**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

RAFAEL DE SOUZA PONTES

**Caracterização imunogênica do domínio B recombinante da proteína E2 de
Chikungunya expressa em *Escherichia coli***

RIBEIRÃO PRETO - SP

2021

RAFAEL DE SOUZA PONTES

**Caracterização imunogênica do domínio B recombinante da proteína E2 de
Chikungunya expressa em *Escherichia coli***

**Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da
Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e
Dissertações da USP (BDTD)**

Dissertação de Mestrado Apresentada ao
Curso de Pós-Graduação em Imunologia
Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto – Universidade de São
Paulo, como parte das exigências para
obtenção de título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Guerino
Stabeli

RIBEIRÃO PRETO - SP

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudos e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Pontes, Rafael Souza

Caracterização imunogênica do domínio B recombinante da proteína E2 de Chikungunya expressa em *Escherichia coli*. Rafael de Souza Pontes; Orientador, Rodrigo Guerino Stabeli – 2021.

Quantidade de folhas 65f.: il. 30cm

Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Versão Original

1 – Arbovírus. 2 –CHIKV. 3 – Anticorpos. 4 – Terapia de anticorpos.

Folha de Aprovação

Nome: Rafael de Souza Pontes

Título: Caracterização imunogênica do domínio B recombinante da proteína E2 de Chikungunya expressa em *Escherichia coli*.

Dissertação Apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, para obtenção de título de Mestre em Ciências.

Aprovado em ____ de _____ de 2021.

Banca Examinadora

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____

Julgamento _____

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____

Julgamento _____

Prof (a). Dr (a). _____

Instituição: _____

Julgamento _____

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre.”

- Paulo Freire.

AGRADECIMENTOS

De coração, agradeço,

Aos meus pais, Marineide e Euclides, e aos meus irmãos, Eduardo e Natália, que sempre me apoiaram e incentivaram a seguir meus sonhos, esta conquista é nossa.

Ao meu orientador e professor Rodrigo Guerino Stabeli, que depositou em mim sua confiança. Agradeço o incentivo, dedicação e os ensinamentos que me proporcionaram crescimento ao longo desses anos.

Aos professores e funcionários do programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da FMRP, em especial à Ana Cristina, sempre presente e solícita.

Ao meu amigo Luiz Felipe Araujo, obrigado pelo auxílio nos experimentos e pela amizade que vem desde a graduação.

As minhas amigas Caroline Galvão e Jéssica Placência, que mesmo distante, sempre estiveram presentes me apoiando.

Aos amigos que fiz em Ribeirão Preto, Carolina Monteleone, Danilo Machado, Letícia Penteado, Marcos Rosa, Maynara Santana, Reginaldo Alves, Romário Mascarenhas e Vitor Floriano. Cada um à sua maneira tornou esses anos mais alegres.

Ao Dr. Carlos Alessandro Fuzo que foi essencial para a realização deste trabalho, obrigado pela dedicação e paciência.

Ao Professor Dr. Arthur Henrique Cavalcante de Oliveira, que disponibilizou seu laboratório e sempre foi muito solícito. Aos meus colegas de laboratório Dham, Bruno, Elise, Leonardo e Cintya, que sempre me auxiliaram nas inúmeras vezes que precisei. E ao técnico do laboratório, Dr. André Justino, obrigado pela ajuda.

Ao professor Dr. Luiz Tadeu Moraes de Figueiredo pela disponibilização do laboratório. Aos seus alunos, Marcílio Jorge Fumagalli, Danilo Machado e a técnica do laboratório Soraya agradeço a ajuda nos experimentos e a paciência.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 1798828.

RESUMO

PONTES, Rafael Souza. **Caracterização imunogênica do domínio B recombinante da proteína E2 de Chikungunya expressa em *Escherichia coli***. 2021. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

O vírus Chikungunya (CHIKV) é o agente etiológico da febre Chikungunya (CHIKF), caracterizada por febre, erupção cutânea e artralgia. Parte dos indivíduos infectados progridem para artropatia crônica que pode persistir por anos. Nos últimos surtos foram reportadas complicações neurológicas, como encefalite, encefalopatia com alta mortalidade associada e síndrome de Guillain-Barré. No Brasil o vírus continua em circulação e em 2020 foram reportados mais de 60 mil casos e 14 óbitos. Apesar do interesse crescente nas pesquisas com CHIKV, não há nenhuma vacina ou tratamento específico disponível. O objetivo deste trabalho foi avaliar as propriedades imunogênicas do domínio B da proteína de envelope E2 de CHIKV expressa em sistema procarioto. Para isso, foram realizadas análises do grau de conservação das sequências de aminoácidos das proteínas de envelope do CHIKV e de epítomos de células B que são alvos de anticorpos neutralizantes expostos na superfície viral. As análises apontam para um epítopo conservado localizado no domínio B da proteína E2 do CHIKV, que foi expressa utilizando a cepa *Escherichia coli* SHuffle. A estrutura secundária da proteína recombinante foi determinada por dicroísmo circular. Através de ensaio ELISA foi demonstrado a capacidade do soro de camundongos infectados com CHIKV de reconhecer o peptídeo recombinante. A imunização de camundongos Balb/c com o peptídeo recombinante elicitou altos títulos de anticorpos, que quando avaliados pelo teste de redução de plaque foram capazes de reduzir 50% das placas virais. Deste modo, o peptídeo recombinante expresso apresenta potencial para uso no desenvolvimento de vacinas, terapias baseadas em anticorpo e diagnóstico.

Palavras chaves: 1. Arbovírus. 2. CHIKV. 3. Anticorpos. 4. Terapia de anticorpos.

ABSTRACT

PONTES, Rafael Souza. **Immunogenic characterization of the recombinant B domain of the Chikungunya E2 protein expressed in *Escherichia coli***. 2021. Dissertation (Master's degree) – Basic and Applied Immunology Graduate School – Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Chikungunya virus (CHIKV) is the etiologic agent of Chikungunya fever (CHIKF), characterized by fever, rash, and arthralgia. Some infected individuals progress to chronic arthropathy, which can persist for years. In the last outbreaks, neurological complications have been reported, such as encephalitis, encephalopathy with high associated mortality, and Guillain-Barré syndrome. In Brazil, the virus remains in circulation, and in 2020 more than 60 thousand cases and 14 deaths were reported. Despite the growing interest in CHIKV research, there is no specific vaccine or treatment available. The aim of this work was to evaluate the immunogenic properties of domain B of the CHIKV E2 envelope protein expressed in a prokaryotic system. For that, analyzes of the degree of conservation of the amino acid sequences of the CHIKV envelope proteins and of B cell epitopes that are targets of neutralizing antibodies exposed on the viral surface were carried out. The analyzes point to a conserved epitope located in the B domain of the E2 protein of CHIKV, which was expressed using the strain *Escherichia coli* SHuffle. The secondary structure of the recombinant protein was determined by circular dichroism. The ELISA assay demonstrated the ability of serum from mice infected with CHIKV to recognize the recombinant peptide. The immunization of Balb / c mice with the recombinant peptide elicited high antibody titers, which when evaluated by the plaque reduction test were able to reduce 50% of the viral plaques. Thus, the expressed recombinant peptide has potential for use in the development of vaccines, antibody-based therapies, and diagnosis.

Keywords: 1. Arbovirus. 2. CHIKV. 3. Antibodies. 4. Antibody therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Países onde a infecção por CHIKV foi reportada até outubro de 2020.....	19
Figura 2. Organização do genoma e produtos gênicos do CHIKV.....	20
Figura 3. Características genômicas e estruturais do Chikungunya.....	22
Figura 4. Estrutura do heterodímero E1E2 do vírus Chikungunya.....	23
Figura 5. Vetor de expressão pET22b(+).	30
Figura 6. Resultados do cálculo para estimação do grau de conservação evolucionária realizado com o programa <i>Consurf</i>	36
Figura 7. Localização dos monômeros sE1 e sE2.....	38
Figura 8. Mapeamento de epítomos de células B em uma espícula de CHIKV.....	40
Figura 9. Cromatograma de purificação do peptídeo de CHIKV.....	41
Figura 10. Eletroforese em gel desnaturante da proteína recombinante do envelope do CHIKV.....	42
Figura 11. Espectro de dicroísmo circular no UV distante em pH 5,0.....	43
Figura 12. Predição da estrutura secundária de cada resíduo de aminoácido em solução ao longo da simulação por meio do programa gmx do_dssp.....	45
Figura 13. Avaliação da resposta anti-histag ao peptídeo de CHIKV.....	47
Figura 14. Avaliação da resposta sérica de camundongos infectados com CHIKV ao peptídeo de CHIKV.....	48
Figura 15. Avaliação da resposta sérica de camundongos imunizados com o peptídeo de CHIKV.....	49
Figura 16. Teste de neutralização por redução de plaque a partir do soro de camundongos Balb/c imunizados com o peptídeo recombinante.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Porcentagens da estrutura secundária obtida a partir da espectroscopia do dicroísmo circular atribuídas pelo BeStSel.....	44
Tabela 2. Porcentagens da estrutura secundária obtida a partir da espectroscopia do dicroísmo circular em comparação com a predição gerada pelo programa gm do_dssp.....	46

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CMC	Carboximetilcelulose
CHIKV	Vírus Chikungunya
CHIKF	Febre Chikungunya
Cryo-EM	<i>Cryogenic electron microscopy</i>
DENV	Vírus da Dengue
DC	Dicroísmo circular
DNA	Ácido desoxiribonucléico
DO ₍₆₀₀₎	Densidade óptica em 600 nm
DSSP	<i>Dictionary of Secondary Structure of Proteins</i>
ECSA	Genótipo Leste-Centro-Sul-Africano
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EEEV	Vírus da encefalite equina oriental
Fabs	Fragmentos de ligação ao antígeno
FL	<i>Fusion loop</i>
FR	Framework
FPLC	<i>Fast protein liquid-chromatography</i>
Grx	<i>Glutaredoxin</i>
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IOL	Linhagem do Oceano Índico
IPTG	<i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i>
kDa	Quilo Daltons

LB	Luria Bertani
MAYV	Vírus Mayaro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mmol	Milimol
mRNA	RNA mensageiro
NaCl	Cloreto de sódio
nm	Nanômetro
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONNV	Vírus <i>O'nyong-nyong</i>
pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação de polimerase em cadeia
pET	Plasmídeo para expressão pela T7 RNA polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PMSF	<i>Phenylmethysulfonyl fluoride</i>
PRNT	Teste de neutralização por redução das placas virais
rpm	Rotações por minuto
RMSD	<i>Root-mean-square deviation</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RRV	Vírus <i>Ross River</i>
SFV	Vírus da Floresta de Semliki

SDS-PAGE	Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida
sE	Região solúvel da proteína de envelope
SFB	Soro fetal bovino
TAM	<i>Tyros3, Axl, e Mer receptors</i>
TIM	<i>T cell immunoglobulin mucin domain protein 1</i>
Tris	Tris-hidróximetil aminometano
TM	Âncora transmembrana
UV	Ultravioleta
ViPR	<i>Virus Pathogen Database and Analysis Resource</i>
VEEV	Vírus da encefalite equina venezuelana
YFV	Vírus da febre amarela
ZIKV	Zika vírus
µg	Micrograma
µL	Microlitro

