

João Paulo da Cruz Silva

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

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

São Paulo

2018

João Paulo da Cruz Silva

Chikungunya virus structural proteins epitope mapping

Dissertation presented to the postgraduate program of Microbiology of the Institute of Biomedical Sciences of the University of São Paulo, to obtain the degree of Master in Science.

São Paulo

2018

João Paulo da Cruz Silva

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

.

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

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Paolo Marinho de Andrade Zanotto

Versão original

São Paulo

2018

João Paulo da Cruz Silva

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

Dissertation presented to the postgraduate program of Microbiology of the Institute of Biomedical Sciences of the University of São Paulo, to obtain the degree of Master in Science.

Concentration area: Microbiology

Advisor: Prof. Dr. Paolo Marinho de Andrade Zanotto

Original Version

São Paulo

2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

da Cruz Silva, João Paulo

Mapeamento de epitopos para as proteínas estruturais do vírus Chikungunya / João Paulo da Cruz Silva; orientador Paolo Marinho de Andrade Zanotto. -- São Paulo, 2018.

65 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Vírus Chikungunya. 2. mapeamento de epitopos. 3. peptídeos . 4. anticorpos. 5. ELISA. I. de Andrade Zanotto, Paolo Marinho, orientador. II. Título.

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato: João Paulo da Cruz Silva

Título da Dissertação: **Mapeamento de epitopos das proteínas estruturais do vírus Chikungunya**

.

Orientador: Prof. Dr. Paolo Marinho de Andrade Zanotto

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a):	Assinatura:..... Nome: Instituição:
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Presidente:	Assinatura: Nome: Instituição:



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 14 de dezembro de 2017.

PARECER 1367/CEPSH

CAAE nº 78060617.9.0000.5467

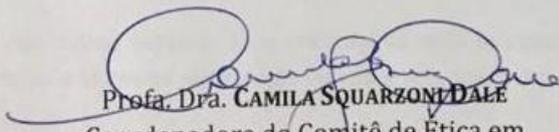
Protocolo CEPSH-ICB nº 1406/17

O Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB, nesta data, **APROVOU** o projeto intitulado: "**Mapeamento de epitopos e reconhecimento antigênico das proteínas estruturais do vírus Chikungunya em pacientes infectados em Sergipe, 2016**", do pesquisador Prof. Dr. **Paolo Marinho de Andrade Zanotto** e do aluno João Paulo da Cruz Silva.

Caberá aos pesquisadores elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final) de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde, conforme modelo constante no site: ww2.icb.usp.br/icb/cepsh, como também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste projeto.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria do CEP em **14/12/2018**, bem como anexado uma cópia à Plataforma Brasil.

Atenciosamente,


Prof. Dra. **CAMILA SQUARZONI DALE**
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Dedico esta dissertação primeiramente aos meus pais Paulo Januário da Silva e Rosemary da Cruz que me ensinaram a ter persistência e sempre enfrentar os desafios com respeito e dignidade.

Dedico também aos meus avós, Benedito Ronald da Cruz e Maria Lúcia de Freitas Cruz, minha irmã Ana Lúcia da Cruz Silva e meu tio Ronald Eduardo da Cruz, os quais sempre me motivaram e acreditaram na conclusão deste trabalho.

Dedico ao Prof. Dr. Paolo Marinho de Andrade Zanotto, agradeço por todos os ensinamentos, confiança, enorme paciência, por me acolher em seu laboratório e me ensinar a ser pesquisador.

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

Sinceros agradecimentos aos pesquisadores Marielton dos Passos Cunha, Shahab Zhaki Pour, Carla Torres Braconi e ao amigo Dino, agradeço por terem me recebido na equipe do Laboratório de Evolução Molecular e Bioinformática, pela enorme paciência, dedicação e atenção. Vocês foram fundamentais para conclusão deste trabalho.

AGRADECIMENTOS FINANCEIROS

Gostaria de agradecer o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por me conceder bolsa de estudos durante dois anos, possibilitando a realização deste trabalho.

“Tudo parece impossível até que seja feito”
Nelson Mandela

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

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

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

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

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

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

Lista de figuras

Figura 1: Árvore filogenética dos alphavirus Erro! Indicador não definido.

Figura 2 Distribuição geográfica do vírus Chikungunya

Figura 3: Organização da poliproteína do vírus Chikungunya

Figura 4: *Ciclo de replicação do vírus Chikungunya*

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

Figura 6: Organização do genoma e estrutural do vírus Chikungunya

Figura 7: Ciclo de Transmissão do vírus Chikungunya

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

Figura 9: Árvore filogenética representando os genótipos do vírus Chikungunya

Figura 10: Predição epitopos conformacionais para a proteína E1 de CHIKV

Figura 11: Predição epitopos conformacionais para a proteína E2 de CHIKV.

