ANA LIA PRADELLA PUGLIA

Expressão de proteínas estruturais de *Alphavirus* em células S2 (*D. melanogaster*)

São Paulo

2018

ANA LIA PRADELLA PUGLIA

Expressão de proteínas estruturais de *Alphavirus* em células S2 (*D melanogaster*)

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia da Universidade de
São Paulo, Instituto Butantan e
Instituto de Pesquisas Tecnológica
para obtenção do Título de
Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Dr. Renato Mancini Astray – orientador

Versão Original

São Paulo

2018

Resumo

Puglia, ALP. **Expressão de proteínas estruturais de *Alphavirus* em células S2 (*D melanogaster*)**. [tese (Doutorado em Programa de Interunidades em Biotecnologia)] Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2018.

No grupo das doenças infecciosas emergentes e reemergentes, os arbovírus transmitidos por mosquitos, são considerados importantes desafios para a saúde pública. O alastramento mundial do vírus Chikungunya (CHIKV, Togaviridae, *Alphavirus*), acabou resultando na introdução do CHIKV no Brasil, através da transmissão zoonótica por mosquitos do gênero *Aedes spp*, particularmente *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, duas espécies invasoras e cosmopolitas. Outro *Alphavirus*, o vírus Mayaro (MAYV) presente na região amazônica da América do Sul, vem apresentando indícios de uma real urbanização, elevando a preocupação sobre sua possível transmissão por mosquitos urbanos. Diante desse cenário, fica clara a necessidade da realização de estudos sobre estratégias de controle e prevenção da infecção por MAYV e CHIKV, uma vez que não há vacinas ou terapia antiviral específica para a infecção por esses arbovírus. Este projeto descreve pela primeira vez a eficiente expressão, purificação e análise de partículas semelhantes a vírus (VLP, “virus-like particles”) dos *Alphavirus* CHIKV e MAYV em células de inseto S2 (*Drosophila melanogaster*). Para esse fim, clonamos os genes das proteínas estruturais dos vírus MAYV e CHIKV em vetores para a expressão recombinante em células S2. Essa plataforma de expressão de proteínas provou ser adequada para o processamento de glicoproteínas do CHIKV e MAYV para produção de VLP, uma vez que detectamos a presença de partículas no sobrenadante do cultivo por *Western blotting* e Microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Ainda, foi possível selecionar células para uma maior produção de VLP e estabelecer um método de purificação das partículas.

Palavras chave: *Alphavirus*, Mayaro, Chikungunya, células S2.

Abstract

Puglia, ALP. **Expression of *Alphavirus* structural proteins in the *Drosophila Schneider* 2 cell system** [Ph.D thesis (Doutorado em Programa de Interunidades em Biotecnologia)] Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo ; 201.

In the group of emerging and reemerging infectious diseases, mosquito-borne arboviruses are considered major public health challenges. The transmission of Chikungunya (CHIKV, Togaviridae, *Alphavirus*) in America continent was first reported in Central America and Caribbean region. The CHIKV epidemics reached Brazil through zoonotic transmission by *Aedes spp* mosquitoes, particularly *Ae. Aegypti* and *Ae. albopictus*, two invasive and cosmopolitan species. Another *Alphavirus*, the Mayaro virus (MAYV) present mainly in the Amazon region has been showing evidence of a real urbanization, increasing concerns about its transmission by urban mosquitoes. Therefore, it is clear that studies on strategies for the control and prevention of MAYV and CHIKV infection are needed. Currently no vaccines or antiviral therapy specific for CHIKV and MAYV infection are available. This work describes for the first time an efficient expression, purification and analysis of virus-like particles (VLP) of CHIKV and MAYV *Alphaviruses* in S2 (*Drosophila melanogaster*) insect cells. The genes coding for the structural proteins of the MAYV and CHIKV viruses were cloned into vectors for recombinant expression in S2 cells. This platform proved to be suitable for the processing of CHIKV and MAYV glycoproteins and to produce VLP, since we detected the presence of particles in the culture supernatant by Western blotting and Transmission Electron Microscopy (TEM). Furthermore, it was possible to select cells for greater production of VLP and to establish a method for particle purification.

