aos meus amigos de curso que se fizeram presentes e me apoiaram.

Ao Departamento de Biologia Geral e ao Departamento de Microbiologia.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de iniciação científica, que foi de extrema ajuda para minha manutenção na graduação.

A mim mesma por não ter desistido, apesar de todas as adversidades.

A todos que de certa forma me auxiliaram durante toda a graduação.

Deixo aqui os meus mais sinceros agradecimentos.

“Eu faço da minha dificuldade a minha motivação. A volta por cima vem na continuação”. (Charlie Brown Jr)

RESUMO

O vírus Mayaro (MAYV) é um arbovírus emergente pertencente à família *Togaviridae* e gênero *Alphavirus* e causador da febre Mayaro em humanos. A doença é caracterizada por febre aguda, dores articulares e musculares, vômito e diarreia. Os sintomas possuem uma alta similaridade com outras arboviroses, o que afeta o diagnóstico correto da doença. No Brasil, é endêmico na região Norte onde causa surtos pontuais. Seu principal vetor é o mosquito *Haemagogus janthinomys*, restrito ao ciclo silvestre, porém já foi observado que espécies adaptadas ao ciclo urbano, como mosquitos do gênero *Aedes*, apresentam capacidade vetorial para transmitir o vírus. Esse fato gera uma grande preocupação visto que são vetores urbanizados e circulam em áreas com alta densidade populacional. Outras questões também se tornam pertinentes na dispersão viral como a intensa globalização, o aumento de desmatamentos e consequentemente as rápidas mudanças climáticas. Além disso, até o momento, não há vacinas disponíveis para o vírus Mayaro, deixando a população exposta devido à ausência de imunidade prévia. Logo, o MAYV possui um alto potencial de emergência, e risco de epidemias. Este cenário reforça a necessidade do desenvolvimento de alternativas ao combate ao vírus que visem a proteção da população. As *virus-like particles* (VLPs) são estruturas que mimetizam a conformação do vírus sem conter seu material genético, se mostrando uma opção segura para aplicação médica. Neste sentido, a proposta deste trabalho foi realizar a clonagem da sequência da poliproteína estrutural de MAYV em vetor de expressão pPICZ α A em *Komagataella phaffii* para produção de VLPs para fins terapêuticos. Foi realizada a construção do plasmídeo pPICZ α A/E-MAYV contendo a sequência codificadora da poliproteína estrutural (C, E1, E2, E3 e 6k) de MAYV. A transformação do plasmídeo foi feita em *Escherichia coli* e sua confirmação através de uma reação da polimerase em cadeia. Após a confirmação, o DNA plasmidial foi extraído por lise alcalina e quantificado por leitura da absorbância. O plasmídeo extraído foi linearizado em reação de digestão e utilizado para transformação de *K. phaffii* KM71H. Observou-se a transformação em *E. coli* TOP10F via PCR e a confirmação da extração do DNA plasmidial. Não foram observados clones transformantes de *K. phaffii* KM71H. A partir disso, foi feito um novo design de plasmídeo contendo apenas a proteína E2, mas não foi observado colônias transformantes de *E. coli*.

Palavras-chave: vírus Mayaro, *Virus-like particles*, *Komagataella phaffii*, plasmídeo.

ABSTRACT

Mayaro virus (MAYV) is an emerging arbovirus belonging to the family *Togaviridae* and genus *Alphavirus* and causes Mayaro fever in humans. The disease is characterized by acute fever, joint and muscle pain, vomiting and diarrhea. The symptoms are very similar to those of other arboviruses, which affects the correct diagnosis of the disease. In Brazil, it is endemic in the northern region where it causes occasional outbreaks. Its main vector is the *Haemagogus janthinomys* mosquito, restricted to the wild cycle, but it has been observed that species adapted to the urban cycle, such as mosquitoes of the *Aedes* genus, have the vectorial capacity to transmit the virus. This is a major concern given that they are urbanized vectors and circulate in areas with high population density. Other issues are also relevant to viral dispersal, such as intense globalization, increased deforestation and, consequently, rapid climate change. In addition, to date, there are no vaccines available for the Mayaro virus, leaving the population exposed due to the lack of prior immunity. MAYV therefore has a high potential for emergence and the risk of epidemics. This scenario reinforces the need to develop alternatives to combat the virus in order to protect the population. Virus-like particles (VLPs) are structures that mimic the conformation of the virus without containing its genetic material, proving to be a safe option for medical application. The aim of this study was to clone the MAYV structural polyprotein sequence into the pPICZ α A expression vector in *Komagataella phaffii* in order to produce VLPs for therapeutic purposes. The pPICZ α A/E-MAYV plasmid containing the structural polyprotein coding sequence (C, E1, E2, E3 and 6k) of MAYV was constructed. The plasmid was transformed into *Escherichia coli* and confirmed by polymerase chain reaction. After confirmation, the plasmid DNA was extracted by alkaline lysis and quantified by reading the absorbance. The extracted plasmid was linearized in a digestion reaction and used to transform *K. phaffii* KM71H. Transformation was observed in *E. coli* TOP10F via PCR and confirmation of plasmid DNA extraction. No transformant clones of *K. phaffii* KM71H were observed. From this, a new plasmid design containing only the E2 protein was made, but no transforming *E. coli* colonies were observed.

Keywords: Mayaro virus, Virus-like particles, *Komagataella phaffii*, plasmid.

Lista de figuras

Figura 1 - Estrutura e representação esquemática do genoma do MAYV.....	13
Figura 2 - Vetor de expressão pPICZ α	22
Figura 3 – Mapa plasmídeo pPICZ α A_MAYV_E2.....	28
Figura 4 – Mapa plasmídeo pPICZ α A/E-MAYV.....	30
Figura 5 - Confirmação da PCR das células transformantes de <i>E coli</i> TOP10F.....	31
Figura 6 - Confirmação da digestão do DNA plasmidial bacteriano extraído.....	33
Figura 7 - Colônias de <i>K. phaffii</i> KM71H em meio seletivo suplementado com Zeocina	33
Figura 8 - Confirmação da PCR da sequência codificante para a proteína E2.....	36

Lista de tabelas

Tabela 1 - Sequências de *primers* senso e antissenso AOX1 para PCR.....24

Tabela 2 - Sequências de *primers* senso e antissenso para proteína E2.....27

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 CONTEXTUALIZAÇÃO	13
2.1 Mayaro vírus.....	13
2.2 <i>Virus-like particles</i>	16
2.3 <i>Komagataella phaffii</i>	17
3 OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo geral.....	20
3.2 Objetivo específico.....	20
4 MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1 Obtenção do plasmídeo pPICZαA/E-MAYV	21
4.2 Transformação da bactéria <i>Escherichia coli</i> TOP10F	22
4.2.1 Preparo de <i>E. coli</i> TOP10F eletrocompetentes.....	22
4.2.2 Transformação do plasmídeo pPICZ α A/E-MAYV em <i>E. coli</i> TOP10F.....	23
4.3 Extração de DNA plasmidial bacteriano	23
4.4 Confirmação da transformação em <i>E. coli</i>	24
4.5 Reação de digestão do plasmídeo pPICZαA/E-MAYV	25
4.6 Dessalinização do DNA plasmidial linearizado	25
4.7 Transformação de <i>K. phaffii</i> KM71H	25
4.7.1 Preparo das células de <i>Komagataella phaffii</i> KM71H para transformação.....	25
4.7.2 Transformação de <i>K. phaffii</i> KM71H via eletroporação.....	26
4.7.3 Extração do DNA genômico de <i>K. phaffii</i>	26
4.7.4 Confirmação da transformação em <i>K. phaffii</i>	27
4.8 Construção do novo plasmídeo pPICZαA_MAYV_E2	27
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1 Construção do plasmídeo pPICZαA/E-MAYV	29
5.2 Confirmação da transformação via eletroporação em <i>E. coli</i> TOP10F	30
5.3 Confirmação da reação de digestão do plasmídeo usando a enzima de restrição <i>SacI</i>	32
5.4 Confirmação da transformação via eletroporação em <i>K. phaffii</i> KM71H	33
5.5 Confirmação da clonagem do novo plasmídeo pPICZαA_MAYV_E2	35
6 CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

Países da América Latina, principalmente o Brasil, vem enfrentando sérios surtos de arboviroses causando grande preocupação na saúde pública (Cabezas *et al.*, 2024). A expectativa é que essas infecções arbovirais se espalhem globalmente com muita facilidade em função da expansão de mosquitos vetores, devido à alta globalização e rápidas mudanças climáticas (Diagne *et al.*, 2020). O vírus Mayaro (MAYV; família *Togaviridae*; gênero *Alphavirus*) foi isolado pela primeira vez em 1954 em Trinidad e Tobago por análise sorológica de trabalhadores de áreas florestais (Wei *et al.*, 2024). É o agente etiológico da febre Mayaro, uma doença endêmica em áreas florestais, mas que possui capacidade de se estabelecer em regiões urbanizadas (Caicedo *et al.*, 2021).

O quadro clínico da doença não é específico e apresenta similaridades com outras arboviroses, como a dengue, chikungunya e febre zika. (Ganjian *et al.*, 2020). Assim, existe uma problemática no diagnóstico da doença promovendo uma subnotificação de casos que impede a análise da real magnitude da febre Mayaro nos países (Gonzalez-Escobar *et al.*, 2021). O MAYV tem como principais vetores os mosquitos hematófagos, principalmente os restritos a um ciclo silvestre. Dessa forma, sua transmissão é limitada a áreas rurais próximas a florestas, tendo como reservatórios primatas não-humanos, roedores, pássaros e até répteis (Esposito *et al.*, 2017). Porém, já foi identificado que mosquitos adaptados ao ciclo urbano possuem competência vetorial para transmissão do vírus (Pereira *et al.*, 2020). Logo, aumenta-se a chance de futuras epidemias da febre Mayaro em centros urbanizados da América Latina.

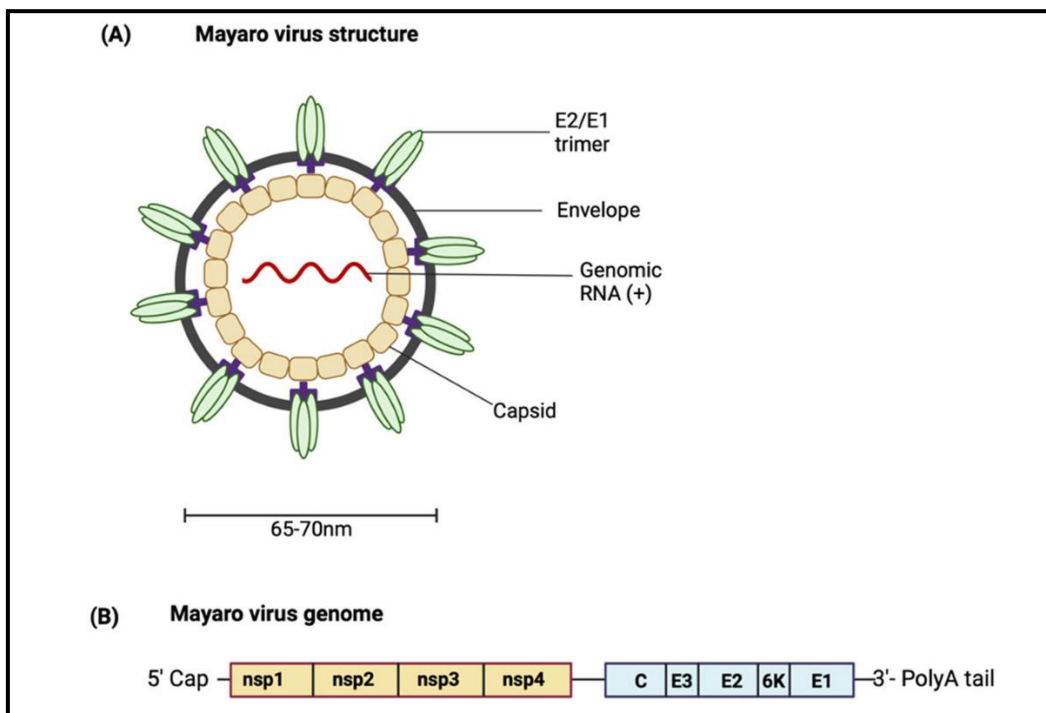
O Brasil apresenta o maior número de ocorrência de MAYV em toda a América Latina, com alta concentração do vírus no Centro-Oeste e Norte do país (Celone *et al.*, 2023). Além disso, por ser uma doença negligenciada, os casos de infecção podem ser subnotificados. Até o momento não existem vacinas ou tratamentos específicos disponíveis para MAYV. Neste contexto, o desenvolvimento de novas estratégias para a prevenção a infecção causada pelo vírus Mayaro é de extrema urgência, tendo em vista seu caráter emergente.

