## UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

## FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

## PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

## MARCILIO JORGE FUMAGALLI

Estudos sobre aspectos da resposta imune em infecções virais incluindo: proteção cruzada entre os vírus Chikungunya e Mayaro; análise de epítopos antigênicos da proteína E do vírus Zika; e avaliação da resposta à vacina inativada de SARS-CoV-2

> Ribeirão Preto 2022

## MARCILIO JORGE FUMAGALLI

Estudos sobre aspectos da resposta imune em infecções virais incluindo: proteção cruzada entre os vírus Chikungunya e Mayaro; análise de epítopos antigênicos da proteína E do vírus Zika; e avaliação da resposta à vacina inativada de SARS-CoV-2

#### Versão Original

Tese apresentada ao programa de pósgraduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Luiz Tadeu Moraes Figueiredo

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

## FICHA CATALOGRÁFICA

#### Fumagalli, Marcílio Jorge

Estudos sobre aspectos da resposta imune em infecções virais incluindo: proteção cruzada entre os vírus Chikungunya e Mayaro; análise de epítopos antigênicos da proteína E do vírus Zika; e avaliação da resposta à vacina inativada de SARS-CoV-2. Ribeirão Preto, 2022.

97 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada Orientador: Figueiredo, Luiz Tadeu Moraes

1. Imunologia. 2. Virologia. 3. Anticorpos. 4. Resposta imune cruzada. 5. Vacina inativada. 6. *Alphavirus*. 7. *Flavivirus*. 8. SARS-CoV-2.

Trabalho realizado no Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo 2018/09383-3.

#### Marcilio Jorge Fumagalli

Estudos sobre aspectos da resposta imune em infecções virais incluindo: proteção cruzada entre os vírus Chikungunya e Mayaro; análise de epítopos antigênicos da proteína E do vírus Zika; e avaliação da resposta à vacina inativada de SARS-CoV-2

Tese apresentada ao programa de Pósgraduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_/

### Banca Examinadora

Prof. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo

Julgamento:	Assinatura:	
0		

Instituição: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Prof (a). Dr. (a)	)	 

Julgamento: \_\_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof (a). Dr. (a)	

Julgamento: \_\_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof (a). Dr. (a)		
Instituição:		
Julgamento:	Assinatura:	

# DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado ao meu Pai, que através de sua simplicidade me ensinou muito mais do que qualquer instituição.

#### AGRADECIMENTOS

Agradeço,

Ao meu grande pai José Jorge, do qual sou eternamente grato pelo bom exemplo de sempre, pelo apoio incondicional e pela presença constante, mesmo que não física. O seu bom coração o torna pai não só de mim, mas de todos à sua volta;

A minha querida mãe Samira, que sempre esteve presente durante minha jornada, o seu amor e apoio foram e são essenciais para mim;

Ao meu orientador Prof. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo, que com bom humor conduz nossa jornada na virologia, obrigado pela confiança durante estes anos;

Ao programa de Imunologia Básica e Aplicada, em especial à equipe técnica e coordenadora do curso, que há muitos anos mantém a excelência do programa;

Aos professores colaboradores que tive o prazer de trabalhar junto, Ademilson P. Castelo, Benedito A. L. da Fonseca, Cristina R. B. Cardoso, Ricardo T. Gazzinelli, José Luiz P. Módena e Vânia L. D. Bonato;

Aos amigos e parceiros de pesquisa, Alberto Amarilla, Fabiano Capato, Patrick O. de Azevedo, Luiz Gustavo N. de Almeida, Luiza A. Castro-Jorge, Murillo Duarte, Renan V. H. Carvalho, Thaís F.C. Fraga e William M. de Souza;

Aos técnicos de limpeza, faxineiros e vigias da USP, o trabalho de vocês é essencial para o funcionamento desta instituição, à vocês o meu muito obrigado;

A Universidade de São Paulo, que há muitos anos promove de maneira muito significativa o desenvolvimento científico, cultural e social do Brasil;

Ao apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo no. 2018/09383-3), que de maneira essencial permitiu o desenvolvimento deste e de muitos outros projetos;

A todas as agências de fomento à pesquisa do Brasil, especialmente FAPESP, CAPES e CNPq;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desta tese e com minha formação acadêmica, de coração obrigado!

#### **RESUMO**

Fumagalli, M.J. Estudos sobre aspectos da resposta imune em infecções virais incluindo: proteção cruzada entre os vírus Chikungunya e Mayaro; análise de epítopos antigênicos da proteína E do vírus Zika; e avaliação da resposta à vacina inativada de SARS-CoV-2. 2022. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Esta Tese de Doutorado analisa distintos aspectos de respostas imunes a infecções virais e inclui 3 estudos. Na Parte I temos um estudo sobre a proteção cruzada entre os vírus Chikungunya e Mayaro onde foi possível concluir que: A resposta imunológica ao CHIKV confere proteção cruzada parcial contra a infecção secundária por MAYV, reduzindo a carga viral tecidual e os danos histopatológicos. Anticorpos anti-CHIKV de seres humanos e de camundongos possuem baixa neutralização cruzada contra a infecção por MAYV. Após a infecção secundária por MAYV em camundongos, observaram-se elevados títulos de anticorpos com atividade neutralizante cruzada. A depleção de células do sistema imune indicou que uma combinação de células imunes adaptativas podem ser relevantes na proteção cruzada contra MAYV. A redução de citocinas pró-inflamatórias, de células NK e de monócitos inflamatórios durante a infecção por MAYV de camundongos previamente infectados com CHIKV, sugere papel da imunidade inata na proteção cruzada. Na Parte II temos uma análise de epítopos antigênicos da proteína E do vírus Zika, onde foi possível: Selecionar 9 peptídeos lineares da proteína E de ZIKV com base na reatividade cruzada de anticorpos IgG anti-DENV. Dos 9 peptídeos selecionados, 3 pertencem ao domínio I (DI) da proteína E, 2 ao DII, sendo supostamente gênero ou grupoespecíficos e 4 peptídeos ao DIII, correspondendo, provavelmente, a regiões antigênicas imunodominantes dos flavivirus. Observou-se soro-neutralização cruzada dos soros de pacientes convalescentes de DENV contra a infecção por ZIKV não relacionada aos 9 peptídeos lineares mencionados. A maioria dos soros de convalescentes de DENV exibiram ADE, potencializando a infecção por ZIKV e, ao ser depletar os anticorpos com afinidade pelos 9 peptídeos lineares selecionados, reduziram esta atividade, sugerindo que anticorpos contra tais peptídeos podem estar envolvidos no ADE para ZIKV. Na Parte III temos uma avaliação da resposta imune à vacina inativada de SARS-CoV-2, onde concluímos que: Indivíduos vacinados 2 vezes com o SARS-CoV-2 inativado seroconvertem, produzindo altos níveis de IgG anti-Spike (S) viral com significativa capacidade neutralizante, que é significativamente reduzida contra SARS-CoV-2 e as variantes Gamma e Zeta após 6 meses. Anticorpos de animais vacinados por vacina de vírus inativado mostraram-se menos neutralizantes contra as variantes Gamma e Zeta do SARS-CoV-2, mas com significativo aumento 3 dias após a infecção. O estímulo de células esplênicas de camundongos com antígenos de SARS-CoV-2 inativado em animais imunizados induziu linfoproliferação mesmo aos antígenos das diferentes variantes virais. A imunização prévia com SARS-CoV-2 inativado reduziu em quase 100 vezes a carga das variantes Gamma e Zeta no pulmão dos camundongos. Níveis indetectáveis de IL-6 e TNFα nos camundongos imunizados após infecção com as linhagens WT e a variante Zeta, associaram-se com a redução do infiltrado inflamatório pulmonar, evidenciando um papel protetor da imunização prévia por SARS-CoV-2 inativado.

**Palavras-chave**: Resposta imunológica cruzada; infecções virais; vacina de vírus inativado; epítopos imunodominantes; Virus Mayaro; Vírus Chikungunya; Vírus Zika; Vírus do Dengue; SARS-CoV-2

#### ABSTRACT

Fumagalli, M.J. Studies on aspects of the immune response in viral infections including: crossprotection between Chikungunya and Mayaro viruses; analysis of Zika virus E protein antigenic epitopes; and evaluation of response to inactivated SARS-CoV-2 vaccine. 2022. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

This Doctoral Thesis analyzes different aspects of immune responses to viral infections and includes 3 studies. In Part I, we have a study on the cross-protection between Chikungunya and Mayaro viruses where it was possible to conclude that: The immune response to CHIKV provides partial cross-protection against secondary MAYV infection, reducing tissue viral load and histopathological damage. Anti-CHIKV antibodies from humans and mice have low crossneutralization against MAYV infection. After secondary MAYV infection in mice, high titers of antibodies with cross-neutralizing activity were observed. Depletion of immune system cells indicated that a combination of adaptive immune cells might be relevant in cross-protection against MAYV. The reduction of pro-inflammatory cytokines, NK cells, and inflammatory monocytes during MAYV secondary infection, suggests a role for innate immunity in crossprotection. In Part II, we have an analysis of antigenic epitopes of Zika virus E protein, where it was possible to: Select 9 linear ZIKV protein E peptides based on the cross-reactivity of anti-DENV IgG antibodies. Of the 9 peptides selected, 3 belong to the domain I (DI) of protein E, 2 to DII, supposedly being genus or group-specific, and 4 peptides to DIII, probably corresponding to immunodominant antigenic regions of flaviviruses. Serum crossneutralization of sera from convalescent DENV patients against ZIKV infection unrelated to the 9 linear peptides mentioned was observed. Most of the DENV convalescent sera exhibited ADE, potentiating a ZIKV infection and, when depleting those with affinity for the 9 linear peptides selected, they reduced their activity, suggesting that antibodies against such peptides may be involved in ADE for ZIKV. In **Part III**, we have an evaluation of the immune response to the inactivated SARS-CoV-2 vaccine, where we conclude that: Individuals vaccinated twice with the inactivated SARS-CoV-2 seroconvert, producing high levels of IgG anti-Spike (S) viral protein with significant neutralizing capacity, which is significantly reduced against SARS-CoV-2 and the Gamma and Zeta variants after 6 months. Antibodies from animals vaccinated by the inactivated virus vaccine were less neutralizing against the Gamma and Zeta variants of SARS-CoV-2, but with a significant increase 3 days after infection. The stimulation of mouse splenic cells from immunized mice with SARS-CoV-2 inactivated antigens induced lymphoproliferation even to the antigens of the different viral variants. Prior immunization with inactivated SARS-CoV-2 reduced the burden of Gamma and Zeta variants in mouse lungs by almost 100 times. Undetectable levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  in mice immunized after infection with WT strains and the Zeta variant were associated with a reduction in the pulmonary inflammatory infiltrate, evidencing a protective role of previous immunization by inactivated SARS-CoV-2.

**Keywords**: Crossed immune response; viral infections; inactivated virus vaccine; immunodominant epitopes; Mayaro Virus; Chikungunya virus; Zika virus; Dengue virus; SARS-CoV-2

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de infecção de patas traseiras por alphavirus artritogênicos
Figura 2. Desenho experimental da infecção por CHIKV seguida por inóculo da pata com MAYV
<b>Figura 3.</b> A infecção prévia por CHIKV durante a infecção secundária por MAYV reduz o inchaço da pata traseira e a carga viral
Figura 4. Histopatologia e imunohistoquímica de camundongos durante o pico da doença de MAYV
<b>Figura 5.</b> Níveis de anticorpos e títulos de neutralização em soro de camundongos infectados por CHIKV e proteção cruzada <i>in vivo</i> após transferência passiva de soro anti-CHIKV
Figura 6. Níveis de anticorpos e títulos de neutralização de MAYV após infecção secundária
Figura 7. Neutralização homóloga e heteróloga de CHIKV e MAYV por soros humanos convalescentes
<b>Figura 8.</b> Avaliação das subpopulações de linfócitos B CD19 <sup>+</sup> e T CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> na proteção cruzada contra MAYV
<b>Figura 9.</b> A infecção prévia por CHIKV reduziu os níveis de citocinas inflamatórias na pata traseira e no soro de camundongos infectados por MAYV41
<b>Figura 10.</b> O infiltrado tecidual de células NK e monócitos inflamatórios é reduzido durante a infecção por MAYV em camundongos previamente infectados com CHIKV42
Figura 11. Mapeamento de epítopos lineares de células B nas proteínas de envelope de ZIKV    e DENV 1-4
<b>Figura 12.</b> Sequências de aminoácidos dos peptídeos de ZIKV selecionados e sua frequência de detecção por amostras anti-DENV
Figura 13. Identificação e validação dos peptídeos lineares selecionados60
Figura 14. Atividades neutralizantes e depleção funcional de anticorpos anti-DENV61
Figura 15. Ensaio <i>in vitro</i> de aumento da infecciosidade dependente de anticorpos (ADE) de ZIKV foram conduzidos com soros DENV

Figura 16. Momentos de coleta de amostra de sangue e produção de anticorpos em indivíduos
vacinados com CoronaVac74
Figura 17. Atividade neutralizante de soros de indivíduos vacinados com CoranaVac75
Figura 18. Imunização de camundongos, produção de anticorpos e resposta imune celular76
Figura 19. Cargas virais e produção de citocinas em pulmões de camundongos imunizados e
não imunizados após infecção com WT SARS-CoV-2, e com as variantes Gamma ou Zeta78
Figura 20. Histopatologia e análise de subpopulações de linfócitos T de pulmões de
camundongos
Figura 21. Títulos de anticorpos e atividade de neutralização em camundongos imunizados
com WT SARS-CoV-2 e infectados com diferentes linhagens

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3. Amostras séricas de ZIKV utilizadas neste estudo	53
Tabela 2. Amostras séricas de DENV e controles negativos utilizadas neste estudo	52
amostras convalescentes de CHIKV e MAYV	37
<b>Tabela 1</b> . Análise da detecção de IgM e IgG e títulos de PRNT <sub>50</sub> contra CHIKV e MAYV	de

#### Lista de Abreviaturas e Siglas

- µL: Microlitro
- µm: Micrómetro
- aa amino acido
- ADE: Aumento dependente de anticorpo
- AUC: Área abaixo da Curva
- BSA: Albumina séria bovina
- CHIKV: Vírus Chikungunya
- DENV: Vírus Dengue
- DMEM: Meio de cultura Eagle modificado
- DNA: Ácido Desoxirribonucleico
- dpi: Dias após infecção
- ELISA: Ensaio de imunoabsorção enzimática
- FBS: Soro fetal bovino
- g: Grama
- H: hora
- HRP: Peroxidase horseradish
- Hz Hertz
- IFN: Interferon
- IgG: Imunoglobulina G
- IgM: Imunoglobulina M
- IL: Interleucina
- m: Massa
- MAYV: Vírus Mayaro

mg: Miligrama

min: Minuto

ml: Mililitro

mm: milímetro

NK: Natural Killer

ηm: Nanômetros

Pb: pares de base

PBS: Salina tamponada com fosfato

PFU: Unidades formadoras de plaques

qRT-PCR: Transcrição reversa seguida da reação de polimerização em cadeia em tempo real quantitativa

RBD: Domínio de ligação ao receptor

RNA: Ácido Ribonucleico

TMB: 3,3',5,5'- Tetrametilbenzidina

TNF: Fator de Necrose Tumoral

v: Volume

xg – Força G

ZIKV: Vírus Zika

# SUMÁRIO

PA SLO Y	KTE 1: PROTEÇAO IMUNOLOGICA CRUZADA ENTRE INFECÇOES VÍRUS CHIKUNGUNYA E o vírus MAYARO	
1.1	INTRODUÇÃO	
1.2 0	BJETIVOS	•••
1.2	.1 Objetivo geral	•••
1.2	.2 Objetivos Específicos	•••
1.3 M	IATERIAIS E MÉTODOS	
1.3	.1 Declarações Éticas	
1.3	.2 Vírus utilizados	•••
1.3	.3 Camundongos	•••
1.3	.4 Amostras humanas IgG-positivas para CHIKV e MAYV	•••
1.3	.5 Infecção de camundongos, avaliação de sinais clínicos e coleta de sangue	
1.3	.6 ELISAs para CHIKV e MAYV	•••
1.3	.7 Ensaio de soro-neutralização por redução de <i>plaques</i> virais (PRNT)	•••
1.3	.8 Processamento e quantificação da carga viral por ensaio de Plaque	•••
1.3	.9 Quantificação de genoma viral por qRT-PCR	•••
1.3	.10 Processamento e análise de Histologia	•••
1.3	.11 Imuno-histoquímica	•••
1.3	.12 Transferência passiva de soro anti-CHIKV	•••
1.3	.13 Depleção das subpopulações de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> , T CD8 <sup>+</sup> e B CD19 <sup>+</sup>	•••
1.3	.14 Quantificação de citocinas	•••
1.3	.15 Imunofenotipagem do tecido das patas	
1.3	.16 Análises estatísticas	•••
1.4 R	ESULTADOS	•••
1.4 infe	.1 A infecção prévia por CHIKV reduz o inchaço da pata e carga viral durante a ecção secundária por MAYV	•••
1.4 MA	.2 Sinais de patologia tecidual são reduzidos durante a infecção secundária por AYV	•••
1.4 con	.3 Anticorpos anti-CHIKV demonstram reduzida proteção cruzada <i>in vitro</i> e <i>in vi</i> atra MAYV	vc
1.4	.4 Soro humano de convalescentes infectados por CHIKV ou MAYV desenvolve	m

1.4.5 As subpopulações de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> , T CD8 <sup>+</sup> , e B CD19 <sup>+</sup> não alteram cruzada contra MAYV	a proteção 38
1.4.6 A infecção prévia por CHIKV reduz a expressão de mediadores inflamate durante a infecção secundária por MAYV	órios 40
1.4.7 A infecção prévia por CHIKV reduz recrutamento de células NK e de mo inflamatórios na infecção por MAYV	nócitos 41
1.5 DISCUSSÃO	43
1.6 CONCLUSÕES	47
2. PARTE II: MAPEAMENTO DE EPÍTOPOS LINEARES DE DENV e ZI SUAS APLICAÇÕES	KV e 48
2.1 INTRODUÇÃO	48
2.2 OBJETIVOS	51
2.2.1 Objetivos Geral	51
2.2.2 Objetivos Específicos	51
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS	51
2.3.1 Soros de pacientes infectados por DENV e ZIKV	51
2.3.2 Mapeamento de epítopos lineares	53
2.3.3 Validação dos peptídeos por ELISA	55
2.3.4 Linhagens celulares e estoque de vírus	55
2.3.5 Teste de neutralização por redução de plaques virais (PRNT) de ZIKV	55
2.3.6 Aumento da infecção mediada por anticorpos (ADE) para ZIKV	56
2.3.7 Depleção peptídeo-específica de anticorpos séricos	56
2.3.8 Análise e visualização de dados	57
2.4 RESULTADOS	57
2.4.1 Identificação de 9 peptídeos de ZIKV que reagem de forma cruzada com anti-DENV	anticorpos 57
2.4.2 Anticorpos peptídeo-específicos não alteram o perfil de neutralização de	ZIKV60
2.4.3 Anticorpos peptídeo-específicos alteram o perfil de ADE para ZIKV	61
2.5 DISCUSSÃO	62
2.6 CONCLUSÕES	65
3. PARTE III: AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE APÓS VACINAÇÃO	) COM
SARS-COV-2 INATIVADO	66
3.1 INTRODUÇAO	66
3.2 OBJETIVOS	68
3.2.1 Objetivo Geral	68

	3.2.2 Objetivos Específicos	.68
3	3.3 MATERIAIS E MÉTODOS	68
	3.3.1 Declarações éticas	68
	3.3.2 Amostras humanas	69
	3.3.3 Linhagens de células e Vírus	69
	3.3.4 Preparo de SARS-CoV-2 inativado	.70
	3.3.5 Imunização de camundongos, desafio viral e coleta de amostras	.70
	3.3.6 Quantificação viral por ensaio de <i>Plaques</i> virais	.71
	3.3.7 Quantificação do genoma de SARS-CoV-2 por qRT-PCR	.71
	3.3.8 Ensaio de neutralização por redução de <i>plaques</i> virais	72
	3.3.9 Quantificação de anticorpos por ELISA	72
	3.3.10 Quantificação de citocinas do pulmão de camundongos	72
	3.3.11 Ensaio de linfoproliferação	.73
	3.3.12 Análises estatísticas	.73
3	3.4 RESULTADOS	.73
	3.4.1 Indivíduos vacinados com CoronaVac produzem anticorpos reativos contra SAR CoV-2 incluindo as variantes Gamma e Zeta	. <b>S-</b> 73
	3.4.2 Imunização de camundongos com SARS-CoV-2 inativado induz resposta imune contra as variantes Gamma e Zeta	75
	3.4.3 Imunização com SARS-CoV-2 inativado reduz a carga viral e citocinas pró- inflamatórias no pulmão de animais infectados com as variantes Gamma e Zeta	77
	3.4.4 A imunização com SARS-CoV-2 inativado reduz o dano pulmonar após a infecç com as variantes Gamma e Zeta	ão 78
	3.4.5 Produção de anticorpos e neutralização viral em animais infectado com as variar Gamma e Zeta de SARS-CoV-2	ites 80
3	3.5 DISCUSSÃO	82
3	3.6 CONCLUSÕES	.84
4.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	.85
5.	ANEXOS	.95
	5.1 Anexo A: Lista de Publicações relacionadas à Tese	.95
	5.2 Anexo B: Repercussão do trabalho na Mídia	.95

#### PRÓLOGO

A relação entre os seres humanos e os agentes virais se intensificou significativamente durante o período neolítico, aproximadamente a 12.000 anos atrás, quando as comunidades de caçadores-coletores passaram a se organizar em comunidades agrícolas sedentárias, crescendo cada vez mais a sua densidade populacional [1]. Esta nova sociedade modificou pela primeira vez de maneira drástica o seu ambiente natural, promovendo o plantio de diversas monoculturas, a domesticação de animais e o estabelecimento das primeira cidades. Tais características, permitiram o rápido aumento no compartilhamento e propagação de alguns microrganismos (patogênicos ou não) entre humanos, animais e plantas, dos quais, alguns mais tarde seriam conhecidos como os 'vírus'. Dentre os importantes agentes virais causadores de doenças durante a história das civilizações humanas, podemos destacar o vírus da varíola e do sarampo, que apareceram pela primeira vez há centenas de anos atrás, provavelmente transmitidos de outros animais, como roedores e bovinos, sendo responsáveis por causar drásticas consequências para saúda humana e profundos impactos econômicos [2, 3]. Durante as últimas décadas, devido ao grande crescimento populacional e a rápida industrialização mundial, a humanidade provocou grandes mudanças ambientais e climáticas, tais como urbanizações descontroladas, grandes desmatamentos, plantio de monoculturas, construção de estradas e de hidroelétricas, promovendo o desequilíbrio natural e aumentando cada vez mais o contato com novos microrganismos [4]. Associados a tais fatores, também a humanidade tem feito uma rápida expansão das relações comerciais e da movimentação humana, fatores fortemente associados à disseminação de vírus.

Dentre os grandes causadores de doenças humanas, podemos destacar os vírus transmitidos por artrópodes hematófagos, conhecidos como *arbovírus* (*arthropod-borne vírus*) e também vírus transmitidos através de partículas suspensas no ar (*airborne vírus*). Vários *arbovirus* e *airbornevírus*, representam graves problemas para a saúde pública, principalmente em países subdesenvolvidos de regiões tropicais, tais como o Brasil. Dentre os arbovirus brasileiros, podemos destacar como mais importantes os vírus da dengue, Chikungunya, Zika, Oropouche e o da febre amarela, todos responsáveis por importantes doenças humanas, com relevante impacto social e econômico [5, 6]. Por outro lado, dentre os principais vírus transmitidos por aerossóis no Brasil, podemos destacar os vírus da influenza, do sarampo, e mais recentemente o coronavirus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2) [7-9].

Durante infecções por microrganismos, cada indivíduo pode apresentar características distintas de resposta imunológica devido a diferenças genéticas ou fisiológicas do hospedeiro.

Entretanto, um importante fator capaz de 'moldar' ou alterar o curso da patogênese viral é a imunidade prévia induzida pela exposição a outros agentes infecciosos, que pode alterar de maneira crítica o curso de uma infecção secundária. Este fenômeno é conhecido como imunidade heteróloga, e pode ser induzido naturalmente por infecções naturais ou pela vacinação, podendo resultar em uma resposta imune protetora ou patogênica [10]. No caso de infecções heterólogas por diferentes espécies de microrganismos, espécies virais evolutivamente próximas ou distantes, de diferentes ordens ou reinos, são capazes de promover a imunidade heteróloga, com propriedades protetoras durante infecções subsequentes [11-13]. Por outro lado, também, sabemos que a imunidade prévia pode mediar o aumento da patogênese viral durante a infecção heteróloga secundária, como por exemplo, o clássico aumento da infecciosidade viral dependente de anticorpos (ADE), que pode levar à síndrome de choque do dengue durante a infecção secundária por um sorotipo diferente do causador da infecção primária [14].