Figura 12: . Predição epitopos Lineares para a proteína E2 de CHIKV

Figura 13: Predição epitopos conformacionais para a proteína E2 de CHIKV

Figura 14: Predição epitopos conformacionais para a proteína E2 de CHIKV

Figura 15: Peptídeos destacados na estrutura da proteína E3

Figura 16: Peptídeos destacados na estrutura secundária da proteína E2

Figura 17: Peptídeos destacados na superfície da estrutura da Proteína E2

Figura 18: Resultados da padronização do ensaio imunoenzimático indireto à base de peptídeo

Figura 19: Reatividade dos peptídeos P1 à P5 da proteína E2

Figura 20: Curva ROC para os peptídeos 1 à 5 da proteína E2

Lista de tabelas

Tabela 1 Sorologia das amostras para o vírus Chikungunya.

Tabela 2 Oligopeptídeos lineares sintéticos correspondentes às regiões imunogênicas das proteínas E3 e E2 do vírus Chikungunya.

Tabela 3 Reatividade dos peptídeos P1 à P5 da proteína E2

Lista de abreviações e símbolos

Ae. Aegypti – *Aedes aegypti*

Ae. Albopictus- *Aedes albopictus*

Arbovirus - Athropod borne vírus

Asian – Genótipo Asiático

AUC – *Area under the curve*

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool (GenBank)

CDC - Center for Disease Control and Prevention

CHIKV- vVrus Chikungunya

DENV - Dengue Vírus

E1 – Proteína estrutural E1

E2- Proteína estrutural E2

E3 – Proteína estrutural E3

ECSA- Genótipo Leste-central- sul- Africano

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

IEDB – Imune Epitope DataBase

Ig- Imunoglobulina

IFN – Interferon

IL – Interleucina

IOL – Linhagem do Oceano Índico

kDa – Kilodalton

NK – Células *Natural Killer*

NSP1 – Proteína não-estrutural 1

NSP2 - Proteína não-estrutural 2

NSP3 - Proteína não-estrutural 3

NSP4- Proteína não-estrutural 4

P1-P11 – Peptídeos sintéticos 1 à 11

PBS – Solução fosfato salina

PDB - Formato do arquivo (Protein Data Bank)

RNA- Ácido ribonucleico

ROC – *Receiver operating characteristic curve*

VEEV – Vírus da Encefalite equina do Leste

WEEV – Vírus da Encefalite equina do Oeste

TMB - tetra-metil-benzidina

WA- Genótipo Oeste africano

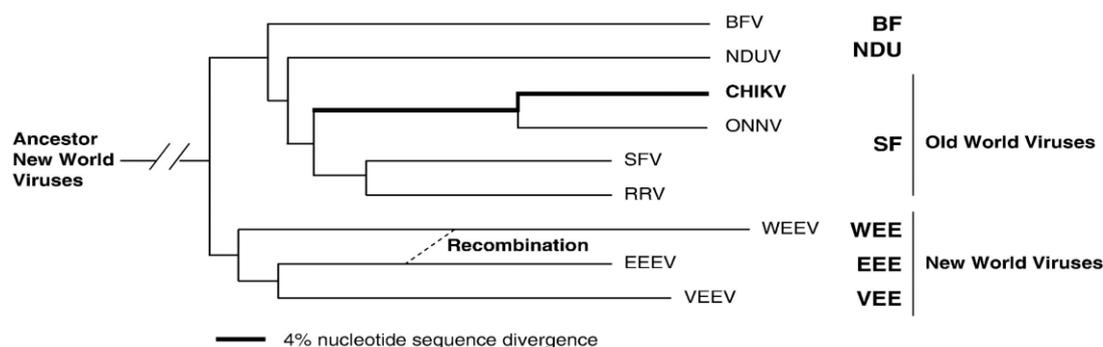
Sumário	
1. Introdução	
1.1 Epidemiologia	1
1.2 Organização do Genoma e das Proteínas estruturais e ciclo de replicação	3
1.3 Transmissão	7
1.4 Manifestações Clínicas e patogênese.....	9
1.5 Imunidade	
1.5.1 Imunidade Inata	10
1.5.2 Imunidade Adaptativa e proteção	11
1.6 Reconhecimento Antigênico	12
1.7 Mapeamento de epitpos	13
2. Objetivos	
2.1. Objetivos gerais	16
2.2 Objetivos específicos	16
3. Metodologia	
3.1 Comitê de ética	16
3.2 Reconstrução Filogenética	17
3.3 Ensaio imunoenzimático qualitativo para os anticorpos IgG anti-CHIKV	17
3.4 Ensaio imunoenzimático quantitativo para os anticorpos IgG anti-CHIKV	18
3.5 Modelagem computacional	19
3.6 ELISA indireto à Base de Peptídeos	20
3.6.1 Padronização ELISA indireto à Base de Peptídeos	20
3.6.2 ELISA indireto à Base de Peptídeos padronizado	21
3.7 Análises estatísticas	22
4. Resultados	23
5. Discussão	39
6. Conclusão	42