2 CONTEXTUALIZAÇÃO

2.1 *Vírus Mayaro*

O Mayaro (MAYV) é um vírus envelopado, icosaédrico, com genoma de RNA fita simples, sentido positivo com tamanho de aproximadamente 11,5 kb, como demonstrado na figura 1. Seu genoma é dividido em duas ORFs (*open-reading frames*): a primeira codifica uma poliproteína não estrutural, clivada posteriormente em quatro proteínas não estruturais (NSPs) nsp1 (capeamento de mRNA e ancoragem de complexos da replicação), nsp2 (replicação do RNA e clivagem da poliproteína não estrutural), nsp3 (replicação do RNA) e nsp4 (replicação viral). A segunda ORF codifica a poliproteína estrutural que ao ser processada produz as proteínas estruturais do vírus, a proteína do capsídeo (C), a glicoproteína de envelope E1 envolvida na fusão de membrana, a glicoproteína de envelope E2 relacionada a ligação ao receptor da célula hospedeira, a proteína E3 na qual a função ainda não foi bem elucidada e a proteína 6K responsável pela permeabilidade de membrana (Chen *et al.*, 2018). As glicoproteínas de envelope, E1 e E2, são relevantes para imunologia pois formam trímeros heterodiméricos na superfície viral que são capazes de induzir a geração de anticorpos neutralizantes (Wei *et al.*, 2024).

Figura 1- Estrutura e representação esquemática do genoma do MAYV.



Fonte – Adaptado de Wei, 2024, p. 2.

O MAYV é um arbovírus emergente transmitido por artrópodes pertencente à família *Togaviridae* e gênero *Alphavirus* (Wei *et al.*, 2024). Os alfavírus possuem importância médica e veterinária e apresentam similaridades filogenéticas e sorológicas, onde compartilham sítios antigênicos que podem ocasionar reatividade cruzada em análises de sorologia. Esse grupo sorológico é conhecido como Semliki e é composto por oito vírus: Mayaro, Bebaru, Getah, Chikungunya, Ross River, Una, Semliki Forest e O'nyong-nyong (Cao *et al.*, 2023). Estudos filogenéticos demonstraram a presença de dois genótipos circulantes em solo brasileiro, D e L. O genótipo D está presente em diversos países da América do Sul (Trinidad, Brasil, Peru, Guiana Francesa, Suriname, Venezuela e Bolívia), enquanto o genótipo L foi detectado apenas no Brasil e Haiti. (Marinho *et al.*, 2024).

Seu principal vetor é o mosquito hematófago *Haemagogus janthinomys*, o mesmo do vírus da febre amarela, endêmico da região amazônica. Este mosquito possui ciclo silvestre e vive próximo as copas das árvores, tendo como reservatório uma gama de mamíferos, como primatas não-humanos, pássaros e pequenos roedores, mas que eventualmente podem picar seres humanos (Pereira *et al.*, 2020). Porém, já existem registros de mosquitos antropofílicos e adaptados ao ciclo urbano envolvidos na transmissão do MAYV, como *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* e *Culex quinquefasciatus* que podem contribuir para o aumento de surtos da febre do Mayaro na América Latina (Constantin *et al.*, 2020).

Isolado pela primeira vez em Trinidad e Tobago, em 1954, a infecção por este vírus pode causar a febre do Mayaro (Da Silva *et al.*, 2024). Esta doença é caracterizada por sintomas como febre alta, calafrios, vômitos, dor ocular, artralgia e mialgia. A fase aguda da doença pode durar de três a cinco dias para a maioria dos pacientes. No entanto, em alguns casos, a doença pode evoluir para a fase crônica, na qual um quadro de artralgia e mialgia pode se estender por até 12 meses, tornando a febre do Mayaro mais debilitante do que outras arboviroses, como a febre chikungunya que apresenta sintomas, por exemplo, com duração de uma a três semanas. Há também a possibilidade de ocorrer complicações mais agravantes em idosos, crianças e neonatos em função da infecção por MAYV, como miocardite, hemorragias e sequelas neurológicas (Bengue *et al.*, 2021).

Apesar de apresentar uma baixa taxa de mortalidade a infecção pode causar limitações físicas que tornam o paciente temporariamente incapaz. Assim, uma epidemia de febre do Mayaro além de impactar o sistema de saúde traz prejuízos econômicos. Somado a isso, grande parte da população nunca teve contato com o vírus e não apresenta memória imunológica. Portanto, o MAYV representa uma preocupação relevante para a saúde pública (Fischer *et al.*, 2020). Além disso, a febre do Mayaro apresenta sintomas similares a outras infecções por

arbovírus, como dengue e chikungunya, provocando uma subnotificação de casos e a ausência de estimativas precisas da real circulação do MAYV na sociedade (Caicedo *et al.*, 2021).

Apesar de diversos casos em toda a América Latina, o Brasil é o país que apresenta o maior número de casos de infecção por MAYV (1.206 casos confirmados), com alta concentração na região Norte e Centro-Oeste sendo os estados do Amazonas, Pará, Goiás com os maiores índices de distribuição do MAYV (Celone *et al.*, 2024). É possível notar que são essas áreas as mais afetadas pelo desmatamento e expansão agropecuária descontrolada (Lorenz *et al.*, 2019). Dessa forma, as rápidas mudanças climáticas provocadas por essas ações antrópicas são um fator chave para rápida disseminação do MAYV. Apesar da maioria dos casos serem recorrentes em áreas florestadas e/ou rurais, há também a ocorrência de casos autóctones em outros estados como Mato Grosso do Sul (3) e Rio de Janeiro (3) (Lima *et al.*, 2021).

Quanto ao ciclo de replicação do MAYV, ainda há poucos estudos desenvolvidos. Porém, é possível obter informações com base no ciclo viral de outros alfavírus (Andreolla *et al.*, 2022). Acredita-se que o ciclo replicativo do MAYV se inicia com a fusão do envelope viral com a membrana plasmática de células-alvo humanas. Sugere-se que a entrada do vírus Mayaro na célula é realizada por endocitose mediada pela ligação da glicoproteína transmembrana E2 a receptores da célula hospedeira, como a molécula de adesão Mxra8 (Zhang *et al.*, 2018). Ao entrar na célula, o vírus se encontra em um endossomo que quando presente no citoplasma tem seu pH reduzido, levando ao desmonte da estrutura viral e liberação do RNA genômico. Após, o RNA é imediatamente traduzido em proteínas não estruturais que geram o RNA mensageiro e as proteínas estruturais. Por fim, forma-se o nucleocapsídeo com suas glicoproteínas de envelope, que ao interagir com a membrana plasmática da célula hospedeira há a liberação de novas partículas virais por brotamento (Diagne *et al.*, 2020).

Os testes sorológicos usados para detecção dos vírus não são de fácil acesso, principalmente nas regiões mais endêmicas, tendo em vista suas localizações mais distantes e a falta de laboratórios especializados nos locais (Wei *et al.*, 2024). Somado a isso, testes rápidos apresentam uma alta taxa de falsos-positivos dado sua reatividade cruzada com outros arbovírus. Dessa forma, há uma carência nesse setor da saúde que precisa ser resolvida. Ensaio moleculares apresentam resultados mais confiáveis para detecção do vírus Mayaro. A técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real com transcrição reversa (RT-qPCR) é altamente específico e sensível para detecção molecular do MAYV e é considerado teste padrão ouro (Naveca *et al.*, 2017).

O tratamento usado para a febre do Mayaro se limita a medidas paliativas, já que não existem opções específicas para o MAYV. Em função de sua similaridade antigênica com outros arbovírus, medicamentos utilizados no tratamento da febre Chikungunya, por exemplo, podem ser aplicados para remediar as manifestações febris (Fernandes *et al.*, 2021). Entretanto, diversos estudos vêm sendo desenvolvidos para criação de uma vacina. Abbo e colaboradores (2023) desenvolveram um estudo sobre a eficácia comparativa entre vacinas de VLPs do vírus Mayaro geradas em células de mamífero e inseto. Demonstrou-se que ambas as vacinas geraram proteção, mas as que continham VLPs geradas em células de mamíferos induziram uma produção maior de anticorpos do que as de insetos. A AdV-MAYV é uma outra plataforma vacinal em estágio de desenvolvimento formada pela poliproteína estrutural viral gerada a partir do adenovírus humano V (AdV) não replicante (Powers *et al.*, 2021). A candidata vacinal foi capaz de gerar anticorpos neutralizantes em camundongos infectados com MAYV. Logo, faz-se necessário o desenvolvimento de um vacina específica e novos kits diagnósticos para o combate ao vírus, tendo em vista que a febre do Mayaro é uma doença subnotificada e negligenciada dado sua maior incidência em regiões tropicais.

2.2 *Virus-like particles*

Virus-like particles (VLPs) são estruturas multiproteicas que simulam a conformação de um vírus nativo, mas não capazes de se replicar. São partículas capazes de serem induzidas em laboratório e podem ser constituídas por um único tipo ou a mescla de diferentes proteínas, formando as VLPs quiméricas (Srivastava *et al.*, 2023). Por apresentarem características morfológicas muito semelhantes ao vírus original e não conterem o material genético viral, as VLPs se mostram uma alternativa mais segura para o desenvolvimento de novas vacinas, principalmente quando se trata da imunização de pessoas imunocomprometidas. Sua estrutura permite a apresentação de antígenos de uma forma repetitiva e multivalente fazendo com que haja uma forte ativação da resposta imune celular e humoral (Qian *et al.*, 2020). Além disso, seu tamanho reduzido (20-100 nm) permite uma difusão facilitada por vasos linfáticos até a área dos linfonodos, onde serão reconhecidas por células dendríticas e macrófagos (Mohsen *et al.*, 2017).

As VLPs apresentam uma alta diversidade estrutural e podem ser identificadas e agrupadas taxonomicamente pela classificação de Baltimore – sistema que classifica os vírus em sete grupos distintos de acordo com o tipo de ácido nucleico e a forma como o genoma é transcrito (Koonin *et al.*, 2021). Há também a classificação conforme a complexidade estrutural

das VLPs, podendo ser mono ou multicamadas; se são encapsuladas ou não pelo envelope viral; e virossomas que consistem em proteínas embutidas no interior de um envelope de bicamada lipídica (Donaldson *et al.*, 2018).

A característica não infecciosa dessas partículas vem atraindo cada vez mais o mercado. Diversos estudos estão sendo desenvolvidos sobre a aplicação de VLPs como fator chave na imunização (Bhat *et al.*, 2022). Já existe uma variedade de vacinas de VLPs disponíveis comercialmente como Recombivax HB™ (Merck) para Hepatite B, Hecolin™ (Xiamen Innovax Biotech) para Hepatite E, Mosquirix™ (Glaxo-SmithKline Inc) para Malária, Cervarix™ (Glaxo-SmithKline Inc) para HPV e NanoGripe™ para gripe sazonal (Novavax) (Nooraei *et al.*, 2021).