No caso das vacinas, múltiplos estudos demonstram que a imunização com vacinas como a da varíola, poliomielite e a do sarampo, são capazes de induzir proteção imunológica heteróloga contra outros patógenos, incluindo até mesmo agentes não-virais [15-17]. Potenciais mecanismos da imunidade heteróloga podem incluir o compartilhamento de epítopos similares entre distintos patógenos, o desenvolvimento de imunidade inata treinada, modulação do perfil da resposta imune, desenvolvimento de linfócitos T e B de memória e também o reconhecimento cruzado por anticorpos [18]. Grande quantidade de estudos e registros suportado por experimentos laboratoriais e dados epidemiológicos, descrevem mecanismos imunológicos e consequências da imunidade heteróloga após infecções naturais ou vacinações, entretanto, muito ainda precisa ser desvendado, principalmente considerando a frequente emergência de novos patógenos e a complexidade de suas interações com os hospedeiros.

Desta forma, esta Tese inclui 3 trabalhos que analisaram aspectos de distintos mecanismos envolvidos na resposta imune heteróloga contra importantes agentes virais que assolam a saúde humana. **Na Parte I**, em modelo de infecção murina e *in vitro*, verificamos se a infecção prévia pelo vírus Chikungunya é capaz de induzir uma resposta imune protetora durante a infecção secundária pelo vírus Mayaro, um vírus silvestre americano ainda pouco conhecido, causador de surtos esporádicos em diversas regiões da Amazônia. **Na Parte II**, mapeamos epítopos lineares da proteína de envelope do vírus Zika, que foram reconhecidos de maneira cruzada por anticorpos anti-dengue e analisamos a contribuição destes anticorpos no aumento da infecciosidade por Zika *in vitro*. **Na Parte III**, estudamos indivíduos vacinados e

imunizamos camundongos, avaliando a eficácia e a duração da resposta imune induzida por vacina de SARS-CoV-2 inativado contra suas variantes Gamma e Zeta.

# 1. PARTE I: PROTEÇÃO IMUNOLÓGICA CRUZADA ENTRE INFECÇÕES PELO VÍRUS CHIKUNGUNYA E O VÍRUS MAYARO

#### 1.1 INTRODUÇÃO

Na família *Togaviridae*, os *Alphavírus* são um gênero que possui 32 vírus envelopados, não segmentados, com RNA de fita simples e polaridade positiva [19]. Tais vírus são transmitidos aos seres humanos e outros animais vertebrados por artrópodes hematófagos, como mosquitos do gênero *Aedes*. Os alphavírus causadores de doença humana são divididos em dois grupos; os artritogênicos, como os vírus Chikungunya (CHIKV) e Mayaro (MAYV), causadores de doença febril aguda e dores articulares, que pode progredir para doença crônica [20]. E os alphavírus encefalíticos, que são restritos ao continente americano e incluem os vírus da Encefalite Equina do Leste (EEEV), da Encefalite Equina Venezuelana (VEEV) e da Encefalite Equina do Oeste (WEEV), também relacionados ao desenvolvimento de doença febril aguda porém com acometimento do sistema nervoso central (SNC), particularmente em seres humanos e em equinos [21].

O CHIKV foi identificado pela primeira em 1952 na Tanzânia, e até a década de 1960 causou diversos surtos na África e Ásia [22]. Mais recentemente, surtos de CHIKV causam milhões de casos principalmente em regiões tropicas e subtropicais do mundo [23-28]. Em agosto de 2014, os primeiros casos de transmissão autóctone de CHIKV no Brasil foram descritos, indicando a co-circulação do genótipo Asiático, introduzido no estado do Amapá, e do genótipo ECSA (*East/Central/South/Africa*), introduzido no estado da Bahia [26]. Até o ano de 2017, mais de 2,5 milhões de casos de CHIKV foram notificados apenas na região das Américas [29]. A transmissão de CHIKV ocorre em ciclo urbano, envolvendo mosquitos *Aedes aegypti* ou *Aedes albopictus* e hospedeiros humanos [30]. A infecção por CHIKV causa doença febril aguda, mialgia, exantema e artralgia, que podem durar por até três semanas após a infecção [31, 32]. Em alguns casos, a artralgia pode persistir por meses, indicando uma cronificação com poliartralgia, poliartrite, exacerbação de comorbidades e fadiga crônica [31, 32].

O MAYV, é um alphavírus americano causador de doença febril com acometimento articular, sendo que parte dos pacientes evoluem para dor e inflamação articular crônica, com impacto socioeconômico [33, 34]. O MAYV foi isolado pela primeira vez em Trinidade e Tobago em 1954, a partir de amostras sanguíneas de trabalhadores rurais com doença febril [35]. Atualmente, o MAYV é endêmico na região amazônica. Seu ciclo silvático envolve mosquitos do gênero *Haemagogous* que transmitem o vírus para hospedeiros vertebrados, tais como pequenos mamíferos, aves e primatas não humanos [36]. Entretanto, MAYV tem mostrado um grande potencial de dispersão para outros países e para outras regiões brasileiras, o que poderia estar associado à variedade de vetores capazes de transmiti-lo, incluindo mosquitos do gênero *Aedes* e *Anopheles* [37, 38]. Observou-se recentemente casos autóctones de MAYV nas regiões centro-oeste do Brasil, Caribe e Haiti, onde a circulação de CHIKV, também, é endêmica [39-41].

Infecções por CHIKV e MAYV costumam desencadear forte resposta imune inflamatória, com formação de potentes anticorpos neutralizantes e secreção de mediadores imunológicos pró-inflamatórios [42, 43]. Sabe-se, que a ativação de células B e T é necessária para a eliminação viral e proteção contra infecções secundárias por CHIKV [44]. Além disso, a resposta imune inata, bem como a indução de Interferon do tipo I (IFN), é essencial para o controle da fase aguda da doença desencadeada após infecção por alphavirus [43]. No entanto, o perfil de mediadores imunes induzidos pelas infecção por CHIKV e MAYV apresenta diferenças, incluindo níveis mais baixos de IL-10, IL-5 e GM-CSF durante a infecção por MAYV [42]. Também, pouco se sabe sobre como este e outros fatores imunológicos são afetados pela imunidade prévia ao CHIKV durante uma infecção heteróloga secundária com o MAYV.

CHIKV e MAYV são classificados como membros do complexo antigênico *Semliki forest* dos *Alphavirus* e portanto, costuma ocorrer reatividade imunológica cruzada entre membros do complexo [45]. Nesse sentido, um candidato vacinal de CHIKV atenuado, foi testado em camundongos, e produziu ampla imunidade protetora mediada por anticorpos contra outro alphavirus, o vírus o'nyong-nyong (ONNV) [46]. Similarmente, outro candidato vacinal para CHIKV e MAYV utilizando vetores adenovirais contendo suas proteínas estruturais, conferiu proteção cruzada parcial contra infecções heterólogas por MAYV e CHIKV, respectivamente [47]. Também, observou-se que anticorpos de convalescentes infectados por CHIKV demonstram baixa neutralização cruzada para MAYV *in vitro* [48]. Também observouse que anticorpos monoclonais murinos e humanos contra CHIKV amplamente neutralizantes são capazes de mediar proteção cruzada contra a infecção por MAYV e ONNV *in vivo* [49]. Além disso, observou-se que a infecção prévia por CHIKV e MAYV é capaz de conferir proteção contra infecção por ONNV em macacos *Rhesus* [50]. Esses estudos sugerem a existência de epítopos conservados que promovem proteção cruzada entre os alphavirus. Em contraste, outro estudo mostrou que anticorpos subneutralizantes anti-CHIKV aumentam a adesão viral e a replicação em culturas de células, bem como a carga viral, a inflamação das articulações e a gravidade da doença em camundongos [51]. Em suma, ainda não está claro como a imunidade prévia ao CHIKV poderia afetar uma infecção secundária por MAYV.

Portanto, compreender como infecções naturais pregressas podem afetar a resposta imunológica durante infecções secundárias, é importante no entendimento da dinâmica de transmissão e da patogênese viral. Nesta parte da Tese, para investigar o desenvolvimento da proteção imunológica cruzada induzida por CHIKV durante a infecção secundária por MAYV, desenvolvemos um modelo experimental de infecção em camundongos. Este modelo permitiu inferir quanto aos níveis de proteção cruzada com base em sinais clínicos, histopatológicos, presença de antígenos virais teciduais, carga viral, expressão de mediadores inflamatórios e recrutamento de células imunes. Além disso, também, avaliamos mecanismos de proteção cruzada mediados por células e anticorpos.

#### **1.2 OBJETIVOS**

#### 1.2.1 Objetivo geral

Avaliar possíveis mecanismos de proteção imunológica cruzada em infecções pelos vírus Chikungunya e Mayaro

#### 1.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar eventuais reduções de sinais clínicos, cargas virais, histopatologia, antígenos virais, expressão de mediadores inflamatórios e recrutamento de células imunológicas em animais infectados por MAYV e previamente infectados por CHIKV;
- Avaliar a produção de anticorpos e suas capacidades neutralizantes contra CHIKV e MAYV no soro de animais infectados por CHIKV;
- Avaliar a soro-neutralização contra MAYV em camundongos previamente infectados por CHIKV após a infecção secundária por MAYV;
- Avaliar soro-neutralização homóloga e heteróloga em pacientes infectados por CHIKV e MAYV.

## **1.3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### 1.3.1 Declarações Éticas

Os experimentos envolvendo amostras humanas foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (protocolo nº 2017 / 2.206.200), que obedeceu às diretrizes da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Todos os procedimentos envolvendo os animais seguiram os princípios éticos da pesquisa animal e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, de acordo com o protocolo nº 182/2020.

#### 1.3.2 Vírus utilizados

As cepas de vírus utilizadas neste estudo foram a S27 African do CHIKV e TRVL 4675 do MAYV. Para os experimentos envolvendo camundongos, os estoques virais foram produzidos em cérebro de camundongos recém nascidos, homogeneizados em tampão fosfatosalino (PBS), clarificados por centrifugação a 300 xg para remoção de debris, filtrados através de filtro com 0,22  $\mu$ M, aliquotados e mantidos a -80°C. Como controle não infectado (*Mock*), utilizamos PBS. Para os ensaios *in vitro*, os estoques virais foram produzidos em células Vero (ATCC CCL-81), cultivadas em meio *Dulbecoo 's Eagle* modificado (DMEM) e suplementado com 2% (v/v) de soro fetal bovino (*FBS*) inativado por calor. O sobrenadante coletado após 2-3 dias da infecção (dpi) teve debrís celulares removidos por centrifugação a 300xg, filtração a 0,22  $\mu$ M e as alíquotas foram mantidas a -80°C. Os estoques virais foram titulados por ensaio de formação de placas (*PFU*) em células Vero [52].

#### 1.3.3 Camundongos

Foram utilizados neste estudo camundongos fêmeas de 6 à 8 semanas de vida da linhagem C57BL/6 (JAX 000664). Os animais foram criados em condições livres de patógenos, no biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

#### 1.3.4 Amostras humanas IgG-positivas para CHIKV e MAYV

Amostras de pacientes convalescentes IgG-positivas para CHIKV foram obtidas na cidade de Ribeirão Preto - SP, durante surtos locais do vírus e armazenadas em banco de amostras. Também, amostras de soro IgG-positivas para MAYV foram coletadas em 2015 de pacientes da cidade de Sinop - MT, na região amazônica. Amostras séricas de indivíduos saudáveis e sem histórico de infecção por Chikungunya ou Mayaro foram usadas como controles negativos.

1.3.5 Infecção de camundongos, avaliação de sinais clínicos e coleta de sangue

Para imunização, camundongos C57BL/6 fêmeas foram inoculados intraperitonealmente (i.p.) com  $10^6$  PFUs de CHIKV em um volume final de 100 µL. Para avaliar a produção de anticorpos e atividade de soro-neutralização, o sangue dos camundongos

imunizados com CHIKV foi coletado pela veia facial nos dias 7, 14, 21 e 28 após a infecção. Vinte e oito dias após a primeira infecção, os animais foram reinfectados com  $10^5$  PFUs de CHIKV ou MAYV por inoculação subcutânea da pata traseira, em um volume final de 20 µL. Camundongos controles não infectados foram inoculados com meio de cultivo celular diluído em PBS. O inchaço da pata traseira foi avaliado usando um paquímetro digital. O inchaço foi quantificado, medindo-se largura e espessura da região perimetatarsal durante 14 dpi. As patas traseiras e o sangue foram coletados nos dias 1, 3, 5, 7 e 9 após a infecção secundária para quantificação viral, análises histopatológicas e quantificação de citocinas.

#### 1.3.6 ELISAs para CHIKV e MAYV

O sangue de camundongos infectados, nos tempos indicados, foi coletado, centrifugado a 5000xg e o soro separado para as análises. As amostras de soro de camundongos e indivíduos convalescentes da infecção por CHIKV ou MAYV foram submetidas a detecção de anticorpos IgG e IgM por ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent assay*) indireto, utilizando proteínas recombinantes do Envelope 2 (E2) de CHIKV e MAYV, como previamente padronizado [53, 54].

#### 1.3.7 Ensaio de soro-neutralização por redução de plaques virais (PRNT)

A atividade neutralizante para CHIKV ou MAYV do soro de seres humanos ou de camundongos, foi avaliada por ensaios de neutralização de redução de placa com corte de 50% (PRNT<sub>50</sub>) como descrito previamente [54]. Brevemente,  $5x10^4$  células Vero foram semeadas em placa de 48 poços, em DMEM contendo 10% de FBS e cultivadas durante uma noite a 37°C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, as amostras séricas foram inativadas por calor a 56°C durante 1h e diluídas de forma seriada de 1:10 à 1:20480 (para avaliar a neutralização homóloga) ou 1:10 a 1: 320 (para avaliar a neutralização heteróloga) em DMEM e misturadas com  $10^2$  *PFUs* de CHIKV ou MAYV. Como controle positivo, utilizamos apenas meio de cultura. A mistura vírus-soro foi incubada durante 1h a 37°C para permitir a formação do complexo anticorpo-vírus. Em seguida, o sobrenadante da cultura de células foi removido e as misturas de vírus-anticorpo foram inoculadas em duplicata de poços. Para permitir a adsorção viral, as placas foram incubadas durante 1h sob leve agitação em temperatura ambiente. O inóculo viral residual foi removido e o meio *overlay* pré-aquecido foi adicionado a cada poço.

Para permitir a formação dos *plaques* virais, as placas foram incubadas durante 2 dias a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>. Para visualização dos *plaques* virais, as células foram fixadas por 2h com solução de formaldeído a 4% (v/v) e coradas com solução de preto de naftaleno (Sigma, EUA) por 1h. A atividade de neutralização foi determinada pela redução na formação dos *plaques* virais comparando-se a mistura soro-vírus ao controle positivo.

#### 1.3.8 Processamento e quantificação da carga viral por ensaio de Plaque

Os camundongos foram sacrificados e perfundidos por via intracardíaca com PBS após a infecção viral. Suas patas traseiras foram removidas, pesadas e homogeneizadas em PBS estéril (1: 5 m/v) utilizando o equipamento TissueLyser II (Qiagen, EUA) com esfera de aço inoxidável de 5 mm (Qiagen, EUA). As amostras foram processadas para a ruptura do tecido, por 10 min, a 30 Hz, foram centrifugadas por 5 min a 10.000xg e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80 ° C. Para a quantificação da carga viral, o homogeneizado de tecido foi diluído serialmente e inoculado em uma monocamada de células Vero em placas de 24 poços, conforme descrito anteriormente [52]. Brevemente, um dia antes da infecção, 5x10<sup>4</sup> células Vero foram semeadas em placas de 48 poços e cultivadas durante a noite em DMEM contendo 10% de FBS. No dia seguinte, as amostras foram serialmente diluídas em DMEM, de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-</sup> <sup>6</sup>. O sobrenadante das culturas de células foi removido e as diluições virais foram inoculadas em duplicata. As placas foram incubadas por 1h à temperatura ambiente, sob leve agitação, para permitir a adsorção viral. Em seguida, 500µl de meio overlay pré-aquecido (DMEM contendo 2% [m/v] de carboximetilcelulose e 2% FBS) foi adicionado a cada poço e as placas foram incubadas por 2 dias a 37°C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> para permitir a formação dos plaques. Em seguida, as monocamadas celulares foram fixadas por 2h com solução de formaldeído a 4% e coradas com preto de naftaleno (Sigma, EUA), por 1h, para permitir a visualização dos plaques.

#### 1.3.9 Quantificação de genoma viral por qRT-PCR

Para quantificação do RNA viral, as mesmas amostras de homogeneizado do tecido foram processadas usando o QIAmp® viral RNA Mini Kit (Qiagen, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. A reação de transcrição reversa seguida da reação de polimerização em cadeia em tempo real (qRT-PCR) foi realizada usando-se o kit *TaqMan*®

Fast Virus 1-Step Master Mix (Applied Biosystems, EUA), segundo as recomendações do fabricante. Os primers e a sonda foram desenhados visando a amplificação de um fragmento genético com 120 pares de bases (pb) da região do gene NSP4 de MAYV (Forward: '5-TACCATGTCAGATATGCTAAGCCTCGG-3'; '5reverse: TCTGTGCCGGTGATGCAAAGACTTAGCAGCGC-3', е Sonda: '5-FAM-CGCCACTGTAGGGTAGTTGCG- BHQ1-3 '). Os primers e a sonda de CHIKV foram desenhadas para amplificar um fragmento de 124 pb na região do gene NSP3 (Forward: '5-CGACGGATGCAGACGTGGTC-3'; reverse: '5-ACATCGCAGTCTATGGAGATGTGC-3', e Sonda: '5-HEX-TGCGGACCCAAGTGGAGCTGCTGGA- BHQ1-3 '). As reações foram realizadas em equipamento StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems, EUA). As curvas padrão foram geradas usando RNAs extraídos de estoques virais com carga conhecida. Cada amostra foi analisada em duplicata e os resultados foram normalizados segundo a quantidade relativa de vírus por grama de tecido.

#### 1.3.10 Processamento e análise de Histologia

Após 7 dias do inóculo viral com MAYV, os camundongos foram sacrificados, perfundidos por via intracardíaca com solução de formalina a 4% e suas patas traseiras foram coletadas e submergidas por 2 dias em solução de formalina a 4%. Em seguida, para descalcificação, as patas traseiras foram incubadas em solução de EDTA a 10% (m/v) durante 3 semanas sob leve agitação, a 4°C. Em seguida, os membros foram cortados longitudinalmente, e a região do metatarso separada do tornozelo. As amostras de tecido foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol, depuradas em xileno, incluídas em parafina e seccionadas em espessura de 5  $\mu$ m. Secções do metatarso e do tornozelo foram coradas com hematoxilina e eosina de Harris (H&E) para análise histopatológica. As secções do tornozelo foram coradas com seguintes foram analisados de forma cega por dois patologistas, de acordo com os seguintes parâmetros de pontuação: (1) infiltração de células polimorfonucleares; (2) infiltração de células monomorfonucleares; (3) edema subcutâneo; e (4) eventos de diapedese. Cada parâmetro foi escalado como nenhum (0), leve (1), moderado (2) ou grave (3) [56]. As imagens foram obtidas em microscópio Nikon Eclipse E800 (Nikon Corporation, Japão).

#### 1.3.11 Imuno-histoquímica

Os cortes dos tecidos das patas descalcificados, fixados em formalina e embebidos em parafina foram submetidos à recuperação antigênica por tratamento com Tripsina-EDTA 0,25% (Sigma-Aldrich, EUA), por 15 min, a 37°C. As seções foram bloqueadas com tampão de bloqueio SuperBlock (Thermo Fisher Scientific, EUA) e em seguida incubadas por 1h com anticorpo policional anti-MAYV produzido em camundongo e diluído a 1:200. Utilizou-se como anticorpo secundário IgG anti-mice biotinilada (Vector Laboratories, EUA) diluída a 1:200, incubando-se por 1h e o sinal foi amplificado utilizando estreptavidina conjugada a peroxidase (Vector Laboratories, EUA), diluída a 1:200 e incubando-se por 1h. A reação foi revelada com o substrato cromogênico AEC (Sigma-Aldrich, EUA). Uma contra-coloração com hematoxilina de Harris também foi realizada para melhorar a visualização e a análise. As secções coradas foram digitalizadas em microscópio de campo claro ScanScope VS120 (Olympus Life Sciences, Japão), em ampliação de 400X. As lâminas digitalizadas virtualmente (quatro animais por grupo) foram seccionadas em 12 campos para análise. A coloração dos antígenos de MAYV (coloração vermelha) foi aprimorada com o software Adobe Photoshop, usando ferramentas de ajuste em preto e branco. Para a quantificação da área total do tecido e da área marcada (µm<sup>2</sup>) em cada campo utilizou-se o software ImageJ. Os resultados são apresentados como razão percentual entre a área marcada / área total do tecido (média de 12 campos por animal).

#### 1.3.12 Transferência passiva de soro anti-CHIKV

Camundongos C57BL/6 (n = 6) foram infectados pela via intraperitoneal com.  $10^6$  PFUs de CHIKV. Após 4 semanas da infecção, os soros foram coletados e agrupados em uma única mistura (*pool*). Em seguida, 200 µL do *pool* de soros foi inoculado i.p. em camundongos C57BL/6 virgens (*naïve*) (n = 6) 1 dia antes da infecção com MAYV ou CHIKV.

#### 1.3.13 Depleção das subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> e B CD19<sup>+</sup>

Para depletar seletivamente subpoluçãoes de células T e B, os camundongos foram injetados i.p. com 500 µg de anticorpos anti-CD4 (GK1.5) (Bioxcell, EUA), ou anti-CD8 (2,43) (Bioxcell, EUA), ou anti-CD19 (1D3) (Bioxcell, EUA), 1 dia antes da infecção viral. Os animais controle foram injetados com 500 µg de anticorpo controle do isotipo IgG (Bioxcell,

EUA). Os anticorpos foram diluídos em PBS em volume de 200  $\mu$ L. Para avaliar a eficácia da depleção, sangue total dos animais foi coletado 1 e 7 dias após o tratamento. As hemácias foram lisadas e as células remanescentes foram coradas com anti-CD4-PerCP (Biolegend, EUA), anti-CD8-FITC (Biolegend, EUA) e anti-CD19-PE (Biolegend, EUA). A aquisição de células foi feita em citômetro de fluxo BD FACSCanto II (BD biosciences, EUA) e analisada com o software FlowJo (Tree Star, EUA).

#### 1.3.14 Quantificação de citocinas

Os níveis proteicos de citocinas no soro de camundongos e no homogenado da pata traseira foram determinados, nos tempos indicado após a infecção, usando o kit *Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1 / Th2 / Th17 Cytokine* (BD Biosciences, EUA), segundo instruções do fabricante. As amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo BD FACSCanto II (BD Biosciences, EUA) e analisadas com o *FCAP Array TM Software* Versão 3.0 (BD Biosciences, EUA).

#### 1.3.15 Imunofenotipagem do tecido das patas

Grupos de camundongos foram sacrificados 7 dias após a infecção, suas patas traseiras foram removidas e os metatarsos separados do tornozelo. Os espécimes do tornozelo tiveram sua medula óssea lavada com PBS estéril para remoção das células hematopoiéticas. Para dissociação do tecido, as amostras foram picotadas e incubadas com 100 U de colagenase VIII (Invitrogen, EUA) por 2 h a 37°C e passadas por um filtro de células com malha de 70 μm. As células foram contadas e adicionadas a placas de fundo em U de 96 poços, bloqueadas com solução de *Fc Block* (BD Biosciences, EUA) e coradas para citometria de fluxo. Os anticorpos usados foram anti-CD3ε-PerCP (clone 145-2C11) (BioLegend, EUA), anti-CD19-APC (clone 6D5) (BioLegend, EUA), anti-NK1.1-FITC (clone PK136) (BioLegend, EUA), anti-CD45-APC (clone 30-F11) (BD Biosciences), anti-CD11b-FITC (clone M1/70) (BioLegend, EUA), anti-Ly6G-PerCP (clone 1A8) (BioLegend, EUA) e anti-Ly6C-PE (clone HK1.4) (BioLegend, EUA). As amostras foram submetidas a um citômetro de fluxo BD FACSCanto II (BD Biosciences, EUA) e analisadas com o *software* FlowJo (Tree Star, EUA).

Os dados obtidos foram analisados no software *GraphPad Prism* versão 8.0.2 (GraphPad, EUA). Para comparações de vários grupos, foi usada a análise de variância (ANOVA) unilateral ou bidirecional, juntamente com testes de correção múltipla (indicados nas legendas das figuras).