Sumário

1. Introdução.....	16
1.1 Arbovírus	17
1.2 <i>Alphavirus</i>	17
1.3 Vírus Chikungunya	18
1.3.1 Epidemiologia do vírus Chikungunya.....	18
1.3.2 Genoma e estrutura viral	21
1.3.3 Proteína de Envelope 2.....	23
1.4 Anticorpos.....	25
2. Objetivos	27
2. Objetivo geral	28
2.1 Objetivos específicos	28
3. Material e Métodos.....	29
3.1 Análise do grau de conservação das proteínas de envelope	30
3.2 Mapeamento de epítomos	30
3.3 Expressão do peptídeo	31
3.3.1 Vetor de expressão.....	31
3.3.2 Expressão do peptídeo recombinante	32
3.4 Dicroísmo circular (DC)	33
3.5 Predição da estrutura secundária a partir de simulação molecular	33
3.6 Avaliação sorológica.....	34
3.6.1 Avaliação da resposta imune de camundongos Balb/C imunizados	34
3.7 Teste de neutralização por redução de plaque (PRNT)	35
4. Resultados e Discussão	36
4.1 Avaliação do grau de conservação evolucionário	37

4.2 Mapeamento dos epítomos obtidos a partir de banco de dados sobre a superfície viral.....	39
4.3 Expressão do peptídeo recombinante	41
4.4 Avaliação da estrutura secundária do peptídeo expresso por dicroísmo circular. 44	
4.5 Avaliação Sorológica.....	47
4.5.1 Avaliação da resposta sérica de camundongos infectados com CHIKV ao peptídeo de CHIKV	47
4.5.2 Avaliação da resposta sorológica dos camundongos imunizados com o peptídeo recombinante	50
4.5.3 Teste de neutralização por redução de plaque (PRNT)	50
5. Conclusão	53
6. Referências bibliográficas	55

1.Introdução

1.1 Arbovírus

Arbovírus é um grupo de vírus transmitidos por artrópodes hematófagos, tais quais mosquitos e carrapatos, a hospedeiros vertebrados (Gubler, 2006; World Health Organization, 1985). Os arbovírus que afetam a saúde humana são patógenos zoonóticos originados em ciclos de transmissão que envolvem animais silvestres como hospedeiros reservatórios (Weaver e Reisen, 2010). São descritos mais de 140 arbovírus associados com doenças humanas (Gubler, 2002; Huang, Higgs e Vanlandingham, 2019), dentre estes, os de relevância a saúde pública pertencem as famílias *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Peribunyaviridae*, *Nairoviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* e *Orthomyxoviridae* (Conway, Colpitts e Fikrig, 2014).

As arboviroses de importância médica com elevada prevalência pertencem as famílias *Flaviviridae* e *Togaviridae*, tais como os da família *Flaviviridae*: dengue (DENV), vírus do Nilo Ocidental (WNV), vírus Zika (ZIKV) e vírus da febre amarela (YFV). E por último os *Alphavirus* da família *Togaviridae* incluem o vírus chikungunya (CHIKV), vírus *Ross River* (RRV), vírus *O'nyong-nyong* (ONNV) e vírus Mayaro (MAYV) (Ciota, 2019).

1.2 *Alphavirus*

A família *Togaviridae* possui apenas o gênero *Alphavirus* descrito e inclui mais de 30 espécies virais reconhecidas pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV). Os arbovírus deste gênero são pequenos vírus esféricos envelopados com 70 nm de diâmetro (Chen, R. *et al.*, 2018). As partículas virais contêm um núcleo icosaédrico distinto e uma camada de glicoproteína também icosaédrica, seu genoma composto por um RNA de fita simples de sentido positivo com 10–12 kb (Li *et al.*, 2010).

Os *Alphavirus* podem ser divididos em dois grupos com base nos sinais e sintomas provocados. Os vírus artritogênicos, como o CHIKV e o RRV, que causam febre, erupção cutânea e poliartrite, geralmente são endêmicos em certas áreas e podem causar grandes epidemias (Liu, Tharmarajah e Taylor, 2017; Silva e Dermody, 2017). O segundo grupo é o dos vírus neuroinvasivos, que inclui o vírus da encefalite equina venezuelana (VEEV) e o vírus da encefalite equina oriental (EEEV), que causam encefalite e morte em diversas espécies de mamíferos (Yu e Bolton, 2019). Embora estes grupos provoquem patologias diferentes, ambos são muito semelhantes na organização

do genoma, replicação, via de montagem e estrutura do vírion (Chen, L. *et al.*, 2018; Hasan *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2013).

1.3 Vírus Chikungunya

Chikungunya (CHIKV) é um vírus artrítogênico e o agente etiológico da doença aguda febre Chikungunya (CHIKF). O nome do vírus veio da língua Makonde (Kimakonde), do sul da Tanzânia, que significa “curvar-se”, devido a postura apresentada por indivíduos que desenvolvem as formas mais graves da doença, com dores articulares extremas, muitas vezes incapacitantes (Robinson, 1955).

Estima-se que 75-95% das pessoas que são infectadas com CHIKV apresentem a doença aguda caracterizada por febre, erupção cutânea e artralgia (Assunção-Miranda, Cruz-Oliveira e Poian, Da, 2013; Erin Staples, Breiman e Powers, 2009; Hoarau *et al.*, 2010). Destaca-se que aproximadamente metade dos indivíduos sintomáticos da infecção desenvolvam artropatia crônica que pode persistir de meses a anos, afetando enormemente a qualidade de vida dos indivíduos (Consuegra-Rodríguez *et al.*, 2018; Petitdemange, Wauquier e Vieillard, 2015), podendo deixar sequelas como depressão, fadiga crônica e desordens neurológicas (Brizzi, 2017; Duvignaud *et al.*, 2018).

A transmissão do vírus se dá principalmente por mosquitos do gênero *Aedes*. No ciclo urbano as espécies responsáveis são o *A. aegypti* e *A. albopictus* (Weaver, 2006), sendo o *A. aegypti* o principal vetor de outros vírus, como Zika (ZIKV) e Dengue (DENV), não sendo incomum a transmissão simultânea de mais de um tipo de vírus (Carrillo-Hernández *et al.*, 2018). Outro meio de transmissão do vírus também reportado é a transmissão vertical, entre a mãe e o feto, resultando em complicações como encefalopatia (Gérardin *et al.*, 2008; Ramful *et al.*, 2007).

Há quatro genótipos de CHIKV identificados desde sua descoberta (Weaver, 2014). Os genótipos Leste-Centro-Sul-Africano (ECSA) e Oeste Africano são endêmicos e causam epidemias na África Subsaariana, enquanto o genótipo Asiático circula nos ciclos de transmissão urbana por *A. aegypti* no Sudeste Asiático. A linhagem do Oceano Índico (IOL) é responsável pelas epidemias massivas nas ilhas do Oceano Índico e na Ásia entre 2005 e 2011 (Tsetsarkin *et al.*, 2014).

1.3.1 Epidemiologia do vírus Chikungunya

O primeiro relato de uma epidemia ocorreu 1952/53 na província de Tanganica, atual Tanzânia, onde o vírus foi isolado de um indivíduo que apresentava dores

incapacitantes nas articulações, febre intensa e erupção cutânea (Robinson, 1955; Ross, 1956). Embora inicialmente o surto tenha sido atribuído ao vírus da dengue, baseado nos sinais e sintomas apresentados por indivíduos infectados, após o isolamento viral, caracterização sorológica e antigênica foi identificado que se tratava de um novo *Alphavirus* similar aos vírus Mayaro e Vírus da Floresta de Semliki (SFV) (Casals e Whitman, 1957; Spence e Thomas, 1959). Revisões retrospectivas de casos indicam que as epidemias de CHIKV ocorram desde 1779, tendo sido, reportadas como surtos de dengue (Carey, 1971).

Após a identificação do CHIKV foram reportados surtos do vírus restritos aos continentes africano e asiático, com ocorrências se estendendo da década de 1960 até o início dos anos 2000 (Powers e Logue, 2007). Em 2004, o vírus reemergiu no Quênia e se espalhou para as Ilhas Comores, onde 5000 casos foram reportados (Sergon *et al.*, 2007; Simon, Tolou e Jeandel, 2006). Em 2005–2006, o surto continuou em outras ilhas do Oceano Índico, onde foram registrados casos CHIKV em La Réunion. Esta ilha possui uma população de aproximadamente 785.000, tendo sido reportados cerca de 300.000 casos de infecções por CHIKV com 237 mortes resultantes (Bonn, 2006; Schuffenecker *et al.*, 2006).

Os surtos continuaram avançando durante 2004–2007, com a introdução do vírus na Europa (Reino Unido, Bélgica, Alemanha, República Tcheca, Noruega, Itália, Espanha e França), Hong Kong, Canadá, Taiwan, Sri Lanka e EUA com centenas de milhares de casos relatados (Powers e Logue, 2007). Atualmente o CHIKV é considerado um patógeno global, circulando ou tendo circulado em aproximadamente 100 países (figura 1) (Deeba *et al.*, 2016, 2020).

Figura 1 – Países onde a infecção por CHIKV foi reportada até outubro de 2020.

Fonte: *Centers for Disease Control and Prevention* – CDC (CDC, 2020)

Em 2013, foram notificados os primeiros casos de transmissão autóctone de CHIKV no continente americano, na ilha de São Martinho e nas Ilhas Martinica. Em janeiro de 2014, as transmissões de CHIKV ocorreram em várias ilhas do Caribe, com número de infectados superando a marca de 30.000 em apenas 4 meses (Leparc-Goffart *et al.*, 2014; Nasci, 2014).

No início de 2014, as infecções por CHIKV haviam avançado até território continental com infecções autóctones reportadas. A Guiana Francesa foi o primeiro país da América do Sul a declarar infecção pelo CHIKV, onde de 2014 a 2015, mais de 16.000 indivíduos foram infectados. Com maior ocorrência de surtos em diferentes locais e consequentemente maior número de indivíduos infectados, foi observado o surgimento de diversas manifestações atípicas, como distúrbios neurológicos, insuficiência cardiorrespiratória, hepatite aguda, pancreatite aguda, distúrbios renais e comprometimento muscular (Bonifay *et al.*, 2018).

No Brasil, a primeira transmissão local do CHIKV ocorreu em setembro de 2014 pela linhagem asiática, na cidade de Oiapoque, no estado do Amapá. Logo após essa primeira detecção autóctone, infecções por CHIKV do genótipo ECSA foram notificadas na cidade de Feira de Santana, estado da Bahia, região Nordeste do Brasil. Os genótipos asiáticos e ECSA circularam simultaneamente nas regiões Norte e Nordeste do Brasil

(Nunes *et al.*, 2015). No Brasil, de 2015 a 2019 foram confirmados 712.990 casos de CHIKV, com maior incidência nas regiões Sudeste e Nordeste, representando dois terços de todos os casos confirmados (Cunha *et al.*, 2020).

1.3.2 Genoma e estrutural viral

A partícula viral de CHIKV é composta por um RNA genômico de fita simples positiva com 11,8 Kb. Seu genoma possui duas regiões abertas de leitura: a primeira localizada à 5' que codifica a poliproteína precursora P1234 que origina as proteínas não-estruturais (nsPs1-4) (Khan *et al.*, 2002) e a região 3' que codifica a poliproteína precursora das proteínas estruturais. O genoma do CHIKV se assemelha aos mRNAs eucarióticos, pois possui estruturas de 5'-cap e cauda de 3'-poli (A) (Silva e Dermody, 2017; Solignat *et al.*, 2009).