Além disso, o custo-benefício na produção destas partículas é um fator muito atrativo quando comparado às alternativas disponíveis. Podem ser produzidas em laboratórios com nível 2 de biossegurança, possuem um tempo menor de confecção quando comparada a vacinas de vírus atenuados que demandam o cultivo, inativação e controle de segurança mais rígidos, apresentam um amplo arcabouço de sistemas de expressão e demonstram capacidade de induzir uma forte resposta imune. Somado a isso, é possível produzi-las em larga escala através de biorreatores (Raji *et al.*, 2024).

Assim, diante deste cenário pós-pandemia, faz-se necessário desenvolver estratégias efetivas diante de novas ameaças à saúde humana (Hassine *et al.*, 2023). Tendo em vista o caráter emergente do vírus Mayaro, a produção de VLPs a partir de suas proteínas estruturais, para aplicação em uma vacina, apresentam uma possibilidade de enfrentamento à doença.

2.3 *Komagataella phaffii*

Existe uma grande variedade de sistemas de expressão para produção de antígenos como candidatos vacinais, incluindo VLPs. Podem ser empregadas leveduras, bactérias, células de inseto e mamíferos. Dentre as possibilidades citadas, as leveduras apresentam alto potencial de expressão heteróloga de proteínas e são fortemente empregadas para produção de produtos biotecnológicos, devido a sua facilidade de cultivo, com expressão de proteínas em tempo menor que outros sistemas, capacidade de escalonamento de produção, permitindo o barateamento do processo. Esses organismos eucariotos permitem que genes exógenos sejam incorporados ao seu genoma de uma forma eficiente através de recombinação homóloga. Assim, geram linhagens estáveis com expressão contínua de proteína (Ata *et al.*, 2021).

Além disso, as leveduras aplicadas em processos biotecnológicos voltados para a área da saúde são humanizadas e adicionam modificações co e pós-traducionais às proteínas com o mesmo padrão de mamíferos (Schütz *et al.*, 2023). Estas alterações se dão pela incorporação de grupos químicos que favorecem o dobramento, estabilidade e solubilidade as proteínas produzidas. Dentre as modificações mais frequentes, temos a fosforilação, acetilação, metilação, glicosilação, ubiquitinação, dentre outras (Walsh *et al.*, 2005).

A levedura *Komagataella phaffii* (anteriormente classificada como *Pichia pastoris*) é usada há décadas como sistema de expressão de proteínas recombinantes, assim como *Saccharomyces cerevisiae*. Inicialmente, foi usada para produção de proteína adicionada em ração animal e posteriormente, quase 10 anos depois, a Philips Petroleum juntamente com o Salt Institute Biotechnology/Industry Associates, Inc. (SIBIA) confeccionou a *K. phaffii* como sistema de expressão de genes heterólogos. Atualmente, essa levedura é considerada como Geralmente Reconhecido como seguro (GRAS) pela Food and Drug Administration (FDA) (Vijayakumar *et al.*, 2023).

A produção de albumina sérica humana, enzimas industriais como xilanases e lipases, insulina e moléculas para fins cosméticos se dá pelo método de expressão de *K. phaffii* (Unver *et al.*, 2024). Além das características citadas acima, *K. phaffii* é muito utilizada para o design vacinal devido sua capacidade de adicionar modificações pós-traducionais (N e O-glicosilação) as proteínas (Infant *et al.*, 2021). Outro fator relevante para sua escolha como sistema de expressão é a presença de um sistema refinado de reparo e controle que age corrigindo as proteínas mal-dobradas, garantindo sua qualidade. Ademais, *K. phaffii* é capaz de secretar as proteínas expressas no sobrenadante do meio de cultura usado para indução, o que torna o processo de purificação mais fácil (Karbalaie *et al.*, 2020).

K. phaffii é uma levedura metilotrófica, ou seja, metaboliza o metanol como fonte principal de carbono e energia durante a indução da expressão proteica. O controle da expressão é feito pelo promotor do gene da enzima álcool oxidase 1 (AOX1). Esta enzima, codificada pelos genes *AOX1* e *AOX2*, fica confinada no peroxissomo e degrada o metanol gerando dois subprodutos, formaldeído e peróxido de hidrogênio (Schjoldager *et al.*, 2020). O gene *AOX1* contribui majoritariamente para a produção da enzima, enquanto *AOX2* possui uma expressão menor na célula. O promotor é fortemente induzível na presença de metanol e reprimido na de glicose ou glicerol. Logo, é amplamente usado na indústria para expressão gênica (Barone *et al.*, 2023).

A manipulação dos genes codificantes para a álcool oxidase permite a obtenção de diferentes fenótipos. A linhagem Mut^s (*Methanol utilization slow*) possui apenas o gene *AOX2*,

o que resulta em uma metabolização mais lenta do metanol e, conseqüentemente, em um crescimento reduzido. A linhagem de *K. phaffii* KM71H é um exemplo de mutante Mut^s, caracterizada por um crescimento menor e elevada capacidade de produzir proteínas recombinantes em alta concentração (Invitrogen, 2010). Em contrapartida, existe a linhagem contendo apenas o gene *AOX1*, Mut⁺ (*Methanol utilization plus*) que cresce rapidamente na presença de metanol. Um exemplo é a cepa GS115 (Karbalaei *et al.*, 2020). Por fim, há também a linhagem Mut⁻ onde ambos os genes são deletados, impossibilitando o crescimento em metanol. Essa característica permite um controle mais refinado da expressão heteróloga, tendo em vista que os vetores de expressão utilizados costumam conter o promotor *AOX1*.

Além da produção de inúmeras biomoléculas, como suplementos alimentares, anticorpos, fármacos e fatores de crescimento, há o uso dessa espécie para a produção de VLPs para fins terapêuticos. Já existe um embasamento e aplicação satisfatório dessa levedura como sistema de expressão de VLPs e vacinas, como a Heberbiovac-HB, Enivac-HB e Revac-B para o vírus da Hepatite B, são alguns exemplos (Karbalaei *et al.*, 2020). Assim, *K. phaffii* se demonstra um bom sistema de expressão de proteínas recombinantes para fins terapêuticos e este projeto propõe o uso desta levedura como plataforma de expressão de VLPs de MAYV para aplicação em um candidato vacinal.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Clonar a sequência da poliproteína estrutural de MAYV em vetor de expressão pPICZ α A para produção de VLPs recombinantes utilizando o sistema de expressão eucarioto *Komagataella phaffii*.

3.2 Objetivos Específicos

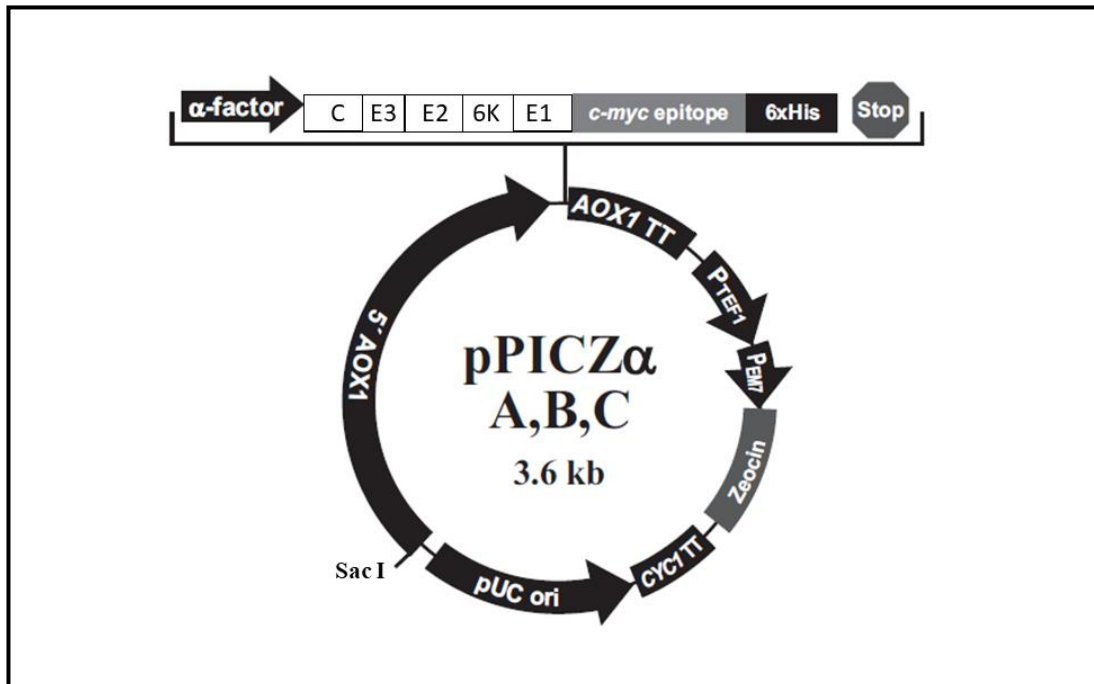
- Transformar o vetor pPICZ α A contendo o gene codificante para poliproteína estrutural do MAYV em *Escherichia coli* TOP10F;
- Extrair o DNA plasmidial bacteriano das células transformadas e confirmar a clonagem via PCR;
- Transformar o vetor pPICZ α A contendo o gene codificante para a poliproteína estrutural do MAYV em *Komagataella phaffii* KM71H;
- Expressar a poliproteína estrutural e formar VLPs em levedura *K. phaffii*;
- Caracterizar a poliproteína estrutural por *Western blot*;
- Construir um novo plasmídeo contendo apenas a sequência da glicoproteína de envelope E2;
- Amplificar a sequência da proteína E2 utilizando o plasmídeo adquirido;
- Inserir a sequência de E2 em um novo plasmídeo pPICZ α A.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção do plasmídeo pPICZ α A/E-MAYV

O plasmídeo foi sintetizado pela empresa GenOne e nomeado como pPICZ α A/E-MAYV. A sequência codificante para a poliproteína estrutural do vírus Mayaro foi selecionada através da *National Center for Biotechnology Information* (NCBI: NC_003417.1) e códon genético otimizado para expressão em *K. phaffii*. A sequência foi inserida em vetor de expressão pPICZ α A (Invitrogen). O plasmídeo foi sintetizado para conter a sequência codificante para as proteínas estruturais C, E1, E2, E3 e 6k, com 4.256 pares de base (pb).

O vetor pPICZ α A apresenta um tamanho de 3.538 pb e é formado por: promotor AOX1 para expressão a enzima álcool oxidase para metabolização do metanol; sinal de secreção, fator α , da levedura *Saccharomyces cerevisiae* que permite o endereçamento extra celular das proteínas geradas; sítio múltiplo de clonagem onde foi inserido os genes de interesse; um sítio de restrição da enzima *Sac I* para a linearização do plasmídeo; a cauda de histidina para purificação das proteínas e imunodeteção via *Western blot*; os promotores PTFE1 e PEM7 capazes de codificar genes que conferem resistência a antibiótico, gene *Sh ble* que confere resistência ao antibiótico Zeocina em bactérias e leveduras; e a origem de replicação que permite que o plasmídeo se replique em *E. coli*. No total, somando o tamanho da região codificante com o tamanho do vetor, o plasmídeo possui 7.264 pb. Para a aplicação nos experimentos, o plasmídeo liofilizado foi centrifugado a 12.000 rpm, por 5 minutos e ressuspenso em 20 μ L de água destilada estéril, e incubado em banho-maria a 50 °C por 15 minutos. Em seguida, foi feita uma nova centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos e o plasmídeo foi armazenado a -20 °C.