#### **1.4 RESULTADOS**

1.4.1 A infecção prévia por CHIKV reduz o inchaço da pata e carga viral durante a infecção secundária por MAYV

Para avaliar a proteção imunológica cruzada entre CHIKV e MAYV, usamos um modelo de infecção de camundongos C57BL/6 que desenvolvem doença aguda, caracterizada pelo inchaço da pata traseira [49]. A magnitude do inchaço para animais infectados com diferentes concentrações virais (10<sup>3</sup> a 10<sup>5</sup> PFUs) foi semelhante para ambos os vírus, com inchaços mais graves observados 7 dpi (Fig. 1A e B). Os animais foram inoculados pela via intraperitoneal com 10<sup>6</sup> PFUs de CHIKV e receberam uma segunda inoculação, após 28 dias, na pata traseira, com 10<sup>5</sup> PFUs de MAYV. Medições diárias do inchaço foram feitas por 14 dias (Fig. 2). Entre os grupos controle, os infectados com CHIKV e que receberam um inoculo secundário de CHIKV, não desenvolveram sinais aparentes de doença e tiveram cargas virais (quando detectáveis) reduzidas (Fig. 3A-C). Os animais infectados com CHIKV e que foram infectados secundariamente com MAYV, 7 dpi, tiveram a área de inchaço na pata reduzida 1,3 vezes (mm<sup>2</sup>), uma redução de 18 vezes no RNA de MAYV e diminuição de 136 vezes na carga de MAYV na pata (Fig. 3D-F). Nenhuma evidência de doença ou carga viral tecidual foi observada nos grupos-controles. Portanto, nossos dados indicam que a infecção prévia com CHIKV nesse modelo de infecção por MAYV em camundongo, reduz os sinais clínicos de doença e a carga viral.



Figura 1. Modelo de infecção de patas traseiras por alphavirus artritogênicos. (A e B) Camundongos C57BL/6 foram inoculados nas patas traseiras com 20  $\mu$ L de diferentes concentrações virais de CHIKV, MAYV ou Mock. A região metatarsal de suas patas (expessura x largura) foi medida diariamente durante 15 dias após infecção por (A) MAYV e (B) CHIKV (n = 3/grupo). Análise estatística foi realizada por two-way ANOVA com teste post-hoc de *Dunnett*. Os números indicam diferenças significativas (P <0,05) entre camundongos infectados por MAYV ou CHIKV com o grupo infectado por *Mock*. O número "3" representa o grupo de camundongos inoculados com 10<sup>3</sup> PFU de MAYV ou CHIKV; "4" representa 10<sup>4</sup> PFU de MAYV ou CHIKV; e "5", 10<sup>5</sup> PFU de MAYV ou CHIKV. mm<sup>2</sup> = milímetro quadrado, SD = desvio padrão, PFU = unidade formadora de placa.



Figura 2. Desenho experimental da infecção por CHIKV seguida por inóculo da pata com MAYV.



 $\pm$  Mock  $\rightarrow$  CHIKV  $\rightarrow$  CHIKV  $\rightarrow$  CHIKV  $\pm$  Mock  $\rightarrow$  MAYV  $\rightarrow$  CHIKV  $\rightarrow$  MAYV  $\rightarrow$  CHIKV  $\rightarrow$  Mock  $\pm$  Mock  $\rightarrow$  Mock

Figura 3. A infecção prévia por CHIKV durante a infecção secundária por MAYV reduz o inchaço da pata traseira e a carga viral. D - I) Camundongos foram inoculados intraperitonealmente com 100  $\mu$ L de *Mock* ou CHIKV (10<sup>6</sup> PFUs) e após 28 dias foram inoculados via subcutânea na pata traseira com 20  $\mu$ L de *Mock* ou 10<sup>5</sup> PFU de CHIKV ou 10<sup>5</sup> PFU de MAYV. (A e D) O inchaço da região perimetatarsal da pata traseira foi medido ao longo de 14 dias após o inóculo secundário (n = 6/grupo). Os camundongos foram sacrificados nos tempos de 1, 3, 5, 7 e 9 dias após a infecção secundária, e a carga viral de CHIKV ou MAYV foi determinada nas patas por (B e E) qRT-PCR e por (C e F) ensaio de placa (n = 3/grupo). Em A e D, a análise estatística foi realizada por *two-way* ANOVA com teste *post-hoc* de *Tukey*. Os asteriscos indicam diferenças significativas (\*\*\*\*, P <0,0001) entre os grupos (A) Mock-CHIKV e CHIKV-CHIKV ou (D) Mock-MAYV e CHIKV-MAYV. O '#' indica diferenças significativas (##, P <0,001; ####, P <0,0001) entre (A) grupos CHIKV-CHIKV e CHIKV-Mock ou (D) CHIKV-MAYV ou grupos CHIKV-Mock. Em B-E e C-F, a análise estatística foi realizada por *two-way* ANOVA com o teste *post-hoc* de *Dunnett*. Os asteriscos indicam diferenças significativas (\*, P <0,01; \*\*\*\*, P <0,001) entre (B e E) grupo Mock-CHIKV e CHIKV-CHIKV ou (C e F) Mock-MAYV e grupo CHIKV-MAYV. mm<sup>2</sup> = milímetro quadrado, SD = desvio padrão, PFU = unidade formadora de placa, g = grama, LOD = limite de detecção.

#### 1.4.2 Sinais de patologia tecidual são reduzidos durante a infecção secundária por MAYV

A inflamação da pata traseira dos camundongos foi avaliada por histopatologia e imunohistoquímica, ambas realizadas 7 dias após a infecção secundária por MAYV. Os camundongos previamente infectados com CHIKV e infectados com MAYV tiveram reduzidos os escores clínicos de lesão tecidual, com diminuição dos infiltrados de células mononucleares e polimorfonucleares na região dérmica. Uma redução nos eventos de diapedese e edema tecidual também foi observada em comparação com camundongos não infectados previamente com CHIKV (**Fig. 4A-E**). Os tecidos das patas de camundongos infectados com MAYV foram fortemente corados pelos anticorpos policlonais anti-MAYV (média de 9,03%), e a infecção mostrou-se distribuída em tecidos distintos (**Fig. 4F**). Assim, houve diminuição significativa (5,4%) na área marcada para MAYV em camundongos previamente infectados com CHIKV (média de 3,61%) (**Fig. 4F e G**). Animais infectados com CHIKV ou *Mock* com subsequente infecção secundária por *Mock* não demostraram elevados níveis na coloração para MAYV, indicando a especificidade do anticorpo usado no ensaio. Alterações histopatológicas ou aumento da presença viral não foram observados nos grupos-controle infectados apenas com *Mock*. Além disso, a lesão da cartilagem do tornozelo não foi observada em nenhum grupo (dados não mostrados). Nossos dados com os camundongos mostram que a infecção prévia por CHIKV reduz a inflamação causada pela infecção por MAYV com base em análise histopatológica e também na redução da distribuição dos antígenos virais.



**Figura 4. Histopatologia e imunohistoquímica de camundongos durante o pico da doença de MAYV.** Os camundongos foram infectados com *Mock* ou com  $10^6$  PFUs de CHIKV e, após 28 dias, foram infectados em suas patas traseiras com *Mock* ou com  $10^5$  PFUs de MAYV. As análises histopatológicas foram realizadas 7 dias após a infecção por MAYV. As patas inoculadas foram dissecadas, processadas para análise de histológia e coradas com H&E ou submetidos à imunohistoquímica (IHQ) para visualização de antígenos virais. (A) Imagens representativas da pata traseira de regiões externas e internas após a coloração com H&E. (B – E) *Scores* histopatológicos de cada camundongo (n = 4-8 por grupo). (F) Imagens representativas de imunohistoquímica das patas traseiras e (G) quantificação da coloração (anti-MAYV); cada ponto representa uma média de 5-7 campos de visualização de cada animal (n = 4). A análise estatística foi conduzida por *one-way* ANOVA teste de Sidak. Os asteriscos indicam diferenças significativas (\*, P <0,05; \*\*, P <0,01; \*\*\*, P <0,001; \*\*\*\*, P <0,0001). H & E = hematoxilina e eosina, IHC = imunohistoquímica, PMN = células polimorfonucleares, MN = células monomorfonucleares.

1.4.3 Anticorpos anti-CHIKV demonstram reduzida proteção cruzada *in vitro* e *in vivo* contra MAYV

Soros de camundongos infectados por CHIKV foram coletados 7, 14, 21 e 28 dias após a infecção. O aumento da atividade de neutralização contra o CHIKV foi observada nesses diferentes tempos após a infecção (Fig. 5A). O ensaio de neutralização para MAYV, com soros de camundongos infectados com CHIKV, mostrou baixa neutralização cruzada (Fig. 5B). Também, foi observada a mudança do isotipo de anticorpos IgM para IgG ao longo dos 28 dpi (Fig. 5C). A transferência passiva de soros de camundongos convalescentes da infecção por CHIKV em camundongos naïve, que foram subsequentemente inoculados na pata traseira com CHIKV, resultou em proteção do desenvolvimento de inchaço da pata. No entanto, quando os animais foram infectados secundariamente por MAYV, não observou-se redução no inchaço da pata, indicando ausência de proteção cruzada *in vivo* contra MAYV (Fig. 5D). Além disso, ao quantificar a produção de IgG e IgM anti-MAYV após a infecção secundária, não se observou diferença significativa na produção destes anticorpos entre camundongos infectados previamente com CHIKV ou Mock (Fig. 6A e B). Entretanto, observou-se significativo aumento da atividade de neutralização cruzada contra MAYV em animais previamente infectados com CHIKV (Fig. 6C). Estes resultados sugerem que os camundongos apenas infectados com CHIKV não produzem anticorpos neutralizantes, mas após a infecção secundária com MAYV, a resposta imune responde rapidamente elevando-se significativamente os níveis de anticorpos neutralizantes contra MAYV.



Figura 5. Níveis de anticorpos e títulos de neutralização em soro de camundongos infectados por CHIKV e proteção cruzada *in vivo* após transferência passiva de soro anti-CHIKV. Camundongos C57Bl/6 foram infectados intraperitonealmente com 10<sup>6</sup> PFUs de CHIKV. Os soros foram coletados uma vez por semana durante 28 dias. (A e B) soro neutralização *in vitro* homóloga e heteróloga de CHIKV (n = 5 por grupo) ou MAYV (n = 5 por grupo), respectivamente. As curvas de regressão não linear foram geradas com número máximo de interações de 1.000 e intervalo de confiança de 95%. As barras de erro foram delimitadas por cores. A linha pontilhada delimita 50% de neutralização. (C) Quantificação de IgG e IgM por ELISA indireto usando proteína recombinante E2 de CHIKV (n = 4-5 por grupo). (D) Medida do inchaço da pata após transferência passiva de soro convalescentes *Mock* ou CHIKV para camundongos Naïve com subsequente infecção da pata traseira com MAYV ou CHIKV (n = 5 por grupo). A análise estatística foi realizada por *two-way* ANOVA teste de Tukey. Em D, diferenças significativas (P <0,0001) do grupo 'soros de CHIKV  $\rightarrow$  infecção *Mock*' para outros grupos são indicadas por '@@@@' (soros *Mock*  $\rightarrow$  grupo de infecção por CHIKV), '\*\*\*\*' (soros de CHIKV  $\rightarrow$  Grupo de infecção por MAYV) e '####' (soros *Mock*  $\rightarrow$  grupo de infecção por MAYV). D.O. = densidade óptica; SD = desvio padrão; mm = milímetro;


Figura 6. Níveis de anticorpos e títulos de neutralização de MAYV após infecção secundária. Quantificação de anticorpos (A e B) IgG e IgM por ELISA indireto usando proteína E2 recombinante de MAYV e (C) atividades de neutralização contra MAYV após infecção secundária por MAYV (n = 3 por grupo). A análise estatística foi realizada por *two-way* ANOVA teste de Tukey. Em C, diferenças significativas (P <0,0001) entre 'CHIKV  $\rightarrow$  MAYV' e 'Mock  $\rightarrow$  MAYV' são indicadas por '\*\*\*'. D.O. = densidade óptica; SD = desvio padrão; mm = milímetro; Ns = diferença não significativa; dpi = dias pós-infecção; PRNT = teste de neutralização por redução de placas virais.

1.4.4 Soro humano de convalescentes infectados por CHIKV ou MAYV desenvolvem reduzida atividade neutralizante cruzada *in vitro* 

Os soros de pacientes convalescentes infectados com CHIKV e MAYV exibiram elevada atividade neutralizante homóloga pelo teste de neutralização por redução de *plaques* (PRNT<sub>50</sub>), com títulos entre 320 e 10.240 (**Fig. 7A e D**). No entanto, foram observados baixos níveis de neutralização cruzada contra a infecção heteróloga, observando-se títulos inferiores a 20 para a maioria dos indivíduos (**Fig. 7B, C, E, F e Tabela 1**). Estes resultados sugerem que anticorpos neutralizantes humanos específicos para MAYV e CHIKV não apresentam neutralização cruzada relevante, *in vitro*, em infecções por CHIKV ou MAYV.

		CHIKV ELISA		MAYV ELISA		Título PRNT <sub>50</sub>	
	Amostra	lgM	lgG	IgM	lgG	MAYV	CHIKV
	1	-	-	-	+	1280	<10
	2	-	+	-	+	1280	<10
	3	-	+	-	+	2560	<10
	4	-	-	-	+	640	<10
	5	-	+	-	+	640	20
	6	-	+	-	+	320	20
	7	-	+	-	+	1280	<10
	8	-	-	-	+	640	<10
	9	-	+	-	+	5120	<10
	10	-	+	-	+	320	<10
	11	-	-	-	+	320	<10
	12	+	+	-	-	<10	1280
	13	-	+	-	-	<10	2560
	14	+	+	-	-	20	5120
	15	-	+	-	-	10	1280
	16	-	+	-	-	10	5120
	17	-	+	-	-	10	1280
	18	+	+	-	-	10	2560
	19	+	+	-	-	<10	1280
	20	+	+	-	-	<10	2560
	21	+	+	-	-	10	5120
	22	+	+	-	-	10	2560
Pacientes	23	+	+	-	-	<10	2560
СНІКУ	24	-	+	-	-	10	1280
	25	-	+	-	-	<10	640
	26	-	+	-	-	10	10240
	27	+	+	-	-	<10	1280
	28	-	+	-	-	<10	5120
	29	+	+	-	-	<10	1280
	30	+	+	-	-	10	2560
	31	+	+	-	-	10	2560
	32	+	+	-	-	<10	5120
	33	+	+	-	-	<10	5120
	34	+	+	-	-	<10	2560
	35	+	+	_	_	<10	2560

**Tabela 1**. Detecção de IgM e IgG e títulos de PRNT<sub>50</sub> contra CHIKV e MAYV em amostras de indivíduos convalescentes de CHIKV e MAYV.

Legenda = +: Positivo, -: Negativo.



**Figura 7. Neutralização homóloga e heteróloga de CHIKV e MAYV por soros humanos convalescentes.** Amostras de soro humano foram coletadas de pacientes convalescentes infectados por CHIKV (n = 22) ou MAYV (n = 8) e avaliadas contra a neutralização homóloga de (A) CHIKV e (D) MAYV, e neutralização cruzada heteróloga de (B) MAYV e (E) CHIKV, respectivamente. Títulos de PRNT<sub>50</sub> de neutralização homóloga e heteróloga de CHIKV e MAYV foram obtidos usando (C) soros de CHIKV e (F) soros de MAYV. Curvas de regressão não linear foram geradas com número máximo de interações de 1.000 e intervalo de confiança de 95%. As barras de erro foram delimitadas pela cor azul. A linha pontilhada delimita 50% de neutralização.

1.4.5 As subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup>, e B CD19<sup>+</sup> não alteram a proteção cruzada contra MAYV

As subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> e B CD19<sup>+</sup> foram individualmente depletadas nos camundongos convalescentes da infecção por CHIKV 1 dia antes da infecção secundária por MAYV (**Fig. 8A**). A depleção de células T CD8<sup>+</sup> e B CD19<sup>+</sup> não alterou significativamente o desenvolvimento da doença aguda indicado pelo do inchaço das patas traseiras, enquanto a depleção de linfócitos T CD4<sup>+</sup> aboliu completamente o padrão de inchaço (**Fig. 8B-E**). Além disso, 7 dias após a infecção, as quantidades de RNA de MAYV nas patas não foram alteradas em camundongos que tiver linfócitos T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup> em comparação com os controles de isótipo (**Fig. 8F**). Todos os grupos de camundongos com depleção de

células mostraram cargas virais significativamente reduzidas em comparação com camundongos infectados com MAYV naïve não depletados (**Fig. 8G**). Além disso, todos os grupos de camundongos apresentaram quantidades semelhantes de RNA de MAYV 20 dias após a infecção. Notavelmente, a carga viral de MAYV foi detectada apenas em camundongos que tiveram os linfócitos T CD4<sup>+</sup> depletados (**Fig. 8H e I**). Coletivamente, esses resultados mostram que a depleção individual de células T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> e B CD19<sup>+</sup> não afetam o fenótipo da proteção cruzada.



**Figura 8.** Avaliação das subpopulações de linfócitos B CD19<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> na proteção cruzada contra MAYV. Os camundongos foram infectados com CHIKV ou *Mock* e, após 28 dias, foram infectados na pata traseira com MAYV ou *Mock*. Um dia antes da infecção, as subpopulações de linfócitos CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> ou CD19<sup>+</sup> foram depletadas independentemente. (A) A eficiência de depleção foi avaliada pela coleta de sangue total em 1 e 7 dias após a injeção intraperitoneal de anticorpos de depleção específicos: anti-CD4 (GK1.5), anti-CD8 (2,43), anti-

CD19 (1D3) ou controle de isotipo. (B - E) O edema perimetatarsal da pata traseira foi medido durante 14 dias (n = 4 por grupo). A titulação de MAYV em cada pata traseira de camundongo foi determinada por carga viral (PFU) e quantificação de RNA viral por qRT-PCR nos dias (F e G) 7 (pico da doença) e (H e I) 20 (recuperados da doença) (n = 3 - 5 por grupo). A análise estatística foi realizada por *two-way* ANOVA com teste de Tukey. Os asteriscos indicam diferenças significativas (\*, P <0,05; \*\*, P <0,01; \*\*\*, P <0,001 \*\*\*\*, P <0,0001) entre o Mock-MAYV (controle de isotipo) e CHIKV-MAYV (depletado) e grupos em B - E, o '#' indica diferenças significativas (#, P <0,01; ###, P <0,001 ######, P <0,0001) entre CHIKV-MAYV (depletado) e CHIKV-Mock (depletado). Os grupos comparados estão indicados em F-I. LOD = limite de detecção, PFU = unidade formadora de placa, g = grama, mm = milímetro, SD = desvio padrão.

1.4.6 A infecção prévia por CHIKV reduz a expressão de mediadores inflamatórios durante a infecção secundária por MAYV

É bem conhecido que as infecções por CHIKV e MAYV provocam robusta respostas imunológica com elevada expressão de mediadores inflamatórios [57]. Os níveis de citocinas de perfil Th1/Th2/Th17 nas patas traseiras e no soro de camundongos infectados foram avaliados 1, 3 e 7 dias após a infecção secundária por MAYV. Na pata traseira, aos 7 dias após a infecção, uma redução de 2,4 e 2,8 vezes foi observada nos níveis de IFN-y e IL-10, respectivamente (Fig. 9A e B). Também, no soro, observou-se uma redução de 13,3 e 5,5 vezes nos níveis de IFN-y nos dias 1 e 7s, respectivamente, e uma redução de 2,4 a 3,5 vezes nos níveis de TNF-a nos dias 1, 3 e 7 pós-infecção por MAYV quando comparado ao grupo não infectado previamente por CHIKV (Fig. 9D e E). Curiosamente, os níveis de IL-6 foram 5,9 vezes maiores nas patas traseiras 7 dias após a infecção por MAYV em camundongos previamente infectados com CHIKV, enquanto que no soro, eles foram 10 vezes maiores em camundongos naïves infectados por MAYV nos dias iniciais após a infecção (Fig. 9C e F). Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de TNF-α, IL-17A, IL-4 e IL-2 na pata traseira, nem nos níveis séricos de IL-17A após a infecção por MAYV (dados não mostrados). Os níveis de IL-10, IL-4 e IL-2 apresentaram-se abaixo do limite de detecção no soro dos camundongos. Estes resultados indicam que a infecção primária por CHIKV reduz os níveis de IFN-y e IL-10 e aumenta os níveis de IL-6 teciduais após 7 dias da infecção por MAYV, e reduz os níveis de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-6 no soro durante os dias subsequentes após a infecção.



Figura 9. A infecção prévia por CHIKV reduziu os níveis de citocinas inflamatórias na pata traseira e no soro de camundongos infectados por MAYV. Os camundongos (n = 3-5 por grupo) foram infectados com Mock ou CHIKV e, após 28 dias, foram inoculados na pata traseira com Mock ou MAYV. (A – C) As patas traseiras dos animais foram coletadas 7 dias após a infecção secundária por MAYV, e as citocinas foram quantificadas no sobrenadante do homogenato da pata traseira. (D – F) Os soros foram coletados nos dias 1, 3 e 7 após a infecção secundária por MAYV, e as citocinas foram quantificadas. Os dados são representativos de dois experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por *two-way* ANOVA com teste de Sidak. \*, P <0,05; \*\*, P <0,01; \*\*\*, P <0,001. IFN- $\gamma$  = interferon-gama, IL-10 = Interleucina 10, IL-6 = Interleucina 6, TNF- $\alpha$  = fator de necrose tumoral alfa, dpi = dia pós-infecção, pg = picograma, mL = mililitro.

1.4.7 A infecção prévia por CHIKV reduz recrutamento de células NK e de monócitos inflamatórios na infecção por MAYV

Considerando a importante contribuição das células hematopoiéticas e mielóides em infecções por alphavírus [58], o perfil de recrutamento de subconjuntos celulares específicos na pata traseira de camundongos previamente infectados com CHIKV foi analisado 7 dias após a infecção por MAYV. Uma redução média de 1,7 vezes no recrutamento foi observada em células NK (CD3<sup>-</sup> NK1.1<sup>+</sup>) e monócitos inflamatórios (CD11b<sup>+</sup> Ly6C<sup>+</sup>) na pata traseira quando comparados com camundongos *naïves* infectados com MAYV (**Fig. 10B-C e G-H**). Da mesma forma, uma redução de 1,73 e 4,6 vezes no recrutamento de células NK e de monócitos inflamatórios, respectivamente, foi verificada na pata traseira de camundongos infectados

primária e secundariamente com CHIKV em comparação com camundongos *naïves* infectados com CHIKV (**Fig. 10D-E e I-J**). Não se observaram diferenças significativas nas outras subpopulações analisadas nas patas ou tornozelos dos camundongos infectados secundariamente com MAYV, com ou sem infecção prévia por CHIKV (dados não mostrados). Nossos resultados mostram que na infecção por MAYV, camundongos previamente infectados com CHIKV exibiram redução no recrutamento de células NK e de monócitos inflamatórios no local da infecção.



Células Natural killer

Figura 10. O infiltrado tecidual de células NK e monócitos inflamatórios é reduzido durante a infecção por MAYV em camundongos previamente infectados com CHIKV. Camundongos C57BL/6 foram infectados com Mock ou CHIKV e, após 28 dias, foram infectados com Mock, CHIKV ou MAYV na pata traseira (n = 3-5 por grupo). Após 7 dias, os camundongos foram sacrificados, suas patas removidas e processadas para análise de citometria celular. Gráficos representativos mostrando a frequência de (A) células NK (CD3<sup>-</sup>NK1.1<sup>+</sup>) e (B)

monócitos inflamatórios (CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>high</sup>) na pata traseira de cada grupo experimental. (B, D e G, I) Frequências e (C, E e H, J) números absolutos de ambas subpopulações de células. Os dados são representativos de dois experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por *one-way* ANOVA com teste de Tukey. \*, P <0,05; \*\*, P <0,01; \*\*\*, P <0,001.

# 1.5 DISCUSSÃO

Nesta parte da tese, constatamos que a resposta imune de camundongos após a infecção primária por CHIKV protege parcialmente da infecção por MAYV, reduzindo a gravidade da doença com base na redução parcial do inchaço das patas. Nossos resultados corroboram outros estudos que mostram uma diminuição parcial no edema da pata após a infecção por MAYV em camundongos imunocompetentes previamente expostos ao CHIKV [59]. Além disso, observamos redução da carga de MAYV tecidual após a infecção secundária, indicando a existência de uma resposta imune protetora cruzada capaz de desenvolver um controle viral precoce. Transpondo esse achado para os seres humanos, a redução da carga viral pode representar uma barreira para a transmissão urbana do MAYV [38, 60]. Uma redução na carga de MAYV em camundongos pré-expostos ao CHIKV pode ter implicações adicionais para a dinâmica de transmissão viral e na gravidade da doença humana em áreas em que ocorre a co-circulação de ambos os vírus.

