João Paulo da Cruz Silva

**Mapeamento de epitopos das proteínas estruturais do vírus
Chikungunya**

.

Dissertação apresentada ao
programa de Pós-graduação em
Microbiologia do Instituto de
Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para a
obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Paolo Marinho
de Andrade Zanotto

Versão original

São Paulo

SILVA, JP Mapeamento de epitpos para as proteínas estruturais do vírus Chikungunya. [Dissertação (Mestrado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2018.

Resumo A família *Togaviridae* compreende um grande e diverso grupo de vírus responsável por surtos recorrentes em humanos. Dentre os vírus desta família, o vírus Chikungunya (CHIKV) é um *alphavirus*, importante em termos de morbidade, mortalidade e impacto econômico em diferentes regiões do mundo. Este estudo teve como objetivo realizar um mapeamento detalhado de epitopos das proteínas estruturais de CHIKV reconhecidos pelos anticorpos da classe IgG do soro de pacientes em fase de convalescência. As amostras de soro utilizadas foram coletadas no estado de Sergipe, 2016. Com os resultados obtidos no mapeamento foram analisados peptídeos lineares sintéticos de células B correspondentes aos epitopos das proteínas estruturais E2 e E3 de CHIKV pela técnica de Elisa indireto à base de peptídeos. A proteína E2 foi o principal alvo da resposta imunológica onde foram identificados 3 epitopos conservados correspondentes aos Peptídeos P3, P4 e P5. Esses epitopos foram os mais reativos e específicos entre 11 epitopos analisados, e apresentaram potencial para utilização em ensaios de diagnóstico sorológico e desenvolvimento e ou melhoramento de vacinas para o vírus Chikungunya.

Palavras chave: Vírus Chikungunya, epitopos de célula B, peptídeos, ELISA

SILVA, JP Chikungunya vírus structural proteins epitope mapping. [Master Dissertation (Microbiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2018.

Abstract: The Togaviridae family comprises a large and diverse group of viruses responsible for recurrent outbreaks in humans. Among the viruses of this family, the Chikungunya virus (CHIKV) is an alphavirus, important in terms of morbidity, mortality and economic impact in different regions of the world. This study aimed to perform a detailed epitope mapping of the CHIKV structural proteins recognized by the IgG class antibodies from patients in the convalescence phase. The serum samples used were collected in the state of Sergipe, Brazil, in 2016. Synthetic linear peptides corresponding of CHIKV E2 and E3 proteins epitopes were analyzed using a peptide based indirect Elisa in order to identify B cell epitopes. E2 protein was found as the main target of the immune response, and 3 conserved epitopes have been identified. The peptides P3, P4 and P5 were the most reactive and specific epitopes among 11 epitopes analyzed and presented potential for use in serological diagnostic tests and development and / or improvement of vaccines for the Chikungunya virus.

Palavras chave: Vírus Chikungunya , B cell epitopes, peptides, ELISA

1. Introdução

1.1. Epidemiologia

A família *Togaviridae* é composta por dois gêneros: os *Alphavirus* e os *Rubivirus*. O gênero *Alphavirus* contém 24 espécies conhecidas que podem ser classificadas em sete complexos antigênicos. Como um gênero, *Alphavirus* são amplamente distribuídos no mundo, causando diversas doenças em seres humanos e animais, e são também separados didaticamente em vírus do velho e do novo mundo. Os vírus do Velho Mundo, incluindo o vírus rio Ross, vírus da Floresta de Barmah, O'nyongnyong e o vírus Sindbis, causam uma síndrome de artralgia, enquanto que a encefalite é causada pelo vírus da encefalite equina venezuelana (VEEV), vírus da encefalite equina do Leste (EEEV), e vírus da encefalite equina ocidental (WEEV) nas américas (1).

Figura 1 Árvore filogenética dos alphavirus. Árvore filogenética simplificada demonstrando a evolução dos Alphavirus a partir do sequenciamento parcial da glicoproteína E1.

Fonte: adaptado de Powers 2001

O vírus Chikungunya (CHIKV) pertence ao gênero *Alphavirus* (2,3) e é um vírus reemergente que foi identificado pela primeira vez em 1952, durante uma epidemia no Leste da África (Tanzânia e Moçambique) (4). Até o momento, foram identificados 3 genótipos desde seu isolamento: leste-central-sul-africano (*East-*

Central-South-Africa, ECSA), Oeste Africano (*West African, WA*) e o genótipo Asiático. Os genótipos ECSA e WA são endêmicos e causam epidemias na África subsariana. O genótipo Asiático circula no sudeste da Ásia e Américas em ciclos de transmissão urbana entre humanos e vetores *Aedes aegypti* (5).

Figura 2 Distribuição geográfica do vírus Chikungunya, 2018.