Figura 2 - Vetor de expressão pPICZ α 

Fonte – Invitrogen, 2010. Adaptado pelo autor.

4.2 Transformação da bactéria *Escherichia coli* TOP10F

4.2.1 Preparo de *E. coli* TOP10F eletrocompetentes

Para a transformação, foi necessário tornar as células de *E. coli* TOP10F competentes, ou seja, capazes de receber o plasmídeo exógeno. Para isso, 100 μ L de células bacterianas foram adicionadas em 5 mL de meio Luria-Bertani (LB) (1% de peptona, 0,5% de extrato de levedura e 1% de NaCl) sob agitação a 180 rpm, 37 °C, *overnight*. Em seguida, 3 mL da cultura foram transferidos para 300 mL do meio LB sem antibiótico e o crescimento celular foi acompanhado ao longo do tempo por leitura da densidade óptica (DO) em 600nm. Ao atingir a DO requerida, entre 0,2 e 0,3, a cultura foi resfriada por 30 minutos para interromper o crescimento bacteriano e em seguida centrifugada a 4000 rpm, por 20 minutos, a 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células formado passou por quatro lavagens sucessivas com glicerol a 10% gelado. Ao final, o *pellet* foi ressuscitado em 1 mL de glicerol 10% e estocado em alíquotas de 100 μ L a -80 °C.

4.2.2 Transformação do plasmídeo pPICZαA/E-MAYV em *E. coli* TOP10F

Foi realizada a transformação via eletroporação em *E. coli* TOP10F para clonagem do DNA plasmidial. Esse processo teve como objetivo aumentar a quantidade de plasmídeo recombinante em estoque. Assim, DNA plasmidial (1-10 ng/μL) foi incubado com 100 μL de *E. coli* eletrocompetente em gelo por 10 minutos em cubeta de eletroporação (2 mm). Após o tempo de incubação, as células foram submetidas ao choque elétrico via eletroporador (Voltagem: 2500 V; Capacitância: 25 μF; Resistência: 200 Ω). Imediatamente após o pulso, foi adicionado 1 mL de meio LB *low salt* (1% Peptona, 0,5% Extrato de Levedura e 0,5% NaCl) sem antibiótico nas cubetas de eletroporação e as células foram incubadas a 37 °C por 2 horas. Para seleção dos transformantes, as células foram plaqueadas em meio LB *low salt* sólido (1% Peptona, 0,5% Extrato de Levedura, 0,5% NaCl e 1,5% Ágar) suplementado com o antibiótico Zeocina (40 μg/mL) e incubadas a 37 °C, *overnight*. As colônias transformantes foram coletadas e adicionadas em meio LB *low salt* líquido suplementado com Zeocina (40 μg/mL), e incubadas a 37 °C, a 180 rpm, *overnight*. Foram feitas alíquotas em glicerol 20% e armazenados a -80 °C, para estoque.

4.3 Extração de DNA plasmidial bacteriano

Logo após a transformação, foi realizada extração do DNA plasmidial pelo método de lise alcalina (Sambrook; Russell, 2001). Para a primeira etapa do protocolo, foram adicionados 100 μL dos clones estocados em 10 mL de meio LB *low salt* acrescido com 4 μL de Zeocina (40 μg/mL) e incubado a 37 °C, sob agitação de 180 rpm, *overnight*. No dia seguinte, a cultura foi centrifugada em microtubos a 10.000 rpm por 5 minutos para formação de *pellet*. Em seguida, o *pellet* foi ressuspensionado, homogeneizado em 200 μL de Solução I (Glicose 50 mM, Tris-HCl pH 8.0 25 mM, EDTA pH 8.0 10 mM) e 1,5 μL de RNase (20 μg/mL) e incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. Após, foi adicionada a Solução II –Tampão de lise – (NaOH 2 M, SDS 10%) e misturada por inversão de forma cuidadosa. Imediatamente depois, adicionou-se a Solução III – Solução de neutralização – (Acetato de potássio 5 M, Ácido acético glacial) e feita mistura por inversão para formação do precipitado. Os microtubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante, fase transparente da solução, foi recuperado e transferido para novos microtubos. Foram adicionados 420 μL de isopropanol 100% e homogeneizado cuidadosamente para não causar danos no DNA plasmidial. Essa mistura foi incubada de um dia para o outro a -20 °C, para precipitação do DNA. Após o período de precipitação, a mistura foi centrifugada a 13.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante

descartado. O precipitado foi lavado com 500 μ L de etanol 70% para remoção dos sais precipitados e centrifugado novamente. O sobrenadante foi descartado e os microtubos foram secos no concentrador a vácuo. Após a secagem, o DNA foi quantificado pela leitura da absorbância em 260 nm no aparelho *NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer*, ressuspendido em água deionizada estéril e armazenado a -20 °C.

4.4 Confirmação da transformação em *E. coli*

A confirmação da transformação em *E. coli* TOP10F foi feita por meio de uma reação da polimerase em cadeia (PCR) utilizando o DNA plasmidial das colônias coletadas anteriormente. Para cada reação foi adicionado 5X Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega), MgCl₂ 25 mM, dNTP mix 10 mM, *primers* 5' AOX1 (senso) e 3' AOX1 (antissenso) a 10 mM (Tabela 1), GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega), e o DNA obtido. O volume final foi completado para 25 μ L com água deionizada. Para que a reação ocorresse, foi feito o uso de primers específicos para o promotor AOX1 do *EasySelect™ Pichia Expression Kit* (Invitrogen). O ciclo foi programado com as seguintes condições: 1 ciclo a 94 °C (2 minutos), 30 ciclos a 95 °C (1 minuto) para desnaturação das fitas de DNA; 54 °C (1 minuto) para anelamento dos primers, 72 °C (1 minuto) para a extensão da fita pela Taq polimerase e um ciclo final a 72 °C (7 minutos) para finalizar a extensão. A confirmação do resultado foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% com brometo de etídio. As amostras foram submetidas à corrida no gel, e as bandas resultantes foram visualizadas sob luz ultravioleta utilizando um transluminador. Os tamanhos dos fragmentos de DNA foram comparados com o marcador de peso molecular 1 Kb.

Tabela 1 – Sequências de *primers* senso e antissenso AOX1 para PCR

<i>Primer</i>	Sequência
5' AOX1 senso	5'- TATTCTTCCTCCTGCGGTTCTC -3'
3' AOX1 antissenso	5'- CTTGTATGGGAATCCGACTTG -3'

4.5 Reação de digestão do plasmídeo pPICZαA/E-MAYV

Após a confirmação da transformação da bactéria com o plasmídeo, o plasmídeo extraído foi linearizado com a enzima de restrição *Sac I* (Promega) para transformação em levedura *K. phaffii* KM71H. A reação foi montada conforme descrito no manual de instruções do fabricante com a adição do tampão J 10X, BSA acetilada (10 µg/µL), DNA (1 µg/µL) e a enzima *Sac I* (10 u/µL). A reação foi mantida a 37 °C em banho-seco por 16 horas e após esse tempo foi incubada em banho-seco a 65 °C por 15 minutos para inativação da enzima. Para verificação da linearização foi feita uma eletroforese em gel de agarose 1%.

4.6 Dessalinização do DNA plasmidial linearizado

Após a digestão, foi realizada diálise do DNA linearizado para retirada de sais e demais componentes do tampão. Foi utilizado uma placa de Petri de vidro com água deionizada e uma membrana de celulose 0,025 µm (Millipore™). O DNA foi pipetado sobre a membrana de maneira cuidadosa para não ter contato com a água e mantido por 2 horas para dessalinização. Ao fim do processo o DNA foi coletado e armazenado a -20 °C. Essa etapa teve como objetivo tornar o DNA mais puro para transformação em *K. phaffii*.

4.7 Transformação de *K. phaffii* KM71H

4.7.1 Preparo das células de *Komagataella phaffii* KM71H para transformação

As células da levedura *K. phaffii* KM71H foram preparadas para a transformação através de um protocolo disponibilizado em *EasySelect™ Pichia Expression Kit Manual* (Invitrogen). Foi feita a ativação da levedura com 5 mL de meio completo YPD (1% Extrato de levedura, 2% de Peptona e 2% Glicose) e 500 µL de levedura, que permaneceu incubado a 30 °C, 200 rpm, *overnight*. No dia seguinte, o pré-inóculo foi transferido para um frasco contendo 300 mL de meio YPD e mantido a 30 °C sob agitação de 200 rpm até atingir a DO entre 1,3-1,5. Ao alcançar a DO desejada, a cultura foi alíquotada em falcons de 50 mL e centrifugada a 1.500 x g, 4 °C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* passou por uma série de lavagens com água destilada. Ao fim do processo, as células foram solubilizadas em 1 mL de sorbitol 1 M gelado e transferidas para um microtubo.

4.7.2 Transformação de *K. phaffii* KM71H via eletroporação

Imediatamente após o preparo das células, executou-se a transformação. Foram adicionados 80 µL de leveduras competentes e 20 µL do DNA plasmidial linearizado (1-10 ng/µL) e dialisado em uma cubeta de eletroporação. A mistura foi incubada em gelo por 5 minutos e em seguida feito aplicado o pulso elétrico (2500 V; 25 µF; 200 Ω) em um eletroporador. Logo após o choque, foi adicionado 1 mL de sorbitol 1 M gelado na cubeta e homogeneizado de forma gentil. O volume foi transferido para um microtubo e incubado a 30 °C, sem agitação, por 2 horas. Após o tempo de incubação, as leveduras foram plaqueadas em meio YPD sólido (1% Extrato de levedura, 2% Peptona, 2% Glicose, Sorbitol 1 M e 2% de Ágar) acrescido de Zeocina (100 µg/mL). As placas foram mantidas em estufa a 30 °C por volta de 3 a 4 dias, tempo necessário para surgimento de colônias. As colônias foram coletadas e inoculadas em meio YPD líquido suplementado com antibiótico, a 30 °C, 225 rpm, *overnight*, para armazenamento de estoque a -80 °C.

4.7.3 Extração do DNA genômico de *K. phaffii*

Após a transformação, foi feita a extração de DNA total dos clones da levedura para verificação da integração do DNA plasmidial ao seu genoma. O cultivo feito anteriormente com as colônias coletadas em meio YPD foi centrifugado a 12.000 rpm, por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado ressuscitado em 400 µL de tampão de extração (2% Triton X-100, 10% SDS, 10% NaCl 1 M, 10% Tris 1 M e 0,1% EDTA 0,5 M) com adição de 0,3 g de *beads* de vidro. A solução foi agitada em vórtex por 2 minutos para promoção da lise das células e centrifugada a 12.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente recuperado e transferido para um microtubo, onde foram adicionados 200 µL de solução fenol-clorofórmio (100 µL de clofórmio, 96 µL de fenol e 4 µL de álcool isopropílico). A solução foi centrifugada novamente nas mesmas condições anteriores e a fase superior recuperada e transferida para um novo microtubo. Assim, foi adicionado de acetato de sódio 5 M (1/10 do volume total) e 2 volumes de etanol 100% gelado. A mistura foi incubada a temperatura ambiente por 2 minutos para precipitação e centrifugada em seguida por 5 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com etanol 70%. Após a lavagem, os microtubos foram secos em concentrador a vácuo e o material genético foi ressuscitado em 20 µL de água destilada estéril e armazenado a -20 °C.

4.7.4 Confirmação da transformação em *K. phaffii*

Para confirmação da integração dos genes de MAYV ao genoma de *K. phaffii* foi realizada uma PCR com o DNA previamente extraído. A reação utilizada foi a mesma descrita no item 4.4. Para checagem das bandas foi feita uma eletroforese em gel de agarose 1,5%.