Figura 2 - Organização do genoma e produtos gênicos do CHIKV.

As sequências proximais 5' e 3' do genoma de CHIKV possuem regiões não traduzíveis (NTR). A região de junção (J) também não é codificadora. O mRNA de fita positiva, também denominado RNA 26S, é transcrito a partir de um intermediário de RNA de fita negativa e serve como o mRNA para a síntese das proteínas estruturais virais. As diferentes proteínas não estruturais (nsP1 – nsP4) e proteínas estruturais (C, Capsídeo; E1, E2, E3, envelope; 6K) são geradas após a clivagem proteolítica de precursores da poliproteína (Fonte: adaptado de Solignat *et al.*, 2009).

Os vírions apresentam conformação icosaédrica e possuem de 60–70 nm de diâmetro. São compostos pelo nucleocapsídeo envolvido por uma membrana fosfolipídica derivada do hospedeiro. O nucleocapsídeo do CHIKV apresenta simetria icosaédrica $T = 4$ e consiste no RNA viral recoberto por 240 cópias da proteína do capsídeo (Voss *et al.*, 2010). A proteína do capsídeo do CHIKV é organizada em 3 regiões (I, II e III) e possui 261 aminoácidos (Hong, Perera e Kuhn, 2006; Khan *et al.*, 2002).

Na região I, o capsídeo possui uma porção N-terminal com baixo grau de conservação que tem papel potencial na montagem do RNA viral pelos resíduos Arg, Lys e Pro carregados positivamente. A região II está envolvida na ligação do RNA genômico viral sintetizado com a proteína do capsídeo, que é empacotado com alta especificidade devido a sinais do gene nsP2. Assim, apenas o RNA genômico total é capaz de formar vírions (Owen e Kuhn, 1996; Weiss *et al.*, 1989).

A proteína do capsídeo de CHIKV também atua no processo de brotamento do vírus. Inicialmente, são formados dímeros do capsídeo ligado ao RNA viral, 120 cópias que se oligomerizam posteriormente e formam o nucleocapsídeo no citoplasma das células infectadas (Perera *et al.*, 2001). Posteriormente, os nucleocapsídeos são transportados para a membrana plasmática a se associarem a E2 para início do brotamento do vírion (Metz e Pijlman, 2016).

Os *Alphavirus* possuem um envelope membranoso derivado da célula hospedeira que o vírus incorpora durante o brotamento. Este envelope é composto por glicoproteínas virais que atuam na ligação do vírus com receptores da célula hospedeira e também na liberação do vírion para o citoplasma através da fusão da membrana endossomal (Metz e Pijlman, 2016). O CHIKV codifica duas poliproteínas, sendo uma delas a de envelope, que após clivagem proteolítica origina quatro proteínas de envelope na ordem E3-E2-6K-E1. Há também uma proteína *transframe* (TF) adicional originada de um evento de *frameshift* no final de 3' de 6K (Firth *et al.*, 2008). Nem todas as proteínas estruturais do cassete do envelope são incorporadas nas partículas virais, tendo em vista que a E3 não é associada ao vírion maduro (Simizu *et al.*, 1984).

As duas proteínas mais importantes do cassete do envelope são as glicoproteínas: a E1, responsável pela fusão viral e E2 responsável pela ligação ao receptor da célula hospedeira. A E2 é inicialmente expressa como o precursor E2 (E3, E2 ou PE2) e sofre modificações em vários compartimentos celulares. E1 e E2 são proteínas de membrana

integrais N glicosiladas do tipo I que possuem domínios transmembranares próximos a C-terminal, seguidos por uma cauda citoplasmática. Os heterodímeros E1 e E2 são expostos na superfície do vírion como pontas triméricas e são os principais alvos para uma resposta de anticorpos neutralizantes (figura 3), muito embora seja E2 o antígeno primário (Strauss e Strauss, 1994). Além de se ligar aos receptores celulares durante a via de entrada vesicular, E2 é essencial na translocação intracelular e enovelamento das outras proteínas do envelope. A E2 ainda atua como um fator estabilizador para as interações E1-E2 durante o transporte do retículo endoplasmático para a membrana plasmática na célula hospedeira (Metz e Pijlman, 2016).

Figura 3 - Características genômicas e estruturais do vírus Chikungunya

A e B, reconstrução microscópica crioelétrica de partículas semelhantes ao vírus CHIKV e representação ampliada das pontas triméricas consistindo em heterodímeros de glicoproteínas do envelope E1 e E2. Abreviaturas: E, envelope; TM, transmembrana. Fonte: adaptado de Erasmus, Rossi e Weaver, 2016

1.3.3 Proteína de Envelope 2

A glicoproteína CHIKV E2 consiste de 423 aminoácidos dispostos em três domínios (A, B e C) com conformação semelhante as imunoglobulinas. O domínio A contém o sítio de ligação ao receptor (Hunt *et al.*, 2006; Porta *et al.*, 2014; Roehrig, Day e Kinney, 1982; Smith *et al.*, 1995), o domínio B está na extremidade distal de cada ponta recobrendo o *fusion loop* em DII de E1, enquanto o domínio C está situado mais próximo da membrana viral. O domínio B está conectado aos domínios A e C por uma fita- β (Li *et al.*, 2010; Voss *et al.*, 2010).

Figura 4 - Estrutura do heterodímero E1/E2 do vírus Chikungunya (PDB 3N42)

Estrutura do heterodímero E1E2 do vírus chikungunya . Os conectores de fita β de amino e carboxi E2 para o domínio B são de cor marrom e o *fusion loop* E1 é de cor preta. As esferas vermelhas e azuis representam os aminoácidos nas pegadas Fab 8B10 e 5F10, respectivamente. As esferas de cor cinza representam mutantes de escape. Fonte: (Porta *et al.*, 2016)

Durante os estágios iniciais da infecção, o receptor celular do hospedeiro é reconhecido pela glicoproteína de superfície E2. Uma vez que o vírus foi internalizado, o baixo pH do endossomo faz com que o vírion sofra uma mudança conformacional irreversível, resultando na dissociação de E2 de E1 e na formação de trímeros de E1 (Li *et al.*, 2010). A glicoproteína E1 possui um *loop* de fusão hidrofóbico responsável pela fusão da membrana viral com a membrana endossômica, este *loop* em pH neutro é recoberto pela E2. Após a dissociação de E2, o *loop* de fusão então se funde com a membrana endossômica, liberando o genoma viral no citoplasma do hospedeiro, onde a replicação de novas partículas virais começa (Porta *et al.*, 2016).

O ápice do domínio A e uma parte do domínio B possuem o sítio de ligação putativo para o receptor do hospedeiro (Dubuisson e Rice, 1993; Li *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2013), que foi confirmado pela identificação de um receptor compartilhado, Mxra8, para uma série de *Alphavirus* artritogênicos, incluindo CHIKV, O vírus o'nyong nyong (ONNV), MAYV e RRV (Zhang *et al.*, 2018). Em pH neutro, o domínio B de E2 protege o *loop* de fusão na extremidade distal de E1 da ativação (Lescar *et al.*, 2001; Mukhopadhyay *et al.*, 2006; Voss *et al.*, 2010). As estruturas crio-EM de vários *Alphavirus* mostraram que o domínio B de E2 tem uma densidade de elétrons mais baixa em comparação com outros domínios, sugerindo que o domínio B seja flexível. Em pH

baixo, o domínio B de E2 está desordenado e a alça de fusão na ponta do domínio E1 II é exposta na estrutura cristalina de raios-X das proteínas do envelope dos *Alphavirus* (Dubuisson e Rice, 1993; Li *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2013).

1.4 Anticorpos

Os anticorpos neutralizantes contra vírus são comumente avaliados quanto às suas capacidades de inibirem a entrada do vírus nas células-alvo. A neutralização da entrada de vírus envelopados por anticorpos monoclonais (mAbs) pode ocorrer por meio de dois mecanismos principais: inibição da ligação ao receptor e prevenção de alterações conformacionais nas proteínas de fusão viral pós-ligação ao receptor. Para *Alphavirus*, a fusão da membrana ocorre em endossomas acidificados após o vírus entrar nas células hospedeiras (Jin e Simmons, 2019).

O receptor celular usado pelo CHIKV e por outros *Alphavirus* artritogênicos para infecção celular não era conhecido, porém alguns estudos indicavam que os glicosaminoglicanos da célula hospedeira eram utilizados pelo vírus para a entrada na célula (Gardner *et al.*, 2014; Smit *et al.*, 2002; Weber *et al.*, 2017), como a imunoglobulina de células T e mucina 1 (TIM-1) (Moller-Tank *et al.*, 2013), e outras proteínas de ligação a PtdSer, como Axl e TIM- 4 (Jemielity *et al.*, 2013) e a proibitina (Wintachai *et al.*, 2012). No entanto, recentemente foi demonstrado que o CHIKV e outros *Alphavirus*, como o RRV e o MAYV, utilizam o Mxra8, uma molécula de adesão de células epiteliais, mielóides e mesenquimais, como receptor celular para a entrada na célula hospedeira. Exceto a cepa CHIKV ECSA La Réunion que ainda infectava células deletérias para o receptor, indicando que possa haver a utilização de outros receptores na infecção. (Zhang *et al.*, 2018).

O sítio de ligação do vírus CHIKV ao receptor se encontra na proteína E2, um epítopo acessível a solvente abrangendo o topo do domínio A e domínio B (Zhang *et al.*, 2018). Foram descritos diversos mAbs neutralizantes que se ligam nos epítopos do domínio A (2H1, 8G18, 3E23 e 1O6) e também o mAb neutralizante humano 4J21 que se liga a epítopos que abrangem o domínio A e o domínio B, sendo capazes de inibir a ligação do CHIKV ao receptor Mxra8 (Smith *et al.*, 2015). Além destes anticorpos, foi demonstrado através de crio-EM que outros anticorpos neutralizantes humanos e murinos se ligam aos domínios A e B da proteína E2, e bloqueiam a ligação do CHIKV ao receptor da célula hospedeira (Porta *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2013).

O último mecanismo para que ocorra a neutralização de *Alphavirus* é evitar a fusão do envelope viral com a membrana do endossomo da célula hospedeira. Para isso, anticorpos neutralizantes (nAbs) precisam manter o domínio B de E2 em sua conformação original para evitar que ocorra a exposição do loop de fusão no endossomo. Em estudos com estruturas cryo-EM de CHIKV VLP em complexo com fragmentos Fab de mAb de camundongo (Sun *et al.*, 2013) e mAb humano (Long *et al.*, 2015), ambos os mAbs abrangem o domínio A e o domínio B de E2, bem como o conector de fita β que liga os dois domínios dentro de uma molécula E2. Ambos os anticorpos, CHK-152 (Pal *et al.*, 2013) e 5M16 (Smith *et al.*, 2015) bloqueiam com eficiência a fusão do CHIKV ao endossomo. Estes mAbs se ligam de forma cruzada ao domínio B flexível com o resto da superfície do vírus, mantendo assim o loop de fusão não exposto abaixo do domínio B (Jin e Simmons, 2019). Estes estudos demonstram a importância do domínio B da E2 para o ciclo de replicação viral do CHIKV, como também a neutralização deste alvo por anticorpos pode prevenir a infecção em modelos *in vitro* e *in vivo*.

Diante de tal contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de um peptídeo recombinante do envelope de CHIKV expresso em sistema heterólogo em gerar anticorpos neutralizantes. Desta forma, o uso de técnicas de baixo custo para geração de insumos biotecnológicos se faz relevante, tendo em vista que até o momento não há nenhum tratamento ou profilaxia específica para CHIKV.