Fonte: <https://www.cdc.gov/chikungunya/geo/index.html>

O genótipo ECSA causou epidemias nas ilhas do Oceano Índico e Ásia entre 2005 e 2011 (6,7), e durante este surto surgiu a linhagem do Oceano Índico (IOL) (8,9). A partir de 2007 casos autóctones dessa arbovirose foram reportados na Itália e França (10). Em Dezembro de 2013, o primeiro caso de transmissão autóctone do genótipo Asiático de CHIKV foi registrado nas Américas, na região do Caribe (11). Um ano depois, no final de 2014, países da América do Sul, tais como Guiana Francesa, Venezuela, Colômbia, Suriname, Paraguai e Brasil já haviam registrado a circulação local do CHIKV. O primeiro

registro autóctone em território brasileiro ocorreu em 2014, na cidade do Oiapoque, no Amapá, e sete dias depois em Feira de Santana, Bahia (5). Devido à similaridade entre os ciclos de transmissão do vírus Dengue e do CHIKV, associada à circulação dessas arboviroses nas diferentes regiões do país, o CHIKV atualmente apresenta comportamento endêmico em vários estados do Brasil, com os picos de transmissão ocorrendo entre Janeiro e Abril (5,12).

1.2. Organização do Genoma e das Proteínas estruturais e ciclo de replicação

O CHIKV é um vírion_envelopado com diâmetro entre 70-100 nm, possui genoma linear de RNA fita simples polaridade positiva (+ssRNA) com 11.8 kb (13,14). O genoma possui um Cap na extremidade 5' que consiste em uma 7-metilguanosina, uma poliadenilação na extremidade 3', e está organizado em duas regiões de leitura abertas com a primeira responsável por codificar as quatro proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4) e a segunda as proteínas estruturais (Capsídeo, E1 e E2) além de dois pequenos produtos de clivagem (E3 e 6K) (Figura 1) (3).

Figura 3 Organização da poliproteína do vírus Chikungunya.

Figura 4

À esquerda proteínas não estruturais nsP1-nsP4 transcritas a partir da primeira região de leitura aberta. À direita proteínas estruturais C-E3-E2-6k-E1 transcritas a partir da segunda região de leitura aberta. Fonte: Modificado de: Kam et al. 2014.

O ciclo de replicação do vírus inicia-se pela ligação da partícula viral à receptores celulares, seguido pela adsorção via a entrada em células permissivas por endocitose. Após este processo ocorre a fusão pH-mediada: o meio ácido do endossomo provoca mudanças conformacionais no envelope que promovem a fusão do envelope viral à membrana endossomal. A isto segue a liberação do nucleocapsídeo viral no citoplasma celular que é processado por proteases celulares para a apresentação do genoma viral no meio citoplasmático. A replicação do genoma viral ocorre com a transcrição de dois precursores das proteínas não-estruturais, que são convertidos a partir do +ssRNA que atua como um RNAm, e a clivagem destes precursores gera o complexo nsP1-nsP4 (3). A nsP1 está envolvida na síntese da cadeia negativa do RNA viral e contém propriedades para o *capping*. A nsP2 exibe atividades como a RNA helicase, RNA trifosfatase e proteinase e está envolvido no desligamento da transcrição na célula hospedeira. A nsP3 faz parte do complexo de replicação e a nsP4 é a RNA polimerase RNA-dependente. Estas proteínas montam-se e formam o complexo de replicação viral, que sintetiza um RNA de cadeia negativa intermediário, onde o mesmo funciona como molde para a síntese de ambos RNAs sub-genômicos (26S) e genômicos (49S) (2,3). O RNA subgenômico dirige a expressão para o precursor da poliproteína estrutural C-E3-pE2-6K-E1 que é processada por uma serina protease auto proteolítica. O capsídeo (C) é liberado, e as glicoproteínas pE2 (precursor de E2) e E1 são geradas por processamento pós-traducional. As pE2 e E1 associadas no complexo de Golgi são exportadas para a membrana plasmática, onde pE2 é clivada em E2 (que está envolvida na ligação ao receptor) e E3 (que auxilia a dobragem adequada de pE2 e sua posterior associação com E1).

Figura 4. Ciclo de replicação do vírus Chikungunya.

A montagem viral é promovida pela ligação do nucleocápsídeo ao RNA viral, seguido pelo recrutamento das glicoproteínas do envelope associada à membrana (3). A partir desta fase, as partículas virais adquirem uma camada lipídica contendo as glicoproteínas E1 e E2, e ocorre a maturação do nucleocápsídeo na membrana celular da célula hospedeira (15).

Subsequentemente as partículas virais maduras são liberadas para infectar outras células hospedeiras. O envelope maduro é um heterotrímero composto pelas proteínas E1 e E2 que formam espículas na superfície dos vírions (16).

Figura 5 Organização das proteínas estruturais E3, E2 e E1 em diagrama de fitas

Proteína E3 colorida em cinza claro. Proteína E2 domínio A colorido em azul ciano, domínio B em verde escuro domínio C em rosa e fitas beta em roxo. Domínios I, II e III da proteína E1 colorido em vermelho, amarelo e azul respectivamente e os peptídeos de fusão em laranja. Glicosilações estão destacadas em formas de bastões e esferas e pontes dissulfetos em bastões verdes. A flecha preta representa a orientação C-terminal das proteínas E1 e E2 direcionadas à membrana celular. Na parte superior direita diagrama esquemático mostrando o posicionamento e a conexão dos domínios das proteínas estruturais. Fonte: adaptado de Voss et al. 2010.