4.8 Construção do novo plasmídeo pPICZ α A_MAYV_E2

Através do *RCSB Protein Data Bank* (RCSB PDB), um banco de dados de proteínas, obteve-se a sequência completa da proteína E2. A partir disso, foram desenhados *primers* para a proteína E2: *primer* antissenso com domínio transmembrana, denominado E2-TM-XbaI-R; *primer* antissenso sem o domínio transmembrana, denominado E2-XbaI-R e o *primer* senso denominado E2-EcoRI-F (Tabela 2). Foram adicionados sítios para as enzimas *EcoRI* e *XbaI* nas sequências dos *primers* e sua produção foi via síntese química pela empresa IDT – *Integrated DNA Technologies*.

Tabela 2 – Sequências de *primers* senso e antissenso para proteína E2

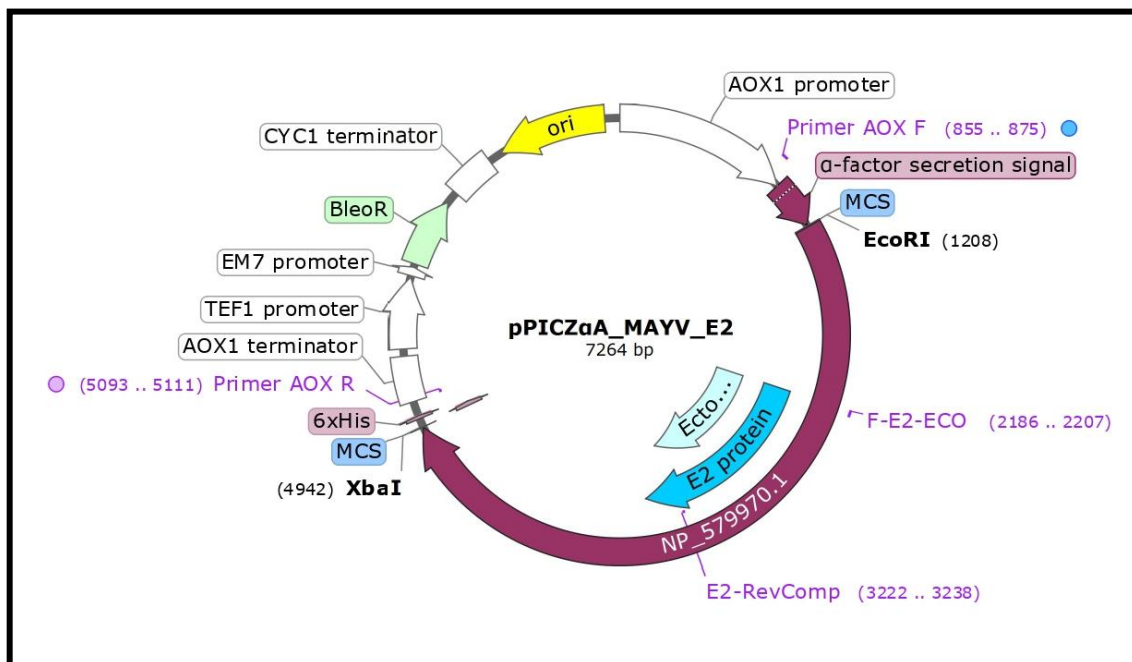
<i>Primer</i>	Sequência
E2-TM-XbaI-R	5'-TAAGTATCTAGAGCGTGTGCCTTTGGAGC-3'
E2-XbaI-R	5'-TAATCATCTAGAGGGCCAACCGTGTGCTT-3'
E2-EcoRI-F	5'-ATTCTCGAATTCAGTACCGCTAACCACTTCAACG-3'

A primeira etapa do experimento consistiu em realizar a digestão dupla do plasmídeo pPICZ α A/E-MAYV com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XbaI* para clivagem e amplificação da sequência codificante para a poliproteína estrutural do vírus Mayaro do vetor de expressão pPICZ α A. A reação foi montada conforme a instrução do fabricante e incubada a 37 °C, *overnight*. No dia seguinte, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 1% por aproximadamente 4 horas para separação completa dos fragmentos. Para recuperação da banda de interesse foi feita a excisão no gel de agarose por meio de uma lâmina. Essa banda foi purificada utilizando o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). Posteriormente, foi montada uma PCR de pPICZ α A/E-MAYV para amplificação da proteína E2, com adição das extremidades coesivas para *EcoRI* e *XbaI* através dos *primers*. Foram testadas diferentes temperaturas de *melting* (T_m) dos *primers* para garantir a ligação apenas à sequência-alvo, as temperaturas aplicadas foram de 48 °C, 50 °C, 52 °C, 54 °C, 56 °C e 58 °C.

O tamanho esperado para o amplicon 1 (E2-TM) foi de 1.053 pb e para o amplicon 2 (E2+TM) 1.265 pb. A confirmação do resultado foi feita via eletroforese em gel de agarose a 1%.

Por fim, foi montada uma reação para ligação do vetor (pPICZ α A) com o inserto (E2+TM). Ambos os fragmentos continham extremidades coesivas das enzimas *EcoRI* e *XbaI* para que as duas moléculas se unissem pela ação da T4 DNA ligase (New England Biolabs), criando um novo plasmídeo contendo apenas a sequência codificante da proteína de envelope E2. A reação foi montada seguindo uma proporção inserto/vetor de 3:1, conforme o protocolo do fabricante. Após o período de incubação necessário para a ligação dos fragmentos foi realizada uma transformação em *E. coli* TOP10F eletrocompetente seguindo o mesmo protocolo descrito no item 4.2.2. O novo plasmídeo foi denominado como pPICZ α A_MAYV_E2.

Figura 3 - Mapa plasmídeo pPICZ α A_MAYV_E2.



Fonte - Snapgene Viewer, 2024. Adaptado pelo autor.

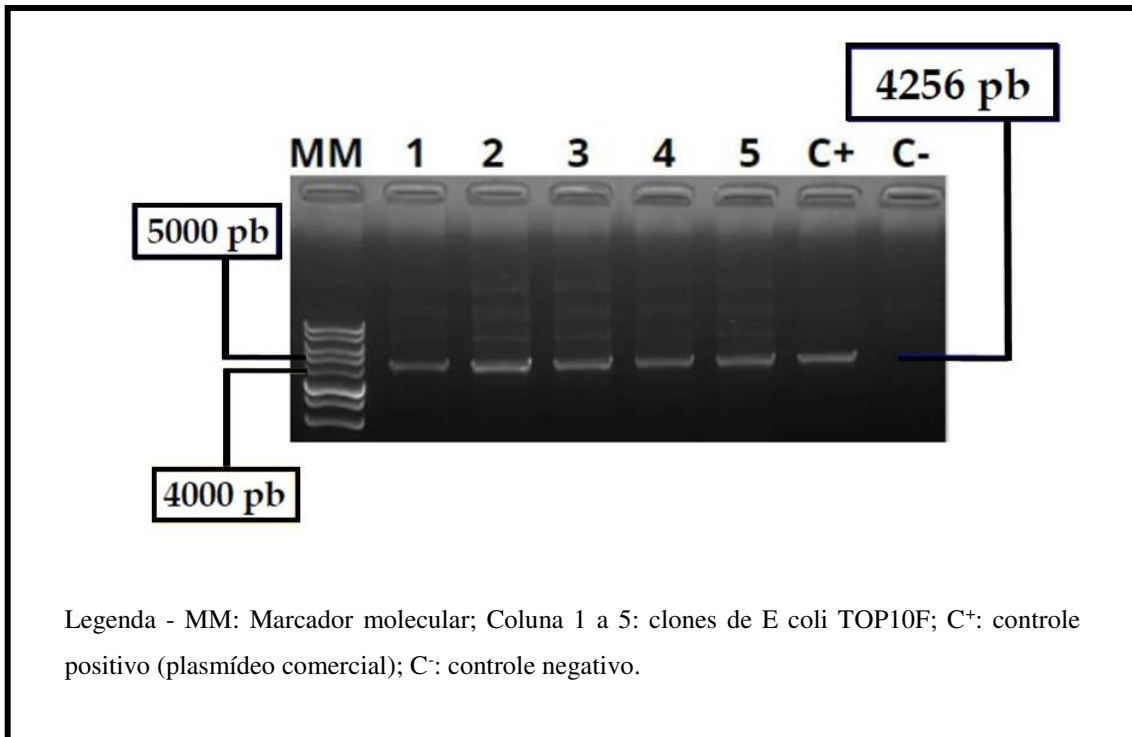
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Construção do plasmídeo pPICZ α A/E-MAYV

O desenho do plasmídeo e a otimização dos códons foram realizados com o objetivo de garantir um processo de clonagem eficiente. O vetor de expressão pPICZ α A foi escolhido devido às suas características que permitem tanto a replicação em bactérias, um passo essencial para obter um alto número de cópias do plasmídeo recombinante, quanto sua integração no genoma de *K. phaffii* para a produção de proteínas heterólogas. O plasmídeo pPICZ α A/E-MAYV (Figura 4) foi projetado utilizando o software SnapGene, que permitiu realizar alterações necessárias. Para a construção, foi utilizada a sequência codificadora da poliproteína estrutural do capsídeo do vírus Mayaro, obtida por meio da *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Adicionalmente, foi consultado o manual do *EasySelect™ Pichia Expression Kit for Expression of Recombinant Proteins Using pPICZ and pPICZ α in Pichia pastoris* (Invitrogen, 2010) para obter informações detalhadas sobre as características estruturais do vetor. Finalmente, o plasmídeo foi produzido por síntese química pela empresa GenOne, seguindo as especificações determinadas com base na literatura e na construção do mapa gerado pelo SnapGene.

A estabilidade do plasmídeo se deve a uma escolha minuciosa das sequências de DNA inseridas, origem de replicação, cepa bacteriana, marcador de seleção e o sistema de expressão das proteínas de interesse. Além disso, buscar um promotor forte e altamente regulável, como o da enzima álcool oxidase (AOX1), faz a diferença na expressão da proteína heteróloga (Weidner *et al.*, 2010). Somado a isso, foi adicionado na construção um peptídeo C-terminal com epítipo *c-myc* e uma etiqueta de poli-histidina (6xHis) usados na detecção e purificação proteica.

Figura 5 - Confirmação da PCR das células transformantes de *E coli* TOP10F



Fonte - Elaboração própria.