2.Objetivos

2. Objetivo geral

Avaliar as propriedades imunogênicas do domínio B da proteína de envelope E2 de CHIKV expressa em sistema procarioto.

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar a o grau conservação da sequência de aminoácidos das proteínas de envelope e mapear os potenciais epítomos para uso na neutralização do CHIKV;
- Expressar o peptídeo recombinante em sistema procarioto;
- Avaliar a conformação da estrutura secundária do peptídeo recombinante;
- Avaliar o reconhecimento do soro de camundongos infectados por CHIKV frente ao peptídeo recombinante expresso;
- Imunizar camundongos Balb/c com o peptídeo recombinante e avaliar a soroconversão e geração de anticorpos neutralizantes.

3.Material e Métodos

3.1 Análise do grau de conservação das proteínas de envelope

Os peptídeos de epítomos sobre o CHIKV que foram alvos de estudo são resultantes do projeto intitulado “*Busca por novos epítomos conformacionais voltada para o desenvolvimento de soroterapia a partir de nanocorpos do tipo VHH para tratamento de doenças virais agudas tropicais com especial foco em zika, chikungunya e febre amarela*”, processo CNPq 118449/2017-6.

Os genomas para o CHIKV foram obtidos a partir do banco de dados *Virus Pathogen Database and Analysis Resource (ViPR)*. As regiões de interesse para a busca por epítomos são as regiões expostas sobre a superfície do vírus formadas a partir da organização das proteínas de envelope E1 e E2. Como referência para a escolha das sequências para as análises de conservação e construção dos mapas foram utilizadas as regiões solúveis das proteínas de envelope que estão depositadas no PDB com ID 3J2W (Sun *et al.*, 2013). Esta estrutura corresponde à forma madura do vírus e a cadeia A foi utilizada como referência para E1 e a cadeia M para E2, sendo denominadas como sE1 e sE2, respectivamente, ao longo deste trabalho. As demais cadeias que se repetem para formação da unidade assimétrica para a construção da forma biológica das cadeias e regiões transmembrana foram excluídas.

As sequências obtidas foram então filtradas para remoção de sequências incompletas, duplicatas e com baixa qualidade utilizando o pacote MAFFT (Katoh e Standley, 2013) no programa Jalview (Waterhouse *et al.*, 2009). O alinhamento resultante de sE1 e sE2 foi utilizado para estimar o grau de conservação evolucionária utilizando o ConSurf 2016 (Ashkenazy *et al.*, 2016), o algoritmo do programa ConSurf determina um *score* de conservação relativo a partir da variação de cada resíduo de aminoácido em determinada sequência. Os *scores* são normalizados pelo programa para que a média seja igual a zero, assim os valores positivos e negativos denotam o grau de conservação e a variação. Os *scores* são então convertidos em uma escala de 1 a 9 (1 para mais variável, 5 para valores medianos e 9 para mais conservado) de forma a gerar um *heatmap* sob a superfície molecular para a visualização das regiões de maior conservação e variação.

3.2 Mapeamento de epítomos

A busca por epítomos foi realizada utilizando o The Immune Epitope Database (IEDB) (Vita *et al.*, 2014) através da plataforma do ViPR e se deu a partir de informações

sobre epítomos para a proteína E1 e E2 em células B que foram determinados experimentalmente e apresentam resultados positivos nos ensaios decorrentes. Também foi realizada no PDB a busca pela estrutura tridimensional de anticorpos contra o envelope de CHIKV.

3.3 Expressão do peptídeo

3.3.1 Vetor de expressão

A sequência nucleotídica correspondente ao domínio B da proteína E2 de envelope do Chikungunya foi sintetizada e clonada no vetor pET22b(+) pela empresa FastBio© (BR). O plasmídeo foi entregue liofilizado, posteriormente ressuspensionado em 20µl de água ultrapura (autoclavada), conforme recomendações do fabricante.

Figura 5 – Vetor de expressão pET22b(+)

O vetor possui uma calda de Histidina (His-tag) na porção C-terminal, um sítio de trombina e uma sequência T7. Uma sequência de sinal pelB N-terminal para localização periplasmática potencial. XhoI e NdeI foram

escolhidas como enzimas de restrição para inserção da sequência do peptídeo recombinante de CHIKV. ORI – Origem de replicação do bacteriana; AmpR – Gene de resistência ao antibiótico Ampicilina; Promotor – LacI; f1 origin- Origem de replicação do bacteriófago. Imagem gerada no software SnapGene© Copyright 2018 GSL Biotech LLC.

3.3.2 Expressão do peptídeo recombinante

O vetor contendo a sequência foi transformado utilizando a cepa SHuffle por choque térmico em uma proporção de 2 µL de plasmídeo para 98 µL de células Ca⁺ competentes. Em seguida, a regeneração das células bacterianas foi feita em 1 mL de meio S.O.C por uma hora a 30°C em agitação branda. As células foram posteriormente centrifugadas (centrífuga Eppendorf, modelo 5415 R) a 5000xg por três minutos a 25°C. O pellet foi ressuspensionado em 50 µL de meio de cultura e inoculados em meio LB sólido seletivo (contendo 50µg/mL de estreptomicina e 50µg/mL ampicilina) a 30°C por 15 horas. Posteriormente com uma das colônias isoladas foi realizado o repique em um tubo de ensaio contendo 5 mL de LB líquido com 50µg/mL de estreptomicina, 50µg/mL de ampicilina e 10 mmol/L de MgSO₄. Os tubos foram incubados sob agitação branda a 30°C por 12 horas, posteriormente 2,5 mL de cultura foi inoculado em 500 mL de meio LB líquido contendo 50µg/mL de estreptomicina, 50µg/mL de ampicilina e 10 mmol/L de MgSO₄, incubados sob agitação branda em temperatura de 30°C.

A expressão foi induzida com 0.6 mmol/L de isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG, Promega) quando a cultura atingiu OD 0.6 (600nm). Após a indução, a cultura permaneceu sob agitação branda a 16°C. Após 24 horas, as células foram centrifugadas a 5000x g por 10 minutos a 4°C. O pellet foi então ressuspensionado em 20 mL de tampão de lise (50 mmol/L fosfato de sódio, 300 mmol/L NaCl, 40 mmol/L imidazol pH 8.0) contendo 4 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, Sigma) e 1% (v/v) Triton X-100. Após a completa dissolução do pellet, foi aplicada a sonicação (Sonicador de sonda, Fisher Scientific) em um gradiente de amplitude de 20-100% com intervalos de 20%. Na faixa de 20-60% o processo se repetiu por 2 vezes de 30s em cada amplitude com intervalos de 30s entre cada pulso; de 80-100% o processo foi repetido por 2 vezes 15s com intervalos de 45s, sendo posteriormente o lisado de bactérias centrifugado a 10000xg por 30 min a 4°C. Aliquotas foram coletadas em diferentes momentos durante o processo de expressão do peptídeo para análise por gel SDS-PAGE, sendo estes a indução com IPTG, 24 horas após a indução e as frações solúvel e insolúvel obtidas após centrifugação do lisado de bactérias. A fração solúvel foi submetida a purificação em sistema ÄKTA (GE Healthcare) com coluna HisTrap FF Crude (GE

Healthcare) pré-equilibrada com 20 mL de tampão A (50 mmol/L fosfato de sódio, 300 mmol/L NaCl). A fração ligada a coluna foi eluída utilizando-se um gradiente linear de imidazol (0 a 0.5 M), de 10-100% a cada 1,5 mL. Os diferentes estágios do processo de purificação e a fração eluída da proteína foram avaliados por SDS-PAGE 15% e o gel corado com Coomassie brilliant blue R-250 (Sigma-Aldrich). O peptídeo eluído foi quantificado pelo método de Bradford. A fração eluída foi dialisada em SnakeSkin™ Dialysis Tubing, 3.5K MWCO Thermo Scientific™ com tampão fosfato-citrato pH 5,0.

3.4 Dicroísmo circular (DC)

Os espectros de DC do peptídeo recombinante foi obtido após a diálise da fração solúvel, descrito anteriormente, em um espectropolarímetro JASCO810 (JASCO Inc., Tokyo, Japan - alocado no Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP). Cada espectro de DC acumula quatro varreduras a 50 nm/min com uma fenda de 1 nm de largura e resposta de 1 segundo. Os espectros de UV distante da proteína recombinante (0,2 mg/mL) foram coletados entre 190-250 nm (tampão 20 mmol/L fosfato/citrato, pH 5, dialisado por 12 horas) para o monitoramento da estrutura secundária. O espectro foi corrigido para as contribuições dos tampões e convertidos para MRE (*mean residue ellipticity*) em $\text{deg.cm}^2.\text{mol}^{-1}$, definido como:

$$MRE = \frac{M\theta_{\lambda}}{10dcr}$$

Onde M é a massa molecular da proteína, θ_{λ} é o valor obtido a partir da medida em milidegree, d é o caminho óptico em cm, c é a concentração da amostra de proteína em mg/mL e r é o número estimado de resíduos de aminoácidos na proteína analisada (Kelly e Price, 1997). O resultado foi plotado na plataforma online BeStSel (Micsonai *et al.*, 2015, 2018), para verificação da porcentagem de cada tipo de estrutura secundária.

3.5 Predição da estrutura secundária a partir a partir de simulação molecular

O programa gmx do_dssp (*Dictionary of Secondary Structure of Proteins*) (Kabsch e Sander, 1983), permite quantificar as diferentes estruturas secundárias de uma proteína a partir da estrutura tridimensional conhecida. Utilizando das características geométricas e comportamento dos aminoácidos expostos a solventes e das coordenadas atômicas das ligações de hidrogênio entre os átomos. O programa utiliza a estrutura tridimensional de uma molécula conhecida para então através de um algoritmo obter a estrutura secundária mais provável dado a sua estrutura. O programa avalia a posição dos

átomos na proteína e, posteriormente, calcula a energia de ligação de hidrogênio entre eles. A partir disso, o algoritmo possibilita definir a melhor ligação de hidrogênio para cada átomo, e determinar o tipo de estrutura secundária na proteína. Foi gerada uma trajetória de 100 ns a partir do modelo utilizado anteriormente 5ANY, a partir da trajetória gerada pelo programa dos aminoácidos em solução o algoritmo define as porcentagens das estruturas secundárias mais prováveis na molécula.

3.6 Avaliação sorológica

Para avaliar a capacidade do peptídeo recombinante em gerar uma resposta sorológica, foram utilizados três camundongos machos Balb/c com 6 semanas. Foram realizadas 4 imunizações com intervalo de 7 dias em cada camundongo. As imunizações foram administradas via intraperitoneal utilizando 30 µg do peptídeo, sendo a primeira imunização realizada com adjuvante de Freund's completo e as outras três imunizações utilizando o adjuvante de Freund's incompleto. Após o fim das imunizações foi obtido um *pool* de soro dos camundongos imunizados.