1. Introdução

1.1. Epidemiologia

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

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

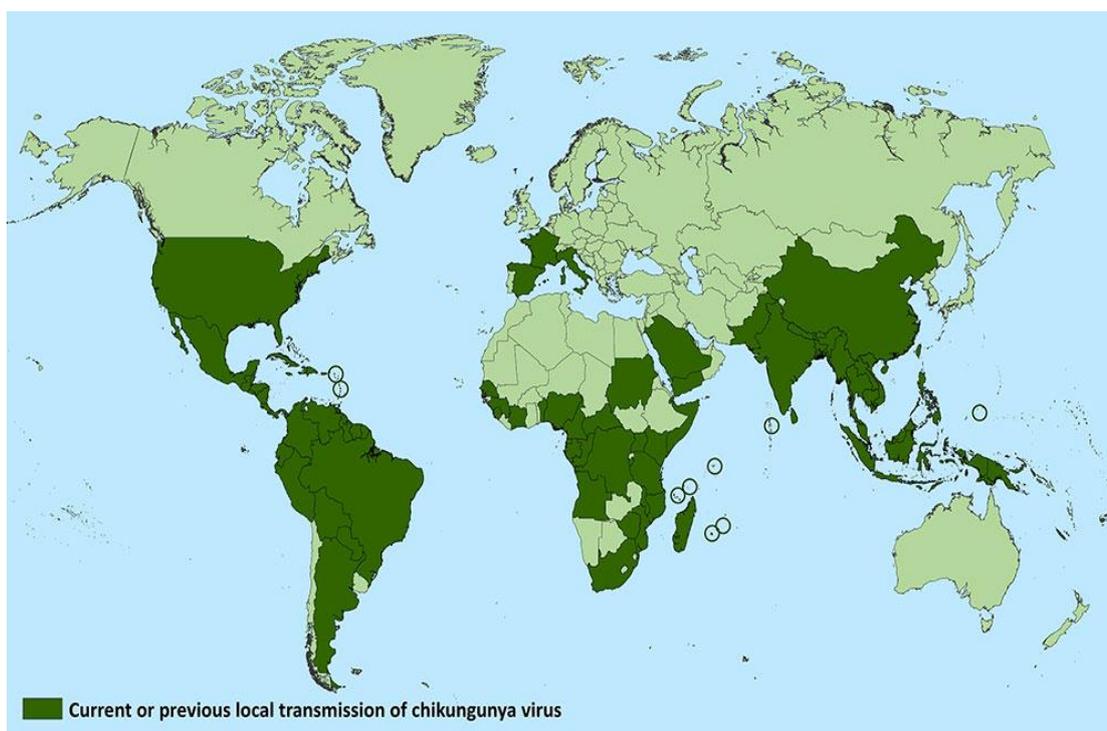


Fonte: adaptado de Powers 2001

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

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

Figura 2 Distribuição geográfica do vírus Chikungunya, 2018.



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

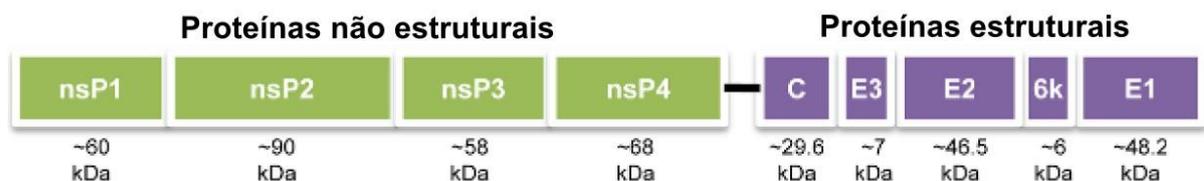
O genótipo ECSA causou epidemias nas ilhas do Oceano Índico e Ásia entre 2005 e 2011 (6,7), e durante este surto surgiu a linhagem do Oceano Índico (IOL) (8,9). A partir de 2007 casos autóctones dessa arbovirose foram reportados na Itália e França (10). Em Dezembro de 2013, o primeiro caso de transmissão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

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

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

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

Figura 3 Organização da poliproteína do vírus Chikungunya.