Key words: *Alphavirus*, Mayaro, Chikungunya, VLP, S2 cells.

1 INTRODUÇÃO

A introdução do vírus Chikungunya (CHIKV) no Brasil aconteceu na sequência de uma série de alertas epidemiológicos realizados anteriormente. Esse vírus tem se espalhado pelas regiões tropicais e causado surtos em diversos países da África, Ásia, Europa e América. A transmissão entre humanos é promovida pelos mosquitos do gênero *Aedes*, abundantemente encontrados em nosso país. O vírus se espalhou por diversas regiões do país, conforme o previsto por especialistas (Figueiredo e Figueiredo, 2014).

O CHIKV pertence à família Togaviridae, gênero *Alphavirus*, que concentra alguns vírus patogênicos aos seres humanos. A patogenia causada pela infecção por CHIKV manifesta-se primeiro como um estágio agudo de inflamação articular grave e doença febril, que depois evolui para um estágio crônico, durante o qual os pacientes podem experimentar dores articulares debilitantes e persistentes por períodos prolongados. A gravidade da artrite causada pelo CHIKV chama a atenção das autoridades de saúde pública dos países afetados, visto que metade dos casos tem evoluído para forma crônica da doença (Runowska *et al.*, 2018).

O vírus Mayaro, assim como o CHIKV é um arbovírus da família Togaviridae e gênero *Alphavirus*. É transmitido aos humanos pela picada da fêmea do mosquito do gênero *Haemagogus*, tendo sido detectado na natureza em vários hospedeiros vertebrados como primatas não humanos, roedores, pássaros, preguiças e outros pequenos mamíferos. Experimentalmente o mosquito urbano *Aedes aegypti* já mostrou capacidade de se tornar um vetor para o vírus Mayaro, gerando a preocupação de que, assim como o vírus da febre amarela, poderia ser transmitido em áreas urbanizadas (Mackay e Arden, 2016). Os sintomas da doença são semelhantes a outras arboviroses, entretanto a infecção por MAYV pode persistir por meses, tornando-se mais incapacitante que a dengue. Nos últimos anos, o número de casos de febre Mayaro vem aumentando em vários estados brasileiros. Com a circulação simultânea de MAYV e CHIKV, em muitos locais é possível questionar se os sintomas apresentados por um paciente são provocados por uma infecção por MAYV ou CHIKV (Hotez e Murray, 2017).

Tendo em vista esse cenário, é fundamental que sejam propostas alternativas para o combate a esses vírus emergentes. Neste trabalho buscamos a expressão recombinante

das proteínas estruturais e imunogênicas desses *Alphavirus*, de maneira a possibilitar futuros estudos da utilização dessas preparações para fins de imunização. Desenvolvemos uma metodologia de obtenção das proteínas imunogênicas do CHIKV e/ou MAYV, visando sua apresentação como partículas semelhantes a vírus (VLP), consideradas uma das formas mais promissoras para a imunização contra *Alphavirus*. As VLP apresentam diversas vantagens frente a outras formas de apresentação de antígenos vacinais: são mais seguras que as vacinas virais inativadas ou atenuadas e por serem essencialmente desprovidas de material genético infeccioso não são infectivas ou replicativas.

A abordagem utilizada para a obtenção das VLP envolveu a utilização de células de inseto S2 (*Drosophila melanogaster*). Essa estratégia é inicialmente atrativa, pois além de permitir a expressão estável das proteínas recombinantes, envolve um sistema de inseto em que não deve haver modificações importantes nas características estruturais das proteínas, dado que em seu ciclo zoonótico, ambos os vírus realizam passagem em insetos da mesma ordem *Diptera* das células S2. Dessa forma espera-se que as proteínas produzidas pelas células de inseto tenham as características de modificações pós-traducionais e imunogenicidade desejadas.