As proteínas E3 e E2 têm a função de ligação aos receptores celulares e a proteína E1 é a proteína responsável pela fusão de membranas na vesícula endossomal. Na organização do complexo das glicoproteínas de envelope, E2 protege E1, que não tem contato direto com E3, que se liga lateralmente a E2. E3 é uma proteína em formato de ferradura organizada com grampo beta N-terminal e três alfas hélices. A proteína E2 pertence à superfamília das imunoglobulinas, com três domínios de imunoglobulinas A, B e C organizados em barril e folhas beta e conectados por arcos. O Domínio B é o domínio central, o domínio A inclui domínio III de proteínas de fusão classe II e o domínio C é semelhante a fibronectina tipo III presente em moléculas de adesão de células nervosas. A proteína E1 é organizada em três domínios ricos em folhas beta,

domínios I, II e III e possui um peptídeo interno de fusão na ponta do domínio II (17).

Figura 6 Organização do genoma e estrutural do vírus Chikungunya.

No painel A na parte superior está representado a organização do genoma do vírus Chikungunya. No painel B está representada a estrutura do virion. No painel C está representada a reconstrução do vírus Chikungunya em imagem de alta resolução por crioeletromicroscopia e a predição das estruturas das glicoproteínas de envelope. Fonte: adaptado de Weaver & Lecuit 2015.

1.3. Transmissão

No continente africano o CHIKV estabelece um ciclo enzoótico/silvático que ocorre essencialmente em áreas florestadas, envolvendo mosquitos vetores silvestres do gênero *Aedes* e primatas não-humanos. Já no continente asiático, o ciclo de transmissão do CHIKV está geralmente associado ao mosquito de hábitos urbano *Ae. Aegypti* e ao homem (4). Entretanto, durante a epidemia de

Chikungunya na ilha Reunião, observou-se baixo número de *Ae. Aegypti* e uma elevada densidade de *Ae. albopictus* na área onde o *Ae. Aegypti* não predomina (18).

Figura 7 Ciclo de Transmissão do vírus Chikungunya. À direita ciclo de transmissão enzoótico e à esquerda ciclo epidêmico urbano. Flechas demonstrando a introdução do ciclo enzoótico para o ciclo urbano.

Fonte: adaptado de Weaver & Forrester 2015

O risco de transmissão é resultado de uma variedade de fatores como presença e abundância de vetores apropriados, variáveis ambientais como temperatura e clima, urbanização e fatores socioeconômicos (19,20). Além disso um estudo recente mostrou que tanto as populações brasileiras de *Ae. Aegypti* quanto as de *Ae. Albopictus* apresentam elevada competência vetorial para transmissão deste vírus, o que torna essa arbovirose uma ameaça com importantes desdobramentos para o sistema de saúde pública e com possível impacto econômico significativo (21).

Atualmente as regiões Nordeste e Norte são as que mais notificam casos no país com uma incidência de 335,6 e 29,0 casos a cada 100 mil habitantes (Boletim epidemiológico - Ministério da Saúde, 2016). Neste contexto, ressaltamos que o Brasil apresenta elevada incidência dos vetores da doença e possui características climáticas favoráveis ao mosquito. Assim, a erradicação dos principais vetores da doença é dificultada pelas condições climáticas favoráveis, socioeconômicas e problemas de saneamento básico limitado e precário nos principais centros urbanos (20,22).

1.4. Manifestações clínicas e Patogênese

Os sintomas típicos na maioria dos pacientes sintomáticos (>85%) incluem febre de início súbito geralmente acima 38,9°C e erupções cutâneas (*rash*), dores articulares, mialgia, cefaléia, edema das extremidades, manifestações oculares e sintomas gastrointestinais, que estão relacionados direta ou indiretamente com os efeitos da replicação viral nos diferentes tecidos (23). O vírus é usualmente detectado no sangue periférico entre 1-2 semanas após a infecção e o pico da viremia está associado com o aparecimento dos sintomas. A febre Chikungunya é principalmente uma doença incapacitante e não fatal, sendo mortes e formas severas geralmente estão associadas com comorbidades (18,24,25).

Casos graves da infecção causada pelo vírus podem ocorrer em populações de Imunocomprometidos, recém-nascidos e idosos, populações naturalmente expostas a riscos. Casos de transmissão materno-fetal foram relatados durante os surtos provocados pelo vírus no Leste da África (26,27), e posteriormente em Sri Lanka (27). Entre esses casos raros, 50% dos recém-nascidos nasceram de

mães com viremia periparto detectável de CHIKV (26). Os recém-nascidos manifestaram encefalopatias e convulsões, trombocitopenia, hipotensão, disfunção ventricular, pericardite e outros problemas cardiovasculares (26–28). Em crianças e adolescentes a Febre Chikungunya é geralmente benigna com quadros raros de artralgia persistente. No entanto, manifestações atípicas com sequelas também foram descritas incluindo manifestações neurológicas simples e graves (29–32).