3.6.1 Avaliação da resposta imune de camundongos Balb/C imunizados

A resposta de anticorpos dos camundongos por imunização com o peptídeo expresso foi avaliada por ELISA. Para isso, placas 96 poços do tipo Nunc-MaxiSorp (eBioscienc -EUA) foram adsorvidas com 50µl do peptídeo expresso na concentração de 1µg/ml com tampão carbonato-bicarbonato a 0,05M (pH 9,6). A placa foi incubada a 4°C por 16 horas. Após a incubação, a placa foi lavada por 3 vezes com 150 µL de tampão PBS 1X pH= 7,4 + *Tween* 0,05% para a adição de 150 µL de Solução Bloqueio 5% (5% Leite desnatado – Molico + PBS 1X pH= 7,4), seguida de incubação em câmara úmida por 4 horas a 4°C. Após isso, a placa foi novamente lavada 3X com PBS 1X pH= 7,4 + *Tween* 0,05%. O *pool* de soro foi titulado em Solução Bloqueio de 1/10 a 1/10000, dispostos em duplicada na placa e submetidos a incubação a 37°C por 1 hora.

Novamente, a placa foi lavada 4X com PBS 1X pH= 7,4 + *Tween* 0,05%. Em seguida, foram adicionados 50µL do anticorpo secundário conjugado à peroxidase (Anti-Mouse IgG) na diluição 1:2000 e incubado por 1 hora em câmara úmida a 37°C.

Após 1 hora, a placa foi lavada novamente 5X com PBS 1X pH= 7,4 + *Tween* 0,05%. Foram adicionados 50 µL do substrato TMB e incubado em câmara úmida a 37°C. Após 15 minutos, foram adicionados à reação de cada poço 50 µL de HCl 1N, seguido de leitura imediata no comprimento de onda de 450nm, filtro de referência 620nm.

3.7 Teste de neutralização por redução de plaque (PRNT)

Para avaliar a capacidade de neutralização dos anticorpos gerados pela imunização dos camundongos com peptídeo expresso foi realizado o teste de neutralização por redução de 50% das placas virais (PRNT50). Assim, 4×10^5 células Vero foram semeadas em placas de 24 poços e incubadas por 24 horas a 37°C em 5% de CO₂. Os soros foram titulados (1/2,5 até 1/20) e adicionados ao CHIKV em quantidade constante de $5,75 \times 10^5$ PFU, valor de vírus definido após titulação viral. O soro utilizado foi aquecido a 56°C por 1 hora para inativação de proteínas do sistema complemento. Para que ocorresse a neutralização, incubou-se a mistura do soro juntamente com o vírus por 1 hora a 37°C. Em seguida, sobre a monocamada de células Vero, foram adicionados 100µl das misturas soro-vírus aos poços da placa em duplicata. Como controle foi positivo foi adicionado somente de $5,75 \times 10^5$ PFU do vírus ao poço, e como controle de viabilidade celular foi adicionado 100µL de meio DMEM. A placa foi incubada por 1 hora a 37°C sob agitação. Posteriormente, adicionou-se sobre as monocamadas celulares, 2ml de DMEM (Gibco – Life technologies™) contendo 2% de carboximetilcelulose (CMC) e 2% de soro fetal bovino (SFB) (Vitrocell, Brasil), seguido de incubação por 4 dias a 37°C em 5% de CO₂. Ao final, fixaram-se as células removendo o meio contendo CMC e adicionando 2ml de solução formaldeído a 10% em PBS, seguido por incubação de 2 horas e descarte do sobrenadante. As células foram coradas com 1ml de cristal violeta a 1% por 1 hora. As placas virais, ou seja, os espaços circulares formados na monocamada celular devido a morte celular pela infecção viral, foram contadas e uma média entre os poços foi obtida. Comparou-se este resultado a média obtida em orifício com o controle-viral, definindo-se assim a porcentagem de neutralização para cada diluição do soro.

4.Resultados e Discussão

4.1 Avaliação do grau de conservação evolucionário

O alvo inicial é a proteína de envelope que forma a superfície do vírus, ou seja, busca-se a neutralização do vírus antes que ocorra o processo de infecção. A escolha das regiões para a construção dos peptídeos foi realizada a partir do levantamento de múltiplos fatores como regiões expostas sobre a superfície do vírus que são conservadas, regiões que são alvos de epítomos e outras propriedades estruturais.

A partir do ViPR foram obtidas 4228 e 1351 sequências para as proteínas E1 e E2, respectivamente. Após as etapas de remoção de sequências incompletas e redundantes e, daquelas que levavam à baixa qualidade de alinhamento e seleção dos correspondentes às sequências sE1 e sE2, restaram apenas 171 e 83 sequências, respectivamente. A matriz de alinhamento foi utilizada como entrada para estimar o grau de conservação evolucionária onde os valores obtidos estão demonstrados na Figura 6. É possível observar a presença nas proteínas de envelope tanto de regiões sequenciais de aminoácidos conservados quanto variáveis.

Figura 6 - Resultados do cálculo para estimação do grau de conservação evolucionária realizado com o programa *Consurf*

Figura 6 - Resultados do cálculo para estimação do grau de conservação evolucionária realizado com o programa *Consurf* onde as barras correspondem aos scores normalizados para as

sequências sE1 (top) e sE2 (bottom). As cores são resultado da aplicação de um gradiente ciano-branco-marrom entre os números 1 e 9 com o ponto médio em 5 sob os dados gerados a partir da transformação realizada pelo algoritmo do *Consurf* para visualização da superfície molecular gerando índices entre 1 (variável) e 9 (conservado).

A partir dos dados gerados com o grau de conservação dos aminoácidos foi realizado o mapeamento destes sob a superfície dos picos virais do CHIKV. Como observado na figura 7, as sequências contínuas de aminoácidos conservados apresentam uma outra sequência conservada próxima e o mesmo pode ser observado para as sequências variáveis.

Resíduos de aminoácidos críticos para a retenção da função de uma proteína estão associados a uma baixa variabilidade de sua sequência de aminoácidos. Assim, regiões que possuam sequências de baixa variabilidade quanto aos diferentes tipos de aminoácidos, representam alvos importantes para o desenvolvimento de terapias baseada em epítomos, tendo em vista estes epítomos se manterem constantes em diferentes estágios do ciclo replicativo do patógeno (Bui *et al.*, 2007).

O CHIKV é um vírus altamente conservado quando comparado com outros vírus, como HIV, influenza e hepatite que são altamente variáveis. As sequências de envelope de diferentes linhagens de CHIKV são 95-99,9% conservadas. O CHIKV apesar de apresentar quatro linhagens genéticas distintas classificadas com base em E1, possui apenas um único sorotipo (Erasmus, Rossi e Weaver, 2016b).

A proteína E2 do CHIKV além de ser conservada entre as diferentes linhagens do vírus, é também entre outros *Alphavirus*, como; ONNV, MAYV, RRV e SFV. A similaridade da sequência de aminoácidos, MAYV é 60%, ONNV é 86% e SFV e RRV são 57,6% idênticos ao CHIKV (Fox *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2019). A característica de possuir o envelope altamente conservado o torna um alvo atrativo para neutralização com anticorpos.

Tendo em vista estes fatores, a seleção de uma região conservada para o desenvolvimento de terapias baseada em epítomos pode vir a ser eficaz em fornecer proteção de amplo espectro e evitar o escape do vírus.

Figura 7 - Localização dos monômeros sE1 e sE2.

Figura 7 – Localização dos monômeros sE1 (verde) e sE2 (ciano) em um dos picos (tradução do inglês *spike*) formados pelo arranjo de três heterodímeros sE1/sE2 sobre a superfície do vírus e mapeamento a partir da análise de conservação onde as cores são resultado da aplicação de um gradiente ciano-branco-marrom entre os números 1 (variável) e 9 (conservado) com o ponto médio em 5 sob os dados gerados a partir da transformação realizada pelo algoritmo do *Consurf*. As localizações dos monômeros sE1 e sE2 são exemplificadas nos painéis A e C como estruturas secundárias e superfícies, respectivamente. Os respectivos mapas de conservação encontram-se nos painéis B e D.

4.2 Mapeamento dos epítomos obtidos a partir de banco de dados sobre a superfície viral

A interação entre um anticorpo e seu antígeno é o passo central para que ocorra a resposta imune humoral. Os anticorpos ligam-se aos seus antígenos correspondentes em locais denominados determinantes antigênicos ou epítomos, conforme definição (Jerne, 1960). A localização de um epítomo pode ser essencial no desenvolvimento de aplicações biomédicas na geração de anticorpos, como vacinas, kits de diagnóstico e imunoterapia (Irving, Pan e Scott, 2001; Rubinstein *et al.*, 2008). Deste modo, determinar a localização

de epítomos conhecidos auxiliam na escolha de um alvo molecular que possa reter a estrutura e a função de um epítomo nativo, reduzindo o número de experimentos e consequentemente o tempo e o custo do processo.

Em relação a busca por epítomos em banco de dados, não há vasta informação estrutural no PDB em relação aos complexos formados entre as proteínas de envelope do CHIKV com anticorpos. A única entrada disponível no memento da consulta tem o ID 5ANY (Fox *et al.*, 2015).

O mapeamento da superfície para os epítomos a partir do banco de dados encontra-se na Figura 8, onde é possível observar que as regiões alvo de anticorpos concentram-se entre domínio A e B da sE2. Os dados na literatura apontam que o domínio B é bastante flexível. Esta flexibilidade está relacionada à exposição do peptídeo de fusão na E1 e é modulada pela ligação de anticorpos no domínio B, o que compromete a exposição do peptídeo de fusão (Sun *et al.*, 2013), consequentemente não ocorre a mudança conformacional necessária em E1 para a liberação do material genético viral para o citoplasma (Jin e Simmons, 2019). Um outro mecanismo que pode levar a neutralização por estes anticorpos é impedir a ligação do vírus com o receptor do hospedeiro utilizado para infecção, como demonstrado na literatura que o local de contato entre o Mxra8 e glicosaminoglicanos fica no domínio B de E2 localizado no pico viral (Kumar *et al.*, 2020).

Figura 8 – Mapeamento de epítomos de células B em uma espícula de CHIKV.

Figura 8 –Mapeamentos correspondem às regiões que são resíduos detectados como epítomos de células B (em marrom).

Portanto, os dados tanto da análise de conservação e do mapeamento de epítomos demonstram que o domínio B é um alvo conservado e antigênico do envelope dos *Alphavirus* e pode ser utilizado para o desenvolvimento de terapia de anticorpos de amplo espectro.

4.3 Expressão do peptídeo recombinante

Os sistemas procarióticos são comumente utilizados para expressar proteínas recombinantes, incluindo antígenos de CHIKV, como foi demonstrada a expressão da proteína E2 (Tripathi, Nagesh K, Priya e Shrivastava, 2014; Tripathi, Nagesh K., Priya e Shrivastava, 2014). Essas plataformas apresentam vantagens de serem simples, rápidas e econômicas. Devido à presença de pontes dissulfeto no peptídeo alvo, foi utilizada a cepa *E. coli* SHuffle para expressão. Esta cepa é específica para expressão de proteínas com

ligações dissulfeto em seu citoplasma, pois possui mutações para permitir a oxidação das cisteínas no citoplasma, através do *knocking out* das redutases *glutaredoxin* e *thioredoxin* (*trx* e *grx*), além de possuir integrado ao seu cromossomo uma isomerase de ligação dissulfeto sem sequência de sinal, DsbC (Lobstein *et al.*, 2012).