Os trabalhos realizados envolveram a amplificação e clonagem dos genes das proteínas estruturais a partir do próprio vírus (Mayaro) ou de genes sintéticos (Chikungunya) em vetores de expressão em células S2; a avaliação das melhores condições de expressão das proteínas recombinantes e VLP; o estabelecimento de métodos analíticos adequados e de purificação das VLP até então inexistentes no laboratório e a análise das estruturas geradas utilizando métodos específicos para a análise de partículas.

Os resultados apresentados nesta tese permitem concluir que as células S2 recombinantes obtidas produzem proteínas estruturais de CHIKV ou MAYV em estrutura compatível com o esperado para a forma de VLP.

7. CONCLUSÃO

1. Células S2 transfectadas estavelmente com vetores indutíveis para a expressão de proteínas de *Alphavirus* foram estabelecidas com sucesso.
2. As populações demonstram melhor expressão das proteínas de CHIKV quando foram obtidas a partir da transfecção com o vetor modificado para conter o gene de seleção, evitando a necessidade da realização de co-transfecção.
3. O procedimento de enriquecimento populacional por técnica imunomagnética demonstrou melhorar a expressão das proteínas recombinantes.
4. Com base na utilização de anticorpos específicos, foi possível observar a presença das proteínas C e E2 de Chikungunya, e da proteína C de Mayaro, tanto em amostras de células íntegras (Imunofluorescência) como em lisados celulares e sobrenadante de cultivo (*Western blotting*).
5. Com base em análises de cultivos em diferentes meios de cultura, contendo ou não suplementação, foi verificada uma maior presença de proteínas recombinantes no sobrenadante celular quando o meio SF900 III foi suplementado com emulsão lipídica.
6. Cinéticas de cultivo celular demonstraram uma presença das proteínas recombinantes com aumento gradual de quantidade no decorrer do tempo de cultivo após a indução.
7. Lisados celulares de células S2MT-MAYV-Hy e S2MT-CHIKV-Hy foram capazes de estimular camundongos contra os antígenos virais, sendo observado aumento no título de anticorpos específicos quando os animais foram expostos aos respectivos vírus inativados.
8. Os dados obtidos utilizando técnicas de análise de estruturas e partículas (TEM, Zetasizer e Nanosight) indicam claramente a formação de estruturas VLP a partir dos cultivos de S2MT-MAYV-Hy e S2MT-CHIKV-Hy.

Referências Bibliográficas*

AKAHATA, W.; NABEL, G. J. A specific domain of the Chikungunya virus E2 protein regulates particle formation in human cells: implications for alphavirus vaccine design. **J Virol**, v. 86, n. 16, p. 8879-83, Aug 2012. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22647698> >.

AKAHATA, W. et al. A virus-like particle vaccine for epidemic Chikungunya virus protects nonhuman primates against infection. **Nat Med**, v. 16, n. 3, p. 334-8, Mar 2010. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20111039> >.

ASSUNÇÃO-MIRANDA, I.; CRUZ-OLIVEIRA, C.; DA POIAN, A. T. Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of alphavirus-induced arthritis. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 973516, 2013. ISSN 2314-6141. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24069610> >.

ASTRAY, R. M. et al. Kinetic studies of recombinant rabies virus glycoprotein (RVGP) cDNA transcription and mRNA translation in *Drosophila melanogaster* S2 cell populations. **Cytotechnology**, v. 65, n. 5, p. 829-38, Oct 2013. ISSN 0920-9069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23340966> >.

AZEVEDO, R. S. et al. Mayaro fever virus, Brazilian Amazon. **Emerg Infect Dis**, v. 15, n. 11, p. 1830-2, Nov 2009. ISSN 1080-6059. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19891877> >.