Os primeiros casos graves e óbitos por febre Chikungunya foram descritos em 2005-2006 durante a epidemia na ilha de Reunião principalmente em pacientes imunocomprometidos (33). Durante o surto houve um aumento de 22% de casos de GuillainBarré em pacientes adultos que foram submetidos a suporte respiratório (Lebrun et al. 2009). Nos idosos, o CHIKV possui atividade artritogênica aguda que contribui para uma artrite crônica incapacitante, descrita também para outras doenças causadas por *Alphavirus* (34– 38).

Figura 8 Linha do tempo da infecção do vírus Chikungunya, sintomas e biomarcadores.

Fonte: adaptado de Couderc & Lecuit 2015

1.5. Imunidade

1.5.1. Imunidade inata

As respostas da imunidade inata são importantes para limitar a disseminação do vírus a partir do local de infecção, a replicação viral e auxiliar a resposta imunológica adaptativa no combate à infecção. A produção dos interferons tipo I, IFN- α e IFN- β são essenciais para a imunidade inata na tentativa de contenção a replicação e o espalhamento do vírus, sendo a principal resposta antiviral dos hospedeiros, atuando através de diversos mecanismos para impedir a infecção (38,39,40). Citocinas e quimiocinas podem ser identificadas na fase aguda da doença, como as citocinas, IL-1 β , IL-6, e o TNF- α (39,40,41).

A infecção causada pelo vírus pode induzir a uma reação inflamatória que pode perpetuar causando dores articulares por anos, mesmo após a recuperação da fase aguda (41). Além disso foram encontrados altos níveis de fatores pró-inflamatórios em pacientes com poliartrite induzida por CHIKV demonstrando o potencial inflamatório nas dores musculares e articulares crônicas (39,42,43).

1.5.2. Imunidade Adaptativa e proteção

As células TCD4+ e TCD8+ são importantes efetores da imunidade celular durante a infecção viral e ambos podem eliminar as células infectadas por CHIKV. Foi demonstrado que essas células têm importante papel na ativação das células *Natural Killer* (NK) conferindo uma resposta mais efetiva contra várias proteínas virais (42–44). A resposta imune humoral ou adaptativa requer a produção de anticorpos específicos pelos plasmócitos (células B

maduras) contra antígenos virais específicos e imunogênicos. A infecção primária por CHIKV gera anticorpos de proteção contra uma nova infecção precoce gerando populações imunes à uma nova infecção causada pelo vírus (18,44). Os anticorpos anti-CHIKV das classes M e G (imunoglobulinas M - IgM e G - IgG) são detectados no soro dos pacientes infectados durante a fase aguda e convalescente da infecção, respectivamente (46,47). Entende-se que pacientes em fase convalescente da infecção possuem anticorpos com capacidade neutralizante (48,49) sugerindo um potencial profilático contra a Febre Chikungunya (48–51). Além disso, os anticorpos do isótipo IgG3 dominam a resposta humoral contra CHIKV. Ainda, existe uma correlação entre o final da fase virêmica e a produção precoce dos anticorpos IgG3, que pode conferir uma proteção clínica contra o risco de artralgia persistente (48,50,52). Os pacientes com resposta tardia estão mais suscetíveis a artralgia crônica devido a possibilidade do vírus estabelecer uma infecção prolongada persistindo nas articulações afetadas, gerando reservatórios virais protegidos da ação neutralizante dos anticorpos IgG. Kam et al. (48,52) sugere que uma carga viral elevada na fase aguda favorece o estabelecimento de uma proteção total contra a fase crônica, enquanto uma baixa viremia que provoca sintomas menos graves na fase aguda, está, em contraste, associada à artralgia persistente em fases mais avançadas da infecção.

1.6. Reconhecimento Antigênico dos Anticorpos contra CHIKV

O reconhecimento antigênico baseia-se em determinar as proteínas imunogênicas de CHIKV reconhecidas pelos anticorpos específicos gerados na fase convalescente da infecção. Em 2008, durante um surto de CHIKV em Singapura, observou-se que anticorpos de resposta contra a maioria destes

determinantes proteicos foram elevadas em 2 a 3 meses, mas progressivamente diminuiu. Apenas a resposta contra a glicoproteína E2 ainda era detectável em 21 meses pós infecção. Esta resposta de longa duração contra a região N-terminal da glicoproteína E2 (aminoácidos entre as posições 2800 e 2818) faz com que seja um importante candidato para ferramentas de diagnóstico sorológico (48).

Entre as proteínas não estruturais, apenas a nsP3 foi reconhecida pelos anticorpos anti-CHIKV sob condições experimentais descritas por (48). Isto reflete a diferente especificidade biológica destas proteínas não estruturais. A proteína nsP1 interage preferencialmente com lipídios da célula hospedeiras (53–55) e pode, assim, ser protegida de detecção imunológica e de reconhecimento antigênico (56). As proteínas não estruturais nsP2 e nsP4 também interagem com diferentes proteínas do hospedeiro que podem protegê-las da detecção imunológica (56). As funções e a atividade da proteína nsP3 são pouco conhecidas, porém foi relatado que a região C-terminal desta proteína é desordenada e pode favorecer o reconhecimento pelos receptores de células B que estão presentes em células B específicas (56). Não há relatos da proteína 6K elicitar uma resposta imune adquirida, esta proteína forma canais de íons e poros estando, portanto, inserida na membrana plasmática da célula hospedeira (57) e não acessíveis aos anticorpos contra ela direcionados (48).