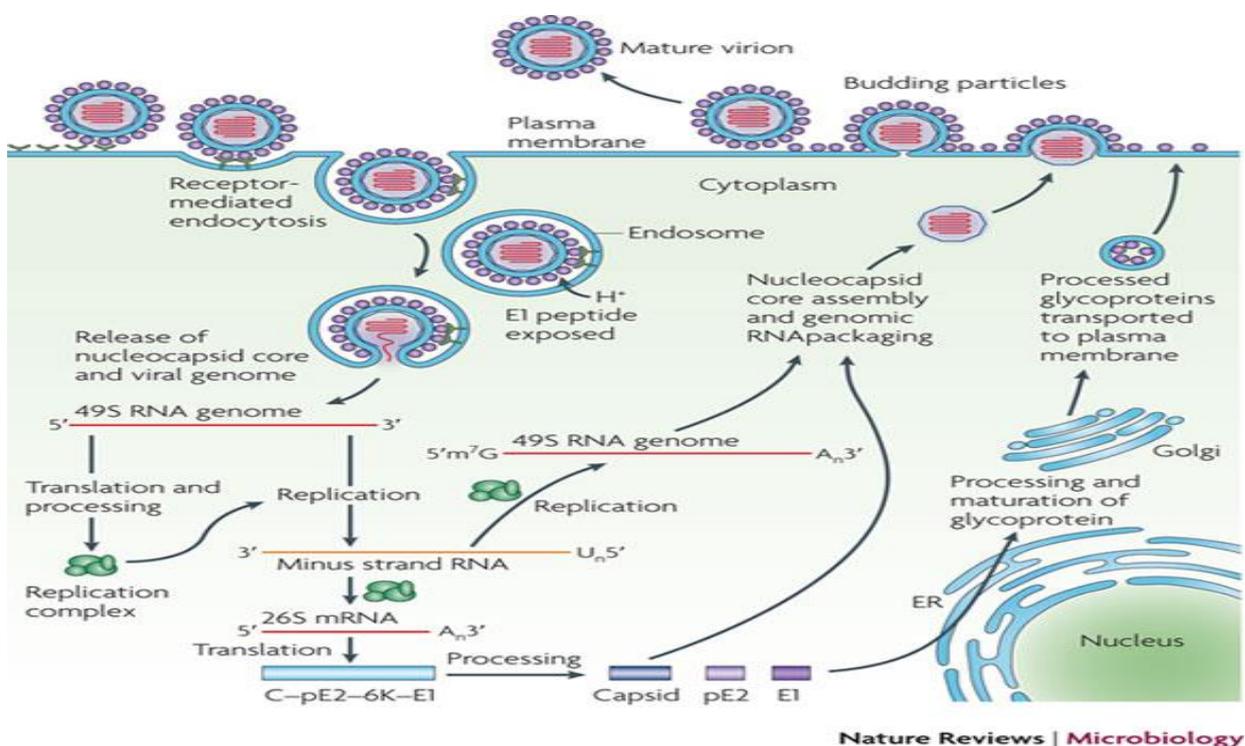


À esquerda proteínas não estruturais nsP1-nsP4 transcritas a partir da primeira região de leitura aberta. À direita proteínas estruturais C-E3-E2-6k-E1 transcritas a partir da segunda região de leitura aberta. Fonte: Modificado de: Kam et al. 2014.

O ciclo de replicação do vírus inicia-se pela ligação da partícula viral à receptores celulares, seguido pela adsorção via a entrada em células permissivas

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

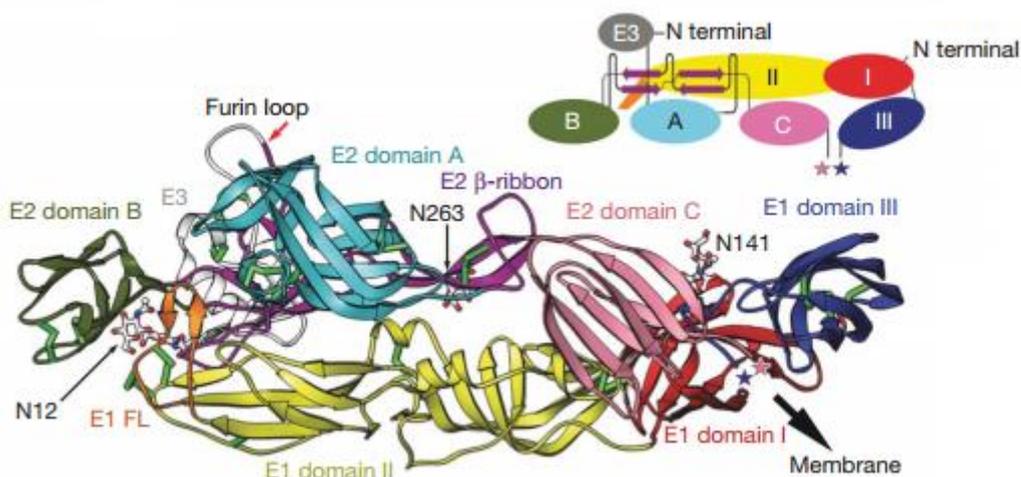
Figura 4. Ciclo de replicação do vírus Chikungunya.