BRILLET, K.; PEREIRA, C. A.; WAGNER, R. Expression of membrane proteins in *Drosophila Melanogaster* S2 cells: Production and analysis of a EGFP-fused G protein-coupled receptor as a model. **Methods Mol Biol**, v. 601, p. 119-33, 2010. ISSN 1940-6029. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20099143> >.

BRUNINI, S. et al. High Frequency of Mayaro Virus IgM among Febrile Patients, Central Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 23, n. 6, p. 1025-1026, 06 2017. ISSN 1080-6059. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28518022> >.

CHUNG, Y. T.; KELLER, E. B. Regulatory elements mediating transcription from the *Drosophila melanogaster* actin 5C proximal promoter. **Mol Cell Biol**, v. 10, n. 1, p. 206-16, Jan 1990. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2104658> >.

CLEMENTS DE, et al. Development of a recombinant tetravalent dengue virus vaccine: immunogenicity and efficacy studies in mice and monkeys. **Vaccine**, 2010;28(15):2705-2715.

COIMBRA, T. L. et al. Mayaro virus: imported cases of human infection in São Paulo State, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 49, n. 4, p. 221-4, 2007 Jul-Aug 2007. ISSN 0036-4665. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17823750> >.

CUNHA, R. V. D.; TRINTA, K. S. Chikungunya virus: clinical aspects and treatment - A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 8, p. 523-531, Aug 2017. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28767976> >.

*De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [Cited 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

DEZURE, A. D. et al. Whole-Inactivated and Virus-Like Particle Vaccine Strategies for Chikungunya Virus. **J Infect Dis**, v. 214, n. suppl 5, p. S497-S499, Dec 2016. ISSN 1537-6613. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27920180> >.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. Chikungunya in Brazil: an emerging challenge. **Rev Bras Epidemiol**, v. 18, n. 1, p. 283-5, 2015 Jan-Mar 2015. ISSN 1980-5497. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25651028> >.

DOS SANTOS, A. S. et al. Rabies virus glycoprotein expression in Drosophila S2 cells: influence of re-selection on protein expression. **Biotechnol J**, v. 4, n. 11, p. 1578-81, Nov 2009. ISSN 1860-7314. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19824020> >.

EDELMAN, R. et al. Phase II safety and immunogenicity study of live chikungunya virus vaccine TSI-GSD-218. **Am J Trop Med Hyg**, v. 62, n. 6, p. 681-5, Jun 2000. ISSN 0002-9637. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11304054> >.

ERASMUS, J. H. et al. A chikungunya fever vaccine utilizing an insect-specific virus platform. **Nat Med**, v. 23, n. 2, p. 192-199, Feb 2017. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27991917> >.

ESPOSITO, D. L. A.; FONSECA, B. A. L. D. Will Mayaro virus be responsible for the next outbreak of an arthropod-borne virus in Brazil? **Braz J Infect Dis**, v. 21, n. 5, p. 540-544, 2017 Sep - Oct 2017. ISSN 1678-4391. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28688628> >.

FERNANDES, F. et al. Insect cells as a production platform of complex virus-like particles. **Expert Rev Vaccines**, v. 12, n. 2, p. 225-36, Feb 2013. ISSN 1744-8395. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23414412> >.

FIGUEIREDO, L. T. Emergent arboviruses in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 40, n. 2, p. 224-9, 2007 Mar-Apr 2007. ISSN 0037-8682. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17568894> >.

FIGUEIREDO, M. L.; FIGUEIREDO, L. T. Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 47, n. 6, p. 677-83, 2014 Nov-Dec 2014. ISSN 1678-9849. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25626645> >.

FUENMAYOR, J.; GÒDIA, F.; CERVERA, L. Production of virus-like particles for vaccines. **N Biotechnol**, v. 39, n. Pt B, p. 174-180, Oct 2017. ISSN 1876-4347. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28778817> >.

GIAS, E. et al. Purification of human respiratory syncytial virus by ultracentrifugation in iodixanol density gradient. **J Virol Methods**, v. 147, n. 2, p. 328-32, Feb 2008. ISSN 0166-0934. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18029032> >.