A linhagem de *E. coli* SHuffle foi transformada com o plasmídeo pET22b(+) contendo a sequência de interesse. Após a expressão, as células bacterianas foram lisadas para obtenção de um extrato solúvel que foi submetido a purificação em sistema ÄKTA (GE Healthcare) com coluna HisTrap FF Crude (figura 9), o que permitiu a obtenção do peptídeo majoritariamente purificado. A figura 10 mostra o gel de SDS-PAGE 15% atestando que o peptídeo de interesse foi eficientemente expresso após 24 horas de indução com IPTG. Na figura pode-se observar a presença de uma banda de aproximadamente 11kda, que representa o peptídeo com His-tag e um sítio de clivagem de trombina.

Figura 9 - Cromatograma de purificação da proteína de CHIKV/ Expressão 400 mL, 16°C, 24 horas. Cromatograma da purificação em coluna de níquel em sistema ÄKTA *fast protein liquid-chromatography* (FPLC).

Figura 10 - Eletroforese em gel desnaturante da proteína recombinante do envelope do CHIKV.

Figura 9 - Gel de SDS-PAGE 15% corado com *Coomassie Brilliant Blue*. (1) Marcador de peso molecular BIO-RAD Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards. (2 - 250 kDa); (2) Meio antes da indução com IPTG; (3) Meio após 24 horas de incubação com IPTG; (4) Extrato insolúvel; (5) Extrato solúvel; (6) *Flowthrough*. (7) *Wash*; (8) Proteína majoritária após purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel;

Foi demonstrado previamente que a proteína E2 expressa em sistema procarioto é capaz de gerar anticorpos quando utilizada na imunização de coelhos (Tripathi, Nagesh K, Priya e Shrivastava, 2014), como também sua utilização em ensaios diagnósticos (Bagno *et al.*, 2020; Fumagalli *et al.*, 2018).

Um estudo também demonstrou que a utilização de subunidades da proteína E2, como o domínio B com a sequência do conector β , presente entre o domínio A e B, foi capaz de gerar anticorpos neutralizantes (Weber, Büchner e Schnierle, 2015a). Assim, os resultados obtidos em consonância com os dados da literatura corroboram com a utilização do peptídeo expresso para a geração de anticorpos potencialmente neutralizantes.

4.4 Avaliação da estrutura secundária do peptídeo expresso por dicroísmo circular

O dicroísmo circular (DC) é um excelente método para avaliar a estrutura secundária, propriedades de enovelamento e ligação de proteínas. O DC é definido como a absorção desigual de luz polarizada circularmente para direita e esquerda. Um feixe de luz tem campos elétricos e magnéticos dependentes do tempo associados a ele. Quando a luz polarizada passar por prismas, seu campo elétrico (E), oscilará sinusoidalmente em um único plano. Quando vista de frente, a onda senoidal pode ser entendida como a resultante de dois vetores de igual comprimento, que traçam círculos, um que gira no sentido horário (ER) e outro no sentido anti-horário (EL). As duas ondas polarizadas circularmente têm existência física (Beychok, 1966; Greenfield, 2007).

Após a etapa de purificação do peptídeo e diálise em tampão fosfato-citrato pH 5,0 foram realizados os experimentos de DC para avaliar a integridade da estrutura secundária do peptídeo recombinante expresso. Como observado na figura 11 os espectros de UV distante da proteína recombinante coletados entre 190-250 nm.

Figura 11 – Espectro de dicroísmo circular no UV distante em pH 5,0

Figura 11 - Espectro de dicroísmo circular UV-distante do peptídeo expresso do envelope do CHIKV. Espectro de dicroísmo circular oriunda da proteína purificada do extrato solúvel e dialisada para tampão fosfato citrato 20mM, pH: 5.

Posteriormente, utilizou-se da plataforma online BeStSel (Micsonai *et al.*, 2015, 2018), que permite a análise de dados em diferentes formatos, incluindo os gerados pelos programas de DC. A plataforma possibilita analisar os dados por diferentes algoritmos e comparar em bancos de dados os espectros gerados com estruturas bem descritas por cristalografia de Raio-X e DC. Os resultados gerados foram então plotados na plataforma e as porcentagens geradas são demonstradas na tabela 1. Tal resultado destaca que o peptídeo expresso se encontra dobrado, e sua utilização para imunização pode gerar anticorpos para epítomos não linearizados.

Tabela 1 - Porcentagens da estrutura secundária obtida a partir da espectroscopia do dicroísmo circular atribuídas pelo BeStSel.

Estrutura Secundária	Porcentagem (%)
α -hélice	1,2
β -folhas	37,4
<i>Turns</i>	15,6
Outros	45,8

Para comparar o enovelamento do peptídeo expresso obtido do DC, foi utilizado o programa dssp para quantificar as estruturas secundárias do peptídeo corresponde que possui estrutura tridimensional depositada PDB ID 3J2W. Os programas automáticos de predição de estrutura secundária tentam atribuir estrutura secundária de maneira consistente e são construídos para explorar as regularidades associadas às estruturas periódicas, como por exemplo os ângulos diédricos (ϕ , ψ). Assim, a partir dos 100 ns gerados pelo programa gmx do_dssp de predição de estrutura secundária, foi possível definir a estrutura de cada resíduo de aminoácido da proteína em solução, conforme demonstrado na Figura 12.

Figura 12 – Predição da estrutura secundária de cada resíduo de aminoácido em solução ao longo da simulação por meio do programa gmx do_dssp.

Figura 12 - As cores correspondem a estrutura secundária assumida de cada resíduo de aminoácido nos 100 ns de simulação.

A partir dos dados gerados, também foi possível determinar as porcentagens das estruturas secundárias do modelo tridimensional, bem como comparar com as porcentagens advindas da análise do dicroísmo circular gerado a partir da proteína solúvel da expressão em SHuffle (tabela 2). Observa-se uma similaridade nas porcentagens de folhas β geradas a partir do dicroísmo circular com o comportamento predito para ele. Apesar das diferenças encontradas na quantidade α -hélice, vale ressaltar que a plataforma BeStSel possui uma maior fidelidade em diferenciar folhas β , podendo não diferenciar α -hélice e classificar como outros (Micsonai *et al.*, 2015, 2018).

Tabela 2 - Porcentagens da estrutura secundária obtida a partir da espectroscopia do dicroísmo circular (195-250 nm) em comparação com a predição gerada pelo programa gm do_dssp.

Estrutura Secundária	Porcentagem (%)	
	BeStSel	DSSP
α -hélice	1,2	19
β -folhas	37,4	48
<i>Turns</i>	15,6	6
Outros	45,8	28
<i>Bends</i>	*	18
<i>3-Helix</i>	*	0,8

Análise realizada na plataforma online BeStSel. Resultado gerado a partir do espectro de dicroísmo circular UV-distante oriunda da proteína purificada do extrato solúvel e dialisada para tampão fosfato-citrato 20mM, pH: 5. DSSP – *Dictionary of Secondary Structure Protein*. Resultado gerado a partir da simulação de dinâmica molecular. * A plataforma BeStSel não inclui na classificação estruturas *bends* e *3-Helix*.

A vasta maioria de estruturas cristalográficas de anticorpos complexados com antígenos mostra a existência de vários pontos de contato entre o antígeno e o anticorpo. Isso ocorre, pois comumente os pontos de contato são com aminoácidos que não são contíguos na sequência do antígeno, mas estão próximos na proteína dobrada. A grande maioria dos determinantes antigênicos reconhecidos por anticorpos e células B são conformacionais (Goding, 1996; Laver *et al.*, 1990). Tais resultados do DC são importantes e sugerem que o peptídeo expresso se encontra dobrado e possivelmente assumindo a conformação similar a estrutura nativa.

4.5 Avaliação Sorológica

4.5.1 Avaliação da resposta sérica de camundongos infectados com CHIKV ao peptídeo de CHIKV

Para realização dos testes sorológicos, primeiro foi realizado um teste para avaliar a capacidade do peptídeo em diferentes concentrações de aderir a placa utilizando como marcação o anticorpo anti-histag. Como observado na figura 13 em concentrações superiores a 0,25 μ g era possível detectar o peptídeo recombinante de maneira eficiente.

Figura 13 - Avaliação da resposta anti-histag ao peptídeo de CHIKV

Sete concentrações de revestimento (16, 4, 2, 1, 0,5 0,25 µg/mL) foram testados em placas de ELISA de alta ligação utilizando Anti-His

A fim de avaliar o reconhecimento de imunoglobulinas G séricas de camundongos imunizados com o vírus Chikungunya frente ao peptídeo recombinante expresso, comparando-as com a proteína E2 de CHIKV adquiridos de forma comercial, realizou-se um ensaio de ELISA indireto. Para isso, utilizou-se a titulação dos soros de 1/100 a 1/800, em triplicata, com sete concentrações de revestimento (0,125, 0,25, 0,5, 1, 2 µg/mL). Os resultados obtidos demonstram um reconhecimento similar entre os soros nas diferentes concentrações de revestimento do peptídeo, porém melhor nas concentrações de 1 e 2 µg/mL (figura 14). Demonstrando assim que o peptídeo expresso manteve sítios antigênicos que foram reconhecidos por anticorpos gerados a partir da infecção do camundongo com o vírus.

Figura 14 - Avaliação da resposta sérica de camundongos infectados com CHIKV ao peptídeo de CHIKV.

Figura 14 - Cinco concentrações de revestimento (0,125, 0,25, 0,5, 1, 2 µg/mL) foram testados em placas de ELISA de alta ligação com soro titulado entre 1/200-800.

Embora a proteína E2 tenha apresentado um reconhecimento maior pelos soros, vale ressaltar que o peptídeo expresso possui apenas 60 aminoácidos da sequência de CHIKV, em relação aos 423 aa da proteína E2 total, assim era esperado o resultado, devido a sequência total possuir um número maior de sítios antigênicos.

Além de em uma infecção natural, com um patógeno, os anticorpos desenvolvidos possuem alto grau de hiper mutações somáticas levando a ampla reatividade e auto reatividade às proteínas do hospedeiro (Kumar *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2015; Patil *et al.*, 2016). Assim a utilização de subunidades menores para geração de anticorpos pode também levar a obtenção de anticorpos mais específicos.

4.5.2 Avaliação da resposta sorológica dos camundongos imunizados com o peptídeo recombinante

Foi realizado um teste sorológico para determinar os títulos de anticorpos após a imunização dos camundongos com o peptídeo recombinante. Como observado na figura 15 o reconhecimento do soro dos camundongos imunizados foi alto até no título de 1/10000. Estudos anteriores demonstraram a capacidade de diferentes construções de proteínas contendo o domínio B ou o peptídeo do domínio B com o conector β de elicitarem anticorpos específicos na imunização de camundongos (Weber, Büchner e Schnierle, 2015b). Porém os resultados obtidos demonstram pela primeira vez o peptídeo contendo apenas a sequência do domínio B elicitando altos títulos de anticorpos específicos.

Figura 15 - Avaliação da resposta sérica de camundongos imunizados com o peptídeo de CHIKV.

Figura 15 - Utilizando 1 μ g do peptídeo para sensibilização da placa foi avaliada a resposta sorológica desenvolvida por camundongos imunizados com o peptídeo recombinante.

4.5.3 Teste de neutralização por redução de plaque (PRNT)

O teste de neutralização por redução de plaque foi realizado para avaliar a capacidade neutralização dos anticorpos gerados a partir da imunização de camundongos

Balb/c com a proteína expressa. O teste consiste na comparação entre o número de plaques formados pelo vírus sem a adição do soro com a o número de plaques formados com a adição de diferentes concentrações do soro para determinar a porcentagem de neutralização. Os resultados obtidos estão na figura 16, onde é possível observar que o soro na diluição 2,5 reduziu em 55% o número de plaques em relação ao controle viral.