1.7. Mapeamento de Epítomos de CHIKV

A técnica de mapeamento de epítomos possui inúmeras e importantes aplicações, dentre elas o uso de desenvolvimento de novas vacinas e também para melhoria de vacinas já existentes. Este é um processo rápido, eficiente e crucial no entendimento do sistema imune para uma proteína qualquer (58,59).

o desenvolvimento de métodos para síntese de imunógenos sintéticos tornou-se cada vez mais aplicada e explorada junto com o desenvolvimento e melhoramento dos algoritmos de bioinformática para predição de alvos imunogênicos identificando as potenciais moléculas de interesse (35–37). Os epitopos são classificados conforme seu reconhecimento por diferentes células de defesa e pelo seu processamento. Os linfócitos T reconhecem apenas epitopos lineares processados e apresentados pelas células apresentadoras de antígenos via MHC de classe II. Este processo é crucial para estimular a produção dos anticorpos específicos secretados pelos linfócitos B que são capazes de reconhecer e se ligar aos epitopos lineares e conformacionais dos antígenos. Portanto, os epitopos podem ser lineares ou conformacionais, sendo os lineares dispostos linearmente em uma proteína (sequência de aminoácidos da estrutura primária), já os conformacionais são descontínuos na sequência de aminoácidos e estão ligados as estruturas secundárias, terciárias e quaternárias das proteínas. (35–37).

Poucos estudos foram realizados para um mapeamento detalhado de epitopos reconhecidos pelos anticorpos da classe IgG dos pacientes infectados por CHIKV. Em um desses estudos (KAM et al., 2012b) realizou um mapeamento de múltiplos epitopos lineares reconhecidos por pacientes infectados por CHIKV cobrindo todo o proteoma do vírus. Esse estudo mostrou que apenas três proteínas estruturais (proteína do capsídeo e glicoproteínas E2 e E3), e uma proteína não estrutural (NSP3) continham epitopos lineares reconhecidos por anticorpos anti-CHIKV dos pacientes estudados.

Posteriormente (48) realizou um mapeamento de epítapos na região N-terminal

da glicoproteína E2. E nesse estudo foi detectado que altos níveis de anticorpos contra o epítipo, E2EP3 (aminoácidos 2800-2818), durante a fase aguda da infecção e está associado com a protecção clínica a longo prazo.

Justificativa

Devido à natureza explosiva dos surtos de CHIKV e o choque no sistema de saúde nos países em que ocorreram, estes surtos têm grande impacto em termos de morbidade e problemas socioeconômicos. A predição de transmissão futura do CHIKV dentro do Brasil indica que os limites geográficos dos atuais genótipos *asiático* e *ECSA* provavelmente irão se sobrepor, com casos de co-circulação espaço-temporal. Não havia imunidade prévia da população para CHIKV no Brasil, de modo que a incidência aumentou consideravelmente em 2016 (5). Dados do boletim epidemiológico do Ministério da Saúde do Brasil revelaram 271.424 mil casos do CHIKV em 2016, um aumento de 10 vezes em relação ao ano de 2015. Além disso foram relatados 120 óbitos pelo CHIKV em 2016 sendo que a maior parte desses óbitos ocorreram de fevereiro a março, período de intensa circulação viral em áreas endêmicas (Boletim epidemiológico Ministério da Saúde, 2016), demonstrando o potencial emergente do CHIKV. Em 2017, foram registrados 185.593 casos prováveis de febre de chikungunya e 186 óbitos confirmados. Em 2018, até a Semana Epidemiológica 34 (31/12/2017 a 25/08/2018), foram registrados 72.117 casos prováveis de febre de chikungunya e 22 óbitos confirmados no país, com uma incidência de 34,7 casos/100 mil habitantes. A região Sudeste apresentou o maior número de casos prováveis de febre de chikungunya (42.933 casos; 59,5%) em relação ao total do país (Boletim epidemiológico Ministério da Saúde, 2018).

Não há estudos sobre os alvos específicos da resposta imune mediada por anticorpos anti-CHIKV dos pacientes infectados no Brasil. Atualmente não há vacina aprovada e não foram disponibilizados agentes antivirais eficazes até o momento. A terapia para a infecção causada pelo vírus é muitas vezes limitada ao tratamento sintomático devido a problemas na especificidade e eficácia dos medicamentos (59). No entanto, os dados epidemiológicos recentes revelam cada vez mais evidências sobre a importância da proteção mediada por anticorpos contra CHIKV (46,51,60), onde é importante destacar a possibilidade de utilizar anticorpos anti-CHIKV no tratamento terapêutico ou profilático (47,52).