GOO, L. et al. A virus-like particle vaccine elicits broad neutralizing antibody responses in humans to all Chikungunya virus genotypes. **J Infect Dis**, Sep 2016. ISSN 1537-6613. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27655868> >.

GORCHAKOV, R. et al. Attenuation of Chikungunya virus vaccine strain 181/clone 25 is determined by two amino acid substitutions in the E2 envelope glycoprotein. **J Virol**, v. 86, n. 11, p. 6084-96, Jun 2012. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22457519> >.

GRAHAM, J. M. Formation of self-generated gradients of iodixanol. **ScientificWorldJournal**, v. 2, p. 1356-60, May 2002. ISSN 1537-744X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12805920> >.

GUO, P. et al. Rapid and simplified purification of recombinant adeno-associated virus. **J Virol Methods**, v. 183, n. 2, p. 139-46, Aug 2012. ISSN 1879-0984. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22561982> >.

GÉLINAS, J. F. et al. Assessment of selected media supplements to improve F/HN lentiviral vector production yields. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 10198, Aug 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28860488> >.

HANDLER, M. Z. et al. Chikungunya fever: an emerging viral infection threatening North America and Europe. **Int J Dermatol**, Sep 2016. ISSN 1365-4632. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27667734> >.

HARRISON, V. R.; BINN, L. N.; RANDALL, R. Comparative immunogenicities of chikungunya vaccines prepared in avian and mammalian tissues. **Am J Trop Med Hyg**, v. 16, n. 6, p. 786-91, Nov 1967. ISSN 0002-9637. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4965219> >.

HOTEZ, P. J.; MURRAY, K. O. Dengue, West Nile virus, chikungunya, Zika-and now Mayaro? **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 8, p. e0005462, 08 2017. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28859086> >.

IWAKI, T.; CASTELLINO, F. J. A single plasmid transfection that offers a significant advantage associated with puromycin selection in Drosophila Schneider S2 cells expressing heterologous proteins. **Cytotechnology**, v. 57, n. 1, p. 45-9, May 2008. ISSN 0920-9069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19003171> >.

IWAKI, T. et al. Rapid selection of Drosophila S2 cells with the puromycin resistance gene. **Biotechniques**, v. 35, n. 3, p. 482-4, 486, Sep 2003. ISSN 0736-6205. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14513552> >.

IZURIETA, R. O. et al. Hunting in the Rainforest and Mayaro Virus Infection: An emerging Alphavirus in Ecuador. **J Glob Infect Dis**, v. 3, n. 4, p. 317-23, Oct 2011. ISSN 0974-8245. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22223990> >.

JOHANSSON, D. X. et al. Efficient expression of recombinant human monoclonal antibodies in Drosophila S2 cells. **J Immunol Methods**, v. 318, n. 1-2, p. 37-46, Jan 2007. ISSN 0022-1759. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17137589> >.

JOHN, W. A.; SALGUEIRO, S. **The use of Drosophila S2 in R&D and bioprocessing**. Pharmaceutical Bioprocessing. 1: 197-213 p. 2013.

JONGH, W. A.; SANCHI, S.; CHARLOTTE, D. **The**

use of Drosophila S2 cells in R&D and bioprocessing Pharmaceutical Bioprocessing. 1: 197-213 p. 2012.

JOSE, J.; SNYDER, J. E.; KUHN, R. J. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. **Future Microbiol**, v. 4, n. 7, p. 837-56, Sep 2009. ISSN 1746-0921. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19722838> >.

KARIUKI NJENGA, M. et al. Tracking epidemic Chikungunya virus into the Indian Ocean from East Africa. **J Gen Virol**, v. 89, n. Pt 11, p. 2754-60, Nov 2008. ISSN 0022-1317. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18931072> >.

KRUTIKOV, M.; MANSON, J. Chikungunya Virus Infection: An Update on Joint Manifestations and Management. **Rambam Maimonides Med J**, v. 7, n. 4, Oct 2016. ISSN 2076-9172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27824550> >.