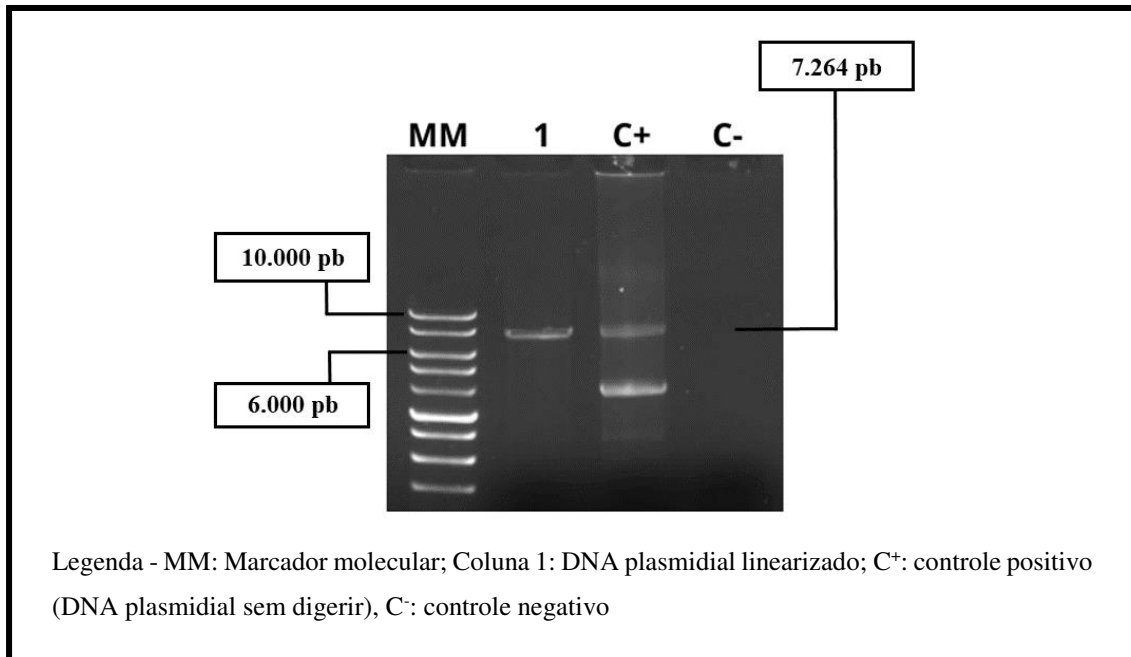
Existem diferentes métodos de transformação indicados para cada cepa de *E. coli*, que leva em consideração diversos parâmetros para a obtenção de altos níveis de eficiência de clonagem. O meio de cultura para crescimento das colônias, tempo de incubação, preparo das células competentes, qualidade e quantidade do DNA recombinante, o tipo de técnica (choque térmico ou pulso elétrico), dentre outros fatores chaves (Chan *et al.*, 2013). O método escolhido no atual trabalho foi o de eletroporação que aumenta a permeabilidade da membrana celular através de pulsos elétricos. É uma técnica bastante aplicada nos ramos da medicina, indústria alimentícia, biotecnologia e apresenta uma alta eficiência quando comparado com outros métodos. A eletroporação forma poros na membrana celular que permitem a entrada e saída de moléculas. Essa técnica surgiu em 1892 com Wong e Neumann, quando descreveram que impulsos elétricos aumentavam a captação de DNA em células de glioma de camundongo. O modelo gerou um campo elétrico externo com a camada lipídica da membrana através de um poro que induziu e estabilizou os locais de transpase, aumentando o transporte de DNA. No primeiro registro de eletroporação em células bacterianas, observou-se um aumento na transformação quando usado polietilenoglicol (PEG) um polímero solúvel em água capaz de permitir a passagem passiva do DNA para dentro da célula (Shivarova *et al.*, 1983). A primeira transformação em *E. coli* por eletroporação foi descrita em 1988 por Fiedler e Wirth, eles

demonstraram que as células foram cultivadas previamente em meio LB até atingir a fase log (crescimento exponencial) e lavadas em tampão de transformação. Nessas circunstâncias, as células de *E. coli* foram transformadas em uma taxa de 1×10^5 transformantes/ μg de DNA. Buscando obter melhores resultados, pesquisadores desenvolveram protocolo para eletroporação que elevou a taxa de transformação em uma faixa de 10^9 a 10^{10} transformantes/ μg de DNA (Dower *et al.*, 1988). Logo, com os avanços tecnológicos ao longo do tempo foram surgindo novos protocolos e melhorias para o processo de transformação via eletroporação. Este trabalho fez o uso do protocolo disponível no livro “*Molecular Cloning: A laboratory manual*” (Sambrook *et al.*, 2001). Assim, pode-se observar que houve a clonagem do plasmídeo pPICZ α A/E-MAYV em *E. coli* TOP10F pela análise da figura 5.

5.3 Confirmação da reação de digestão do plasmídeo usando a enzima de restrição *SacI*

O DNA plasmidial extraído dos clones bacterianos foram submetidos a uma reação de digestão com a enzima de restrição de corte único *Sac I* (Promega) que corta o DNA não metilado em posições limitadas. Para verificação da digestão, foi feita uma eletroforese em gel de agarose 1%. A figura 6 mostra o resultado da linearização do plasmídeo por meio da comparação da banda com o DNA plasmidial sem digerir, que contém mais de uma banda. A *Sac I* é uma endonuclease do tipo II capaz de reconhecer e clivar o sítio palindrômico 5'-GAGCT↓C-3' (A seta indica o local de clivagem) no DNA, liberando uma extremidade 5'-fosfato e uma extremidade 3'-OH. Sua atividade pode ser inibida pela presença de metilações na posição central da sequência de reconhecimento do DNA. Por apresentar uma alta versatilidade, a *Sac I* se tornou uma ferramenta essencial na biologia molecular. Um dos fatores levados em consideração na escolha da enzima foi a possibilidade de uso na clonagem de fragmentos de DNA em vetor de expressão, permitindo a expressão gênica heteróloga (Green *et al.*, 2021).

Figura 6 - Confirmação da digestão do DNA plasmidial bacteriano extraído.

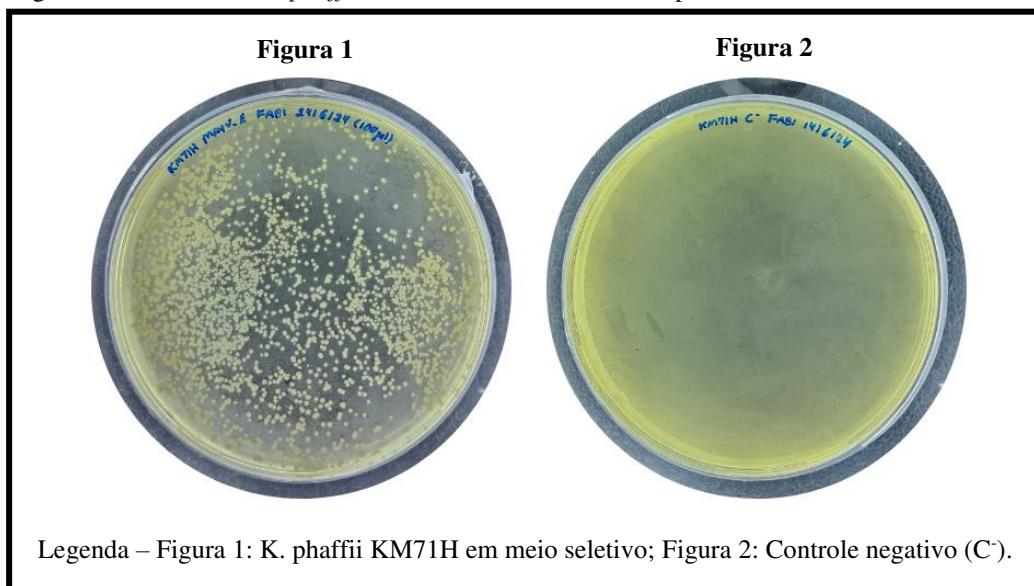


Fonte - Elaboração própria.

5.4 Confirmação da transformação via eletroporação em *K. phaffii* KM71H

A visualização do gel sob luz UV não evidenciou a amplificação esperada. O experimento foi repetido utilizando o mesmo procedimento, e novamente não foi observada a obtenção de clones de *K. phaffii*. Mesmo não havendo a confirmação via PCR, em diversas vezes foi observado crescimento de colônias em meio seletivo.

Figura 7 – Colônias de *K. phaffii* KM71H em meio seletivo suplementado com Zeocina.



Fonte: Elaboração própria.

Diante disso, novos protocolos de transformação em leveduras foram testados com o objetivo de obter os transformantes. O primeiro protocolo testado (Benatuil *et al.*, 2010) apresentava uma nova abordagem, onde as células eram preparadas para transformação com CaCl_2 , MgCl_2 , acetato de lítio (AcLi) e ditioneitol (DTT). O uso desses componentes tinha como objetivo facilitar a entrada do DNA exógeno nas células competentes. Contudo, não foi possível confirmar a ocorrência da transformação. Na sequência, adotou-se outro protocolo (Kumar, 2019) que visava uma transformação mais descomplicada. Consistiu no cultivo de células de *K. phaffii* KM71H em *patches* para formação de colônias que posteriormente foram coletadas e tratadas em DTT e HEPES-NaOH anteriormente ao choque elétrico. Também não foi possível observar transformantes.

Assim, na tentativa de entender o que estava acontecendo foi feita uma busca ativa na literatura sobre possíveis problemas referentes a integração do DNA plasmidial no genoma da levedura. Para que seja mantido, o plasmídeo precisa integrar-se ao genoma de *K. phaffii*. A expectativa para isso levava em consideração a ocorrência do processo de recombinação homóloga onde as extremidades do DNA plasmidial linearizado apresentaria sequências homólogas a regiões do genoma da levedura. E assim, o sistema de reparo do DNA faria o reconhecimento dessas sequências, enzimas atuariam no alinhamento das regiões e ocorreria a integração da sequência. A análise dos resultados obtidos mostrou o contrário, aparentemente esse processo de recombinação não estava ocorrendo. Mas o que poderia explicar o fato de inúmeras colônias de *K. phaffii* estarem crescendo em meio seletivo sendo que o plasmídeo não se integrou?

A partir desse ponto, levantou-se possíveis hipóteses do que poderia estar ocorrendo com o processo de incorporação do DNA plasmidial linearizado no genoma da *K. phaffii*. O primeiro passo consistiu em checar a construção do plasmídeo pPICZ α A/E-MAYV via SnapGene e uma ferramenta de alinhamento de sequências (BLAST) na tentativa de encontrar algum erro na sequência gênica inserida e se as extremidades 5' das fitas apresentavam homologia com o genoma da levedura. Como o vetor de expressão escolhido foi o pPICZ α A (Invitrogen, 2010) as regiões adjacentes do sítio de clivagem da *Sac I* correspondiam a regiões do genoma de *K. phaffii*. Dessa forma, verificou-se que não havia nenhum erro no design do plasmídeo. Caso contrário, o DNA poderia integrar-se de forma inespecífica ou ser degradado.

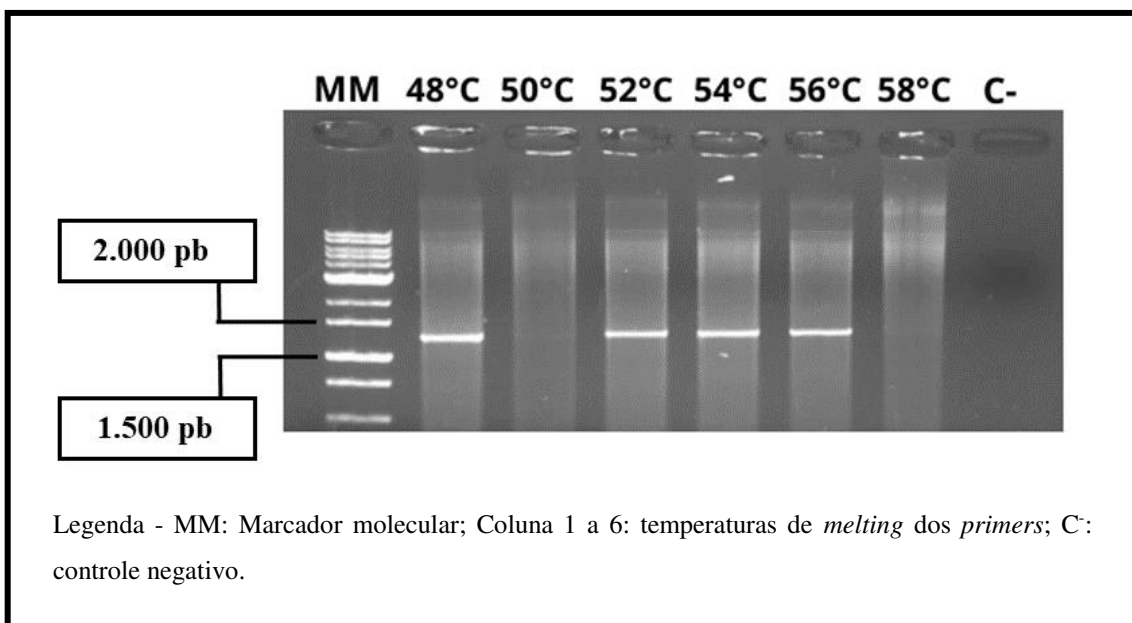
Em seguida, cogitou-se a possibilidade de que haveria um problema no processo de recombinação homóloga entre as sequências de DNA. Além do *crossing-over*, que consiste na troca genética entre cromossomos altamente relacionados durante a meiose, há também a atuação da recombinação homóloga como um mecanismo de reparo de quebra da fita dupla.