A análise histopatológica da infecção por CHIKV nas patas de camundongos mostrou infiltrado local generalizado de células mononucleares, edema subcutâneo e também, grandes focos de infiltrados celulares no tecido muscular [61]. A infecção com MAYV elevou o infiltrado de células mononucleares e polimorfonucleares, acompanhada por eventos de diapedese e desenvolvimento de edema. Também, observamos que esses fenômenos inflamatórios foram reduzidos em animais previamente expostos ao CHIKV. Entretanto, não foram observadas alterações na composição da cartilagem nos diferentes grupos de camundongos, sugerindo que este modelo experimental não é adequado para avaliação de danos à cartilagem, provavelmente porque a análise ocorreu após um curto período de infecção.

Sabe-se que alguns anticorpos monoclonais neutralizantes para CHIKV possuem potente atividade de neutralização cruzada contra outros alphavírus, incluindo MAYV, o que sugere a existência de epítopos conservados no gênero [49]. Por outro lado, também, observouse que a infecção por CHIKV induz anticorpos policlonais de baixa neutralização cruzada contra MAYV e falha na proteção cruzada contra a infecção por MAYV após transferência de soro *in vivo* [59]. Em nosso estudo, mostramos que camundongos infectados com CHIKV produzem altos níveis de anticorpos neutralizantes contra CHIKV, mas que são fracamente neutralizantes ou protetores contra a infecção por MAYV *in vitro* ou *in vivo*. Também, observamos baixa atividade de neutralização cruzada contra a infecção por CHIKV ou MAYV ao utilizar soros de pacientes convalescentes de MAYV ou CHIKV respectivamente. No entanto, em camundongos previamente infectados por CHIKV, observamos após a infecção por MAYV desenvolvimento rápido de elevados níveis de soro-neutralização contra MAYV. Esses resultados sugerem a existência de baixos níveis de anticorpos com reatividade cruzada previamente a infecção secundária, que se elevam rapidamente após a infecção, desenvolvendo atividades protetoras significativas. Estes resultados estão de acordo com estudo prévio que descreveu baixos níveis de neutralização cruzada de anticorpos contra MAYV no soro de pacientes infectados com CHIKV [48]. Portanto, nossos achados sugerem que a infecção primária por CHIKV não induza altos níveis de anticorpos com reatividade cruzada eficientes. No entanto, a infecção secundária por MAYV desencadeia uma rápida e significativa produção de anticorpos neutralizantes que desempenham um papel relevante durante a resposta imune inicial.

A resposta imune adaptativa durante a infecção por alphavírus artritogênicos, especialmente aquela envolvendo células T e B, é essencial para a eliminação e proteção viral [44]. Estudos anteriores mostraram que a infecção por CHIKV em camundongos imunocompetentes induz detecção de RNA viral persistente nas patas e que, embora as células T CD4<sup>+</sup> sejam essenciais para o desenvolvimento da doença aguda, elas não são diretamente essenciais para o controle da replicação viral [44, 62]. Também, observou-se que as células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> de camundongos imunizados com CHIKV são capazes de responder de forma cruzada contra estimulo ex vivo ao antígeno de MAYV [59]. Em nosso estudo, camundongos infectados por CHIKV e com linfócitos T CD8<sup>+</sup> depletados não apresentaram alterações no padrão de edema das patas ou nas quantidades de RNA ou carga de MAYV. No entanto, quando células T CD4<sup>+</sup> foram depletadas, os animais não desenvolveram qualquer inchaço aparente das patas traseiras e exibiram carga viral persistente de MAYV até 20 dpi. Também, outros estudos mostraram que a ausência de células B maduras leva a um aumento significativo da carga viral e do inchaço prolongado das patas dos camundongos durante a infecção por CHIKV [63]. Entretanto, nossos resultados não corroboram estes resultados pois não observamos nenhuma mudança aparente no desenvolvimento da doença secundária e na carga viral tecidual em camundongos que tiveram as células B CD19<sup>+</sup> depletadas após a infecção por MAYV. Nossos resultados sugerem que esta subpopulação de linfócitos pode não afetar prontamente o controle da replicação viral durante a infecção secundária. Além disso, não observamos uma reversão completa do inchaço da pata ou da carga viral em camundongos que tiveram os linfócitos T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> ou B CD19<sup>+</sup> depletados durante a doença aguda. No entanto, não devemos ignorar que provavelmente não conseguimos 100% de depleção celular e que a população de células do sangue pode não refletir totalmente o perfil celular no tecido das patas dos camundongos. Ainda, é possível que a ausência de uma subpopulação de linfócitos resulte em atividade compensatória de outros subconjuntos de células responsáveis por mediar a proteção cruzada contra MAYV. Finalmente, não podemos ignorar o envolvimento de outras populações de células de memória (*memory-like*), que podem desenvolver papéis importantes na proteção cruzada.

Altos níveis de mediadores pró-inflamatórios (por exemplo, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) foram associados a extravasamento capilar e a edema durante a infecção por CHIKV [64]. Um aumento inicial na expressão de IFN- $\gamma$ , acompanhado da produção de TNF- $\alpha$ , foi identificado no sangue de camundongos, macacos e seres humanos durante a infecção por CHIKV [61, 65, 66]. Sugeriu-se que a replicação viral inicial poderia induzir a produção de IFN- $\gamma$  pela ativação de células NK [67]. Segundo Nakaya et al. (2012), a ausência de IFN- $\gamma$  em animais de IFN- $\gamma$ não interfere na carga de CHIKV, mas reduz o inchaço das patas, indicando papel distinto no controle da doença inflamatória [68]. Em contraste, outro estudo mostrou que o IFN- $\gamma$  é importante para o controle do CHIKV, mas é irrelevante quanto ao desfecho do edema das patas [62]. No presente estudo, um pico na produção de IFN- $\gamma$  foi observado no soro e nas patas traseiras do camundongos nos dias 1 e 7 após a infecção por MAYV. Esta quantidade de IFN- $\gamma$ foi substancialmente reduzida em camundongos previamente infectados com CHIKV. Nossos resultados sugerem que a imunidade cruzada induzida pela infecção por CHIKV diminui a expressão de IFN- $\gamma$ , correlacionando-se com a redução na detecção viral e no edema das patas.

A produção de IFN- $\gamma$  é um potencializador da expressão de TNF por monócitos/macrófagos durante a resposta imune [69]. A produção precoce de TNF- $\alpha$  durante a infecção por alphavírus foi atribuída à infiltração de macrófagos nos tecidos [65, 70]. Consequentemente, nos camundongos infectados por CHIKV, observamos uma diminuição nos níveis sanguíneos de TNF- $\alpha$  após a infecção por MAYV. A baixa produção de TNF- $\alpha$  pode estar correlacionada à redução dos monócitos inflamatórios infiltrados no tecido das patas, e que, consequentemente, reduz os escores clínicos. Níveis mais baixos de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  na infecção secundária por MAYV indicam proteção cruzada capaz de atenuar a resposta inflamatória, o que resulta na redução da carga viral, inflamação e escores de doença.

Observamos que os níveis de IL-10 nas patas traseiras foram reduzidos durante a doença causada por MAYV em camundongos previamente infectados com CHIKV. Estudos de coortes de humanos mostraram que os níveis de IL-10 circulante durante a infecção aguda por CHIKV

estão aumentados [66, 71]. No entanto, a IL-10 é uma citocina anti-inflamatória e sua produção pode parecer contraditória, considerando que o CHIKV e o MAYV são agentes causadores de doenças inflamatórias [72, 73]. É possível que a resposta pró-inflamatória ocorra mais cedo na infecção sendo posteriormente reduzida durante a resposta anti-inflamatória relacionada à produção de citocinas do tipo II, incluindo IL-10 [71]. No presente estudo, também, observamos níveis aumentados de IL-6 nas patas traseiras e níveis reduzidos no soro de camundongos previamente infectados com CHIKV durante a doença por MAYV. Níveis aumentados na produção de IL-6 foram observados em pacientes durante a fase aguda da infecção por CHIKV e permaneceram elevados durante um curto período após a recuperação [66]. Embora os níveis aumentados de IL-6 estejam ligados à exacerbação dos desfechos clínicos, evidências anteriores também mostraram que a IL-6 seria capaz de suprimir a replicação viral in vitro [74]. No entanto, consequências inadequadas contra as infecções virais também foram associadas ao aumento na produção de IL-6 [75]. No presente estudo, níveis aumentados de IL-6 foram observados nas patas de camundongos previamente infectados por CHIKV durante a infecção por MAYV, o que parece contraditório considerando-se a redução na inflamação local. Portanto, diferentes cenários imunológicos podem estar associados à produção de IL-10 e IL-6 durante infecções virais e mais trabalhos são necessários para elucidar seus exatos papéis.

A infecção da pata traseira de camundongos com CHIKV induz a expressão de citocinas e quimiocinas responsáveis pelo recrutamento de células NK, macrófagos, monócitos inflamatórios, linfócitos T CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> [61, 76]. Durante a infecção por CHIKV, as células NK tem papéis importantes no controle e destruição das células infectadas [77]. A infecção humana por CHIKV induz altos níveis de células NK no sangue durante a fase aguda da doença [78]. No presente estudo, encontramos níveis reduzidos de células NK (CD3<sup>-</sup> NK1.1<sup>+</sup>) e de danos teciduais nas patas de camundongos pré-expostos ao CHIKV e subsequentemente infectados com MAYV, sugerindo a existência de mecanismos protetores da imunidade cruzada, como previamente descritos durante a fase aguda da infecção por CHIKV [79]. Portanto, é concebível que a proteção cruzada contra MAYV poderia incluir o desenvolvimento de células NK "memory-like" produzidas durante a pré-exposição ao CHIKV [80]. Além disso, papéis patogênicos e protetores foram descritos para os monócitos e células derivadas de monócitos durante a infecção por alphavírus em camundongos [81, 82]. A depleção de monócitos ou neutralização de seus fatores pró-inflamatórios durante a infecção pelo vírus Ross River reduz a gravidade da doença, os infiltrados inflamatórios e os danos aos tecidos [83]. No presente estudo, a infecção prévia por CHIKV reduziu o recrutamento de monócitos inflamatórios (CD11b<sup>+</sup> Ly6C<sup>high</sup>) na pata traseira de camundongos após a infecção por MAYV, o que se correlaciona com a redução dos escores histológicos e do edema das patas. Curiosamente, observamos o desenvolvimento de uma pequena subpopulação de células Ly6C<sup>high</sup> e CD11b<sup>+</sup> em camundongos convalescentes de CHIKV, que aparentemente aumentam após a infecção secundária. Consideramos essa população como sendo de monócitos inflamatórios, mas estudos adicionais são necessários para elucidar melhor a heterogeneidade do desenvolvimento de monócitos após a infecção por alphavirus. De qualquer maneira, nossos resultados sugerem que os monócitos tenham papel importante na infecção secundária por alphavírus.

## **1.6 CONCLUSÕES**

 - A pré-existência de imunidade ao CHIKV confere proteção cruzada parcial contra a infecção secundária por MAYV, reduzindo a carga viral tecidual e os danos histopatológicos da doença secundária.

- Anticorpos anti-CHIKV de seres humanos e de camundongos possuem baixa capacidade neutralizante cruzada contra a infecção por MAYV.

- Após a infecção secundária, são observados elevados títulos de anticorpos com atividades de neutralização cruzada em camundongos.

 A depleção de células do sistema imunes adaptativo indica que células distintas ou uma combinação de células imunes adaptativas pode ser relevantes na proteção cruzada contra a infecção secundária por MAYV.

 A redução de citocinas pró-inflamatórias, células NK e monócitos inflamatórios durante a infecção por MAYV de camundongos previamente infectados com CHIKV, sugere um papel da imunidade inata durante a proteção cruzada.

 A imunidade pré-existente a alphavírus artritogênicos pode afetar a infecção secundária por outro alphavirus.

# 2. PARTE II: MAPEAMENTO DE EPÍTOPOS LINEARES DE DENV E ZIKV E SUAS APLICAÇÕES

# 2.1 INTRODUÇÃO

Os vírus Zika (ZIKV) e os do Dengue (DENV) pertencem ao gênero Flavivirus (família Flaviviridae), em um grupo antigenicamente relacionados responsável por causar doenças transmitidas por artrópodes em todo o mundo. O ZIKV, desde sua emergência em 2014, se disseminou no hemisfério ocidental, causando milhares de infecções, principalmente na América do Sul [84]. A infecção por ZIKV, quando sintomática, geralmente causa febre, exantema cutâneo, mialgia e artralgia, e também está associada a complicações neurológicas, como síndrome de Guillain-Barré e síndrome de Zika congênita em recém-nascidos [85]. Os DENV (sorotipos 1, 2, 3 e 4) são os arbovírus mais importantes que ocorrem no mundo. São endêmicos em 125 países causando mais de 100 milhões de infecções e 10.000 mortes a cada ano [86, 87]. A infecção humana pelos DENV costuma causar doença febril, que geralmente é acompanhada por artralgia, mialgia e dor de cabeça, que podem eventualmente progredir para dengue grave, causando extravasamento capilar, trombocitopenia, manifestações hemorrágicas, choque e morte [88]. Embora as infecções por flavivírus pareçam estar associadas à proteção contra a reinfecção homóloga, alguns dos anticorpos do paciente podem desenvolver reatividade cruzada com outros flavivírus, que podem ter características protetoras ou patogênicas durante uma infecção secundária com um flavivírus diferente [89]. Um fenômeno importante comumente observado durante a infecção secundária por DENV com um sorotipo diferente, é o realce dependente de anticorpos (ADE) da infecção, que está associado a um maior pico de carga viral e risco de doença grave [90].

Os flavivírus possuem um RNA genômico de fita única de polaridade positiva, responsável por codificar um único polipeptídeo que é clivado nas proteínas estruturais e não estruturais [91]. A partícula viral contem 3 três proteínas estruturais (capsídeo [C], prémembrana [prM] e envelope [E]) e o RNA genômico. A proteína E, que é responsável por mediar a entrada do vírus nas células suscetíveis, é uma proteína com 3 domínios (DI, DII e DIII), ligada à membrana viral por uma haste helicoidal [91]. Os três domínios são conectados por regiões flexíveis, desempenham importantes papéis e sofrem mudanças conformacionais irreversíveis durante o ciclo viral [92]. O DI é responsável por estabilizar a orientação geral da proteína E, participando das mudanças conformacionais e carrega importantes resíduous relacionados a ligação celular [93, 94]. O DII contribui no controle da fusão viral à membrana da célula hospedeira, estabilizando e protegendo o peptídeo de fusão em partículas virais imaturas [95]. O DIII apresenta uma estrutura semelhante a imunoglobulinas e participa no reconhecimento do receptor de entrada celular [96, 97].

Grande parte dos epítopos neutralizantes primários detectados por anticorpos humanos são encontrados na proteína E [98]. Esta proteína compartilha homologia estrutural e identidade de sequência de aminoácidos entre os flavivírus, sendo aproximadamente 43% conservada entre os DENV e o ZIKV [99, 100]. A relação antigênica entre ZIKV e DENV, consequentemente, permite que a proteína E seja detectada por muitos anticorpos que apresentam reatividade cruzada, reconhecendo epítopos imunodominantes e conservados. Assim, podem ser neutralizantes ou aumentar a infecciosidade viral mediada por anticorpos (*antibody-dependent enhancement - ADE*) [101-104]. Além disso, os DENV e o ZIKV são transmitidos por mosquitos *Aedes* e costumam ser encontrados circulando em áreas tropicais e subtropicais do mundo [105, 106]. Assim, compreender a interação entre a resposta dos anticorpos dos DENV e do ZIKV é importante para o entendimento da patogênese de suas doenças, a dinâmica da transmissão e também, auxiliar nas estratégias de candidatos vacinais.

A identificação de epítopos é essencial para entender a resposta imune humoral contra um antígeno específico. Em geral, os epítopos são divididos em duas categorias principais: epítopos lineares, que são compostos por uma sequência de aminoácidos contínuos que interagem com os anticorpos com base em sua estrutura primária; e epítopos conformacionais, nos quais aminoácidos chaves são aproximados pela conformação da proteína para formar estruturas mais complexas que participam da ligação com o anticorpo [107]. Embora uma fração reduzida de anticorpos seja direcionada a epítopos lineares, eles geralmente demonstram uma afinidade de ligação mais alta do que os anticorpos direcionados a epítopos descontínuos [108, 109]. Existe uma quantidade crescente de dados a respeito de peptídeos lineares de flavivírus; assim, estudos cuidadosos do perfil de epítopos pode ajudar a identificar candidatos vacinais, elucidar importantes mecanismos imunológicos ou imunopatológicos relacionados a infecções naturais ou vacinações.

É possível que anticorpos policionais e monocionais que apresentam reatividade cruzada, tenham como alvo, peptídeos imunogênicos lineares na proteína do envelope dos flavivírus [110, 111]. Entretanto, pouco se sabe sobre anticorpos que apresentam reatividade cruzada com epítopos lineares na proteína E dos flavivírus. Alguns estudos identificaram peptídeos imunodominantes lineares no domínio II (DII) e na região da alça de fusão (*fusion-loop*) da proteína E de DENV os quais são reconhecidos por anticorpos anti-ZIKV [112, 113].

Além disso, muitos anticorpos isolados de pacientes infectados com DENV foram capazes de ligarem-se ao ZIKV, inclusive com atividades neutralizante e sem induzir ADE. Dentre estes anticorpos um foi capaz de reconhecer epítopo linear altamente conservado na alça de fusão da proteína E do ZIKV [114]. Por outro lado, nenhum peptídeo linear imunodominante na proteína E foi descrito como associado ao desenvolvimento da ADE durante infecção por qualquer flavivírus. Portanto, pouco se sabe sobre as implicações dos anticorpos anti-flavivírus que apresentam reatividade cruzada contra peptídeos lineares. Neste estudo, realizamos o mapeamento de epítopos de peptídeos lineares do ZIKV na proteína E usando anticorpos anti-DENV e avaliamos as atividades patológicas ou protetoras potenciais relacionadas aos anticorpos que reconhecem esses peptídeos.

#### **2.2 OBJETIVOS**

#### 2.2.1 Objetivos Geral

Identificar epítopos imunodominantes de ZIKV reconhecidos de maneira cruzada por anticorpos policlonais anti-DENV e avaliar possíveis consequência protetoras ou patogênicas dos anticorpos contra estes epítopos durante a infecção por ZIKV

## 2.2.2 Objetivos Específicos

- Mapear epítopos lineares da proteína E de ZIKV utilizando um *chip* de microarranjo de peptídeos de alta resolução PEPperPrint® e testar estes microarranjos contra soros de pacientes convalescentes de infecção por DENV;
- Selecionar peptídeos imunodominantes na proteína E de ZIKV que sejam reconhecíveis por anticorpos anti-DENV;
- Avaliar atividades neutralizantes e causadoras de ADE de anticorpos anti-DENV capazes de reconhecer epítopos de ZIKV.

# 2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 Soros de pacientes infectados por DENV e ZIKV

Amostras séricas de convalescentes de DENV foram coletadas na cidade de Ribeirão Preto, antes da emergência local do ZIKV, entre 2007 e 2013 (**Tabela 2**). Essas amostras foram coletadas de um total de 42 pacientes, 14 homens e 28 mulheres, com idades médias de 43 e 39 anos, respectivamente. O diagnóstico de DENV e o do respectivo sorotipo infectante foi feito durante a fase aguda da infecção por RT-PCR, como previamente descrito [115]. Todas as amostras tiveram detecção de IgG anti-DENV por ELISA indireto comercial (Panbio<sup>TM</sup>, Abbott, EUA). As amostras séricas de convalescentes com ZIKV foram coletadas em 2017 na cidade de São Carlos, São Paulo, Brasil (**Tabela 3**). Foram coletadas 20 amostras, 17 homens e 3 mulheres, com idades média de 33 e 27 anos, respectivamente. Presença de IgG contra ZIKV foi diagnosticada por teste de fluxo lateral rápido (LumiQuick Diagnostics, EUA). As amostras IgG-positivas para ZIKV exibiram resultados negativos para detecção de IgG, IgM e Ns1 de DENV utilizando o teste rápido comercial BioPix® (Scenika, Brasil). Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e os procedimentos envolvendo soros humanos foram aprovados por Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (protocolo n. 12603/2006 e 2.206.200 / 2017).

Grupo	Ν	Ano de coleta	Sexo	Idade	Dias após início dos sintomas	DENV IgG	Sorotipo	Título PRNT50 ZIKV	ADE (AUC)
	1	2007	F	28	7	+	DENV-3	10	105,4
	2	2007	F	40	6	+	DENV-3	20	69,82
	3	2019	F	54	11	+	DENV-2	20	905,9
	4	2010	М	52	11	+	DENV-1	5	457,7
	5	2019	F	58	6	+	DENV-2	0	4,736
	6	2008	M	53	15	+	DENV-3	5	634,4
	7	2008	М	48	11	+	DENV-3	0	645,1
	8	2008	F	31	5	+	DENV-3	20	441,1
	9	2008	F	38	10	+	DENV-3	10	86,04
	10	2008	F	34	8	+	DENV-3	0	53,48
	11	2010	M	56	7	+	DENV-1	5	370
	12	2010	F	23	5	+	DENV-1	0	16,19
	13	2010	F	31	16	+	DENV-1	10	43,81
	14	2010	F	38	11	+	DENV-1	0	8,354
	15	2010	F	23	13	+	DENV-1	0	27,65
	16	2008	F	67	8	+	DENV-3	0	800,9
	17	2010	F	41	3	+	DENV-2	80	398,5
	18	2010	M	23	8	+	DENV-3	10	324,8
	19	2010	F	55	2	+	DENV-1	20	379,1
	20	2010	F	22	13	+	DENV-1	5	45,3
Infectados	21	2010	F	34	7	+	DENV-2	0	2,922
por DENV	22	2010	F	45	6	+	DENV-2	10	1,065
	23	2010	M	14	5	+	DENV-1	0	1,033
	24	2008	M	19	15	+	DENV-3	10	41,85
	25	2010	M	77	5	+	DENV-1	0	1,599
	26	2010	M	35	4	+	DENV-1	0	1,415
	27	2011	M	79	9	+	DENV-1	160	15,08
	28	2011	M	55	5	+	DENV-1	5	1,753
	29	2011	F	26	13	+	DENV-1	20	49,62
	30	2011	F	22	5	+	DENV-1	5	1,856
	31	2011	M	25	17	+	DENV-1	10	12,85
	32	2011	F	29	11	+	DENV-1	10	35,23
	33	2013	F	54	12	+	DENV-4	0	8,352
	34	2013	M	25	14	+	DENV-4	40	14,61
	35	2013	F	47	9	+	DENV-4	0	9,095
	36	2013	F	36	11	+	DENV-4	0	29,98
	37	2013	F	45	8	+	DENV-4	0	14,88
	38	2013	F	22	6	+	DENV-4	0	20,73
	39	2013	F	50	8	+	DENV-4	0	9,786
	40	2013	M	49	16	+	DENV-4	0	9,582
	41	2013	F	56	12	+	DENV-4	0	58,87
	42	2013	F	52	14	+	DENV-4	5	264,5

Tabela 2. Amostras séricas de DENV e controles negativos utilizadas neste estudo.

	43	2020	M	39	n/a	-	n/a	0	1
	44	2020	М	33	n/a	-	n/a	0	1,2
	45	2020	M	36	n/a	-	n/a	0	0,8
	46	2020	F	29	n/a	-	n/a	0	3
Controles	47	2020	M	30	n/a	-	n/a	0	4
negativos	48	2020	F	36	n/a	-	n/a	0	2,2
	49	2020	F	38	n/a	-	n/a	0	3
	50	2020	M	29	n/a	-	n/a	0	1,3
	51	2020	M	32	n/a	-	n/a	0	6
	52	2020	F	33	n/a	-	n/a	0	3

Legenda= +: Positivo, -: negativo, n/a = não aplicável.

Tabela 3. Amostra	s séricas de	ZIKV	utilizadas	neste	estudo
-------------------	--------------	------	------------	-------	--------

Grupo	Ν	Ano de coleta	Sexo	Idade	ZIKV IgG	Título PRNT50 ZIKV
	53	2017	F	36	+	320
	54	2017	М	40	+	2560
	55	2017	М	40	+	2560
	56	2017	М	29	+	1280
	57	2017	F	27	+	2560
	58	2017	М	34	+	640
	59	2017	М	37	+	2560
	60	2017	М	36	+	2560
	61	2017	М	22	+	5120
ZIVV	62	2017	F	19	+	2560
ZIKV	63	2017	М	26	+	5120
	64	2017	М	24	+	10240
	65	2017	М	38	+	160
	66	2017	М	42	+	20480
	67	2017	М	39	+	1280
	68	2017	М	40	+	1280
	69	2017	М	38	+	1280
	70	2017	М	37	+	320
	71	2017	М	23	+	320
	72	2017	М	29	+	20

Legenda= +: Positivo.