LEPARC-GOFFART, I. et al. Chikungunya in the Americas. **Lancet**, v. 383, n. 9916, p. 514, Feb 2014. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24506907> >.

LI, C. et al. Hantavirus-like particles generated in CHO cells induce specific immune responses in C57BL/6 mice. **Vaccine**, v. 28, n. 26, p. 4294-300, Jun 2010. ISSN 1873-2518. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20433802> >.

LORENZ, C. et al. Impact of environmental factors on neglected emerging arboviral diseases. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 9, p. e0005959, Sep 2017. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28953892> >.

LUA, L. H. et al. Bioengineering virus-like particles as vaccines. **Biotechnol Bioeng**, v. 111, n. 3, p. 425-40, Mar 2014. ISSN 1097-0290. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24347238> >.

LUMSDEN, W. H. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. II. General description and epidemiology. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 49, n. 1, p. 33-57, Jan 1955. ISSN 0035-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14373835> >.

MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E. Mayaro virus: a forest virus primed for a trip to the city? **Microbes Infect**, v. 18, n. 12, p. 724-734, Dec 2016. ISSN 1769-714X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27989728> >.

MALLILANKARAMAN, K. et al. A DNA vaccine against chikungunya virus is protective in mice and induces neutralizing antibodies in mice and nonhuman primates. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 1, p. e928, 2011. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21264351> >.

MCCARROLL, L.; KING, L. A. Stable insect cell cultures for recombinant protein production. **Curr Opin Biotechnol**, v. 8, n. 5, p. 590-4, Oct 1997. ISSN 0958-1669. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9353223> >.

METZ, S. W. et al. Chikungunya virus-like particles are more immunogenic in a lethal AG129 mouse model compared to glycoprotein E1 or E2 subunits. **Vaccine**, v. 31, n. 51, p. 6092-6, Dec 2013. ISSN 1873-2518. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24099875> >.

METZ, S. W.; PIJLMAN, G. P. Production of Chikungunya Virus-Like Particles and Subunit Vaccines in Insect Cells. **Methods Mol Biol**, v. 1426, p. 297-309, 2016. ISSN 1940-6029. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27233282> >.

MILLAR, N. S.; BUCKINGHAM, S. D.; SATTELLE, D. B. Stable expression of a functional homooligomeric Drosophila GABA receptor in a Drosophila cell line. **Proc Biol Sci**, v. 258, n. 1353, p. 307-14, Dec 1994. ISSN 0962-8452. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7533909> >.

MOHSEN, M. O. et al. Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines. **Semin Immunol**, v. 34, p. 123-132, Dec 2017. ISSN 1096-3618. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28887001> >.

MORAES, A. M. et al. Drosophila melanogaster S2 cells for expression of heterologous genes: From gene cloning to bioprocess development. **Biotechnol Adv**, v. 30, n. 3, p. 613-28, 2012 May-Jun 2012. ISSN 1873-1899. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22079894> >.

MORRISON, T. E. Reemergence of chikungunya virus. **J Virol**, v. 88, n. 20, p. 11644-7, Oct 2014. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25078691> >.

MOTA, M. T. et al. Complete Genome Sequence of Mayaro Virus Imported from the Amazon Basin to São Paulo State, Brazil. **Genome Announc**, v. 3, n. 6, Nov 2015. ISSN 2169-8287. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26607884> >.

MUÑOZ, M.; NAVARRO, J. C. [Mayaro: a re-emerging Arbovirus in Venezuela and Latin America]. **Biomedica**, v. 32, n. 2, p. 286-302, Jun 2012. ISSN 0120-4157. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23242303> >.

MÄKELÄ, P. H. Vaccines, coming of age after 200 years. **FEMS Microbiol Rev**, v. 24, n. 1, p. 9-20, Jan 2000. ISSN 0168-6445. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10640596> >.