Nesse contexto o mapeamento de epítopos promove uma maior compreensão sobre a interação dos peptídeos e a ativação da resposta imune. Em conjunto, estas observações implicam fortemente a importância das interações entre os anticorpos específicos e os peptídeos correspondentes ao nível dos aminoácidos (62), proporcionando informações chaves no desenvolvimento de vacinas para CHIKV, com resíduos de aminoácidos, específicos importantes no reconhecimento dos anticorpos antiCHIKV. Por último este estudo busca também identificar marcadores antigênicos de proteção contra CHIKV.

6. Conclusão

Neste estudo foram avaliados epítopos lineares de células B das proteínas estruturais E2 e E3 do vírus Chikungunya utilizando a técnica de Elisa indireto à base peptídeos. A proteína E2 é o principal alvo da resposta imunológica dos anticorpos da classe IgG gerados pela infecção pelo vírus Chikungunya. Os epítopos conservados correspondentes aos Peptídeos P3, P4 e P5 foram os mais reativos e específicos, e apresentaram potencial para utilização em ensaios de diagnóstico sorológico e desenvolvimento e ou melhoramento de vacinas para o vírus Chikungunya.

Referências

1. Powers ANNM, Brault AC, Shirako Y, Strauss EG, Kang W, Strauss JH, et al. Evolutionary Relationships and Systematics of the Alphaviruses. *Am Soc Microbiol*. 2001;75(21):10118–31.
2. Strauss JH, Strauss EG. The Alphaviruses : Gene Expression , Replication , and Evolution. *Microbiol Rev*. 1994;58(3):491–562.
3. Solignat M, Gay B, Higgs S, Briant L, Devaux C. Replication cycle of chikungunya : A re-emerging arbovirus. *Virology [Internet]*. 2009;393(2):183–97
4. Weaver SC, Forrester NL. Chikungunya : Evolutionary history and recent epidemic spread. *Antiviral Res*. 2015;120(May):32–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.04.016>
5. Nunes MRT, Faria NR, Vasconcelos JM De, Golding N, Kraemer MUG, Oliveira LF De, et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Med [Internet]*. 2015;13(1):1–10.
6. Burt FJ, Rolph MS, Rulli NE, Mahalingam S, Heise MT. Chikungunya : a re-emerging virus. *Lancet*. 2012;379(9816):662–71
7. Weaver SC. Arrival of Chikungunya Virus in the New World : Prospects for Spread and Impact on Public Health. *Plos Neglected Trop Dis*. 2014;8(6):1–5.
8. Sissoko D, Malvy D, Ezzedine K, Renault P, Moschetti F, Pierre V. Post-Epidemic Chikungunya Disease on Reunion Island : Course of Rheumatic Manifestations and

- Associated Factors over a 15-Month Period. *Plos Neglected Trop Dis*. 2009;3(3):1–6.
9. Borgherini G, Poubeau P, Jossaume A, Goux A, Cotte L, Michault A, et al. Persistent Arthralgia Associated with Chikungunya Virus : A Study of 88 Adult Patients on Reunion Island. *Clin Infect Dis*. 2008;47(4):469–75.
 10. Kucharz EJ, Cebula-byrska I. European Journal of Internal Medicine Chikungunya fever. *Eur J Intern Med* [Internet]. 2012;23(4):325–9
 11. Leparc-Goffart I. Chikungunya in the. *Lancet*. 2014;383(12):8003.
 12. Cardoso CW, Paploski IAD, Kikuti M, Rodrigues MS, Silva MMO, Campos GS, et al. Outbreak of Exanthematous Illness Associated with Zika , Chikungunya , and Dengue Viruses , Salvador , Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(12):2274–6.
 13. Simizu B et al. Structural Proteins of Chikungunya Virus. *Journal Virol*. 1984;51(1):254–8.
 14. Khan AH, Morita K, Parquet C, Hasebe F, Mathenge EGM, Igarashi A. Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. *J Gen Virol* (2002),. 2016;83(2002):3075–84.
 15. Suomalainen M, Liljestrom P, Garoff H. Spike Protein-Nucleocapsid Interactions Drive the Budding of Alphaviruses. *J Virol*. 1992;66(8):4737–47.
 16. Ekstrom M, Liljestrom P, Garoff H. Membrane protein lateral interactions control Semliki Forest virus budding. *EMBO J*. 1994;13(5):1058–64.
 17. Voss, James E. , Vaney M, Duquerroy S, Vonrhein C., Girar-Blanc C, Crublet E, Thompson A, Bricogne G, Félix R.. Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. *Nature*. 2010;468:0–5.
 18. Gasque P, Couderc T, Lecuit M, Roques P, Ng LFP. Chikungunya Virus Pathogenesis and Immunity 1. *VECTOR-BORNE ZOONOTIC Dis*. 2015;15(4):241–50.
 19. Gubler DJ. Human Arbovirus Infections Worldwide. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;951:13–24.
 20. Liang G, Gao X, Gould EA. Factors responsible for the emergence of arboviruses ; strategies , challenges and limitations for their control. *Emerg Microbes Infect*. 2015;4(3):1–5.
 21. Vega-rúa A, Zouache K, Girod R, Failloux A, Lourenço-de-oliveira R, Vega-rúa A, et al. High Level of Vector Competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Ten American Countries as a Crucial Factor in the Spread of Chikungunya Virus. *Journal Virol*. 2014;88(11):6294–306.
 22. Tauil PL. Urbanização e ecologia do dengue Urbanization and dengue ecology. *Cad Saúde Pública*. 2001;17:99–102.
 23. Ozden S, Huerre M, Riviere J, Coffey LL, Afonso P V, Mouly V, et al. Human Muscle Satellite Cells as Targets of Chikungunya Virus Infection. *PLoS One*. 2007;2(6).
 24. LEMANT J et al. Serious acute chikungunya virus infection requiring intensive care during the reunion island outbreak in 2005–2006*. *Crit Care Med*. 2008;36(9):2536– 41.