# 2.3.2 Mapeamento de epítopos lineares

As sequências de aminoácidos (aa) das proteínas do envelope de ZIKV (genbank AMA12085), DENV-1 (genbank KP188540.1), DENV-2 (genbank KP188549), DENV-3 (genbank JF808125.1) e DENV-4 (genbank JN559741. 2) contidas na lâmina de microarranjo (PEPperPRINT, Alemanha) foram sintetizadas em forma linear contendo peptídeos de 15 aa com sobreposição de 13 aa dispostos sequencialmente e conjulgados pela região N-terminal e em duplicata. Um total de 792 peptídeos foram sintetizados, 197 para cada sorotipo de DENV e 201 para ZIKV. Um peptídeo controle, correspondendo a um epítopo de poliomielite

(KEVPALTAVETGAT), foi incluído na lâmina para orientar o posicionamento adequado da grade de análise e servir como controle positivo de fluorescência.

O ensaio para mapeamento de epítopos foi realizado segundo recomendação do fabricante. Em resumo, as lâminas de microarranjo de peptídeos foram colocadas em bandejas de incubação (PEPperPRINT, Alemanha) e mantidas sob agitação horizontal de 140 rpm. Inicialmente foram incubadas em solução tampão 'padrão' (PBS com 0,05% [v/v] Tween 20) e bloqueadas durante 30 min com solução tampão de bloqueio (tampão padrão com 1% [m/v] de albumina de soro bovino [BSA]) em temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram incubados por uma noite, a 4°C, com as amostras séricas diluídas 1:20 em solução tampão de 'marcação' (tampão padrão com 0,1% [w / v] BSA). Em seguida, as lâminas foram lavadas por 3 vezes e incubadas por 1h com IgG anti-humano conjugado a DyLight 650 (ThemoFischer, EUA) diluído 1:2000 em solução 'tampão' em temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas de peptídeos foram lavadas por 3 vezes, mergulhadas em solução tampão de 'Dipping' (água deionizada com Tris 1mM, pH 7,4). As lâminas foram secas por centrifugação em baixa velocidade (300xg, 5 min). Imagens fluorescentes destas lâminas foram adquiridas no comprimento de 635nm, com 100% de potência de laser e ganho PMT de 700, no equipamento Axon GenePix 4000B Microarray Scanner (Molecular Devices, EUA). A quantificação da fluorescência foi feita com auxílio do programa GenepixPro Analysis (Molecular Devices, EUA). A intensidade da fluorescência na área do diâmetro impresso de cada peptídeo, bem como a área externa não ocupada por peptídeos, foi quantificada (background). O sinal de fluorescência média e a mediana em cada spot e na região de background, foram calculados e exportados como valores individuais em planilha de dados do Excel. Em seguida, um fluxo de análises foi executado manualmente com os dados das fluorescências. Um valor de correção de background foi obtido calculando-se o valor médio de todos spots negativos. Os valores negativos de cada spot (negativo ou positivo) foram interpretados como zeros e o valor da intensidade mediana dos spots dos peptídeos foi corrigido subtraindo-se o valor médio de background. Valores de intensidade menor que 1, foram corrigidos e ajustados para 1. A intensidade final foi obtida linearizando-se a intensidade de cada peptídeo em Log<sub>2</sub>. Os resultados médios entre os 2 peptídeos iguais de diferentes spots foram usados como intensidade final. A intensidade de fluorescência em cada spot foi considerada positiva se ao final o valor do sinal superasse o da média de 3 amostras negativas acrescida de 2 desvios padrões, no mesmo spot.

#### 2.3.3 Validação dos peptídeos por ELISA

Os peptídeos mapeados foram sintetizados quimicamente e biotinilados em sua região N-terminal (Biomatik, EUA) individualmente. As soluções estoque de cada peptídeo foram dissolvidas em solvente apropriado para uma concentração final de 1 mg/ml. A validação da reatividade destes peptídeos foi feita como descrito anteriormente [23]. Resumidamente, placas de 96 poços revestidas com estreptavidina e pré-bloqueadas (Thermo Fischer # 15126, EUA) foram incubados por 1h, à temperatura ambiente, com os peptídeos diluídos a 1 µg/ml em PBS. Lavaram-se as placas por 3 vezes com PBS-T (0,05% Tween 20 [v/v]) e 50µl das amostras de soro dos, pacientes diluídas a 1:100 em PBS, foram incubadas em duplicatas durante 1h em temperatura ambiente. As placas foram lavadas por 4 vezes com PBS-T e incubadas durante 1h à temperatura ambiente com IgG anti-humano produzido em cabra (específico para região Fab) e conjugado com peroxidase (Thermo Fischer # A0293, EUA). As placas foram lavadas 4 vezes, reveladas com 100 µl de substrato TBM (Seracare Life Sciences, EUA) incubando-se por 15 minutos e a reação interrompida adicionando-se 50 µl de solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N. As placas foram lidas a 450nm/620nm em leitor de microplacas multiskan (Titertek, Alemanha).

## 2.3.4 Linhagens celulares e estoque de vírus

Células Vero (ATCC, CCL-81) foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% de FBS inativado por calor (FBS; Vitrocell, Brasil). Células K562 (ATCC, CCL-243) foram mantidas em meio RPMI 1640 (Vitrocell, Brasil) suplementado com 10% de FBS. O ZIKV (cepa SPH2015) foi propagado em células Vero cultivadas em DMEM com 2% de FBS incubando-se a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após 6 dias da infecção, o sobrenadante da cultura celular foi coletado, clarificado por centrifugação em baixa velocidade e mantido a -80°C. A quantificação viral foi realizada por ensaio de *plaques* virais, como descrito no item 1.3.8, alterando-se o tempo de incubação para formação dos *plaques* virais para 5 dias.

#### 2.3.5 Teste de neutralização por redução de *plaques* virais (PRNT) de ZIKV

Para determinar a capacidade neutralizante das amostras séricas, realizou-se o PRNT conforme descrito anteriormente, no item 1.3.7, com poucas alterações. Para formação do complexo vírus-anticorpo, as amostras de soro foram diluídas de 1:5 a 1:160 (pacientes com

DENV) ou 1:5 a 1:20480 (pacientes com ZIKV) e foram misturadas com  $10^2$  PFUs de ZIKV. Para formação dos *plaques* virais, incubou-se por 6 dias a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. A atividade neutralizante em cada ponto de diluição foi convertida em porcentagem e a AUC foi calculada usando-se o programa *Prism* v.8.0.2 (GraphPad, EUA).

#### 2.3.6 Aumento da infecção mediada por anticorpos (ADE) para ZIKV

O *ADE* da infecção por ZIKV foi medido utilizando um ensaio de citometria de fluxo descrito anteriormente [116]. Resumidamente, diluições seriadas das amostras séricas, diluídas  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ , foram misturadas com ZIKV e incubadas por 1h a 37°C. Em seguida, a mistura soro-vírus foi adicionada a células K562 no (MOI 1) em placa de 96 poços em meio RPMI 1640, incubando-se durante 1h a 37°C. As células foram lavadas por 2 vezes com PBS e ressuspensas em meio RPMI 1640 com 10% de FBS, incubando-as por 2 dias a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, as células foram lavadas 1 vez, com PBS e fixadas com uma solução tampão de fixação 'IC', por 20 min e incubadas com solução tampão de permeabilização (eBioscience, EUA). As células foram marcadas com anticorpo monoclonal anti-flavivirus do clone '4G2' (1 µg/ml) por 1h à temperatura ambiente. Em seguida, após uma lavagem adicional, as células foram incubadas com IgG *goat anti-mouse* (específico para cadeias pesadas + leves) conjugado a *Alexa Fluor 647* (2,5 µg/ml), durante 1h, à temperatura ambiente. O número de células infectadas foi determinado por citometria de fluxo usando um citômetro *BD Accuri* e analisando o resultado com o programa *FlowJo X v.10.0.7r2*. A AUC foi calculada usando o programa *Prism v.8.0.2* (GraphPad, EUA).

# 2.3.7 Depleção peptídeo-específica de anticorpos séricos

A depleção por afinidade de anticorpos séricos a peptídeos específicos foi feita como descrito previamente [117]. Resumidamente, os peptídeos sintéticos foram agrupados em forma de *pool*, diluindo-se cada um para 100 µg/ml em PBS. O *pool* de peptídeos foi incubado em placas revestidas com estreptavidina pré-bloqueada, à temperatura ambiente, durante 1h. Em seguida, as placas foram lavadas por 3 vezes com PBS-T e os soros dos pacientes foram diluídos a 1:5 em DMEM (Vitrocell, Brasil) sendo adicionados aos poços da primeira coluna. Após 20 min de incubação, a solução contendo os anticorpos 'não ligados' aos peptídeos foi transferida ao poço seguinte, para uma nova rodada de depleção, realizando um total de 22 rodadas. Ao

final, a fração de anticorpos não ligados foi coletada para os ensaios funcionais e as placas de ELISA contendo os anticorpos que se ligaram, foram reveladas conforme descrito no item 3.3.3.

#### 2.3.8 Análise e visualização de dados

Os dados sobre a proteína do envelope do ZIKV em conformação homodimérica foram obtidos do *Protein Databank* (PDB: 5JHM) e visualizados no software *PyMOL v.2.5.2* (Schrodinger, EUA). As análises estatísticas foram feitas com auxílio do programa *GraphPad Prism v. 8.0.2* (GraphPad, EUA). Para comparações entre múltiplos grupos, fez-se a análise de variância (ANOVA) unilateral com o teste post-hoc (especificado na legenda da figura). A comparação entre grupos foi feita por teste t de *Student* bicaudal pareado ou não pareado (indicado na legenda), com intervalo de confiança de 95%. Diferenças estatísticas foram consideradas significantes quando o valor de P <0,05.

#### **2.4 RESULTADOS**

2.4.1 Identificação de 9 peptídeos de ZIKV que reagem de forma cruzada com anticorpos anti-DENV

Para avaliar a reatividade de anticorpos anti-DENV contra epítopos de ZIKV fizemos um mapeamento de epítopos em lâminas de microarranjo de peptídeos contendo os aa das proteínas do envelope de ZIKV e dos DENV 1-4. No teste, utilizamos 16 soros de convalescentes de DENV e sem exposição prévia conhecida ao ZIKV e 3 soros de pacientes não infectados por DENV ou ZIKV, como controles negativos (**Tabela 2**). Como resultado, observamos uma ampla detecção cruzada dos anticorpos anti-DENV com os peptídeos de ZIKV, por quase toda a proteína E, indicando um alto grau de reatividade cruzada (**Figura 11**). Selecionamos 9 peptídeos de ZIKV que demonstraram elevada frequência de detecção (44 – 69%) e também reduzida ou similar frequência de detecção (0 – 87%) pelo peptídeo correspondente na proteína E de DENV 1-4 (**Figura 12**). Alguns dos peptídeos de ZIKV, tais como os peptídeos 1, 2 e 3, 6 e 9, demonstraram alta identidade de a.a., apresentando pelo menos 7 resíduos de a.a. conservados em relação aos peptídeos de DENV, enquanto que os peptídeos 4, 5, 7 e 8 demonstraram elevada divergência de sequências, apresentando de 5 a 2 a.a. conservados. Com dados de cristalografia da proteína E do ZIKV, observamos que os 9 peptídeos lineares escolhidos possuem algum grau de exposição na superfície na proteína E (**Figura 13A**). Também estes peptídeos são representativos dos três domínios da proteína E, os peptídeos 1, 2 e 4 são de DI, os peptídeos 3 e 5 de DII e os peptídeos 6, 7, 8 e 9 de DIII (**Figura 13B**). A confirmação da reatividade cruzada dos peptídeos, individualizados no ELISA, mostrou que a maioria dos convalescentes de dengue participantes deste estudo apresentou anticorpos IgG séricos que reconhecem os peptídeos selecionados de ZIKV, em diferentes níveis (**Figura 13C**).



Mapeamento de Epítopos na proteína E

**Figura 11. Mapeamento de epítopos lineares de células B nas proteínas de envelope de ZIKV e DENV 1-4.** Os soros de pacientes de DENV (n = 16) foram aplicados a um chip microarray de peptídeos personalizado

composto de 792 peptídeos lineares de 15 aminoácidos com sobreposição de 13 amino ácidos. Cada peptídeo foi impresso em duplicata e conjugado ao microchip por sua região N-terminal. A frequência de detecção de peptídeos (%) é indicada no eixo y. As regiões de peptídeos selecionadas são indicadas por tons de cinza e números correspondentes em círculos roxos.



# Frequência de detecção dos peptídeos

Figura 12. Sequências de aminoácidos dos peptídeos de ZIKV selecionados e sua frequência de detecção por amostras anti-DENV. As sequências de aminoácidos lineares dos peptídeos selecionados foram alinhadas ao peptídeo linear correspondente de DENV 1-4. As cores vermelhas indicam diferenças de aminoácidos em relação a sequência consenso, enquanto a porcentagem de identidade é indicada por barras roxas. A frequência de detecção de cada peptídeo é indicada no lado direito de cada sequência.



**Figura 13. Identificação e validação dos peptídeos lineares selecionados.** A) Os peptídeos selecionados apresentam-se na superfície da proteína E de ZIKV (PDB 5JHM). As cores roxa e ciano indicam as cadeias A e B da proteína E (homodimérica), enquanto que a cor vermelha indica as posições dos peptídeos selecionados. B) Representação linear da proteína E de ZIKV (Uniprot Q32ZE1) indicando as regiões de domínio I (azul), II (cinza) e III (vermelho) e as regiões correspondentes dos peptídeos lineares 1 - 9 identificados neste estudos. C) ELISA indireto realizado utilizando-se Soros de pacientes de DENV (n = 47) e os peptídeos sintéticos individuais 1 - 9 como antígeno de captura.

### 2.4.2 Anticorpos peptídeo-específicos não alteram o perfil de neutralização de ZIKV

Os ensaios de soro-neutralização para ZIKV utilizando soros de pacientes de dengue, mostrou que estes soros, em sua maioria, apresentam significativa atividade neutralizante porém, em menor título quando comparado a soros de pacientes convalescentes de ZIKV (**Figura 14A**). Para avaliar propriedades funcionais relacionadas ao peptídeos, selecionamos as 8 amostras que tiveram maior atividade de neutralização cruzada contra ZIKV e fizemos um ensaio de depleção de anticorpos peptídeo-específicos, reduzindo o sinal de detecção de anticorpo entre 60 a 95%, após 22 rodadas de depleção (**Figura 14B**). Curiosamente, não observamos mudanças significativas nos níveis de neutralização antes ou após a depleção dos anticorpos específicos (**Figura 14C**).



Figura 14. Atividades neutralizantes e depleção funcional de anticorpos anti-DENV. A) O ensaio de neutralização cruzada foi conduzido para avaliar a neutralização homóloga e heteróloga de ZIKV usando soros de pacientes com ZIKV ou DENV. Comparações estatísticas múltiplas foram realizadas por *one-way* ANOVA com teste post-hoc Tukey (\* P <0,05; \*\*\*\* P <0,0001). B) A depleção por afinidade de anticorpos aos peptídeos foi realizada em oito das amostras de soros. C) A atividade neutralizante foi medida em soros depletados e não depletados. Teste t de student pareado foi realizado entre o grupo não depletado e o depletadoo. AUC = área sob a curva; n.s. = não estatisticamente significativo.

#### 2.4.3 Anticorpos peptídeo-específicos alteram o perfil de ADE para ZIKV

Avaliamos por citometria de fluxo a potencial atividade de ADE cruzada para ZIKV dos soros de convalescentes de DENV (**Figura 15A**). Observamos que 70% das amostras séricas (n = 30/42) elevaram em pelo menos 10 vezes os níveis de infecção por ZIKV (**Figura 15B**). Para avaliar a possível associação do ADE com alguns peptídeos, selecionamos amostras que exibiram diferentes graus de ADE para ZIKV e nelas fizemos a depleção peptídeo-específica

dos anticorpos. Observamos que, após a depleção seletiva, todas as amostras selecionadas tiveram reduzidos seus níveis de ADE para ZIKV (6% - 44%) (**Figura 15C**). Ao correlacionar os níveis de detecção individual dos peptídeos por ELISA com amostras que apresentaram os maiores níveis de ADE, observamos correlação positiva ( $R^2 > 0,46$ ) para os peptídeos 6, 7 e 9 (**Figura 15D**).



Figura 15. Ensaio *in vitro* de aumento da infecciosidade dependente de anticorpos (ADE) de ZIKV foram conduzidos com soros DENV. A) Estratégia de *gating* usada para identificar células infectadas com ZIKV. B) O aumento da infecção foi determinado usando células com receptor de Fc (K-562) por um ensaio baseado em citometria de fluxo com ZIKV e soro de pacientes infectados com DENV (n = 42) e contoles negativos (n = 9). Oito amostras de soro de DENV que exibiram atividade de ADE foram selecionadas para depleção por afinidade do peptídeo. Teste t não pareado foi realizado entre os grupos DENV e controle. \* P <0,05. C) A atividade de ADE foi avaliadas em soros de DENV depletados e não depletados com os peptídeos. Teste t pareado foi realizado entre o grupo não depletado e depletado. \* P <0,05. D) Correlação positiva entre a indução de ADE e a detecção de anticorpos IgG com os peptídeos 6, 7 e 9. A regressão linear foi gerada com intervalo de confiança de 95% (\*, P <0,01; \*\* P <0,05). AUC = área sob a curva; ADE = aumento dependente de anticorpos.

# 2.5 DISCUSSÃO

A tecnologia de microarranjo de peptídeos é uma metodologia útil para mapeamento de epítopos proteicos virais lineares. Usamos essa abordagem para avaliar a reatividade cruzada de anticorpos IgG anti-DENV contra a proteína E do ZIKV e observamos detecção para

diversos peptídeos presentes em toda a proteína E de ZIKV. Selecionamos 9 peptídeos de ZIKV reconhecidos de forma cruzada pelos soros anti-DENV e que poderiam ser relevantes para a patogênese viral. Estes peptídeos apresentaram elevada frequência de detecção e diferentes níveis de conservação de aminoácidos, quando comparados aos peptídeos correspondentes na proteína E de DENV 1-4. Além disso, tais peptídeos também apresentaram exposição na superfície da proteína E, sendo correspondente aos 3 diferentes domínios (DI, DII e DIII).

O DI é dividido em três segmentos, que são responsáveis por estabilizar a orientação geral da proteína E [118]. Devido à falta de atividades biológicas associadas ao DI, a atribuição de epítopos a este domínio pode ser difícil e estudos anteriores sugerem que o DI é predominantemente composto por epítopos não neutralizantes [119, 120]. No presente estudo, identificamos 3 peptídeos no DI da proteína E (peps 1, 2 e 4) de ZIKV. A maioria dos nossos soros anti-DENV foi capaz de reagir com os peptídeos 1, 2 e 4, de ZIKV exibindo, também, reações positivas no ELISA.

O DII de E é dividido em 2 segmentos envolvidos na estabilização estrutural da proteína E, e que também, contém o peptídeo de fusão, responsável por mediar a fusão da membrana viral à célula hospedeira, uma etapa crucial durante a infecção viral [121]. Acredita-se que no DII esteja o principal grupo de epítopos que apresentam reatividades cruzadas com anticorpos de outras espécies de flavivírus [98, 122]. No presente estudo, identificamos 2 peptídeos de interesse localizados em DII (peps 3 e 5) de ZIKV, que reagiram de forma cruzada com anticorpos anti-DENV sendo portanto, possivelmente, gênero ou grupo-específicos. Curiosamente, o peptídeo 3, se sobrepõe parcialmente a um peptídeo descrito anteriormente na proteína E do ZIKV como indutor de altos níveis de detecção homóloga e reatividade cruzada com IgG anti-DENV [113].

O DIII consiste em um único segmento que é dobrado de forma semelhante à imunoglobulina (*immunogloblulin-like*). O DIII interage com o receptor celular na ligação envelope-membrana, que inicia a infecção viral [96]. Dentre os domínios de E, DIII é o menos conservado contendo regiões altamente variáveis e importantes epítopos antigênicos reconhecidos por potentes anticorpos neutralizantes [123, 124]. Com base na reação de anticorpos anti-DENV, identificamos 4 peptídeos no DIII de ZIKV (peps 6, 7, 8 e 9). Peptídeos correspondentes a estes, na proteína E de DENV e WNV, foram descritos por reagirem fortemente com anticorpos homólogos, indicando serem regiões antigênicas imunodominantes dos flavivírus [110, 113, 125-127]. Além disso, os peptídeos correspondentes à região

equivalente do peptídeo 6, em DENV 1-4, já foram usados na construção de uma proteína quimérica, capaz de induzir anticorpos neutralizantes para DENV-2 e DENV-3 em camundongos imunizados e indicando propriedades protetoras dos anticorpos contra esta região [128].

Os soros de convalescentes de DENV permitiram identificar reatividade com os 9 peptídeos selecionados e estas reatividades foram avaliadas individualmente por ELISA, exibindo reações indicativas de reconhecimento variáveis, de baixo a moderado. Quanto à soroneutralização cruzada das amostras anti-DENV contra a infecção por ZIKV, mas mostraram-se inferiores às de convalescentes de ZIKV. Para avaliar as propriedades funcionais dos anticorpos anti-DENV que reconhecem os 9 peptídeos da E de ZIKV, selecionamos amostras com maiores níveis de neutralização cruzada e depletamos seletivamente os anticorpos com afinidade para os 9 referidos peptídeos. Observamos que os soros, após depleção dos anticorpos, não perderam significantemente suas capacidades soro-neutralizantes, sugerindo que anticorpos que reconhecem os 9 peptídeos selecionados não relacionam-se com a neutralização cruzada de ZIKV. A abordagem, utilizando a plataforma de microarranjo de peptídeos, fornece uma estratégia de mapeamento para identificação de epítopos lineares com a limitação de não mapear os epítopos conformacionais descontínuos. Isto é relevante porque os mais potentes anticorpos neutralizantes em pacientes com DENV reconhecem epítopos conformacionais descontínuos na proteína E [129-131]. Provavelmente por isso não observamos mudanças significativas na atividade de neutralização contra ZIKV após a depleção seletiva dos soros com anticorpos anti-DENV, corroborando que os peptídeos lineares selecionados não induziriam anticorpos neutralizantes.

Quanto às propriedades de ADE dos anticorpos anti-DENV na infecção por ZIKV, estas foram avaliadas por ensaio utilizando células que possuem receptores de anticorpos (Fc gama). Observamos que a maioria de nossas amostras de DENV foram capazes de aumentar significativamente a infecção por ZIKV quando comparadas aos controles negativos. Estes achados nos levaram a selecionar 8 soros anti-DENV que apresentaram níveis variáveis de ADE para ZIKV e realizamos a depleção de anticorpos por afinidade aos peptídeos. Curiosamente, todas as amostras de soro depletadas tiveram significantemente reduzida a atividade de ADE quando comparadas aos mesmos soros não depletados. Este resultado sugere que anticorpos capazes de reconhecer tais peptídeos poderiam estar potencialmente envolvidos no desenvolvimento de ADE para ZIKV. Sabe-se que anticorpos anti-DENV direcionados a epítopos presentes na região do peptídeo de fusão no DII da proteína E do ZIKV, são capazes

de aumentar a infecção viral por ADE [101]. No entanto, não existem estudos relacionando anticorpos direcionados a peptídeos lineares como mediadores de ADE para qualquer flavivírus. Futuros estudos com anticorpos monoclonais direcionados a esses peptídeos podem elucidar o potencial de anticorpos contra estes epítopos no desenvolvimento de ADE para ZIKV.

Nossos resultados fornecem informações inéditas sobre peptídeos lineares imunodominantes de ZIKV reconhecidos por anticorpos anti-DENV, que podem auxiliar no desenvolvimento de ensaios sorológicos específicos, estudos de patogênese viral e no desenvolvimento de futuros candidatos vacinais.

### 2.6 CONCLUSÕES

 Avaliando a reatividade cruzada de anticorpos IgG anti-DENV contra a proteína E do ZIKV, com base na alta frequência de reações positivas, foi possível selecionar 9 peptídeos lineares da proteína E de ZIKV que poderiam ser relevantes para a patogênese viral.

- Dos 9 peptídeos lineares de ZIKV selecionados, 3 pertencem ao DI da proteína E, 2 localizados em DII, sendo supostamente gênero ou grupo-específicos e 4 peptídeos no DIII, correspondendo, provavelmente, a regiões antigênicas imunodominantes dos flavivirus.

 Observou-se soro-neutralização cruzada dos soros de pacientes convalescentes de DENV contra a infecção por ZIKV e provavelmente, esta propriedade não é relacionada a reação contra os 9 peptídeos lineares selecionados.

- A maioria dos soros de pacientes convalescentes de DENV exibiram ADE, potencializando a infecção por ZIKV e 8 destes, ao terem os anticorpos depletados por afinidade aos 9 peptídeos selecionados, reduziram sua atividade, sugerindo que anticorpos contra tais peptídeos podem estar envolvidos no ADE para ZIKV.