NORANATE, N. et al. Characterization of chikungunya virus-like particles. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e108169, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25265335> >.

PETERSEN, L. R.; POWERS, A. M. Chikungunya: epidemiology. **F1000Res**, v. 5, 2016. ISSN 2046-1402. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26918158> >.

PIJLMAN, G. P. Enveloped virus-like particles as vaccines against pathogenic arboviruses. **Biotechnol J**, v. 10, n. 5, p. 659-70, May 2015. ISSN 1860-7314. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25692281> >.

PLANTE, K. S. et al. Extended Preclinical Safety, Efficacy and Stability Testing of a Live-attenuated Chikungunya Vaccine Candidate. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 9, p. e0004007, 2015. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26340754> >.

POWERS, A. M.; LOGUE, C. H. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. **J Gen Virol**, v. 88, n. Pt 9, p. 2363-77, Sep 2007. ISSN 0022-1317. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17698645> >.

RAVICHANDRAN, R.; MANIAN, M. Ribavirin therapy for Chikungunya arthritis. **J Infect Dev Ctries**, v. 2, n. 2, p. 140-2, Apr 2008. ISSN 1972-2680. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19738340> >.

ROBINSON, D. M. et al. Inactivated Mayaro vaccine produced in human diploid cell cultures. **Mil Med**, v. 141, n. 3, p. 163-6, Mar 1976. ISSN 0026-4075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/815839> >.

ROBINSON, M. C. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical features. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 49, n. 1, p. 28-32, Jan 1955. ISSN 0035-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14373834> >.

RODRIGUES, A. F. et al. Adaptation of retrovirus producer cells to serum deprivation: Implications in lipid biosynthesis and vector production. **Biotechnol Bioeng**, v. 109, n. 5, p. 1269-79, May 2012. ISSN 1097-0290. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22179842> >.

_____. Retroviral vector production under serum deprivation: The role of lipids. **Biotechnol Bioeng**, v. 104, n. 6, p. 1171-81, Dec 2009. ISSN 1097-0290. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19655394> >.

ROOSENHOFF, R.; ANFASA, F.; MARTINA, B. The pathogenesis of chronic chikungunya: evolving concepts. **Future Virology**, v. 11, n. 1, p. 61-77, 2016. ISSN 1746-0794. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000367159400007 >.

ROSS, R. W. The Newala epidemic. III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. **J Hyg (Lond)**, v. 54, n. 2, p. 177-91, Jun 1956. ISSN 0022-1724. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13346078> >.

RUNOWSKA, M. et al. Chikungunya virus: a rheumatologist's perspective. **Clin Exp Rheumatol**, Mar 2018. ISSN 0392-856X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29533749> >.

SAM, I. C. et al. Updates on chikungunya epidemiology, clinical disease, and diagnostics. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 15, n. 4, p. 223-30, Apr 2015. ISSN 1557-7759. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25897809> >.

SANTOS, N. G. et al. Impact of recombinant Drosophila S2 cell population enrichment on expression of rabies virus glycoprotein. **Cytotechnology**, May 2016. ISSN 0920-9069. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27216014> >.

SARASWAT, S. et al. Expression and Characterization of Yeast Derived Chikungunya Virus Like Particles (CHIK-VLPs) and Its Evaluation as a Potential Vaccine Candidate. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 7, p. e0004782, Jul 2016. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27399001> >.

TAN, M. et al. E. coli-expressed recombinant norovirus capsid proteins maintain authentic antigenicity and receptor binding capability. **J Med Virol**, v. 74, n. 4, p. 641-9, Dec 2004. ISSN 0146-6615. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15484274> >.

TAYLOR, A. et al. Mutation of the N-Terminal Region of Chikungunya Virus Capsid Protein: Implications for Vaccine Design. **MBio**, v. 8, n. 1, 02 2017. ISSN 2150-7511. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28223458> >.