25. MAVALANKAR D. Chikungunya epidemic in India : a major public-health disaster. *Lancet Infect Dis.* 2007;7(May):306–7.
26. Gérardin P, Barau G, Michault A, Bintner M, Randrianaivo H, Choker G, et al. Multidisciplinary Prospective Study of Mother-to-Child Chikungunya Virus Infections ´ union on the Island of La Re. *Plos Med.* 2008;5(3):413–23.
27. Robillard P, Boumahni B, Michault A, Fourmaintraux A, Schuffenecker I, Carbonnier M, et al. Transmission verticale materno-foetale du virus chikungunya. *Press medicale.* 2006;35(5):8–11.
28. Senanayake MP, Senanayake SM, Vidanage KK, Gunasena S, Lamabadusuriya SP. Vertical transmission in chikungunya infection. *Ceylon Med J.* 2009;54(2):47–50.
29. Le Bomin A, Hebert JC, Marty P, Delaunay P. [Confirmed chikungunya in children in Mayotte. Description of 50 patients hospitalized from February to June 2006]. *Med Trop (Mars).* 2008 Oct;68(5):491–5.
30. Valampampil JJ, Chirakkarot S, Letha S, Jayakumar C, Gopinathan KM, Valampampil JJ. Clinical Profile of Chikungunya in Infants. *Indian J Pediatr.* 2009;76(2):151–5.
31. ROBIN S et al. of Child Neurology. *J Child Neurol.* 2008;23(1028):1028–35.
32. Lewthwaite P, Vasanthapuram R, Osborne JC, Begum A, Plank JLM, Shankar MV, et al. Chikungunya Virus and Central Nervous System. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(2):329–31.
33. ECONOMOPOULOU A et al. Atypical Chikungunya virus infections : clinical manifestations , mortality and risk factors for severe disease during the ´ union 2005 – 2006 outbreak on Re. *Epidemiol Infect.* 2009;137:534–41.
34. Levine B, Hardwick M, Griffin DE. Persistence of alphaviruses in vertebrate hosts. *Trends Microbiol.* 1994;2(1):1–4.
35. Tesh RB. Arthritides caused by mosquito-borne viruses. *Annu Rev Med.* 1982;33(1):31–40.
36. Suhrbier A, Linn M La. Clinical and pathologic aspects of arthritis due to Ross River virus and other alphaviruses. *Curr Opin Rheumatol.* 2004;16(4):374–9.
37. Toivanen A. Alphaviruses : an emerging cause of arthritis ? *Curr Opin Rheumatol.* 2008;20(4):486–90.
38. Harley D, Sleight A, Ritchie S, Ev CLINMIR. Ross River Virus Transmission , Infection , and Disease : a Cross-Disciplinary Review. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(4):909–32.
39. Ng LFP, Chow A, Sun Y, Kwek DJC, Lim P, Ng L, et al. IL-1 b , IL-6 , and RANTES as Biomarkers of Chikungunya Severity. *PLoS One.* 2009;4(1):1–8.
40. Kelvin AA, Banner D, Silvi G, Moro ML, Spataro N, Gaibani P, et al. Inflammatory Cytokine Expression Is Associated with Chikungunya Virus Resolution and Symptom Severity. *Plos Neglected Trop Dis.* 2011;5(8):1–12.
41. Chow A, Her Z, Ong EKS, Chen J, Dimatatac F, Kwek DJC, et al. Persistent Arthralgia Induced by Chikungunya Virus Infection is