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

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

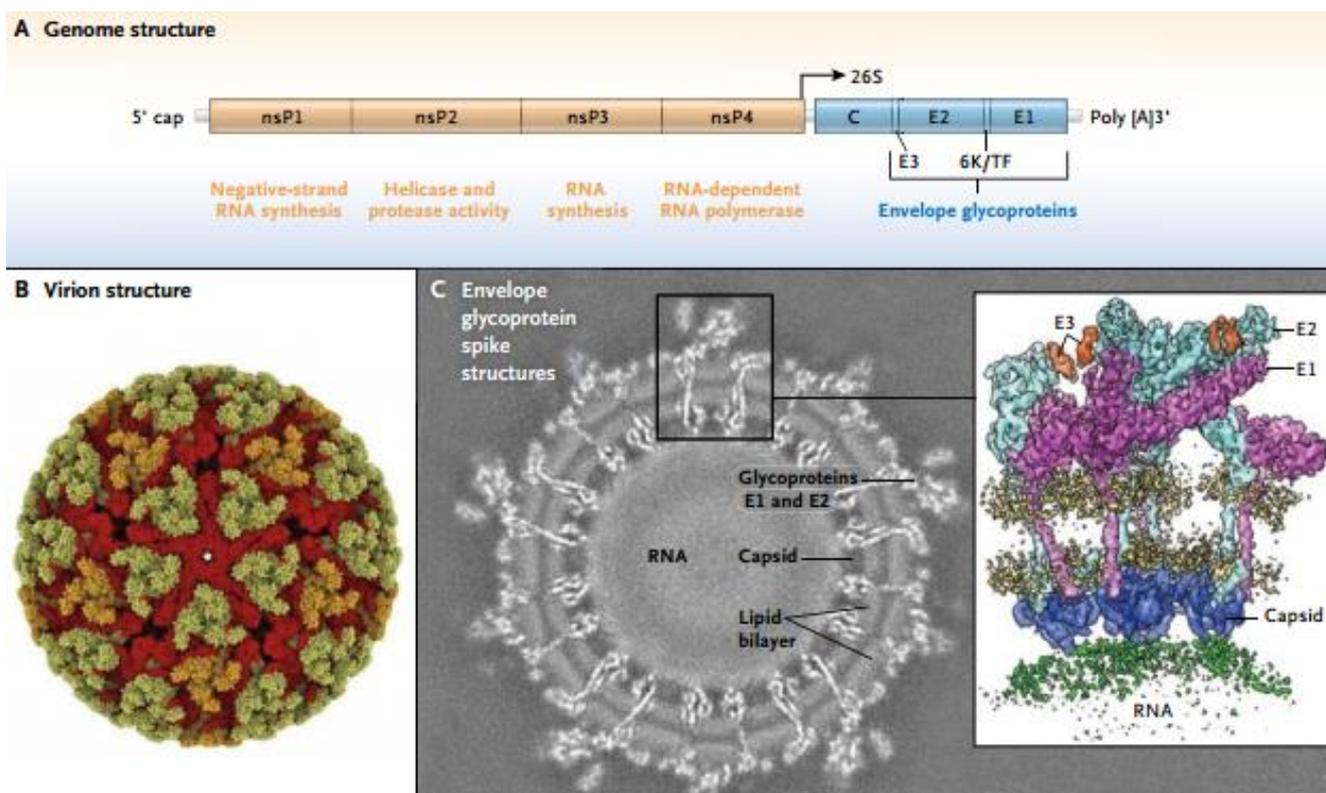
Figura 5 Organização das proteínas estruturais E3, E2 e E1 em diagrama de fitas



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

As proteínas E3 e E2 têm a função de ligação aos receptores celulares e a proteína E1 é a proteína responsável pela fusão de membranas na vesícula endossomal. Na organização do complexo das glicoproteínas de envelope, E2 protege E1, que não tem contato direto com E3, que se liga lateralmente a E2. E3 é uma proteína em formato de ferradura organizada com grampo beta N-terminal e três alfas hélices. A proteína E2 pertence à superfamília das imunoglobulinas, com três domínios de imunoglobulinas A, B e C organizados em barril e folhas beta e conectados por arcos. O Domínio B é o domínio central, o domínio A inclui domínio III de proteínas de fusão classe II e o domínio C é semelhante a fibronectina tipo III presente em moléculas de adesão de células nervosas. A proteína E1 é organizada em três domínios ricos em folhas beta, domínios I, II e III e possui um peptídeo interno de fusão na ponta do domínio II (17).

Figura 6 Organização do genoma e estrutural do vírus Chikungunya.