De tal forma, os anticorpos gerados a partir do peptídeo recombinante apresentaram neutralização. Embora o soro hiper imune dos camundongos imunizados não tenha apresentado uma alta concentração de anticorpos neutralizantes, ressalta-se que ainda é um resultado promissor, tendo em vista que em tal soro existe uma variedade de anticorpos com especificidades e afinidades diversas, mas atesta a capacidade do antígeno utilizado em gerar anticorpos neutralizantes.

Estudos prévios também demonstraram que mesmo anticorpos monoclonais específicos contra o domínio B da E2 de RRV podem apresentar uma neutralização reduzida *in vitro*, porém, quando administrados em camundongos infectados com CHIKV apresentarem capacidade protetiva semelhante a de anticorpos altamente neutralizantes (Powell *et al.*, 2020). Isso pode ocorrer pela limitação da técnica que só permite avaliar a neutralização quanto a entrada do vírus na célula, e como demonstrado, anticorpos neutralizantes contra o domínio B podem impedir também o brotamento do vírus e estimular a citotoxicidade mediada por anticorpos (Fox *et al.*, 2015).

Figura 16 - Teste de neutralização por redução de plaque a partir do soro de camundongos Balb/c imunizados com a proteína recombinante expressa.

Monocamada constante de 4×10^5 células Vero semeadas em orifícios de placas com 24 poços. Controle Viral: somente o vírus em quantidade de $5,75 \times 10^4$ PFU. Controle celular: meio de cultura. Diluições dos soros em presença do vírus em quantidade constante de $5,75 \times 10^4$ PFU.

A terapêutica baseada em anticorpos monoclonais (mAb) são uma forma de tratamento eficaz quando vacinas ou tratamentos específicos não estão disponíveis (Pelfrene *et al.*, 2019), como o CHIKV. A terapia com anticorpos possui várias vantagens, pois seu uso é seguro na população de alto risco, como: imunossuprimidos,

mulheres grávidas e idosos. Além de ser capaz de fornecer proteção rápida (Sparrow *et al.*, 2017).

De modo geral, foi possível obter o peptídeo recombinante de CHIKV que apresenta estrutura secundária e é reconhecido por anticorpos gerados contra o vírus nativo. O peptídeo ainda demonstrou alta imunogenicidade e mostra-se promissor para o uso no desenvolvimento de terapias baseada em anticorpos para CHIKV, um vírus que causa alta morbidade e não possui tratamento.

5.Conclusão

- ✓ Definiu-se uma região dentre as proteínas de envelope do CHIKV como alvo a ser expresso que apresenta sequências de resíduos de aminoácidos conservados. Esta região alvo de anticorpos neutralizantes e se expõe na superfície do vírus;
- ✓ O peptídeo recombinante expresso apresenta estrutura secundária avaliada por dicroísmo circular e é reconhecido pelo soro de camundongos infectados por CHIKV;
- ✓ A imunização de camundongos Balb/c com o peptídeo recombinante foi capaz de elicitar anticorpos
- ✓ O soro de camundongos Balb/c imunizados com o peptídeo recombinante expresso mostrou-se neutralizante contra o vírus CHIKV;
- ✓ O peptídeo recombinante expresso apresenta potencial para uso no desenvolvimento terapias baseadas em anticorpo.

6.Referências bibliográficas

ASHKENAZY, H. *et al.* ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. **Nucleic acids research**, v. 44, n. W1, p. W344–W350, 8 jul. 2016.

ASSUNÇÃO-MIRANDA, I.; CRUZ-OLIVEIRA, C.; POIAN, A. T. DA. Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of alphavirus-induced arthritis. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

BAGNO, F. F. *et al.* Chikungunya E2 Protein Produced in E. coli and HEK293-T Cells—Comparison of Their Performances in ELISA. **Viruses**, v. 12, n. 9, p. 939, 26 ago. 2020.

BEYCHOK, S. Circular dichroism of biological macromolecules. **Science**, v. 154, n. 3754, p. 1288–1299, 9 dez. 1966.

BONIFAY, T. *et al.* Atypical and severe manifestations of chikungunya virus infection in French Guiana: A hospital-based study. **PLOS ONE**, v. 13, n. 12, p. e0207406, 6 dez. 2018.

BONN, D. How did chikungunya reach the Indian Ocean? **The Lancet infectious diseases**, v. 6, n. 9, p. 543, 1 set. 2006.

BUI, H. H. *et al.* Development of an epitope conservancy analysis tool to facilitate the design of epitope-based diagnostics and vaccines. **BMC Bioinformatics**, v. 8, n. 1, p. 361, 26 set. 2007.

CAREY, D. E. Chikungunya and dengue: A case of mistaken identity? **Journal of the History of Medicine and Allied Sciences**, v. 26, n. 3, p. 243–262, 1 jul. 1971.

CARRILLO-HERNÁNDEZ, M. Y. *et al.* Co-circulation and simultaneous co-infection of dengue, chikungunya, and zika viruses in patients with febrile syndrome at the Colombian-Venezuelan border. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 61, dez. 2018.

CASALS, J.; WHITMAN, L. Mayaro virus: a new human disease agent. I. Relationship to other arbor viruses. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 6, n. 6, p. 1004–1011, 1 nov. 1957.

CDC. **Geographic Distribution | Chikungunya virus | CDC**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/chikungunya/geo/index.html>>.

CHEN, L. *et al.* Implication for alphavirus host-cell entry and assembly indicated by a

3.5Å resolution cryo-EM structure. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018.

CHEN, R. *et al.* ICTV virus taxonomy profile: Togaviridae. **Journal of General Virology**, v. 99, n. 6, p. 761–762, 1 jan. 2018.

CIOTA, A. T. The role of co-infection and swarm dynamics in arbovirus transmission. **Virus Research**, v. 265, p. 88–93, 1 maio 2019.

CONWAY, M. J.; COLPITTS, T. M.; FIKRIG, E. Role of the vector in arbovirus transmission. **Annual Review of Virology**, v. 1, n. 1, p. 71–88, 29 set. 2014.

CUNHA, M. S. *et al.* Chikungunya Virus: An Emergent Arbovirus to the South American Continent and a Continuous Threat to the World. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1297, 26 jun. 2020.

DEEBA, F. *et al.* Chikungunya virus: recent advances in epidemiology, host pathogen interaction and vaccine strategies. **Pathogens and disease**, v. 74, n. 3, p. 119, 1 abr. 2016.

DEEBA, F. *et al.* Global transmission and evolutionary dynamics of the Chikungunya virus. **Epidemiology and Infection**, v. 148, 2020.

DUBUISSON, J.; RICE, C. M. Sindbis virus attachment: isolation and characterization of mutants with impaired binding to vertebrate cells. **Journal of Virology**, v. 67, n. 6, 1993.

ERASMUS, J. H.; ROSSI, S. L.; WEAVER, S. C. Development of vaccines for chikungunya fever. **Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. suppl_5, p. S488–S496, 1 dez. 2016a.

_____. Development of Vaccines for Chikungunya Fever. **Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. suppl 5, p. S488–S496, 15 dez. 2016b.

ERIN STAPLES, J.; BREIMAN, R. F.; POWERS, A. M. Chikungunya fever: An epidemiological review of a re-emerging infectious disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 6, p. 942–948, 15 set. 2009.

FIRTH, A. E. *et al.* Discovery of frameshifting in Alphavirus 6K resolves a 20-year enigma. **Virology Journal**, v. 5, n. 1, p. 108, 26 set. 2008.

FOX, J. M. *et al.* Broadly Neutralizing Alphavirus Antibodies Bind an Epitope on E2 and Inhibit Entry and Egress. **Cell**, v. 163, n. 5, p. 1095–1107, 19 nov. 2015.

FUMAGALLI, M. J. *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant envelope protein 2 antigen for diagnosis of Chikungunya virus. **Virology Journal**, v. 15, n. 1, p. 112, 24 jul. 2018.

GARDNER, C. L. *et al.* Deliberate Attenuation of Chikungunya Virus by Adaptation to Heparan Sulfate-Dependent Infectivity: A Model for Rational Arboviral Vaccine Design. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 2, p. e2719, 20 fev. 2014.

GÉRARDIN, P. *et al.* Multidisciplinary Prospective Study of Mother-to-Child Chikungunya Virus Infections on the Island of La Réunion. **PLoS Medicine**, v. 5, n. 3, p. e60, mar. 2008.

GODING, J. W. Nature of Antigens. *In: Monoclonal Antibodies*. [s.l.] Elsevier, 1996. p. 50–71.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2876–2890, jan. 2007.

GUBLER, D. J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Archives of Medical Research**, v. 33, n. 4, p. 330–342, 1 jul. 2002.

____. Human Arbovirus Infections Worldwide. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 951, n. 1, p. 13–24, 25 jan. 2006.

HASAN, S. S. *et al.* Cryo-EM Structures of Eastern Equine Encephalitis Virus Reveal Mechanisms of Virus Disassembly and Antibody Neutralization. **Cell Reports**, v. 25, n. 11, p. 3136–3147.e5, 11 dez. 2018.

HOARAU, J.-J. *et al.* Persistent Chronic Inflammation and Infection by Chikungunya Arthritogenic Alphavirus in Spite of a Robust Host Immune Response. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 10, p. 5914–5927, 15 maio 2010.

HONG, E. M.; PERERA, R.; KUHN, R. J. Alphavirus Capsid Protein Helix I Controls a Checkpoint in Nucleocapsid Core Assembly. **Journal of Virology**, v. 80, n. 18, p. 8848–8855, 15 set. 2006.

HUANG, Y. J. S.; HIGGS, S.; VANLANDINGHAM, D. L. Emergence and re-emergence of mosquito-borne arboviruses. **Current Opinion in Virology**, v. 34, p. 104–109, 1 fev. 2019.

HUNT, A. R. *et al.* A humanized murine monoclonal antibody protects mice either before or after challenge with virulent Venezuelan equine encephalomyelitis virus. **Journal of General Virology**, v. 87, n. 9, p. 2467–2476, 1 set. 2006.

IRVING, M. B.; PAN, O.; SCOTT, J. K. Random-peptide libraries and antigen-fragment libraries for epitope mapping and the development of vaccines and diagnostics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, n. 3, p. 314–324, 1 jun. 2001.

JEMIELITY, S. *et al.* TIM-family Proteins Promote Infection of Multiple Enveloped Viruses through Virion-associated Phosphatidylserine. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 3, p. e1003232, 28 mar. 2013.

JERNE, N. K. Immunological Speculations. **Annual Review of Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 341–358, 28 out. 1960.

JIN, J.; SIMMONS, G. Antiviral functions of monoclonal antibodies against chikungunya virus. **Viruses**, v. 11, n. 4, p. 305, 1 abr. 2019.

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 4, p. 772–780, 1 abr. 2013.

KELLY, S. M.; PRICE, N. C. The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1338, n. 2, p. 161–185, abr. 1997.

KHAN, A. H. *et al.* Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. **Journal of General Virology**, v. 83, n. 12, p. 3075–3084, 1 dez. 2002.

KIM, J. *et al.* Development of a Specific CHIKV-E2 Monoclonal Antibody for Chikungunya Diagnosis. **Virologica Sinica**, v. 34, n. 5, p. 563–571, 1 out. 2019.

KUMAR, R. *et al.* Broadly neutralizing antibodies in HIV-1 treatment and prevention. **Therapeutic Advances in Vaccines and Immunotherapy**, v. 6, n. 4, p. 61–68, 12 ago. 2018.