- Associated with Interleukin-6 and Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor. *J Infect Dis.* 2011;203(II):149– 57.
42. Hoarau J, Bandjee MJ, Trotot PK, Das T, Li-pat-yuen G, Dassa B, et al. Persistent Chronic Inflammation and Infection by Chikungunya Arthritogenic Alphavirus in Spite of a Robust Host Immune Response. *J Immunol.* 2015;184:5914–27.
 43. WAUQUIER N et al. The Acute Phase of Chikungunya Virus Infection in Humans Is Associated With Strong Innate Immunity and T CD8 Cell Activation. *J Infect Dis.* 2011;204(1):115–23.
 44. Petitdemange C, Petitdemange C, Paris C, Pierre DELU, Marie ET. Etude des cellules NK au cours des infections par le virus du Chikungunya et le virus de la Dengue 2014;88:8–232.
 45. Laras K, Sukri NC, Larasati RP, Bangs MJ, Kosim R, Wandura T, et al. Tracking the reemergence of epidemic chikungunya virus in Indonesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2005;99(2):128–41.
 46. KAM Y-W et al. Immuno-biology of Chikungunya and implications for disease intervention. *Microbes Infect.* 2009;11:1186–96.
 47. Kam Y, Lee WWL, Simarmata D, Harjanto S, Teng T, Tolou H, et al. Longitudinal Analysis of the Human Antibody Response to Chikungunya Virus Infection : Implications for Serodiagnosis and Vaccine Development. *Journal Virol.* 2012;86(23):13005–15.
 48. Kam Y, Lum F, Teo T, Lee WWL, Simarmata D, Harjanto S, et al. Early neutralizing IgG response to Chikungunya virus in infected patients targets a dominant linear epitope on the E2 glycoprotein. *EMBO Mol Med.* 2012;4:330–43.
 49. Couderc T et al. A Mouse Model for Chikungunya : Young Age and Inefficient Type-I Interferon Signaling Are Risk Factors for Severe Disease. *PLoS Pathog.* 2008;4(2):1– 12.
 50. Bréhin A, Rubrecht L, Navarro-sanchez ME, Maréchal V, Frenkiel M, Lapalud P, et al. Production and characterization of mouse monoclonal antibodies reactive to Chikungunya envelope E2 glycoprotein. *Virology.* 2008;371(1):185–95.
 51. Lee CY, Kam Y, Fric J, Malleret B, Koh EGL, Prakash C, et al. Chikungunya Virus Neutralization Antigens and Direct Cell-to-Cell Transmission Are Revealed by Human Antibody-Escape Mutants. *PLoS Pathog.* 2011;7(12):1–15.
 52. Kam Y, Simarmata D, Chow A, Her Z, Teng T, Ong EKS, et al. Early Appearance of Neutralizing Immunoglobulin G3 Antibodies Is Associated With Chikungunya Virus Clearance and Long-term Clinical Protection. *J Infect Dis.* 2012;205:1147–54.
 53. Ahola T, Lampio A, Auvinen P, Ka L. Semliki Forest virus mRNA capping enzyme requires association with anionic membrane phospholipids for activity. *EMBO Journa.* 1999;18(11):3164–72.
 54. Ahola T, Kujala P, Tuittila M, Blom T, Laakkonen P, Hinkkanen ARI, et al. Effects of Palmitoylation of Replicase Protein nsP1 on Alphavirus Infection. *J Virol.* 2000;74(15):6725–33.

55. Pirjo Laakkonen†, Tero Ahola and LK "a "inen F. The Effects of Palmitoylation on Membrane Association of Semliki Forest Virus RNA Capping Enzyme *. J Biol Chem. 1996;271(45):28567–71.
56. Bouraï M, Lucas-hourani M, Gad H, Drosten C, Jacob Y, Tafforeau L, et al. Mapping of Chikungunya Virus Interactions with Host Proteins Identified nsP2 as a Highly Connected Viral Component. Jounal Virol. 2012;86(6):3121–34.
57. Melton J V, Ewart GD, Weir RC, Board PG, Lee E, Gage PW. Alphavirus 6K Proteins Form Ion Channels *. J Biol Chem. 2002;277(49):46923–31.
58. Frank R. The SPOT-synthesis technique Synthetic peptide arrays on membrane supports — principles and applications. J Immunol Methods. 2002;267(1):13–26.
59. Amin N, Reyes F, Calero R, Camacho F, Acosta A, Finlay I, et al. Predicción de epítos T y B de la proteína NS4b del virus dengue tipo 3 Materiales y Métodos. Vaccimonitor. 2013;22(3):14–21.
60. Teng T, Kam Y. Host response to Chikungunya virus and perspectives for immune-based therapies. Future Virol. 2011;6(8):975–84.
61. Warter L, Lee CY, Thiagarajan R, Lebecque S, Lin RTP, Ng LFP, et al. Chikungunya Virus Envelope-Specific Human Monoclonal Antibodies with Broad Neutralization Potency. J Immunol. 2011;186(5):3258–64.
62. Mclellan JS, Pancera M, Carrico C, Gorman J, Julien J, Khayat R, et al. with broadly neutralizing antibody PG9. Nature [Internet]. 2011;480(7377):336–43.
63. Trifinopoulos J, Nguyen L, Haeseler A Von, Minh BQ. W-IQ-TREE : a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. 2016;44(April):232–5.
64. Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, J P, Zhang Y. The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. Nat Methods [Internet]. 2015;12(1):7–8.
65. Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A, et al. ExPASy : the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. Nucleic Acids Res. 2003;31(13):3784–8.
66. Zhang Q, Wang P, Kim Y, Haste-andersen P, Beaver J, Bourne PE, et al. Immune epitope database analysis resource. Nucleic Acids Res. 2008;36(2):513–8.

Mukonyora M. Journal of Clinical & Cellular A Review of Important Discontinuous BCell Epitope Prediction Tools. J Clin Cell Immunol.