TESH, R. B. et al. Mayaro virus disease: an emerging mosquito-borne zoonosis in tropical South America. **Clin Infect Dis**, v. 28, n. 1, p. 67-73, Jan 1999. ISSN 1058-4838. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10028074> >.

THARMARAJAH, K.; MAHALINGAM, S.; ZAID, A. Chikungunya: vaccines and therapeutics. **F1000Res**, v. 6, p. 2114, 2017. ISSN 2046-1402. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29259782> >.

THIBERVILLE, S. D. et al. Chikungunya fever: a clinical and virological investigation of outpatients on Reunion Island, South-West Indian Ocean. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 1, p. e2004, 2013. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23350006> >.

USTA, S. N. et al. Chemically defined serum-free and xeno-free media for multiple cell lineages. **Ann Transl Med**, v. 2, n. 10, p. 97, Oct 2014. ISSN 2305-5839. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25405151> >.

VAN DER VALK, J. et al. Optimization of chemically defined cell culture media--replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. **Toxicol In Vitro**, v. 24, n. 4, p. 1053-63, Jun 2010. ISSN 1879-3177. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20362047> >.

VAN ZYL, A. R.; HITZEROTH, I. I. Purification of Virus-Like Particles (VLPs) from Plants. **Methods Mol Biol**, v. 1404, p. 569-79, 2016. ISSN 1940-6029. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27076323> >.

VASCONCELOS, P. F. C.; CALISHER, C. H. Emergence of Human Arboviral Diseases in the Americas, 2000-2016. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 16, n. 5, p. 295-301, May 2016. ISSN 1530-3667. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000374836400001 >.

VENTINI, D. C. et al. Recombinant rabies virus glycoprotein synthesis in bioreactor by transfected *Drosophila melanogaster* S2 cells carrying a constitutive or an inducible promoter. **J Biotechnol**, v. 146, n. 4, p. 169-72, Apr 2010. ISSN 1873-4863. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20176061> >.

WANG, D. et al. A complex adenovirus vaccine against chikungunya virus provides complete protection against viraemia and arthritis. **Vaccine**, v. 29, n. 15, p. 2803-9, Mar 2011. ISSN 1873-2518. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21320541> >.

WEAVER, S. C. et al. Chikungunya virus and prospects for a vaccine. **Expert Rev Vaccines**, v. 11, n. 9, p. 1087-101, Sep 2012. ISSN 1744-8395. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23151166> >.

WEISE, W. J. et al. A novel live-attenuated vaccine candidate for mayaro Fever. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 8, p. e2969, Aug 2014. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25101995> >.

WHITE, A.; BERMAN, S.; LOWENTHAL, J. P. Comparative immunogenicities of Chikungunya vaccines propagated in monkey kidney monolayers and chick embryo suspension cultures. **Appl Microbiol**, v. 23, n. 5, p. 951-2, May 1972. ISSN 0003-6919. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4624213> >.

YANG, L. et al. HIV-1 virus-like particles produced by stably transfected *Drosophila* S2 cells: a desirable vaccine component. **J Virol**, v. 86, n. 14, p. 7662-76, Jul 2012. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22553333> >.

YOKOMIZO, A. Y. et al. Rabies virus glycoprotein expression in *Drosophila* S2 cells. I. Functional recombinant protein in stable co-transfected cell line. **Biotechnol J**, v. 2, n. 1, p. 102-9, Jan 2007. ISSN 1860-7314. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17225257> >.

ZELTINS, A. Construction and characterization of virus-like particles: a review. **Mol Biotechnol**, v. 53, n. 1, p. 92-107, Jan 2013. ISSN 1559-0305. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23001867> >.

ZHU, J. Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. **Biotechnol Adv**, v. 30, n. 5, p. 1158-70, 2012 Sep-Oct 2012. ISSN 1873-1899. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21968146> >.

ZUCHI, N. et al. Molecular detection of Mayaro virus during a dengue outbreak in the state of Mato Grosso, Central-West Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 6, p. 820-3, Sep 2014. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25141284> >.