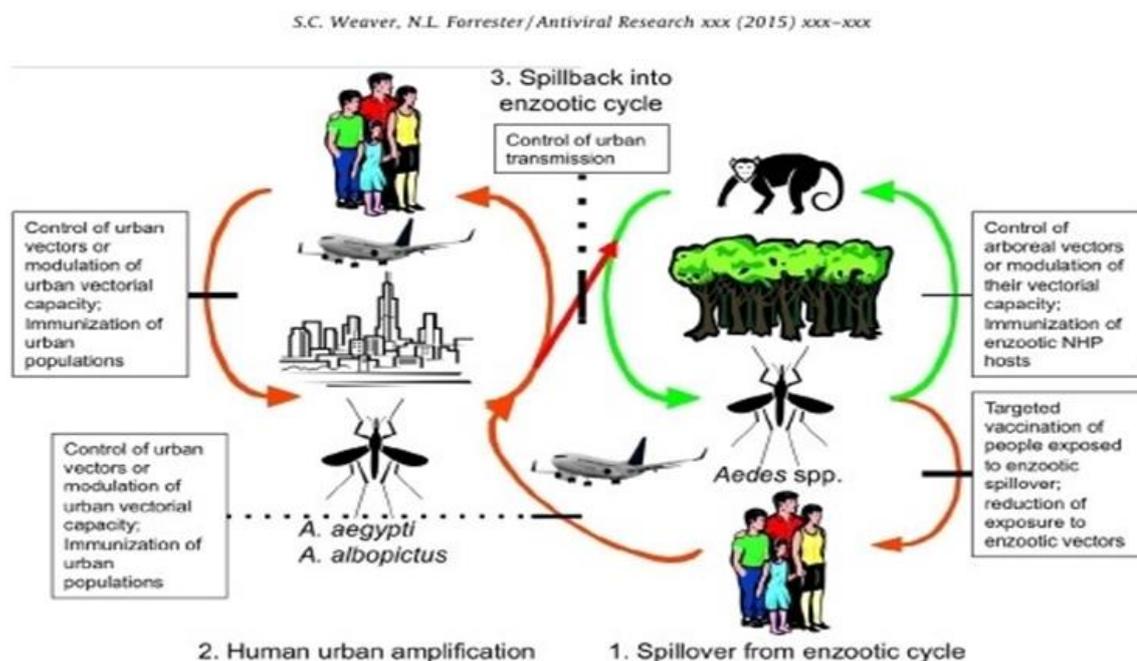


No painel A na parte superior está representado a organização do genoma do vírus Chikungunya. No painel B está representada a estrutura do virion. No painel C está representada a reconstrução do vírus Chikungunya em imagem de alta resolução por crioeletromicroscopia e a predição das estruturas das glicoproteínas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

1.3. Transmissão

No continente africano o CHIKV estabelece um ciclo enzoótico/silvático que ocorre essencialmente em áreas florestadas, envolvendo mosquitos vetores silvestres do gênero *Aedes* e primatas não-humanos. Já no continente asiático, o ciclo de transmissão do CHIKV está geralmente associado ao mosquito de hábitos urbano *Ae. Aegypti* e ao homem (4). Entretanto, durante a epidemia de Chikungunya na ilha Reunião, observou-se baixo número de *Ae. Aegypti* e uma elevada densidade de *Ae. albopictus* na área onde o *Ae. Aegypti* não predomina (18).

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



Fonte: adaptado de Weaver & Forrester 2015

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

Atualmente as regiões Nordeste e Norte são as que mais notificam casos no país com uma incidência de 335,6 e 29,0 casos a cada 100 mil habitantes (Boletim epidemiológico - Ministério da Saúde, 2016). Neste contexto, ressaltamos que o Brasil apresenta elevada incidência dos vetores da doença e possui características climáticas favoráveis ao mosquito. Assim, a erradicação dos principais vetores da

doença é dificultada pelas condições climáticas favoráveis, socioeconômicas e problemas de saneamento básico limitado e precário nos principais centros urbanos (20,22).

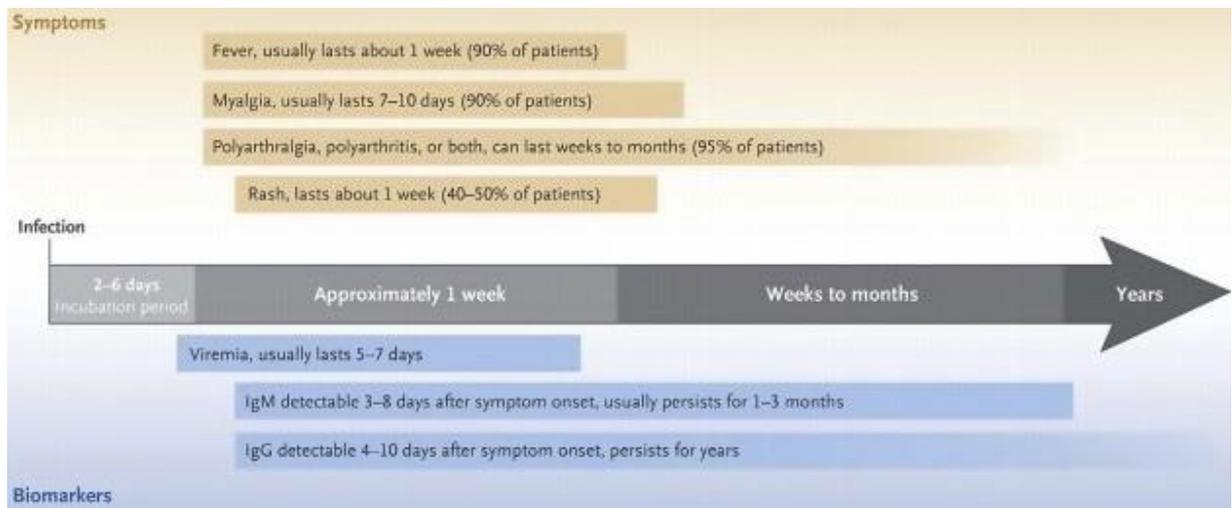
1.4. Manifestações clínicas e Patogênese

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

Casos graves da infecção causada pelo vírus podem ocorrer em populações de imunocomprometidos, recém-nascidos e idosos, populações naturalmente expostas a riscos. Casos de transmissão materno-fetal foram relatados durante os surtos provocados pelo vírus no Leste da África (26,27), e posteriormente em Sri Lanka (27). Entre esses casos raros, 50% dos recém-nascidos nasceram de mães com viremia periparto detectável de CHIKV (26). Os recém-nascidos manifestaram encefalopatias e convulsões, trombocitopenia, hipotensão, disfunção ventricular, pericardite e outros problemas cardiovasculares (26–28). Em crianças e adolescentes a Febre Chikungunya é geralmente benigna com quadros raros de artralgia persistente. No entanto, manifestações atípicas com sequelas também foram descritas incluindo manifestações neurológicas simples e graves (29–32).