# 3. PARTE III: AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE APÓS VACINAÇÃO COM SARS-COV-2 INATIVADO

# 3.1 INTRODUÇÃO

O vírus da síndrome respiratória aguda grave Coronavírus-2 (SARS-CoV-2) surgiu no final de 2019 em Wuhan, China [132]. O SARS-CoV-2 é o agente causador da pandemia da doença Coronavírus 2019 (COVID-19), uma doença respiratória humana caracterizada por tosse seca, dor de cabeça, febre e, pneumonia grave que pode evoluir rapidamente com insuficiência respiratória e levar à morte [133]. Até o momento, o SARS-CoV-2 infectou mais de 250 milhões de pessoas em todo o mundo, resultando em mais de 5 milhões de mortes, o que faz deste patógeno uma das espécies de coronavírus mais ameaçadoras [134]. O SARS-CoV-2 pertence ao gênero *Betacoronavirus* da família *Coronaviridae*. Possuí um RNA genômico de fita simples de sentido positivo que codifica 4 proteínas estruturais [Espícula (S), envelope (E), membrana (M) e nucleocapsídeo (N)], 16 proteínas não estruturais (nsp1 à nsp16) e várias proteínas acessórias [135]. Entre essas proteínas, a proteína S é o principal antígeno empregado no desenvolvimento de vacinas [136-138].

Atualmente, várias vacinas estão sendo usadas para prevenir a COVID-19, incluindo formulações baseadas em DNA e RNA, subunidades contendo epítopos virais, vetores baseados em adenovírus e vírus inteiros inativados [139]. Entre essas plataformas, as vacinas de vírus inativados são geralmente seguras e têm sido classicamente usadas para prevenir infecções virais, tais como aquelas pelos vírus da influenza e da poliomielite [140, 141]. Vários estudos descreveram a eficácia da imunização pela vacina de SARS-CoV-2 inativado em ensaios com seres humanos [142-146]. Sua segurança, tolerabilidade e imunogenicidade foram avaliadas em diferentes coortes humanas [144, 147-150]. Atualmente, uma vacinação em grande escala está ocorrendo em todo o mundo utilizando a Coronavac (*Sinovac Life Sciences*, China), que utilizada p vírus SARS-CoV-2 inativado [151, 152]. No entanto, a evolução do SARS-CoV-2 tem mostrado mutações que podem levar ao surgimento de variantes, com diferenças pequenas nas características virais mas que podem comprometer a resposta imunológica e a eficácia da vacinação em uma população, representando preocupação crescente para o sistema de saúde [153].

Acredita-se que a variante Gamma (linhagem P.1) do SARS-CoV-2 surgiu em Manaus (Brasil) em novembro de 2020 e desde então se tornou predominante no país [154]. Por outro lado, a variante Zeta (linhagem P.2) foi identificada em amostras coletadas entre abril e novembro de 2020 no estado do Rio de Janeiro (Brasil) e mostrou-se uma variante de interesse

[155]. É importante ressaltar que embora ambas as linhagens P.1 (variante 20J/501Y.V3) e P.2 (variante 20J) sejam descendentes da linhagem B.1.28 e compartilhem a mutação E484K, as duas variantes surgiram independentemente em diferentes contextos epidemiológicos [155]. Uma das hipóteses para o aumento abrupto no número de internações hospitalares por COVID-19 no início de 2021 no Brasil é atribuída à evasão imunológica por essas novas variantes [9]. Um estudo mostrou que a linhagem P.1 adquiriu 17 mutações, incluindo K417T, E484K e N501Y na proteína Spike, e estas mutações foram associadas a maior infectividade e transmissibilidade [154]. Comparativamente, a linhagem P.2 exibe apenas a mutação E484K [155]. Muitos estudos descreveram que as mutações presentes nas variantes do SARS-CoV-2, incluindo Gamma e Zeta, são responsáveis por conferir resistência contra anticorpos neutralizantes em indivíduos que foram vacinados por ChAdOx1 (vetor de adenovírus), mRNA-1273 e BNT162b2 (mRNA) ou a CoronaVac [156-160]. Além disso, estudos que investigam a resposta imune celular demonstraram que a ativação de células T em indivíduos vacinados por vacinas de mRNA (Moderna ou Pfizer/BioNTech) não é significativamente afetada por mutações encontradas nas variantes Alfa (B.1.1.7 Reino Unido), Beta (B.1.351 África do Sul), Gamma e Epilson (B.1.427 Califórnia) [161, 162]. Em contraste, outro estudo em indivíduos vacinados com BNT162b2, mostrou que a resposta das células T contra as variantes do SARS-CoV-2 pode ser aumentada, anulada ou inalterada dependendo dos polimorfismos HLA do hospedeiro [163]. De qualquer maneira, os impactos clínicos da resistência do SARS-CoV-2 à neutralização ou alterações na resposta imune celular em indivíduos vacinados não são totalmente compreendidos.

A patogênese do SARS-CoV-2 foi avaliada usando-se vários modelos animais diferentes, tais como camundongos, hamsters sírios, furões e primatas não humanos [164]. Todas essas espécies são suscetíveis à infecção pelo vírus SARS-CoV-2, exceto camundongos. Hamsters, furões e primatas não humanos desenvolvem doenças leves e se recuperam espontaneamente [165]. O camundongo poderia ser adequado para avaliação preliminar de vacinas e agentes terapêuticos para COVID-19, mas as cepas comuns de camundongos de laboratório não são prontamente infectadas por SARS-CoV-2, pela baixa compatibilidade nas interações de ligação entre o receptor ACE2 murino com a proteína S, o ligante viral [166]. No entanto, observou-se que as variantes do SARS-CoV-2 Beta e Gamma são capazes de infectar camundongos de laboratório comuns, levando ao aumento da carga viral pulmonar e a lesões pulmonares moderadas [167, 168]. Esta adaptação viral é parcialmente atribuída a mudanças em resíduos-chave no domínio de ligação do receptor (RBD) da proteína S, incluindo N501Y,

que também está presente em uma linhagem de SARS-CoV-2 adaptada para camundongos [169].

Considerando que a proteção cruzada conferida pela vacinação com SARS-CoV-2 inativado contra as variantes Gamma ou Zeta usando modelo murino não foi avaliada, investigamos a produção de anticorpos anti-SARS-CoV-2 em indivíduos vacinados com a vacina CoronaVac (Sinovac Life Sciences), ao longo de 1, 3 e 6 meses após a segunda dose. Além disso, estabelecemos um modelo animal para avaliar a resposta imune protetora induzida pela imunização com SARSC-CoV-2 inativado contra variantes Gama e Zeta, avaliando a produção de anticorpos, carga viral pulmonar, expressão de citocinas inflamatórias, análise histopatológica e soro neutralização viral.

## **3.2 OBJETIVOS**

#### 3.2.1 Objetivo Geral

Avaliar a eficácia da vacinação por vírus inativado de SARS-CoV-2 contra as variantes brasileiras Gamma e Zeta

# 3.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a produção de anticorpos em seres humanos vacinados com a CoronaVac 1, 3 e 6 meses após terem recebido a segunda dose;
- Avaliar a proteção em camundongos imunizados com SARS-CoV-2 inativado quando desafiados com as variantes Gamma e Zeta;
- Avaliar a produção de anticorpos em animais vacinados antes e após infecção com as variantes Gamma e Zeta do SARS-CoV2;

# **3.3 MATERIAIS E MÉTODOS**

3.3.1 Declarações éticas

Camundongos fêmeas C57BL/6 com seis semanas de idade foram usados para as imunizações. Os animais foram criados e mantidos em condições livres de patógenos específicos no biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os procedimentos envolvendo o cuidado animal seguiram os princípios éticos da pesquisa animal e foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (protocolo CEUA 101/2021). Os experimentos envolvendo amostras humanas foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (protocolo CEP 2021/4.545.390). Todos os participantes forneceram consentimento informado por escrito antes da inclusão no estudo, e todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as boas práticas clínicas da coleta de dados clínicos.

#### 3.3.2 Amostras humanas

Amostras de sangue foram coletadas de indivíduos voluntários saudáveis que foram vacinados com a CoronaVac (Sinovac Life Sciences, China). Os critérios de elegibilidade incluíram idade mínima de 18 anos, ausência de histórico de COVID-19 e vacinação com CoronaVac. Os voluntários foram recrutados no Centro de Pesquisa em Virologia e no Hospital das Clínicas, ambos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP. A coorte (n = 10) foi composta por pesquisadores e profissionais da área médica com idades de 29 a 64 anos (média de 44), sendo 6 homens e 4 mulheres (**Fig. 11A**). As amostras foram coletadas antes da primeira dose e 1, 3 e 6 meses após a segunda dose.

#### 3.3.3 Linhagens de células e Vírus

Três linhagens diferentes de SARS-CoV-2 foram usadas neste estudo, o WT (Wuhan-Hu-1) (acesso Genbank MT126808.1), Gamma (P.1) (GISAID: EPI\_ISL\_2499748) e Zeta (P.2) (GISAID: EPI\_ISL\_770561), todos isolados de pacientes no Brasil [154, 170]. Os estoques virais foram propagados em células Vero E6 (ATCC CRL-1586) cultivadas com meio modificado 1% Eagle Dulbecco (DMEM, Vitrocell, Brasil) contendo de penicilina/estreptomicina e 2% de FBS e mantidas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após 3 dias da infecção, o sobrenadante da cultura celular foi coletado, clarificado por centrifugação em baixa velocidade (300xg por 10 min) e armazenado a -80 °C. Títulos virais foram quantificados por ensaio de placa, conforme descrito anteriormente [170].

#### 3.3.4 Preparo de SARS-CoV-2 inativado

Para a imunização, o vírus WT de SARS-CoV-2 inativado foi preparado como previamente descrito em outro estudo [171]. Resumidamente, células Vero E6 foram propagadas em frasco T-150, o sobrenadante da cultura celular foi removido e, em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS e inoculadas com vírus WT de SARS-CoV-2, incubando-se por 1h sob agitação suave para permitir a adsorção viral. Como controle negativo (Mock), apenas meio de cultura foi usado. Após a incubação, DMEM com 2% de FBS foi adicionado e as células foram incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> até o surgimento de efeitos citopáticos (>50%). O sobrenadante da cultura celular foi coletado e clarificado por centrifugação em baixa velocidade e o sobrenadante incubado com β-propiolactona (Sigma, EUA) a 0,05% (v/v) durante 20h a 4°C sob agitação suave para permitir a inativação viral. A solução foi ultracentrifugada a 170.000xg por 1h e 1h e o precipitado viral foi ressuspenso em 2ml de PBS. Para hidrolisar a  $\beta$ -propiolactona residual, a solução de vírus inativado foi incubada por 2h a 37°C em banho-maria. Para a estimulação celular in vitro, as partículas virais do sobrenadante da cultura de células foram inativadas por calor incubando-se a 60°C por 2h em banho-maria. A concentração de proteínas foi determinada por ensaio de Bradford usandose Quick Start Bradford Dye Reagent (Biorad, EUA) e as amostras foram mantidas a -80°C até o uso. Para avaliar a inativação viral, as amostras foram inoculadas em células Vero E6, incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> e monitoradas diariamente para visualização de efeitos citopáticos.

### 3.3.5 Imunização de camundongos, desafio viral e coleta de amostras

Os camundongos foram imunizados 2 vezes por via intramuscular, 0 e 14 dias com  $10^5$  PFUs de SARS-CoV-2 inativado ou com *Mock*, ambos acrescidos de 30% (v/v) de adjuvante hidróxido de alumínio. Amostras de sangue dos animais foram coletadas pela veia facial 14 e 28 dias após a imunização. O sangue foi centrifugado e o soro coletado para avaliação da resposta imune humoral. Para análise da resposta imune celular, os baços dos camundongos foram coletados após 28 dias da imunização e estimulados *in vitro*. Para a infecção viral, camundongos imunizados foram inoculados pela via intranasal com 7x10<sup>4</sup> PFUs de SARS-CoV-2, Gamma ou Zeta após 28 dias da imunização inicial. Três dias após o desafio viral, amostras de sangue foram coletadas para quantificação de anticorpos e ensaios de soro neutralização. Os camundongos foram sacrificados e os pulmões coletados para análise. O lobo

superior direito foi suavemente perfundido com solução de formaldeído a 10% (v/v) e mantido na mesma solução por 7 dias, sendo submetido ao processador PT05 TS automatizado (Lupetec, Reino Unido). O tecido embebido em parafina foi seccionado em 4 µm de espessura e corado com corante de H&E para análise histopatológica. O pulmão esquerdo foi coletado em meio RPMI completo e processado para citometria de fluxo. Os lobos médio e inferior direito foram pesados e homogeneizados em PBS (1:5 m/v) usando uma esfera de aço inoxidável de 5 mm (Qiagen, EUA) e *TissueLyser LT* (Qiagen, EUA), a 50 Hz, por 5 min, sendo centrifugado a 10.000xg por 10 min e o sobrenadante coletado e utilizado para medição da carga viral por ensaio de placas e qRT-PCR e também, para quantificação de citocinas.

#### 3.3.6 Quantificação viral por ensaio de Plaques virais

O ensaio de quantificação viral de SARS-CoV-2 foi feito como previamente descrito no item 1.3.7, com pequenas modificações. Ao invés de células Vero, utilizaram-se as células Vero E6. A incubação para formação dos *plaques* virais de SARS-CoV-2 ocorreu durante 5 dias a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

## 3.3.7 Quantificação do genoma de SARS-CoV-2 por qRT-PCR

O RNA foi extraído das amostras contendo 20mg de homogenado pulmonar com TRIzol® (Thermo, EUA) conforme recomendação do fabricante. Para a qRT-PCR utilizou-see o kit TaqMan® Fast Virus 1-Step Mix (Applied Biosystems, EUA) segundo as recomendações do fabricante. Os primers e a sonda SARS-CoV-2 foram desenhados baseando-se em protocolo relatado anteriormente [172], tendo como alvo região com 100 pb do gene da polimerase de RNA dependente de RNA (RdRp) que se alinha com as três variantes do SARS-CoV-2 5 '\_ GTGAAATGGTCATGTGTGGCGG \_ 3'; Reverso: 5 '\_ (Forward: CAAATGTTAAAAAACACTATTAGCATA 3' Sonda: '5 -FAM \_ e а CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC - BHQ1-3 '). As reações ocorreram em sistema StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biossystems, EUA). Cada amostra foi analisada em duplicata e os resultados foram comparados com os de uma curva padrão usando estoques virais com títulos conhecidos em PFU/ml.
### 3.3.8 Ensaio de neutralização por redução de plaques virais

Este ensaio foi realizado como descrito no item 1.3.8, com pequenas modificações. Utilizaram-se células da linhagem Vero E6. As diluições de soro utilizadas foram de 1:5 à 1:160 para amostras humanas ou 1:10 a 1: 320 para amostras de camundongos. Para permitir a formação dos *plaques* virais, asplacas foram incubadas durante 4 dias (WT) ou 5 dias (variantes Gamma e Zeta) a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.3.9 Quantificação de anticorpos por ELISA

A produção de anticorpos contra o SARS-CoV-2 foi analisada em ELISA indireto utilizando as proteínas recombinantes S e N como antígenos. As placas foram sensibilizadas com as proteínas, incubando-se 50µl de proteína S ou N diluída a 4µg/mL em solução tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 (Sigma, EUA), a 4°C, durante uma noite. No dia seguinte, as placas foram bloqueadas com solução tampão de bloqueio (PBS-T com albumina de soro bovino a 2% [m/v]), por 2h, a 37 ° C. Em seguida, diluições seriadas das amostras de soro (de 1:50 a 1: 400) foram adicionadas em duplicata e incubadas por 1h a 37 °C. Em seguida, as placas foram incubadas por 1h, a 37 °C, com anticorpo secundário anti-IgG ou anti-IgM humano (Sigma, EUA) ou anti-IgG ou anti-IgM de camundongo (Sigma, EUA) conjugado a peroxidase (HRP), e reveladas com solução TMB (KPL, EUA). A reação foi interrompida pela adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M e a leitura realizada a 450/620ηm em leitor de microplacas *Multiscan MMC/340* (Titertek, Alemanha). A área sobre a curva (AUC) foi calculada usando-se *Prism v.8.0.2* (GraphPad, EUA).

#### 3.3.10 Quantificação de citocinas do pulmão de camundongos

O perfil de citocinas foi analisado nos pulmões de camundongos, no terceiro dia após a infecção com as três linhagens de vírus usando o kit *Cytometric Bead Array* (CBA) *Mouse Th1* / *Th2* / *Th17 Cytokine* (BD Biosciences, EUA). Os procedimentos foram feitos segundo as instruções do fabricante e os resultados foram lidos no equipamento BD FACSCanto (BD Biosciences, EUA) e analisados no FCAP Array v3.0 (BD Biosciences, EUA).

### 3.3.11 Ensaio de linfoproliferação

Baços de camundongos C57BL/6 foram coletados 28 dias após a imunização e processados para ensaio de linfoproliferação. Em resumo,  $2x10^5$  células foram estimuladas com 10 µg de antígenos virais inativados durante 5 dias a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Como controle positivo fitohemaglutinina (Vitrocell, Brasil) foi usada e a linfoproliferação utilizou o kit *CellTiter-Glo* (Promega, EUA) seguindo recomendações do fabricante. O sinal de luminescência foi normalizado com o sinal *Mock* e subsequentemente, o sinal do grupo imunizado foi normalizado com aquele obtido com o grupo não imunizado.

### 3.3.12 Análises estatísticas

Fez-se a análise estatística com auxílio do programa *GraphPad Prism* v.8.0.2 (GraphPad, EUA). O teste de Grubb foi aplicado para detectar e remover possíveis *outliers* e o teste de Kolmogorov-Smirnoff foi usado para verificar a distribuição dos dados. Para a comparação entre dois grupos distintos usou-se teste t de Student bicaudal não pareado, com um intervalo de confiança de 95%. Para comparações de múltiplos grupos, usou-se análise de variância (ANOVA) unilateral ou bidirecional, seguida do teste *post-hoc* especificado nas legendas de cada figura. Diferenças foram consideradas significantes quando o valor de p<0,05.

### **3.4 RESULTADOS**

3.4.1 Indivíduos vacinados com CoronaVac produzem anticorpos reativos contra SARS-CoV-2 incluindo as variantes Gamma e Zeta

Para avaliar a resposta imune pós-vacinação com SARS-CoV-2 inativado, amostras de sangue foram coletadas de indivíduos antes da vacinação e 1, 3 e 6 meses após a segunda dose da vacina CoronaVac (Sinovac, China) (**Fig 16A**). A detecção de anticorpos IgM aumentou após a vacinação inicial e não apresentou alterações significativas após 6 meses (**Fig. 16B**). Uma clara produção de IgG anti-S foi observada após 1 mês da vacinação, no entanto, uma diminuição de 1,5 e 5 vezes nos níveis de IgG foi observada após 3 e 6 meses, respectivamente (**Fig 16C**). Não observou-se produção de anticorpos IgM e IgG contra proteína após a vacinação

(dados não mostrados). Uma redução significativa na capacidade neutralizante para variantes Gama e Zeta do SARS-CoV-2 foi observada 1, 3 e 6 meses após a vacinação (**Fig. 17A - D**). Nossos resultados mostram que a vacinação com Coronavac (SARS-CoV-2 inativado) induz produção de anticorpos IgM e IgG S-específicos, mas ocorre significativo decaimento de seus teores após 6 meses, especialmente nos títulos de neutralização contra as variantes Gama e Zeta.



Figura 16. Momentos de coleta de amostra de sangue e produção de anticorpos em indivíduos vacinados com CoronaVac. (A) Representação esquemática da coorte estabelecida e da coleta de amostras. (B e C) Gráficos de violino mostrando os níveis de IgM e IgG anti-S de indivíduos vacinados antes da vacinação e após 1, 3 e 6 meses da segunda dose. As comparações múltiplas foram realizadas por *one-way* ANOVA com teste post-hoc de Tukey. \* p < 0,005; \*\* p < 0,001; \*\*\*\* p < 0,0001. AUC = área sob a curva; n.s. = não estatisticamente significativo; IgG = Imunoglobulina G.



**Figura 17. Atividade neutralizante de soros de indivíduos vacinados com CoranaVac.** Diluições seriadas de amostras de soro foram preparadas e a atividade de neutralização foi avaliada contra (A) WT SARS-CoV-2, variantes (B) Gamma e (C) Zeta após 1, 3 e 6 meses da segunda dose. Curvas de regressão não linear foram geradas com um máximo de 1.000 interações e intervalo de confiança de 95%. As barras de erro foram delimitadas por cores. As comparações múltiplas foram realizadas por *two-way* ANOVA seguida por teste de Sidak. Os asteriscos indicam diferença significativa em comparação com o grupo de 1 mês. \* p <0,05; \*\* p <0,001; \*\*\*\* p <0,0001. (D) Títulos neutralizantes de PRNT<sub>50</sub> contra WT SARS-CoV-2, Gamma e Zeta usando soros de indivíduos vacinados coletados em diferentes tempos, indicados pelas cores roxa (1 mês), turquesa (3 meses) e vermelho (6 meses). As comparações múltiplas foram realizadas por *one-way* ANOVA seguida por teste de Tukey. \*\* p <0,05. PRNT<sub>50</sub> = teste de neutralização por redução de placa com *cutoff* de 50%; n.s. = não estatisticamente significativo; LOD = limite de detecção.

3.4.2 Imunização de camundongos com SARS-CoV-2 inativado induz resposta imune contra as variantes Gamma e Zeta

Para avaliar a capacidade imunogênica da vacinação com SARS-CoV-2 inativado, utilizamos camundongos C57BL/6 submetidos a 2 imunizações. Em seguida amostras de sangue, baço e pulmão foram coletadas antes e depois o desafio viral com SARS-CoV-2 e com

as variantes Gamma e Zeta (**Fig. 18A**). Observamos um aumento de 10 e 30 vezes na produção de IgG contra a proteína S, 14 e 28 dias após a imunização, respectivamente. Entretanto, não detectamos anticorpos para a proteína N (**Fig. 18B**). Também, observamos linfoproliferação elevada de células esplênicas dos camundongos imunizados 5 dias após estímulo com antígenos de SARS-CoV-2 das linhagens WT, Gamma e Zeta, sem diferença significativa de proliferação entre as linhagens (**Fig. 18C**). Estes resultados indicam que a imunização com SARS-CoV-2 inativado induz robusta produção de anticorpos anti-S e também uma resposta celular com reatividade contra as variantes Gamma e Zeta.



**Figura 18. Imunização de camundongos, produção de anticorpos e resposta imune celular.** (A) Camundongos C57BL/6 foram imunizados por via intramuscular com WT SARS-CoV-2 inativado nos dias 0 e 14, e infectados via intranasal com  $7x10^4$  PFU (WT / Gamma / Zeta) no dia 28. Amostras de soro foram coletadas após a imunização nos dias 14 e 28, e também 3 dias após a infecção. Os órgãos do baço foram coletados no dia 28 e

usados para o ensaio de linfoproliferação. Três dias após a infecção, os camundongos foram sacrificados e os pulmões coletados para análise. (B) Produção de anticorpos IgM e IgG anti-N e anti-S após 14 e 28 dias da imunização inicial detectada por ELISA indireto. A AUC de camundongos imunizados foi normalizada com AUC dos mesmos camundongos antes da infecção. (C) O ensaio de linfoproliferação foi realizado com esplenócitos de camundongos imunizados e não imunizados estimulados por 5 dias com 10 $\mu$ g de antígenos virais inativados da linhagem do vírus WT SARS-CoV-2, Gamma ou Zeta. A análise estatística foi conduzida por *one-way* ANOVA seguida por teste de Tukey. n.s. = não estatisticamente significativo; AUC = área sob a curva; IgM = Imunoglobulina M; IgG = Imunoglobulina G.

3.4.3 Imunização com SARS-CoV-2 inativado reduz a carga viral e citocinas pró-inflamatórias no pulmão de animais infectados com as variantes Gamma e Zeta

Avaliamos a secreção de mediadores imunológicos e a proteção imune após a imunização de camundongos C57BL/6 com SARS-CoV-2 inativado e a infecção com as variantes Gamma e Zeta. Os níveis de RNA viral quantificados por qRT-PCR nos camundongos imunizados foram praticamente indetectáveis nos pulmões de animais infectados com SARS-CoV-2 WT. Não se observaram alterações significativas entre os grupos dos animais imunizados ou não imunizados e infectados com as variantes Gamma ou Zeta (Fig. 19A). No entanto, a carga viral nos pulmões dos camundongos foi significativamente reduzida nos animais imunizados e infectados com as variantes Gamma ou Zeta (Fig. 19B). Observamos que a produção de IL-6 em camundongos imunizados foi reduzida a níveis quase indetectáveis após desafio com a linhagem WT e duplamente reduzida nos animais infectados com a variante Gamma do SARS-CoV-2. A infecção com a variante Zeta induziu pouca e similar produção de IL-6 entre os animais imunizados e não imunizados (Fig. 19C). A produção de TNF em camundongos imunizados foi reduzida em 10 vezes após a infecção com SARS-CoV-2 WT ou a variante Zeta. Alterações significativas não foram observadas entre camundongos imunizados ou não imunizados após infecção com a variante Gamma (Fig. 19D). Os níveis de IL-10, IL-4, IL-2, IL-17 e IFN-γ mostraram-se abaixo dos limites de detecção (dados não mostrados).