____. Antibody-based therapeutic interventions: possible strategy to counter chikungunya viral infection. **Applied Microbiology and Biotechnology**. Springer, , 1 abr. 2020.

LAVER, W. G. *et al.* Epitopes on protein antigens: Misconceptions and realities. **Cell**, v. 61, n. 4, p. 553–556, 18 maio 1990.

LEPARC-GOFFART, I. *et al.* Chikungunya in the Americas. **The Lancet**, v. 383, n. 9916, p. 514, 8 fev. 2014.

LESCAR, J. *et al.* The fusion glycoprotein shell of Semliki Forest virus: An icosahedral assembly primed for fusogenic activation at endosomal pH. **Cell**, v. 105, n. 1, p. 137–148, 6 abr. 2001.

LI, L. *et al.* Structural changes of envelope proteins during alphavirus fusion. **Nature**, v. 468, n. 7324, p. 705–708, 2010.

LIU, M. *et al.* Polyreactivity and Autoreactivity among HIV-1 Antibodies. **Journal of Virology**, v. 89, n. 1, p. 784–798, 1 jan. 2015.

LIU, X.; THARMARAJAH, K.; TAYLOR, A. Ross River virus disease clinical presentation, pathogenesis and current therapeutic strategies. **Microbes and Infection**, v. 19, n. 11, p. 496–504, 1 nov. 2017.

LOBSTEIN, J. *et al.* SHuffle, a novel Escherichia coli protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. **Microbial Cell Factories**, v. 11, n. 1, p. 753, 8 maio 2012.

LONG, F. *et al.* Cryo-EM structures elucidate neutralizing mechanisms of anti-chikungunya human monoclonal antibodies with therapeutic activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 45, p. 13898–13903, 10 nov. 2015.

METZ, S. W.; PIJLMAN, G. P. Function of chikungunya virus structural proteins. *In*: **Chikungunya Virus: Advances in Biology, Pathogenesis, and Treatment**. [s.l.] Springer International Publishing, 2016. p. 63–74.

MICSONAI, A. *et al.* Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 24, p. E3095–E3103, 16 jun. 2015.

____. BeStSel: A web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W315–W322, 2 jul. 2018.

- MOLLER-TANK, S. *et al.* Role of the Phosphatidylserine Receptor TIM-1 in Enveloped-Virus Entry. **Journal of Virology**, v. 87, n. 15, p. 8327–8341, 1 ago. 2013.
- MUKHOPADHYAY, S. *et al.* Mapping the structure and function of the E1 and E2 glycoproteins in alphaviruses. **Structure**, v. 14, n. 1, p. 63–73, 1 jan. 2006.
- NASCI, R. S. Movement of Chikungunya virus into the Western Hemisphere. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 8, p. 1394–1395, 2014.
- NUNES, M. R. T. *et al.* Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine**, v. 13, n. 1, p. 102, 30 abr. 2015.
- OWEN, K. E.; KUHN, R. J. Identification of a region in the Sindbis virus nucleocapsid protein that is involved in specificity of RNA encapsidation. **Journal of Virology**, v. 70, n. 5, 1996.
- PAL, P. *et al.* Development of a Highly Protective Combination Monoclonal Antibody Therapy against Chikungunya Virus. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 4, p. e1003312, 18 abr. 2013.
- PATIL, S. *et al.* Conformational Epitope-Specific Broadly Neutralizing Plasma Antibodies Obtained from an HIV-1 Clade C-Infected Elite Neutralizer Mediate Autologous Virus Escape through Mutations in the V1 Loop. **Journal of Virology**, v. 90, n. 7, p. 3446–3457, 1 abr. 2016.
- PELFRENE, E. *et al.* Monoclonal antibodies as anti-infective products: a promising future? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 1, p. 60–64, 1 jan. 2019.
- PERERA, R. *et al.* Alphavirus Nucleocapsid Protein Contains a Putative Coiled Coil α -Helix Important for Core Assembly. **Journal of Virology**, v. 75, n. 1, p. 1–10, 1 jan. 2001.
- PORTA, J. *et al.* Locking and Blocking the Viral Landscape of an Alphavirus with Neutralizing Antibodies. **Journal of Virology**, v. 88, n. 17, p. 9616–9623, 1 set. 2014.
- PORTA, J. *et al.* Structural Studies of Chikungunya Virus-Like Particles Complexed with Human Antibodies: Neutralization and Cell-to-Cell Transmission. **Journal of Virology**, v. 90, n. 3, p. 1169–1177, 1 fev. 2016.
- POWELL, L. A. *et al.* Human mAbs Broadly Protect against Arthritogenic Alphaviruses

by Recognizing Conserved Elements of the Mxra8 Receptor-Binding Site. **Cell Host and Microbe**, v. 28, n. 5, p. 699–711.e7, 11 nov. 2020.

POWERS, A. M.; LOGUE, C. H. Changing patterns of chikunya virus: Re-emergence of a zoonotic arbovirus. **Journal of General Virology**, v. 88, n. 9, p. 2363–2377, 1 set. 2007.

RAMFUL, D. *et al.* Mother-to-Child Transmission of Chikungunya Virus Infection. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 26, n. 9, p. 811–815, set. 2007.

ROBINSON, M. C. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952–1953. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 1, p. 28–32, 1 jan. 1955.

ROEHRIG, J. T.; DAY, J. W.; KINNEY, R. M. Antigenic analysis of the surface glycoproteins of a Venezuelan equine encephalomyelitis virus (TC-83) using monoclonal antibodies. **Virology**, v. 118, n. 2, p. 269–278, 30 abr. 1982.

ROSS, R. W. The newala epidemic: III. The virus: Isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. **Journal of Hygiene**, v. 54, n. 2, p. 177–191, jun. 1956.

RUBINSTEIN, N. D. *et al.* Computational characterization of B-cell epitopes. **Molecular Immunology**, v. 45, n. 12, p. 3477–3489, 1 jul. 2008.

SCHUFFENECKER, I. *et al.* Genome Microevolution of Chikungunya Viruses Causing the Indian Ocean Outbreak. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 7, p. e263, 23 maio 2006.

SERGON, K. *et al.* Seroprevalence of Chikungunya virus infection on Grande Comore Island, Union of the Comoros, 2005. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n. 6, p. 1189–1193, 1 jun. 2007.

SILVA, L. A.; DERMODY, T. S. Chikungunya virus: Epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 3, p. 737–749, 1 mar. 2017.

SIMIZU, B. *et al.* Structural proteins of Chikungunya virus. **Journal of Virology**, v. 51, n. 1, 1984.

SIMON, F.; TOLOU, H.; JEANDEL, P. Chikungunya, l'épidémie que l'on n'attendait pas. **Revue de Medecine Interne**, v. 27, n. 6, p. 437–441, 1 jun. 2006.

SMIT, J. M. *et al.* Adaptation of Alphaviruses to Heparan Sulfate: Interaction of Sindbis and Semliki Forest Viruses with Liposomes Containing Lipid-Conjugated Heparin. **Journal of Virology**, v. 76, n. 20, p. 10128–10137, 15 out. 2002.

SMITH, S. A. *et al.* Isolation and characterization of broad and ultrapotent human monoclonal antibodies with therapeutic activity against chikungunya virus. **Cell Host and Microbe**, v. 18, n. 1, p. 86–95, 8 jul. 2015.

SMITH, T. J. *et al.* Putative receptor binding sites on alphaviruses as visualized by cryoelectron microscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 23, p. 10648–10652, 7 nov. 1995.

SOLIGNAT, M. *et al.* Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus. **Virology**. Academic Press, , 25 out. 2009.

SPARROW, E. *et al.* Therapeutic antibodies for infectious diseases. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 95, n. 3, p. 235–237, 1 mar. 2017.

SPENCE, L. P.; THOMAS, L. Application of haemagglutination and complement-fixation techniques to the identification and serological classification of arthropod-borne viruses. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 53, n. 3, p. 248–255, 1 maio 1959.

STRAUSS, J. H.; STRAUSS, E. G. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 58, n. 3, 1994.

SUN, S. *et al.* Structural analyses at pseudo atomic resolution of Chikungunya virus and antibodies show mechanisms of neutralization. **eLife**, v. 2013, n. 2, 18 fev. 2013.

TRIPATHI, NAGESH K.; PRIYA, R.; SHRIVASTAVA, A. Production of recombinant Chikungunya virus envelope 2 protein in Escherichia coli. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 6, p. 2461–2471, 1 jan. 2014.

TRIPATHI, NAGESH K; PRIYA, R.; SHRIVASTAVA, A. Immunogenicity of Escherichia coli expressed envelope 2 protein of Chikungunya virus. **Bioengineered**, v. 5, n. 3, p. 198–203, 27 maio 2014.

TSETSARKIN, K. A. *et al.* Multi-peaked adaptive landscape for chikungunya virus evolution predicts continued fitness optimization in Aedes albopictus mosquitoes. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, p. 1–14, 16 jun. 2014.

VITA, R. *et al.* The immune epitope database (IEDB) 3.0. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. 405–412, 28 jan. 2014.

VOSS, J. E. *et al.* Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. **Nature**, v. 468, n. 7324, p. 709–712, dez. 2010.

WATERHOUSE, A. M. *et al.* Jalview Version 2-A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. **Bioinformatics**, v. 25, n. 9, p. 1189–1191, 2009.

WEAVER, S. C. Evolutionary Influences in Arboviral Disease. *In*: DOMINGO, E. (Ed.). **. Quasispecies: Concept and Implications for Virology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2006. p. 285–314.

WEAVER, S. C. Arrival of Chikungunya Virus in the New World: Prospects for Spread and Impact on Public Health. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 6, p. e2921, 26 jun. 2014.

WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. **Antiviral Research**, v. 85, n. 2, p. 328–345, 1 fev. 2010.

WEBER, C. *et al.* Identification of Functional Determinants in the Chikungunya Virus E2 Protein. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 1, p. e0005318, 23 jan. 2017.

WEBER, C.; BÜCHNER, S. M.; SCHNIERLE, B. S. A Small Antigenic Determinant of the Chikungunya Virus E2 Protein Is Sufficient to Induce Neutralizing Antibodies which Are Partially Protective in Mice. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 4, p. e0003684, 23 abr. 2015a.

____. A Small Antigenic Determinant of the Chikungunya Virus E2 Protein Is Sufficient to Induce Neutralizing Antibodies which Are Partially Protective in Mice. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 4, p. e0003684, 23 abr. 2015b.

WEISS, B. *et al.* Evidence for specificity in the encapsidation of Sindbis virus RNAs. **Journal of Virology**, v. 63, n. 12, p. 5310–5318, 1989.

WINTACHAI, P. *et al.* Identification of prohibitin as a Chikungunya virus receptor protein. **Journal of Medical Virology**, v. 84, n. 11, p. 1757–1770, 1 nov. 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Arthropod-borne and rodent-borne viral diseases. Report of a WHO Scientific Group. **World Health Organization - Technical**

Report Series, v. 719, 1985.

YU, Y. A.; BOLTON, M. A Case of Eastern Equine Encephalitis. **Clinical Pediatrics**, v. 58, n. 2, p. 245–246, 1 fev. 2019.

ZHANG, R. *et al.* Mxra8 is a receptor for multiple arthritogenic alphaviruses. **Nature**, v. 557, n. 7706, p. 570–574, 24 maio 2018.