Caso não ocorra o reparo ou as quebras forem reparadas de forma incorreta, é possível a ocorrência de eventos de mutação, como deleção gênica; perda; duplicação ou translocação cromossômica (Zaha *et al.*, 2014). No caso da recombinação em *K. phaffii*, o reconhecimento seria sítio-específico, no qual as trocas são curtas. Existem algumas possibilidades do que pode ter ocorrido, como a recircularização do plasmídeo tornando o processo ineficiente, ocorrência de recombinação não-homóloga (Repolês, 2015), integração parcial do plasmídeo deixando genes e promotores de fora, o tamanho do plasmídeo ter sido muito grande para integração em levedura e degradação do DNA por nucleases antes da recombinação (Sambrook *et al.*, 2001). Alguns desses aspectos podem ser verificados através da técnica de sequenciamento de nova geração.

5.5 Confirmação da clonagem do novo plasmídeo pPICZ α A_MAYV_E2

Devido às dificuldades encontradas na transformação de *K. phaffii* com o plasmídeo pPICZ α A/E-MAYV, foi decidido a construção de um novo plasmídeo contendo apenas a sequência codificante da proteína de envelope (E2) para formação de VLPs, como demonstrado na figura 3. Essa decisão foi tomada tendo em vista que já foi demonstrado confecção de VLPs contendo apenas uma proteína e de que a proteína E2 apresenta capacidade de automontagem com base em estudos de outros alfavírus (Tsai *et al.*, 2022). A hipótese abordada foi de que o fragmento seria muito grande para que a levedura conseguisse integrar em seu genoma. A escolha da proteína E2 se deu com base na sua importância no processo de infecção e ativação da resposta imune (Lucarelli *et al.*, 2015). Além do Mayaro, outros arbovírus como o vírus Dengue e o vírus Chikungunya também apresentam resposta imune mediada por anticorpos induzida apenas pela proteína de envelope E (Shukla, *et al.*, 2022). A parte extracelular da proteína E2 possui domínios ligantes ao receptor e é alvo da ação de anticorpos neutralizantes (Lucarelli *et al.*, 2015). Os *primers* foram desenhados para amplificar a sequência codificante da proteína E com e sem o domínio transmembrana. Isso se deu em função do impacto do domínio transmembrana na etapa de purificação proteica, dado sua característica hidrofóbica (Vilela *et al.*, 2024). Assim, a proteína E apresenta características atrativas para uso terapêutico (Banerjee *et al.*, 2016). A figura 8 mostra o resultado da amplificação da sequência codificante da proteína E2 com o domínio transmembrana (E2+TM). Nas temperaturas, 50 °C e 58 °C, a amplificação das bandas foi mais fraca. Não houve amplificação da sequência referente a proteína E2 sem o domínio transmembrana.

Figura 8 - Confirmação da PCR da sequência codificante para a proteína E2 contendo o domínio transmembrana.



Fonte - Elaboração própria.

Em relação a transformação realizada em *E. coli* TOP10F com o novo plasmídeo não foi observado crescimento de colônias em meio seletivo suplementado de antibiótico. Acredita-se que não houve a ligação dos fragmentos. Consultando a literatura disponível é possível levantar algumas questões referentes a reação de ligação pela enzima T4 DNA ligase. Existem muitos fatores que podem reduzir a ação da enzima e impactar na eficiência da ligação. Um ponto a ser considerado é a razão da proporção inserto/vetor de 3:1, caso haja um excesso ou falta de um dos componentes, pode ocorrer um erro na ligação e um ajuste é necessário. Além disso, a qualidade do DNA pode influenciar fortemente na obtenção do produto. Em 2023, foi realizado um experimento com o objetivo de clonar o DNA complementar (cDNA) da acil peptídeo hidrolase (APEH), uma enzima do peixe antártico *Chionodraco hamatus*, no vetor pET-28a (+) para a produção de proteína recombinante (Prete *et al.*, 2023). O processo envolveu a inserção do gene sintético no vetor de expressão e a ligação dos fragmentos utilizando a T4 DNA ligase. No entanto, os testes revelaram que o produto gerado pela ligase apresentava baixa qualidade, o que motivou uma investigação mais detalhada sobre a influência da concentração de DNA nos experimentos. Para superação do problema os pesquisadores projetaram um novo par de *primers* de PCR capaz de amplificar todo o produto de ligase em uma quantidade efetiva. O produto da amplificação foi então inserido no vetor e propagado em bactéria.

Segundo Matsumura (2015), um dos fatores que podem comprometer a ligação do DNA é a presença de resíduos contaminantes que podem reagir com as enzimas de restrição

utilizadas. Kits de purificação, quando ineficazes na remoção de substratos e inibidores de DNA, como agarose, sais e solventes, podem interferir na atividade da enzima T4 DNA ligase. Uma alternativa eficiente e de baixo custo para minimizar esse problema são os kits que utilizam colunas de centrifugação de sílica. Além disso, a excisão da banda desejada do gel de agarose pode expor o DNA à luz UV, causando danos que afetam sua estrutura e impactam na eficiência da transformação. Outro desafio é o baixo rendimento da purificação a partir do gel, o que dificulta a formação do DNA recombinante.

Apesar de todos os desafios referentes a transformação do plasmídeo em *K. phaffii*, o projeto é promissor quanto ao desenvolvimento de VLPs do MAYV. No Brasil, o vírus Mayaro ainda não é totalmente conhecido por toda a população e existe pouca mobilização por parte do governo em comunicar o público sobre a importância do vírus. Sua cocirculação com outros arbovírus é um fator preocupante para o setor da saúde, tendo em vista que a ocorrência de surtos coletivos pode causar um colapso no sistema (Marinho *et al.*, 2024). Além disso, o surgimento de casos de febre do Mayaro em regiões do país onde a doença não é endêmica representa uma preocupação crescente. Dessa forma, estudos voltados à criação de alternativas para o combate ao vírus tornam-se cada vez mais necessários.

Ainda não há vacinas licenciadas mas existem diversos candidatos. Em 1976 foi realizado o primeiro estudo para criação de uma vacina com o vírus inativado utilizando a cepa selvagem de MAYV TRVL15537 (Robinson *et al.*, 1976). Observou-se que a vacina proporcionou certa proteção contra um desafio letal pelo MAYV, mas seriam necessários mais estudos sobre a geração de anticorpos. A segunda candidata foi uma vacina de vírus atenuado e recombinante, incapaz de se replicar nas células de mosquito. Weise e colaboradores (2014) observaram que a vacina foi capaz de gerar uma forte indução de anticorpos. Mais candidatos foram surgindo ao longo dos anos, como uma vacina de DNA (Choi *et al.*, 2019) e duas com vetor viral (Campos *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2022). Mais recentemente, foi conduzido um estudo para o desenvolvimento de vacina de VLPs do vírus Mayaro em células de inseto. Foi feito o desafio em camundongos com uma dose única da candidata vacinal MAYV-VLP (Abbo *et al.*, 2023) e observou-se altos títulos de anticorpos neutralizantes. No momento, essa vacina se encontra em estágio de desenvolvimento pré-clínico. Dessa forma, nota-se que a comunidade científica vem se mobilizando para o desenvolvimento de uma vacina, porém por se tratar de um vírus negligenciado que acomete países subdesenvolvidos há pouco interesse em investimentos financeiros.

Em síntese, a proposta de uma vacina nacional contra o vírus Mayaro, baseada em VLPs formadas a partir de proteínas estruturais virais, mostra-se altamente relevante. Diante do

cenário pós-pandemia e da crise climática, torna-se cada vez mais necessário o desenvolvimento de tecnologias brasileiras que contribuam para a proteção e o bem-estar da população. O projeto apresenta uma nova abordagem para o desenvolvimento de uma vacina de VLP contra o vírus Mayaro. No entanto, são necessários estudos e experimentos adicionais para que possamos compreender e superar os obstáculos aqui apresentados.

6 CONCLUSÕES

O presente estudo explorou diferentes processos biotecnológicos. Os resultados demonstraram a transformação de *Escherichia coli* TOP10F por eletroporação, com a confirmação dos clones via PCR. As observações reforçam a viabilidade dos protocolos de transformação baseados em choque elétrico. No entanto, não foi possível confirmar a clonagem do vetor de expressão pPICZ α A/E-MAYV em *K. phaffii* para expressão proteica e a formação de VLPs do vírus Mayaro. Esse resultado sugere que possíveis erros na integração do DNA exógeno possam ter ocorrido, indicando a necessidade de otimizações futuras, como a reestruturação do plasmídeo pPICZ α A/E-MAYV e troca da linhagem de *K. phaffii*.

Apesar das limitações, o projeto ressalta a importância de novas abordagens para o desenvolvimento de uma vacina contra o vírus Mayaro. Além disso, forneceu uma base relevante sobre o design de plasmídeos, o desenho de *primers*, a aplicação de diferentes protocolos de transformação e no uso de técnicas de PCR. Pesquisas futuras podem explorar estratégias para otimizar a transformação em leveduras e geração de VLPs, ampliando a aplicabilidade dessas tecnologias na estruturação de novas vacinas. Projetos brasileiros voltados a área de desenvolvimento vacinal e imunologia reforçam a soberania e independência biotecnológica nacional.

REFERÊNCIAS

- ABBO, S. R.; NGUYEN, W. *et al.* Comparative Efficacy of Mayaro Virus-Like Particle Vaccines Produced in Insect or Mammalian Cells. **Journal of Virology**, v. 97, n. 3, 2023.
- ANDREOLLA, A. P. *et al.* Mayaro Virus: The State-of-the-Art for Antiviral Drug Development. **Viruses**, v. 14, n. 8, p. 1787–1787, 16 ago. 2022.
- ATA, Ö. *et al.* What makes *Komagataella phaffii* non-conventional? **FEMS Yeast Research**, v. 21, n. 8, 23 nov. 2021.
- BANERJEE, N.; MUKHOPADHYAY, S. Viral glycoproteins: biological role and application in diagnosis. **VirusDisease**, v. 27, n. 1, p. 1–11, 2016.
- BARONE, G. D.; EMMERSTORFER-AUGUSTIN A.; BIUNDO, A.; *et al.* Industrial Production of Proteins with *Pichia pastoris* - *Komagataella phaffii*. **Biomolecules**, v. 13, n. 3, p. 441–441, 2023.
- BENATUIL, L.; PEREZ, J. M.; BELK, J. *et al.* An improved yeast transformation method for the generation of very large human antibody libraries. **Protein Engineering Design and Selection**, v. 23, n. 4, p. 155–159, 2010.
- BENGUE M. *et al.* Mayaro Virus Infects Human Brain Cells and Induces a Potent Antiviral Response in Human Astrocytes. **Viruses**, v. 13, n. 3, p. 465–465, 11 mar. 2021.
- BHAT, T.; CAO, A.; YIN, J. Virus-like Particles: Measures and Biological Functions. **Viruses**, v. 14, n. 2, p. 383, 14 fev. 2022.
- CABEZAS, C.; VASCONCELOS P. Growing threat of emerging and reemerging diseases: arboviruses and vector-borne diseases in the Americas. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, p. 4–6, 2024.
- CAICEDO, E-Y.; CHARNIGA, K.; RUEDA, A.; *et al.* The epidemiology of Mayaro virus in the Americas: A systematic review and key parameter estimates for outbreak modelling. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 15, n. 6, p. e0009418–e0009418, 2021.
- CAMPOS, R.; PRECIADO-LLANES, L.; AZAR, R. S.; *et al.* Adenoviral-Vectored Mayaro and Chikungunya Virus Vaccine Candidates Afford Partial Cross-Protection From Lethal Challenge in A129 Mouse Model. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2020.
- CAO, D. *et al.* Structure of Semliki Forest virus in complex with its receptor VLDLR. **Cell**, v. 186, n. 10, p. 2208–2218.e15, maio 2023.
- CELONE, M. *et al.* A geopositioned and evidence-graded pan-species compendium of Mayaro virus occurrence. **Scientific Data**, v. 10, n. 1, 14 jul. 2023.
- CELONE, M. *et al.* Understanding transmission risk and predicting environmental suitability for Mayaro Virus in Central and South America. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 18, n. 1, p. e0011859–e0011859, 9 jan. 2024.