Figura 19. Cargas virais e produção de citocinas em pulmões de camundongos imunizados e não imunizados após infecção com WT SARS-CoV-2, e com as variantes Gamma ou Zeta. Três dias após a infecção viral, o pulmão esquerdo foi pesado, homogeneizado e o sobrenadante utilizado para determinação da carga viral por (A) qRT-PCR e (B) PFU. Além disso, a produção das citocinas (C) IL-6 e (D) TNF- $\alpha$  foram avaliadas. O número de camundongos por grupo é indicado por círculos. O teste t de student não pareado foi realizado entre grupos infectados com a mesma linhagem viral. \* p <0,05; \*\* p <0,01; \*\*\*\* p <0,0001). LOD = Limite de detecção; qRT-PCR = reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real; PFU = unidade formadora de placa; g = grama de tecido; n.s. = não estatisticamente significativo.

3.4.4 A imunização com SARS-CoV-2 inativado reduz o dano pulmonar após a infecção com as variantes Gamma e Zeta

Os camundongos infectados com SARS-CoV-2 apresentaram lesões histopatológicas caracterizadas por leve congestão e infiltrado inflamatório misto moderado (células mononucleares e poucos neutrófilos) nos pulmões sem diferença entre os que foram ou não imunizados (**Fig. 20A**). Porém, camundongos não imunizados quando infectados com a variante Gama do SARS-CoV-2 lesões mais evidentes, caracterizadas por espessamento alveolar difuso com infiltrado inflamatório misto moderado o que diferiu nos animais imunizados, que apresentaram apenas leve infiltrado inflamatório peribroncovascular.

Também, os animais não imunizados, quando infectados pela variante Zeta tiveram redução no infiltrado inflamatório no septo alveolar, mais evidente em área peribroncovascular, enquanto que os camundongos imunizados tiveram nítida redução do foco inflamatório. Os animais controle apresentaram arquitetura pulmonar preservada. Nenhuma mudança significativa foi observada nos pulmões de camundongos imunizados ou não, com 3 dias de infecção, quanto a proporções das subpopulações de linfócitos T CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (**Fig. 20B**).



Figura 20. Histopatologia e análise de subpopulações de linfócitos T de pulmões de camundongos. Os pulmões de camundongos imunizados e não imunizados foram coletados após 3 dias de infecção. (A) O lobo superior direito foi processado e corado com H&E. (B) Os lobos médio e inferior foram coletados e avaliados quanto ao recrutamento de subpopulações de linfócitos T. n = 3 para grupos não imunizados e n = 5 para grupos imunizados. Setas pretas indicam infiltrados inflamatórios mistos. Barra de escala = 200  $\mu$ m. A análise estatística foi conduzida por *one-way* ANOVA seguida por teste de Tukey. n.s. = não estatisticamente significativo.

3.4.5 Produção de anticorpos e neutralização viral em animais infectado com as variantes Gamma e Zeta de SARS-CoV-2

Avaliamos a produção de IgG anti-S três dias após a infecção com SARS-CoV-2 WT e com as variantes Gamma ou Zeta em camundongos imunizados com o vírus inativado e não observamos diferenças significativas (**Fig.21A**). No entanto, a infecção viral induziu aumento dos títulos de soro neutralização para os três grupos de camundongos (**Fig. 21B**). Os soros de camundongos imunizados demostraram reduzida capacidade neutralizante contra a variante Gama quando comparada a linhagem WT (**Fig. 21C**). No entanto, 3 dias após a infecção viral, elevaram-se de forma similar os teores de anticorpos neutralizantes nos animais infectados com WT, Gamma ou Zeta (**Fig. 21D**). Estes resultados indicam que apesar dos teores de IgG anti-S nos animais imunizados com vírus inativado não se alterarem significantemente, com a infecção, a capacidade neutralizante destes anticorpos se eleva rapidamente, inclusive contra as variantes Gamma e Zeta.



Figura 21. Títulos de anticorpos e atividade de neutralização em camundongos imunizados com WT SARS-CoV-2 e infectados com diferentes linhagens. (A) Razão dos níveis de IgG anti-S de soros de camundongos imunizados após / antes da infecção viral com linhagens WT SARS-CoV-2, Gamma ou Zeta normalizadas. n = 5-6 animais / grupo (indicado na figura). As comparações múltiplas foram realizadas por *one-way* ANOVA seguida por teste de Tukey. (B) Títulos neutralizantes em PRNT<sub>50</sub> de soros de camundongos imunizados (n = 4) e não imunizados (n = 3) antes e após a infecção viral com WT SARS-CoV-2 (n = 6), Gama (n = 5) ou Zeta (n = 5). (C - D) Perfil de neutralização contra WT SARS-CoV-2, Gamma ou Zeta de soro camundongos imunizados antes (n = 4) e 3 dias após a infecção viral (n = 6). As curvas de regressão não linear foram geradas com no máximo 1.000 interações e intervalo de confiança de 95%. As barras de erro foram delimitadas por cores. As comparações múltiplas foram realizadas por *two-way* ANOVA seguida por teste de Tukey. \* p <0,05; \*\* p <0,001; \*\*\*\* p <0,0001. AUC = Área sob a curva; PRNT<sub>50</sub> = teste de neutralização por redução de placa com *cutoff* de 50%; LOD = limite de detecção; n.s. = não estatisticamente significativo.

### **3.5 DISCUSSÃO**

Nesta parte da tese, avaliamos a resposta imune após a imunização com a vacina Coronavac, uma vacina de SARS-CoV-2 inativado. Observamos que indivíduos vacinados com o SARS-CoV-2 inativado seroconvertem com altos teores de IgG anti-S após a segunda imunização. Esses resultados estão em concordância com o relatado em outros estudos [150]. Entretanto, os altos teores de anticorpos são transitórios e os níveis de IgG anti-SARS-CoV-2 decaem significantemente alguns meses após a vacinação. Acreditamos que isso se deva a resposta imune mais fraca produzida por uma vacina viral inativada que inclusive, pode perder parte de sua antigenicidade durante o processo de inativação. Estudo recente recomenda uma terceira dose de CoronaVac para renovar a eficiência da resposta imune contra SARS-CoV-2 [173]. Em concordância com esse estudo, mostramos que a atividade neutralizante de anticorpos contra SARS-CoV-2 é consideravelmente reduzida após 6 meses da tomada da 2ª dose de CoronaVac e esse padrão também foi observado nas infecções com as variantes Gamma e Zeta, tendo ocorrido redução significativa na capacidade neutralizante de anticorpos desde o primeiro mês após a vacinação, provavelmente devido à evasão imunológica descrita em outros estudos para a variante Gamma em infectados por SARS-CoV-2 ou vacinados com CoronaVac [158, 160].

Quanto a imunidade celular, observamos que o estímulo de células do baço de camundongos com antígenos do SARS-CoV-2 inativado induziu eficiente linfoproliferação, e esta foi semelhante para os estímulos com antígenos virais das variantes Gamma e Zeta, o que sugere uma resposta imune celular à epítopos conservados. Nossos resultados estão de acordo com estudos anteriores que mostram forte produção de anticorpos anti-S em camundongos imunizados e exibindo diferenças indetectáveis na ativação de linfócitos pelas diferentes variantes virais [145, 161]. Em suma nossos resultados corroboram os de outros trabalhos descrevendo que a imunização com SARS-CoV-2 inativado induz forte produção de anticorpos acompanhada de resposta imune celular [150, 174, 175].

Em nosso estudo, detectamos RNA viral no tecido pulmonar de camundongos infectados pelas 3 linhagens de SARS-CoV-2. Não observamos diferenças significativas nos níveis de RNA viral em tecido pulmonar de camundongos imunizados ou não imunizados após a infecção com as variantes Gamma ou Zeta. Por outro lado, a carga viral medida por ensaio de *plaques* em camundongos C57BL/6 com as variantes Gamma ou Zeta, indicou distintos graus de suscetibilidade dos animais contra as variantes. Ressaltamos que a carga das variantes Gamma e Zeta do SARS-CoV-2 em camundongos imunizados foi reduzida em quase 100 vezes.

Isto é importante porque a alta carga viral em humanos correlaciona-se com o aumento da gravidade da doença e maior risco de morte por COVID-19 [176, 177].

Uma característica chave do COVID-19 grave é a desregulação das vias inflamatórias com aumento da produção de citocinas, como a Interleucina-6 (IL-6) e o Fator de Necrose Tumoral-α (TNF-α) [178, 179]. Em nosso estudo observamos que a infecção pelas linhagens WT, Gamma e Zeta do SARS-CoV-2 induziu produção de IL-6 e TNF em camundongos não imunizados. O nível expresso destas citocinas foi variável segundo a variante viral, sugerindo diferentes graus de suscetibilidades dos camundongos. Consistente com uma inflamação mais intensa em camundongos não imunizados na infecção com a variante Gamma, encontramos níveis mais elevados de IL-6 nestes animais. Níveis aumentados de IL-6 e TNF foram associados à gravidade da lesão pulmonar na pneumonia por COVID-19. Além disso, a IL-6 circulante prediz a gravidade da lesão pulmonar [180]. Em nosso estudo, níveis indetectáveis de IL-6 e TNF-α, foram consistentes com a redução do infiltrado inflamatório pulmonar e mostraram que a imunização foi eficaz nos camundongos infectados com a linhagem WT e variante Zeta. Embora menos eficaz para a variante Gamma, os níveis de IL-6 também demostraram-se significativamente reduzidos nos camundongos imunizados. Coletivamente, esses dados sugerem que a imunização com SARS-CoV-2 inativado é capaz de induzir uma resposta imune protetora para suas variantes Gamma e Zeta.

Estudos anteriores demonstraram que a variante Gamma pode escapar da neutralização de anticorpos de soros de pacientes convalescentes ou indivíduos vacinados com as vacinas Oxford-AstraZeneca, Pfizer-BioNTech ou CoronaVac [158, 160]. Em nosso estudo, mostramos que embora os títulos de anticorpos neutralizantes sejam mais baixos contra as variantes Gamma e Zeta, ocorre um aumento significativo 3 dias após a infecção viral, atingindo níveis semelhantes à neutralização observada com linhagem WT de SARS-CoV-2. Esta produção de anticorpos neutralizantes do SARS-CoV-2 sugere a existência de memória imunológica responsiva as variantes, que é desencadeada rapidamente contra a infecção viral.

Em um estudo recente, idosos vacinados com CoronaVac ao se infectarem com SARS-CoV-2, desenvolvem altos títulos de soro neutralização contra a linhagem WT, indicando um *recall* imunológico com rápida produção de anticorpos [181]. Outro estudo, mostrou que a imunidade humoral é significativamente aumentada em indivíduos vacinados contra COVID-19 quando infectados com qualquer uma de 3 variantes do SARS-CoV-2, apresentando alta capacidade de neutralização viral (linhagens B, B.1.1.7 e B.1.351) [182]. Neste contexto, e considerando nossos dados no modelo murino, levantamos a hipótese de que indivíduos totalmente vacinados com SARS-CoV-2 inativado, ao serem infectados com as variantes

Gamma ou Zeta, devem responder rapidamente à infecção e produzir anticorpos neutralizantes eficientes contra a COVID-19. Essa ideia é corroborada por um estudo recente que relatou dois casos de infecção de SARS-CoV-2 pela variante Gamma em idosos que receberam CoronaVac, mas desenvolveram apenas sintomas leves [183].

Ao final, enfatizamos que a contínua elucidação dos mecanismos imunológicos em indivíduos convalescentes e vacinados contra as novas variantes do SARS-CoV-2 são extremamente importantes para o controle da pandemia de COVID-19.

### **3.6 CONCLUSÕES**

 Indivíduos vacinados com a CoronaVac seroconvertem produzindo altos teores de IgG anti-S e neutralização viral, apresentando significativa queda nos níveis séricos destes anticorpos após 6 meses da segunda dose.

- Camundongos imunizados com SARS-CoV-2 inativado produzem IgG anti-S com atividade neutralizante reduzida para as variantes Gamma e Zeta de SARS-CoV-2.

 O estímulo de células esplênicas de camundongos imunizados utilizando antígenos virais de SARS-CoV-2 inativado, induz linfoproliferação semelhante entre as diferentes variantes virais, sugerindo uma resposta celular a epítopos conservados.

- A imunização prévia com SARS-CoV-2 inativado reduz quase 100 vezes a carga viral pulmonar em camundongos infectados com as variantes Gamma e Zeta.

- Reduzidos níveis de IL-6 e TNF-α nos camundongos infectados com a linhagem WT e a variante Zeta, associaram-se a redução do infiltrado inflamatório pulmonar, evidenciando a eficácia da imunização por SARS-CoV-2 inativado.

 A infecção de camundongos imunizados com as variantes Gamma e Zeta, induz rápido aumento da atividade neutralizante 3 dias após a infecção viral, evidenciando memória imunológica responsiva.

## 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1. Bocquet-Appel, J.P., When the world's population took off: the springboard of the Neolithic Demographic Transition. Science, v.333 n.6042: p.560-1, 2011.
- 2. Li, Y., et al., *On the origin of smallpox: correlating variola phylogenics with historical smallpox records.* **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.104 n.40: p.15787-92, 2007.
- 3. Furuse, Y., A. Suzuki, and H. Oshitani, *Origin of measles virus: divergence from rinderpest virus between the 11th and 12th centuries.* **Virol J**, v.7: p.52, 2010.
- 4. Lindahl, J.F. and D. Grace, *The consequences of human actions on risks for infectious diseases: a review.* Infect Ecol Epidemiol, v.5: p.30048, 2015.
- 5. Figueiredo, L.T., *Emergent arboviruses in Brazil.* **Rev Soc Bras Med Trop**, v.40 n.2: p.224-9, 2007.
- 6. Donalisio, M.R., A.R.R. Freitas, and A. Zuben, *Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health.* **Rev Saude Publica**, v.51: p.30, 2017.
- 7. Leite, R.D., J.L. Barreto, and A.Q. Sousa, *Measles Reemergence in Ceara, Northeast Brazil, 15 Years after Elimination.* Emerg Infect Dis, v.21 n.9: p.1681-3, 2015.
- 8. Almeida, A., C. Codeco, and P.M. Luz, *Seasonal dynamics of influenza in Brazil: the latitude effect.* **BMC Infect Dis**, v.18 n.1: p.695, 2018.
- 9. Sabino, E.C., et al., *Resurgence of COVID-19 in Manaus, Brazil, despite high seroprevalence.* Lancet, v.397 n.10273: p.452-455, 2021.
- 10. Agrawal, B., *Heterologous Immunity: Role in Natural and Vaccine-Induced Resistance to Infections.* Front Immunol, v.10: p.2631, 2019.
- 11. Selin, L.K., et al., *Protective heterologous antiviral immunity and enhanced immunopathogenesis mediated by memory T cell populations*. **J Exp Med**, v.188 n.9: p.1705-15, 1998.
- 12. Singh, S., et al., *Heterologous Immunity between Adenoviruses and Hepatitis C Virus: A New Paradigm in HCV Immunity and Vaccines.* **PLoS One**, v.11 n.1: p.e0146404, 2016.
- 13. Saron, W.A.A., et al., *Flavivirus serocomplex cross-reactive immunity is protective by activating heterologous memory CD4 T cells.* **Sci Adv**, v.4 n.7: p.eaar4297, 2018.
- 14. Rothman, A.L., *Dengue: defining protective versus pathologic immunity*. J Clin Invest, v.113 n.7: p.946-51, 2004.
- 15. Sorup, S., et al., *Smallpox vaccination and all-cause infectious disease hospitalization: a Danish register-based cohort study.* **Int J Epidemiol**, v.40 n.4: p.955-63, 2011.
- 16. Aaby, P., et al., *Non-specific beneficial effect of measles immunisation: analysis of mortality studies from developing countries.* **BMJ**, v.311 n.7003: p.481-5, 1995.
- Andersen, A., et al., National Immunization Campaigns with Oral Polio Vaccine Reduce All-Cause Mortality: A Natural Experiment within Seven Randomized Trials. Front Public Health, v.6: p.13, 2018.
- 18. Page, K.R., A.L. Scott, and Y.C. Manabe, *The expanding realm of heterologous immunity: friend or foe?* Cell Microbiol, v.8 n.2: p.185-96, 2006.
- 19. Chen, R., et al., *ICTV Virus Taxonomy Profile: Togaviridae*. J Gen Virol, v.99 n.6: p.761-762, 2018.

- 20. Suhrbier, A., M.C. Jaffar-Bandjee, and P. Gasque, *Arthritogenic alphaviruses--an overview*. **Nat Rev Rheumatol**, v.8 n.7: p.420-9, 2012.
- 21. Zacks, M.A. and S. Paessler, *Encephalitic alphaviruses*. Vet Microbiol, v.140 n.3-4: p.281-6, 2010.
- 22. Schwartz, O. and M.L. Albert, *Biology and pathogenesis of chikungunya virus*. **Nat Rev Microbiol**, v.8 n.7: p.491-500, 2010.
- 23. 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, 2008.
- 24. Laras, K., et al., *Tracking the re-emergence of epidemic chikungunya virus in Indonesia*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.99 n.2: p.128-41, 2005.
- 25. Mavalankar, D., P. Shastri, and P. Raman, *Chikungunya epidemic in India: a major public-health disaster.* Lancet Infect Dis, v.7 n.5: p.306-7, 2007.
- Nunes, M.R., et al., *Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil.* BMC Med, v.13: p.102, 2015.
- 27. Van Bortel, W., et al., *Chikungunya outbreak in the Caribbean region, December 2013 to March 2014, and the significance for Europe.* Euro Surveill, v.19 n.13, 2014.
- Watson, R., *Europe witnesses first local transmission of chikungunya fever in Italy*.
  BMJ, v.335 n.7619: p.532-3, 2007.
- 29. Lima Neto, A.S., et al., *Chikungunya-attributable deaths: A neglected outcome of a neglected disease.* **PLoS Negl Trop Dis**, v.13 n.9: p.e0007575, 2019.
- 30. Weaver, S.C., R. Chen, and M. Diallo, *Chikungunya Virus: Role of Vectors in Emergence from Enzootic Cycles*. Annu Rev Entomol, v.65: p.313-332, 2020.
- 31. Queyriaux, B., et al., *Clinical burden of chikungunya virus infection*. Lancet Infect Dis, v.8 n.1: p.2-3, 2008.
- 32. Weaver, S.C. and M. Lecuit, *Chikungunya virus and the global spread of a mosquitoborne disease*. **N Engl J Med**, v.372 n.13: p.1231-9, 2015.
- 33. de Oliveira Mota, M.T., et al., *Mayaro virus: a neglected arbovirus of the Americas.* **Future Virol.**, v.10: p.1109-1122, 2015.
- 34. Azevedo, R.S., et al., *Mayaro fever virus, Brazilian Amazon*. Emerg Infect Dis, v.15 n.11: p.1830-2, 2009.
- 35. Casals, J. and L. Whitman, *Mayaro virus: a new human disease agent. I. Relationship* to other arbor viruses. **Am J Trop Med Hyg**, v.6 n.6: p.1004-11, 1957.
- 36. Vasconcelos, P.F., et al., *Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arboviruses*. Cad Saude Publica, v.17 Suppl: p.155-64, 2001.
- 37. Brustolin, M., et al., *Anopheles mosquitoes may drive invasion and transmission of Mayaro virus across geographically diverse regions*. **PLoS Negl Trop Dis**, v.12 n.11: p.e0006895, 2018.
- Long, K.C., et al., *Experimental transmission of Mayaro virus by Aedes aegypti*. Am J Trop Med Hyg, v.85 n.4: p.750-7, 2011.
- 39. 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, 2017.

- 40. Serra, O.P., et al., *Mayaro virus and dengue virus 1 and 4 natural infection in culicids from Cuiaba, state of Mato Grosso, Brazil.* **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.111 n.1: p.20-9, 2016.
- 41. Lednicky, J., et al., *Mayaro Virus in Child with Acute Febrile Illness, Haiti, 2015.* Emerg Infect Dis, v.22 n.11: p.2000-2002, 2016.
- 42. Santiago, F.W., et al., *Long-Term Arthralgia after Mayaro Virus Infection Correlates with Sustained Pro-inflammatory Cytokine Response*. **PLoS Negl Trop Dis**, v.9 n.10: p.e0004104, 2015.
- 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**, v.204 n.1: p.115-23, 2011.
- 44. Hawman, D.W., et al., *Chronic joint disease caused by persistent Chikungunya virus infection is controlled by the adaptive immune response*. **J Virol**, v.87 n.24: p.13878-88, 2013.
- 45. Karabatsos, N., Antigenic relationships of group A arboviruses by plaque reduction neutralization testing. Am J Trop Med Hyg, v.24 n.3: p.527-32, 1975.
- 46. Partidos, C.D., et al., *Cross-protective immunity against o'nyong-nyong virus afforded by a novel recombinant chikungunya vaccine*. **Vaccine**, v.30 n.31: p.4638-43, 2012.
- 47. Kroon Campos, R., et al., Adenoviral-Vectored Mayaro and Chikungunya Virus Vaccine Candidates Afford Partial Cross-Protection From Lethal Challenge in A129 Mouse Model. Front Immunol, v.11: p.591885, 2020.
- 48. Martins, K.A., et al., *Neutralizing Antibodies from Convalescent Chikungunya Virus Patients Can Cross-Neutralize Mayaro and Una Viruses.* **Am J Trop Med Hyg**, v.100 n.6: p.1541-1544, 2019.
- 49. 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, 2015.
- 50. Binn, L.N., V.R. Harrison, and R. Randall, *Patterns of viremia and antibody observed in rhesus monkeys inoculated with chikungunya and other serologically related group A arboviruses.* **Am J Trop Med Hyg**, v.16 n.6: p.782-5, 1967.
- 51. Lum, F.M., et al., *Antibody-mediated enhancement aggravates chikungunya virus infection and disease severity*. Sci Rep, v.8 n.1: p.1860, 2018.
- 52. Juarez, D., et al., *Assessment of plaque assay methods for alphaviruses*. J Virol Methods, v.187 n.1: p.185-9, 2013.
- 53. Fumagalli, M.J., et al., *Enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant envelope protein 2 antigen for diagnosis of Chikungunya virus*. **Virol J**, v.15 n.1: p.112, 2018.
- Fumagalli, M.J., et al., Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay To Detect Antibodies Targeting Recombinant Envelope Protein 2 of Mayaro Virus. J Clin Microbiol, v.57 n.5, 2019.
- 55. Bancroft, J.D. and A. Stevens, *Theory and practice of histological techniques*. 3rd ed. 1990, Edinburgh ; New York: Churchill Livingstone. xiv, 726 p.
- 56. Ierna, M., et al., Supplementation of diet with krill oil protects against experimental rheumatoid arthritis. **BMC Musculoskelet Disord**, v.11: p.136, 2010.