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

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



Fonte: adaptado de Couderc & Lecuit 2015

1.5. Imunidade

1.5.1. Imunidade inata

As respostas da imunidade inata são importantes para limitar a disseminação do vírus a partir do local de infecção, a replicação viral e auxiliar a resposta imunológica adaptativa no combate à infecção. A produção dos interferons tipo I, IFN- α e IFN- β são essenciais para a imunidade inata na tentativa de contenção a replicação e o espalhamento do vírus, sendo a principal resposta antiviral dos

hospedeiros, atuando através de diversos mecanismos para impedir a infecção (38,39,40). Citocinas e quimiocinas podem ser identificadas na fase aguda da doença, como as citocinas , IL-1 β , IL-6 , e o TNF- α (39,40,41).

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

1.5.2. Imunidade Adaptativa e proteção

As células TCD4+ e TCD8+ são importantes efetores da imunidade celular durante a infecção viral e ambos podem eliminar as células infectadas por CHIKV. Foi demonstrado que essas células têm importante papel na ativação das células *Natural Killer* (NK) conferindo uma resposta mais efetiva contra várias proteínas virais (42–44). A resposta imune humoral ou adaptativa requer a produção de anticorpos específicos pelos plasmócitos (células B maduras) contra antígenos virais específicos e imunogênicos. A infecção primária por CHIKV gera anticorpos de proteção contra uma nova infecção precoce gerando populações imunes à uma nova infecção causada pelo vírus (18,44). Os anticorpos anti-CHIKV das classes M e G (imunoglobulinas M - IgM e G - IgG) são detectados no soro dos pacientes infectados durante a fase aguda e convalescente da infecção, respectivamente (46,47). Entende-se que pacientes em fase convalescente da infecção possuem anticorpos com capacidade neutralizante (48,49) sugerindo um potencial profilático contra a Febre Chikungunya (48–51). Além disso, os anticorpos do isótipo IgG3 dominam a resposta humoral contra CHIKV. Ainda, existe uma correlação entre o

final da fase virêmica e a produção precoce dos anticorpos IgG3, que pode conferir uma proteção clínica contra o risco de artralgia persistente (48,50,52). Os pacientes com resposta tardia estão mais suscetíveis a artralgia crônica devido a possibilidade do vírus estabelecer uma infecção prolongada persistindo nas articulações afetadas, gerando reservatórios virais protegidos da ação neutralizante dos anticorpos IgG. Kam et al. (48,52) sugere que uma carga viral elevada na fase aguda favorece o estabelecimento de uma proteção total contra a fase crônica, enquanto uma baixa viremia que provoca sintomas menos graves na fase aguda, está, em contraste, associada à artralgia persistente em fases mais avançadas da infecção.

1.6. Reconhecimento Antigênico dos Anticorpos contra CHIKV

O reconhecimento antigênico baseia-se em determinar as proteínas imunogênicas de CHIKV reconhecidas pelos anticorpos específicos gerados na fase convalescente da infecção. Em 2008, durante um surto de CHIKV em Singapura, observou-se que anticorpos de resposta contra a maioria destes determinantes proteicos foram elevadas em 2 a 3 meses, mas progressivamente diminuiu. Apenas a resposta contra a glicoproteína E2 ainda era detectável em 21 meses pós infecção. Esta resposta de longa duração contra a região N-terminal da glicoproteína E2 (aminoácidos entre as posições 2800 e 2818) faz com que seja um importante candidato para ferramentas de diagnóstico sorológico (48).

Entre as proteínas não estruturais, apenas a nsP3 foi reconhecida pelos anticorpos anti-CHIKV sob condições experimentais descritas por (48). Isto reflete a diferente especificidade biológica destas proteínas não estruturais. A proteína nsP1 interage preferencialmente com lipídios da célula hospedeiras (53–55) e pode, assim, ser protegida de detecção imunológica e de reconhecimento antigênico (56). As proteínas não estruturais nsP2 e nsP4 também interagem com diferentes

proteínas do hospedeiro que podem protegê-las da detecção imunológica (56). As funções e a atividade da proteína nsP3 são pouco conhecidas, porém foi relatado que a região C-terminal desta proteína é desordenada e pode favorecer o reconhecimento pelos receptores de células B que estão presentes em células B específicas (56). Não há relatos da proteína 6K elicitar uma resposta imune adquirida, esta proteína forma canais de íons e poros estando, portanto, inserida na membrana plasmática da célula hospedeira (57) e não acessíveis aos anticorpos contra ela direcionados (48).