- CHAN, W.-T. *et al.* A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of *Escherichia coli*. **Bioscience Reports**, v. 33, n. 6, 15 nov. 2013.
- CHEN, R. *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: Togaviridae. **Journal of General Virology**, v. 99, n. 6, p. 761–762, 1 jun. 2018.
- CHOI, H.; KUDCHODKAR, S. B.; REUSCHEL, E. L. *et al.* Protective immunity by an engineered DNA vaccine for Mayaro virus. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 2, p. e0007042–e0007042, 2019.
- CONSTENTIN D.; CIOTA, A. T ; KRAMER, L. D. Transmission potential of Mayaro virus by *Aedes albopictus*, and *Anopheles quadrimaculatus* from the USA. **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 1, 2020.
- DA SILVA, J.; KROKOVSKY, L. Clinical and laboratory diagnosis of Mayaro virus (MAYV): Current status and opportunities for further development. **Reviews in Medical Virology**, v. 34, n. 2, 1 mar. 2024.
- DIAGNE, C. T. *et al.* Mayaro Virus Pathogenesis and Transmission Mechanisms. **Pathogens**, v. 9, n. 9, p. 738–738, 8 set. 2020.
- DONALDSON, B.; LATEEF, Z.; WALKER, G. F. *et al.* Virus-like particle vaccines: immunology and formulation for clinical translation. **Expert Review of Vaccines**, v. 17, n. 9, p. 833–849, 2018.
- DOWER, W. J.; MILLER, J. F.; RAGSDALE, C. W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 13, p. 6127–6145, 11 jul. 1988.
- ESPOSITO, D. L. A.; FONSECA, B. A. L. Will Mayaro virus be responsible for the next outbreak of an arthropod-borne virus in Brazil? **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 5, p. 540–544, 7 jul. 2017.
- FERNANDES, L. S. *et al.* Evaluation of Antiviral Activity of Cyclic Ketones against Mayaro Virus. **Viruses**, v. 13, n. 11, p. 2123, 21 out. 2021.
- FIEDLER, S.; WIRTH, R. Transformation of bacteria with plasmid DNA by electroporation. **Analytical Biochemistry**, v. 170, n. 1, p. 38–44, abr. 1988.
- FISCHER, C. *et al.* Robustness of Serologic Investigations for Chikungunya and Mayaro Viruses following Coemergence. **mSphere**, v. 5, n. 1, 5 fev. 2020.
- GANJIAN N.; RIVIERE-CINNAMOND, A. Mayaro virus in Latin America and the Caribbean. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 44, p. 1–1, 2020.
- GONZALEZ-ESCOBAR, G., CHURAMAN, C., RAMPERSAD, C. *et al.* Mayaro virus detection in patients from rural and urban areas in Trinidad and Tobago during the Chikungunya and Zika virus outbreaks. **Pathogens and Global Health**, 115(3), 188–195. 2021.

GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. Restriction Enzymes. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2021, n. 4, p. pdb.top101360, 3 fev. 2021.

HASSINE I. H.; M'HADHEB M. B.; ALMALKI M. A.; GHARBI J. Virus-like particles as powerful vaccination strategy against human viruses. **Reviews in Medical Virology**, v. 34, n. 1, 2023.

INFANT, T.; DEB, R.; GHOSE, S.; *et al.* Post-translational modifications of proteins associated with yeast peroxisome membrane: An essential mode of regulatory mechanism. **Genes to Cells**, v. 26, n. 11, p. 843–860, 2021.

INVITROGEN. EasySelect™*Pichia* Expression Kit: for expression of recombinant proteins using pPICZ and pPICZ α in *Pichia pastoris*. Carlsbad, CA, 2010. Cat. no. K1740-01; Manual part no. 25-0172; MAN0000042.

KARBALAEI, M.; REZAEE, S. A.; FARSIANI, H. *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. **Journal of Cellular Physiology**, v. 235, n. 9, p. 5867–5881, 2020.

KIM, Y. C.; LÜCKE A-C.; CAMACHO C. L. *et al.* Development of Viral-Vectored Vaccines and Virus Replicon Particle-Based Neutralisation Assay against Mayaro Virus. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 8, p. 4105–4105, 2022.

KOONIN, E. V.; KRUPOVIC M.; AGOL, V. I. The Baltimore Classification of Viruses 50 Years Later: How Does It Stand in the Light of Virus Evolution? **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 85, n. 3, 2021.

KUMAR, R. Simplified protocol for faster transformation of (a large number of) *Pichia pastoris* strains. **Yeast**, v. 36, n. 6, p. 399–410, 2019.

LIMA, W. G.; PEREIRA, R. S.; DA CRUZ NIZER, W. S.; *et al.* Rate of exposure to Mayaro virus (MAYV) in Brazil between 1955 and 2018: a systematic review and meta-analysis. **Archives of Virology**, v. 166, n. 2, p. 347–361, 2021.

LORENZ, C.; RIBEIRO, A. F.; CHIARAVALLOTI-NETO, F. Mayaro virus distribution in South America. **Acta Tropica**, v. 198, p. 105093–105093, 2019.

LUCARELLI, J.; ALIOTA, M. T.; KAMLANGDEE A. *et al.* Identifying the Role of E2 Domains on Alphavirus Neutralization and Protective Immune Responses. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 10, p. e0004163–e0004163, 2015.

MATSUMURA, I. Why Johnny Can't clone: Common Pitfalls and Not So Common Solutions. **BioTechniques**, v. 59, n. 3, 2015.

MIKAELA M.; FERREIRA, G. M.; GROSCHE, V. R.; *et al.* Evolutionary Profile of Mayaro Virus in the Americas: An Update into Genome Variability. **Viruses**, v. 16, n. 5, p. 809–809, 2024.

MOHSEN, M. O. *et al.* Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines. **Seminars in Immunology**, v. 34, n. July, p. 123–132, 2017.

NAVECA, F. G.; NASCIMENTO, V. A.; SOUZA, V. C.; *et al.* Multiplexed reverse transcription real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection of Mayaro, Oropouche, and Oropouche-like viruses. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 7, p. 510–513, 2017.

NOORAEI, S.; BAHRULOLUM, H.; HOSEINI, Z. S.; *et al.* Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 19, n. 1, 2021.

PEREIRA, T. N.; CARVALHO, F. D.; DE MENDONÇA S. F. *et al.* Vector competence of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes for Mayaro virus. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 14, n. 4, p. e0007518–e0007518, 2020.

PRETE, S. D.; GOGLIETTINO, M.; PALMIERI, G.; *et al.* A strategy to recover a poor-quality ligase product. **Journal of Biological Methods**, v. 10, n. 1, p. 1–1, 2023.

QIAN, C.; LIU, X.; XU, Q.; *et al.* Recent Progress on the Versatility of Virus-Like Particles. **Vaccines**, v. 8, n. 1, p. 139, 2020.

RAJI, A. A.; DASTJERDI, P. Z.; OMAR, A. R. Virus-like particles in poultry disease: an approach to effective and safe vaccination. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 11, 2024.

REPOLÊS, M. B. **Estudo sobre o reparo por recombinação homóloga em diferentes linhagens de *Trypanosoma cruzi***. 2015. 80 p. Dissertação (Mestrado em Genética) - Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Geral, Programa de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, p. 14. 2015.

ROBINSON, D. M.; JR COLE F. E.; MCMANUS, A. T. *et al.* Inactivated Mayaro vaccine produced in human diploid cell cultures. **Military medicine**, v. 141, n. 3, 2024.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory. New York. 2001. 1.119 p.

SCHÜTZ, A.; BERNHARD, F.; BERRO, N. *et al.* A concise guide to choosing suitable gene expression systems for recombinant protein production. **STAR Protocols**, v. 4, n. 4, p. 102572–102572, 2023.

SHUKLA, M.; CHANDLEY, P.; SUMAN T. *et al.* Expression, Purification, and Refolding of Chikungunya Virus Full-Length Envelope E2 Protein along with B-Cell and T-Cell Epitope Analyses Using Immuno-Informatics Approaches. **ACS Omega**, v. 7, n. 4, p. 3491–3513, 2022.

SHIVAROVA, N.; FÖRSTER W.; JACOB, H.-E; *et al.* Microbiological implications of electric field effects VII. Stimulation of plasmid transformation of *Bacillus cereus* protoplasts by electric field pulses. **Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie**, v. 23, n. 9, p. 595–599, 1983.

SRIVASTAVA, V.; NAND, K. N.; AHMAD, A.; *et al.* Yeast-Based Virus-like Particles as an Emerging Platform for Vaccine Development and Delivery. **Vaccines**, v. 11, n. 2, p. 479, 2023.

UNVER Y.; DAGCI I. *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) as a Powerful Yeast Expression System for Biologics Production. **Frontiers in Bioscience-Elite**, v. 16, n. 2, p. 19–19, 2024.

VIJAYAKUMAR, V. E.; VENKATARAMAN, K. A Systematic Review of the Potential of *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) as an Alternative Host for Biologics Production. **Molecular Biotechnology**, v. 66, n. 7, p. 1621–1639, 2023.

VILELA, F.; SAUVANET C.; BEZAULT A. *et al.* Optimizing Transmembrane Protein Assemblies in Nanodiscs for Structural Studies: A Comprehensive Manual. **BIO-PROTOCOL**, v. 14, n. 1356, 2024.

WALSH, C. T.; GARNEAU-TSODIKOVA, S.; GATTO, G. J. Protein Posttranslational Modifications: The Chemistry of Proteome Diversifications. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, n. 45, p. 7342–7372, 2005.

WEI, L. L. L.; TOM, R.; KIM, Y. C. Mayaro Virus: An Emerging Alphavirus in the Americas. **Viruses**, v. 16, n. 8, p. 1297–1297, 2024.

WEIDNER, M.; TAUPP, M.; HALLAM, S. J. Expression of Recombinant Proteins in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. **Journal of Visualized Experiments**, n. 36, 2010.

WEISE, W. J.; HERMANCE, M. E.; FORRESTER, N. *et al.* A Novel Live-Attenuated Vaccine Candidate for Mayaro Fever. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 8, p. e2969–e2969, 2014.

WONG, T.; NEUMANN, E. Electric field mediated gene transfer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 107, n. 2, p. 584–587, 1982.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P.; **Biologia Molecular Básica**. 5^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 185 p.

ZHANG, R.; KIM, A. S; FOX, J. M. *et al.* Mxra8 is a receptor for multiple arthritogenic alphaviruses. **Nature**, v. 557, n. 7706, p. 570–574, 2018.