- 57. Hoarau, J.J., et al., *Persistent chronic inflammation and infection by Chikungunya arthritogenic alphavirus in spite of a robust host immune response*. **J Immunol**, v.184 n.10: p.5914-27, 2010.
- 58. Fox, J.M. and M.S. Diamond, *Immune-Mediated Protection and Pathogenesis of Chikungunya Virus*. J Immunol, v.197 n.11: p.4210-4218, 2016.
- 59. Webb, E.M., et al., *Effects of Chikungunya virus immunity on Mayaro virus disease and epidemic potential.* Sci Rep, v.9 n.1: p.20399, 2019.
- 60. Waggoner, J.J., et al., Viremia and Clinical Presentation in Nicaraguan Patients Infected With Zika Virus, Chikungunya Virus, and Dengue Virus. Clin Infect Dis, v.63 n.12: p.1584-1590, 2016.
- 61. Gardner, J., et al., *Chikungunya virus arthritis in adult wild-type mice*. **J Virol**, v.84 n.16: p.8021-32, 2010.
- 62. Teo, T.H., et al., *A pathogenic role for CD4+ T cells during Chikungunya virus infection in mice.* **J Immunol**, v.190 n.1: p.259-69, 2013.
- 63. Lum, F.M., et al., *An essential role of antibodies in the control of Chikungunya virus infection.* **J Immunol**, v.190 n.12: p.6295-302, 2013.
- 64. Rudd, P.A., et al., *Interferon response factors 3 and 7 protect against Chikungunya virus hemorrhagic fever and shock.* **J Virol**, v.86 n.18: p.9888-98, 2012.
- 65. Labadie, K., et al., *Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages.* J Clin Invest, v.120 n.3: p.894-906, 2010.
- 66. Venugopalan, A., R.P. Ghorpade, and A. Chopra, *Cytokines in acute chikungunya*. **PLoS One**, v.9 n.10: p.e111305, 2014.
- 67. Alsharifi, M., et al., *NK cell-mediated immunopathology during an acute viral infection of the CNS.* **Eur J Immunol**, v.36 n.4: p.887-96, 2006.
- 68. Nakaya, H.I., et al., *Gene profiling of Chikungunya virus arthritis in a mouse model reveals significant overlap with rheumatoid arthritis.* Arthritis Rheum, v.64 n.11: p.3553-63, 2012.
- 69. Bundschuh, D.S., et al., *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IFN*gamma restore the systemic TNF-alpha response to endotoxin in lipopolysaccharidedesensitized mice. **J Immunol**, v.158 n.6: p.2862-71, 1997.
- 70. Kumar, S., et al., *Mouse macrophage innate immune response to Chikungunya virus infection.* Virol J, v.9: p.313, 2012.
- 71. Ng, L.F., et al., *IL-1beta*, *IL-6*, and *RANTES* as biomarkers of Chikungunya severity. **PLoS One**, v.4 n.1: p.e4261, 2009.
- 72. de Castro-Jorge, L.A., et al., *The NLRP3 inflammasome is involved with the pathogenesis of Mayaro virus.* **PLoS Pathog**, v.15 n.9: p.e1007934, 2019.
- 73. Pialoux, G., et al., *Chikungunya, an epidemic arbovirosis*. Lancet Infect Dis, v.7 n.5: p.319-27, 2007.
- 74. Kuo, T.M., et al., *HBV replication is significantly reduced by IL-6*. **J Biomed Sci**, v.16: p.41, 2009.
- 75. Velazquez-Salinas, L., et al., *The Role of Interleukin 6 During Viral Infections*. Front Microbiol, v.10: p.1057, 2019.

- Morrison, T.E., et al., A mouse model of chikungunya virus-induced musculoskeletal inflammatory disease: evidence of arthritis, tenosynovitis, myositis, and persistence. Am J Pathol, v.178 n.1: p.32-40, 2011.
- Petitdemange, C., et al., Unconventional repertoire profile is imprinted during acute chikungunya infection for natural killer cells polarization toward cytotoxicity. PLoS Pathog, v.7 n.9: p.e1002268, 2011.
- 78. Thanapati, S., R. Das, and A.S. Tripathy, *Phenotypic and functional analyses of NK and NKT-like populations during the early stages of chikungunya infection.* Front Microbiol, v.6: p.895, 2015.
- 79. Teo, T.H., et al., Caribbean and La Reunion Chikungunya Virus Isolates Differ in Their Capacity To Induce Proinflammatory Th1 and NK Cell Responses and Acute Joint Pathology. J Virol, v.89 n.15: p.7955-69, 2015.
- 80. Sun, J.C. and L.L. Lanier, *Is There Natural Killer Cell Memory and Can It Be Harnessed by Vaccination? NK Cell Memory and Immunization Strategies against Infectious Diseases and Cancer.* Cold Spring Harb Perspect Biol, v.10 n.10, 2018.
- 81. Haist, K.C., et al., *Inflammatory monocytes mediate control of acute alphavirus infection in mice*. **PLoS Pathog**, v.13 n.12: p.e1006748, 2017.
- 82. Lidbury, B.A., et al., *Macrophage-induced muscle pathology results in morbidity and mortality for Ross River virus-infected mice.* J Infect Dis, v.181 n.1: p.27-34, 2000.
- Lidbury, B.A., et al., Macrophage-derived proinflammatory factors contribute to the development of arthritis and myositis after infection with an arthrogenic alphavirus. J Infect Dis, v.197 n.11: p.1585-93, 2008.
- 84. Metsky, H.C., et al., *Zika virus evolution and spread in the Americas*. **Nature**, v.546 n.7658: p.411-415, 2017.
- 85. Musso, D., et al., Zika virus in French Polynesia 2013-14: anatomy of a completed outbreak. Lancet Infect Dis, v.18 n.5: p.e172-e182, 2018.
- 86. Messina, J.P., et al., *A global compendium of human dengue virus occurrence*. Sci Data, v.1: p.140004, 2014.
- 87. Stanaway, J.D., et al., *The global burden of dengue: an analysis from the Global Burden of Disease Study 2013.* Lancet Infect Dis, v.16 n.6: p.712-723, 2016.
- 88. Hammond, S.N., et al., *Differences in dengue severity in infants, children, and adults in a 3-year hospital-based study in Nicaragua*. **Am J Trop Med Hyg**, v.73 n.6: p.1063-70, 2005.
- 89. Rey, F.A., et al., *The bright and the dark side of human antibody responses to flaviviruses: lessons for vaccine design.* **EMBO Rep**, v.19 n.2: p.206-224, 2018.
- 90. Khandia, R., et al., *Modulation of Dengue/Zika Virus Pathogenicity by Antibody-*Dependent Enhancement and Strategies to Protect Against Enhancement in Zika Virus Infection. Front Immunol, v.9: p.597, 2018.
- 91. Mukhopadhyay, S., R.J. Kuhn, and M.G. Rossmann, *A structural perspective of the flavivirus life cycle*. **Nat Rev Microbiol**, v.3 n.1: p.13-22, 2005.
- 92. Modis, Y., et al., *Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion*. **Nature**, v.427 n.6972: p.313-9, 2004.
- 93. Hanna, S.L., et al., *N-linked glycosylation of west nile virus envelope proteins influences particle assembly and infectivity.* **J Virol**, v.79 n.21: p.13262-74, 2005.

- 94. Tang, C.T., et al., *Generation of Monoclonal Antibodies against Dengue Virus Type 4* and Identification of Enhancing Epitopes on Envelope Protein. PLoS One, v.10 n.8: p.e0136328, 2015.
- 95. Roby, J.A., et al., *Post-translational regulation and modifications of flavivirus structural proteins*. J Gen Virol, v.96 n.Pt 7: p.1551-69, 2015.
- 96. Zhang, S., et al., *Role of BC loop residues in structure, function and antigenicity of the West Nile virus envelope protein receptor-binding domain III.* **Virology**, v.403 n.1: p.85-91, 2010.
- 97. Chen, L., et al., *Antiviral activity of peptide inhibitors derived from the protein E stem against Japanese encephalitis and Zika viruses*. **Antiviral Res**, v.141: p.140-149, 2017.
- 98. Lai, C.Y., et al., Antibodies to envelope glycoprotein of dengue virus during the natural course of infection are predominantly cross-reactive and recognize epitopes containing highly conserved residues at the fusion loop of domain II. J Virol, v.82 n.13: p.6631-43, 2008.
- 99. Chang, H.H., et al., *Systematic analysis of protein identity between Zika virus and other arthropod-borne viruses*. Bull World Health Organ, v.95 n.7: p.517-525I, 2017.
- 100. Sirohi, D., et al., *The 3.8 A resolution cryo-EM structure of Zika virus*. Science, v.352 n.6284: p.467-70, 2016.
- 101. Dejnirattisai, W., et al., *Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus*. **Nat Immunol**, v.17 n.9: p.1102-8, 2016.
- 102. Paul, L.M., et al., *Dengue virus antibodies enhance Zika virus infection*. Clin Transl Immunology, v.5 n.12: p.e117, 2016.
- Priyamvada, L., et al., Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. Proc Natl Acad Sci U S A, v.113 n.28: p.7852-7, 2016.
- 104. Stettler, K., et al., *Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection.* Science, v.353 n.6301: p.823-6, 2016.
- 105. Kazazian, L., et al., Spatiotemporal transmission dynamics of co-circulating dengue, Zika, and chikungunya viruses in Fortaleza, Brazil: 2011-2017. PLoS Negl Trop Dis, v.14 n.10: p.e0008760, 2020.
- 106. Nunez-Avellaneda, D., et al., *Co-Circulation of All Four Dengue Viruses and Zika Virus in Guerrero, Mexico, 2019.* Vector Borne Zoonotic Dis, v.21 n.6: p.458-465, 2021.
- 107. Sela;, M., et al., Antibodies to Sequential and Conformational Determinants. Cold SpringHarbor Symposia on Quantitative Biology, v.32: p.8, 1967.
- 108. Jemmerson, R., *Antigenicity and native structure of globular proteins: low frequency of peptide reactive antibodies.* **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.84 n.24: p.9180-4, 1987.
- Van Regenmortel, M.H.V., Mapping Epitope Structure and Activity: From One-Dimensional Prediction to Four-Dimensional Description of Antigenic Specificity. Methods, v.9 n.3: p.465-72, 1996.
- 110. da Silva, A.N., et al., *Identification of continuous human B-cell epitopes in the envelope glycoprotein of dengue virus type 3 (DENV-3)*. **PLoS One**, v.4 n.10: p.e7425, 2009.
- 111. Kuivanen, S., et al., *Identification of linear human B-cell epitopes of tick-borne encephalitis virus*. Virol J, v.11: p.115, 2014.

- Bergamaschi, G., et al., Computational Analysis of Dengue Virus Envelope Protein (E) Reveals an Epitope with Flavivirus Immunodiagnostic Potential in Peptide Microarrays. Int J Mol Sci, v.20 n.8, 2019.
- 113. Kam, Y.W., et al., *ZIKV-Specific NS1 Epitopes as Serological Markers of Acute Zika Virus Infection.* J Infect Dis, v.220 n.2: p.203-212, 2019.
- 114. Kam, Y.W., et al., *Cross-reactive dengue human monoclonal antibody prevents severe pathologies and death from Zika virus infections*. JCI Insight, v.2 n.8, 2017.
- 115. Lanciotti, R.S., et al., *Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction.* J Clin Microbiol, v.30 n.3: p.545-51, 1992.
- 116. Bardina, S.V., et al., *Enhancement of Zika virus pathogenesis by preexisting antiflavivirus immunity*. Science, v.356 n.6334: p.175-180, 2017.
- 117. Poh, C.M., et al., *Two linear epitopes on the SARS-CoV-2 spike protein that elicit neutralising antibodies in COVID-19 patients*. Nat Commun, v.11 n.1: p.2806, 2020.
- Wu, K.P., et al., Structural basis of a flavivirus recognized by its neutralizing antibody: solution structure of the domain III of the Japanese encephalitis virus envelope protein. J Biol Chem, v.278 n.46: p.46007-13, 2003.
- Roehrig, J.T., R.A. Bolin, and R.G. Kelly, Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica. Virology, v.246 n.2: p.317-28, 1998.
- 120. Oliphant, T., et al., *Antibody recognition and neutralization determinants on domains I and II of West Nile Virus envelope protein.* J Virol, v.80 n.24: p.12149-59, 2006.
- 121. Allison, S.L., et al., *Mutational evidence for an internal fusion peptide in flavivirus envelope protein E.* **J Virol**, v.75 n.9: p.4268-75, 2001.
- 122. Beltramello, M., et al., *The human immune response to Dengue virus is dominated by highly cross-reactive antibodies endowed with neutralizing and enhancing activity.* Cell Host Microbe, v.8 n.3: p.271-83, 2010.
- 123. Wahala, W.M., et al., *Dengue virus neutralization by human immune sera: role of envelope protein domain III-reactive antibody*. Virology, v.392 n.1: p.103-13, 2009.
- 124. Robbiani, D.F., et al., *Recurrent Potent Human Neutralizing Antibodies to Zika Virus in Brazil and Mexico*. Cell, v.169 n.4: p.597-609 e11, 2017.
- 125. Nagar, P.K., D. Savargaonkar, and A.R. Anvikar, *Detection of Dengue Virus-Specific IgM and IgG Antibodies through Peptide Sequences of Envelope and NS1 Proteins for Serological Identification.* J Immunol Res, v.2020: p.1820325, 2020.
- 126. Herrmann, S., et al., *T7 phage display of Ep15 peptide for the detection of WNV IgG*. J Virol Methods, v.141 n.2: p.133-40, 2007.
- 127. Li, S., et al., Synthetic peptides containing B- and T-cell epitope of dengue virus-2 E domain III provoked B- and T-cell responses. Vaccine, v.29 n.20: p.3695-702, 2011.
- 128. Ramanathan, B., et al., *Synthetic B-Cell Epitopes Eliciting Cross-Neutralizing Antibodies: Strategies for Future Dengue Vaccine.* **PLoS One**, v.11 n.5: p.e0155900, 2016.
- 129. Crill, W.D. and G.J. Chang, *Localization and characterization of flavivirus envelope* glycoprotein cross-reactive epitopes. J Virol, v.78 n.24: p.13975-86, 2004.

- 130. de Alwis, R., et al., *In-depth analysis of the antibody response of individuals exposed to primary dengue virus infection.* **PLoS Negl Trop Dis**, v.5 n.6: p.e1188, 2011.
- Dejnirattisai, W., et al., A new class of highly potent, broadly neutralizing antibodies isolated from viremic patients infected with dengue virus. Nat Immunol, v.16 n.2: p.170-177, 2015.
- Zhu, N., et al., A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. N Engl J Med, v.382 n.8: p.727-733, 2020.
- Guan, W.J., et al., *Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China*. N Engl J Med, v.382 n.18: p.1708-1720, 2020.
- 134. Organization, W.H., Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. 2021.
- 135. Wu, A., et al., *Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019nCoV) Originating in China.* Cell Host Microbe, v.27 n.3: p.325-328, 2020.
- 136. Keech, C., et al., *Phase 1-2 Trial of a SARS-CoV-2 Recombinant Spike Protein Nanoparticle Vaccine*. **N Engl J Med**, v.383 n.24: p.2320-2332, 2020.
- 137. Mercado, N.B., et al., *Single-shot Ad26 vaccine protects against SARS-CoV-2 in rhesus macaques*. **Nature**, v.586 n.7830: p.583-588, 2020.
- 138. Zhang, N.N., et al., A Thermostable mRNA Vaccine against COVID-19. Cell, v.182 n.5: p.1271-1283 e16, 2020.
- 139. Creech, C.B., S.C. Walker, and R.J. Samuels, *SARS-CoV-2 Vaccines*. **JAMA**, v.325 n.13: p.1318-1320, 2021.
- 140. Murdin, A.D., L. Barreto, and S. Plotkin, *Inactivated poliovirus vaccine: past and present experience*. Vaccine, v.14 n.8: p.735-46, 1996.
- 141. Vellozzi, C., et al., Safety of trivalent inactivated influenza vaccines in adults: background for pandemic influenza vaccine safety monitoring. Vaccine, v.27 n.15: p.2114-20, 2009.
- 142. Xia, S., et al., *Effect of an Inactivated Vaccine Against SARS-CoV-2 on Safety and Immunogenicity Outcomes: Interim Analysis of 2 Randomized Clinical Trials.* JAMA, v.324 n.10: p.951-960, 2020.
- 143. Ella, R., et al., Safety and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine, BBV152: interim results from a double-blind, randomised, multicentre, phase 2 trial, and 3-month follow-up of a double-blind, randomised phase 1 trial. Lancet Infect Dis, v.21 n.7: p.950-961, 2021.
- 144. Guo, W., et al., Safety and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in healthy adults aged 18 years or older: A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 trial. EClinicalMedicine, v.38: p.101010, 2021.
- 145. Gao, Q., et al., *Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2*. **Science**, v.369 n.6499: p.77-81, 2020.
- 146. Turan, R.D., et al., Gamma-irradiated SARS-CoV-2 vaccine candidate, OZG-38.61.3, confers protection from SARS-CoV-2 challenge in human ACEII-transgenic mice. Sci Rep, v.11 n.1: p.15799, 2021.
- 147. Tanriover, M.D., et al., *Efficacy and safety of an inactivated whole-virion SARS-CoV-2 vaccine (CoronaVac): interim results of a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial in Turkey.* Lancet, v.398 n.10296: p.213-222, 2021.

- 148. Wu, Z., et al., Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine (CoronaVac) in healthy adults aged 60 years and older: a randomised, doubleblind, placebo-controlled, phase 1/2 clinical trial. Lancet Infect Dis, v.21 n.6: p.803-812, 2021.
- 149. Han, B., et al., Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine (CoronaVac) in healthy children and adolescents: a double-blind, randomised, controlled, phase 1/2 clinical trial. Lancet Infect Dis, 2021.
- 150. Zhang, Y., et al., Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in healthy adults aged 18-59 years: a randomised, double-blind, placebocontrolled, phase 1/2 clinical trial. Lancet Infect Dis, v.21 n.2: p.181-192, 2021.
- 151. Krammer, F., *SARS-CoV-2 vaccines in development*. **Nature**, v.586 n.7830: p.516-527, 2020.
- 152. Unicef, COVID-19 Vaccine Market Dashboard. 2021.
- 153. Harvey, W.T., et al., *SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape*. **Nat Rev Microbiol**, v.19 n.7: p.409-424, 2021.
- 154. Souza, W.M., et al., *Neutralisation of SARS-CoV-2 lineage P.1 by antibodies elicited through natural SARS-CoV-2 infection or vaccination with an inactivated SARS-CoV-2 vaccine: an immunological study.* Lancet Microbe, v.2 n.10: p.e527-e535, 2021.
- 155. Voloch, C.M., et al., *Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2 lineage from Rio de Janeiro, Brazil.* **J Virol**, 2021.
- 156. Garcia-Beltran, W.F., et al., *Multiple SARS-CoV-2 variants escape neutralization by vaccine-induced humoral immunity*. **Cell**, v.184 n.9: p.2372-2383 e9, 2021.
- 157. Wang, Z., et al., *mRNA vaccine-elicited antibodies to SARS-CoV-2 and circulating variants.* Nature, v.592 n.7855: p.616-622, 2021.
- 158. Souza, W.M., et al., *Neutralisation of SARS-CoV-2 lineage P.1 by antibodies elicited through natural SARS-CoV-2 infection or vaccination with an inactivated SARS-CoV-2 vaccine: an immunological study.* Lancet Microbe, 2021.
- 159. Chen, R.E., et al., *Resistance of SARS-CoV-2 variants to neutralization by monoclonal and serum-derived polyclonal antibodies*. **Nat Med**, v.27 n.4: p.717-726, 2021.
- 160. Dejnirattisai, W., et al., *Antibody evasion by the P.1 strain of SARS-CoV-2*. Cell, v.184 n.11: p.2939-2954 e9, 2021.
- 161. Tarke, A., et al., *Negligible impact of SARS-CoV-2 variants on CD4* (+) *and CD8* (+) *T cell reactivity in COVID-19 exposed donors and vaccinees.* **bioRxiv**, 2021.
- Geers, D., et al., SARS-CoV-2 variants of concern partially escape humoral but not Tcell responses in COVID-19 convalescent donors and vaccinees. Sci Immunol, v.6 n.59, 2021.
- 163. Reynolds, C.J., et al., *Prior SARS-CoV-2 infection rescues B and T cell responses to variants after first vaccine dose*. Science, 2021.
- 164. Munoz-Fontela, C., et al., *Animal models for COVID-19*. **Nature**, v.586 n.7830: p.509-515, 2020.
- 165. Cleary, S.J., et al., *Animal models of mechanisms of SARS-CoV-2 infection and COVID-*19 pathology. **Br J Pharmacol**, v.177 n.21: p.4851-4865, 2020.

- 166. Wan, Y., et al., Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus. J Virol, v.94 n.7, 2020.
- 167. Kant, R., et al., *Common laboratory mice are susceptible to infection with SARS-CoV2 beta variant*. **Research Squarte (preprint)**, 2021.
- 168. Montagutelli, X., et al., *The B1.351 and P.1 variants extend SARS-CoV-2 host range to mice.* **BioRxiv (preprint)**, 2021.
- 169. Gu, H., et al., *Rapid adaptation of SARS-CoV-2 in BALB/c mice: Novel mouse model for vaccine efficacy.* **BioRxiv (preprint)**, 2020.
- 170. Araujo, D.B., et al., *SARS-CoV-2 isolation from the first reported patients in Brazil and establishment of a coordinated task network.* **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.115: p.e200342, 2020.
- 171. Jureka, A.S., J.A. Silvas, and C.F. Basler, *Propagation, Inactivation, and Safety Testing* of SARS-CoV-2. Viruses, v.12 n.6, 2020.
- 172. Corman, V.M., et al., *Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR.* Euro Surveill, v.25 n.3, 2020.
- 173. Pan, H., et al., Immunogenicity and safety of a third dose, and immune persistence of CoronaVac vaccine in healthy adults aged 18-59 years: interim results from a doubleblind, randomized, placebo-controlled phase 2 clinical trial. medRxiv (preprint), 2021.
- Deng, Y., et al., SARS-CoV-2-specific T cell immunity to structural proteins in inactivated COVID-19 vaccine recipients. Cell Mol Immunol, v.18 n.8: p.2040-2041, 2021.
- 175. Xia, S., et al., Safety and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine, BBIBP-CorV: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 trial. Lancet Infect Dis, v.21 n.1: p.39-51, 2021.
- 176. Wang, Y., et al., *Kinetics of viral load and antibody response in relation to COVID-19 severity*. J Clin Invest, v.130 n.10: p.5235-5244, 2020.
- 177. Fajnzylber, J., et al., *SARS-CoV-2 viral load is associated with increased disease severity and mortality*. **Nat Commun**, v.11 n.1: p.5493, 2020.
- 178. Qin, C., et al., *Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019* (COVID-19) in Wuhan, China. Clin Infect Dis, v.71 n.15: p.762-768, 2020.
- 179. Yang, L., et al., *Immune characteristics of severe and critical COVID-19 patients*. Signal Transduct Target Ther, v.5 n.1: p.179, 2020.
- 180. Chen, L.D., et al., *Association between cytokine profiles and lung injury in COVID-19 pneumonia.* **Respir Res**, v.21 n.1: p.201, 2020.
- 181. Souza, W., et al., *Clusters of SARS-CoV-2 Lineage B.1.1.7 Infection After Vaccination With Adenovirus-Vectored and Inactivated Vaccines: A Cohort Study.* **Preprint**, 2021.
- 182. Müller, L., et al., *SARS-CoV-2 infection in fully vaccinated individuals of old age strongly boosters the humoral immune response.* **medRxiv (preprint)**, 2021.
- 183. Estofolete, C.F., et al., *Case Study of Two Post Vaccination SARS-CoV-2 Infections with P1 Variants in CoronaVac Vaccinees in Brazil.* **Viruses**, v.13 n.7, 2021.

### 5. ANEXOS

### 5.1 Anexo A: Lista de Publicações relacionadas à Tese

- 1. **Fumagalli MJ**, de Souza WM, Castro-Jorge LA, de Carvalho RVH, Castro IA, de Almeida LGN, Consonni SR, Zamboni DS and Figueiredo LTM. Chikungunya virus exposure partially cross-protects against Mayaro virus infection in mice. **Journal of Virology**, Setembro 2021. DOI: 10.1128/JVI.01122-21
- Fumagalli MJ, Capato CF, Castro-Jorge LA, de Souza WM, Arruda E and Figueiredo LTM. Stability of SARS-CoV-2 and other airborne viruses in different stress conditions. Archives of Virology. Setembro 2021. DOI: 10.1007/s00705-021-05293-7
- Fumagalli MJ, Figueiredo LTM and Aquino VH. Linear and continuous Flavivirus epitopes from naturally infected humans. Frontiers in cellular and infection microbiology. Outubro 2021 DOI: 10.3389/fcimb.2021.710551
- Fumagalli MJ, Castro-Jorge LA, Fraga-Silva TFC, de Azevedo PO, Capato CF, Rattis BAC, Hojo-Souza NS, Floriano VG, Castro JT, Ramos SG, Fonseca BAL, Deperon VL, Gazzinelli RT and Figueiredo LTM. Protective Immunity against Gamma and Zeta variants after Inactivated SARS-CoV-2 virus Immunization. Viruses. Dezembro 2021. DOI: 10.3390/v13122440
- Fumagalli MJ, Castro-Jorge LA, de Souza WM, de Azevedo PO, Hansen AW, Gazzinelli RT, da Fonseca BAL, Spilki FR and Figueiredo LTM. CoronaVac and ChAdOx1 vaccination and Gamma infection elicited neutralizing antibodies against the SARS-CoV-2 Delta variant. Under Review.
- 6. **Fumagalli MJ**, Castro-Jorge LA, de Azevedo PO, Capato CF, de Souza WM, Figueiredo LTM and Aquino VH. Epitope mapping and functional analysis of cross-reactive dengue antibodies to linear peptides on Zika virus envelope protein. *Under Review*.

#### 5.2 Anexo B: Repercussão do trabalho na Mídia

5.2.1 Entrevista para Agência FAPESP





# 5.2.3 Entrevista para Rádio CBN de Ribeirão Preto



# 5.2.2 Entrevista para o Jornal da USP

### 5.2.4 Matéria no jornal Folha de São Paulo



# 5.2.5 Matéria no site EurekAlert!