1.7. Mapeamento de Epítomos de CHIKV

A técnica de mapeamento de epítomos possui inúmeras e importantes aplicações, dentre elas o uso de desenvolvimento de novas vacinas e também para melhoria de vacinas já existentes. Este é um processo rápido, eficiente e crucial no entendimento do sistema imune para uma proteína qualquer (58,59). o desenvolvimento de métodos para síntese de imunógenos sintéticos tornou-se cada vez mais aplicada e explorada junto com o desenvolvimento e melhoramento dos algoritmos de bioinformática para predição de alvos imunogênicos identificando as potenciais moléculas de interesse (35–37). Os epítomos são classificados conforme seu reconhecimento por diferentes células de defesa e pelo seu processamento. Os linfócitos T reconhecem apenas epítomos lineares processados e apresentados pelas células apresentadoras de antígenos via MHC de classe II. Este processo é crucial para estimular a produção dos anticorpos específicos secretados pelos linfócitos B que são capazes de reconhecer e se ligar aos epítomos lineares e conformacionais dos antígenos. Portanto, os epítomos podem ser lineares ou conformacionais, sendo os lineares dispostos linearmente em uma proteína (sequência de aminoácidos da estrutura primária), já os conformacionais são descontínuos na sequência de

aminoácidos e estão ligados as estruturas secundárias, terciárias e quaternárias das proteínas. (35–37).

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

Posteriormente (48) realizou um mapeamento de epítopos na região N-terminal da glicoproteína E2. E nesse estudo foi detectado que altos níveis de anticorpos contra o epítipo, E2EP3 (aminoácidos 2800-2818), durante a fase aguda da infecção e está associado com a protecção clínica a longo prazo.

Justificativa

Devido à natureza explosiva dos surtos de CHIKV e o choque no sistema de saúde nos países em que ocorreram, estes surtos têm grande impacto em termos de morbidade e problemas socioeconômicos. A predição de transmissão futura do CHIKV dentro do Brasil indica que os limites geográficos dos atuais genótipos *asiático* e *ECSA* provavelmente irão se sobrepor, com casos de co-circulação espaço-temporal. Não havia imunidade prévia da população para CHIKV no Brasil, de modo que a incidência aumentou consideravelmente em 2016 (5). Dados do boletim epidemiológico do Ministério da Saúde do Brasil revelaram 271.424 mil casos do CHIKV em 2016, um aumento de 10 vezes em relação ao ano de 2015.

Além disso foram relatados 120 óbitos pelo CHIKV em 2016 sendo que a maior parte desses óbitos ocorreram de fevereiro a março, período de intensa circulação viral em áreas endêmicas (Boletim epidemiológico Ministério da Saúde, 2016), demonstrando o potencial emergente do CHIKV. Em 2017, foram registrados 185.593 casos prováveis de febre de chikungunya e 186 óbitos confirmados. Em 2018, até a Semana Epidemiológica 34 (31/12/2017 a 25/08/2018), foram registrados 72.117 casos prováveis de febre de chikungunya e 22 óbitos confirmados no país, com uma incidência de 34,7 casos/100 mil habitantes. A região Sudeste apresentou o maior número de casos prováveis de febre de chikungunya (42.933 casos; 59,5%) em relação ao total do país (Boletim epidemiológico Ministério da Saúde, 2018).

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

Nesse contexto o mapeamento de epitopos promove uma maior compreensão sobre a interação dos peptídeos e a ativação da resposta imune. Em conjunto, estas observações implicam fortemente a importância das interações entre os anticorpos específicos e os peptídeos correspondentes ao nível dos aminoácidos (62), proporcionando informações chaves no desenvolvimento de vacinas para CHIKV,

com resíduos de aminoácidos, específicos importantes no reconhecimento dos anticorpos antiCHIKV. Por último este estudo busca também identificar marcadores antigênicos de proteção contra CHIKV.

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

O objetivo do presente estudo é caracterizar o perfil de reconhecimento antigênico dos anticorpos da classe IgG dos pacientes infectados previamente pelo CHIKV, e mapear os epitopos para identificação dos locais específicos de ligação destes anticorpos aos antígenos.

2.2. Objetivos específicos

- (i) Avaliar o reconhecimento antigênico dos anticorpos de classe IgG anti-CHIKV induzidos pela infecção primária em seres humanos de uma das linhagens de ECSA CHIKV introduzida no Brasil recentemente e isolada em Feira de Santana, Bahia.
- (ii) Identificar os epitopos reativos correlacionando-as com os grupos de pacientes em estudo.
- (iii) Identificar assinaturas antigênicas passíveis de uso no desenvolvimento de ensaios de diagnóstico sorológico e/ou desenvolvimento de vacinas.

3. Métodos

3.1. Comitê de ética

A coleta de amostras de soro para o presente estudo foi realizada em Sergipe em estudo colaborativo com o LACEN de Aracajú em Janeiro de 2016, de acordo com um protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEP-ICB). Pacientes com

sintomas característicos de infecção por arbovírus foram amostrados. Todos os adultos participantes da pesquisa assinaram um termo de consentimento informado por escrito, e quando criança, a assinatura foi realizada pelos pais ou tutores com o consentimento livre e esclarecido informado por escrito em seu nome. Em seguida, aos participantes foi aplicado um questionário para obtenção de informações pertinentes à pesquisa.

3.2 Reconstrução Filogenética

Para a reconstrução filogenética do vírus Chikungunya foram obtidas 63 sequências do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) referentes aos genomas completos representando todos os genótipos, a filogenia foi realizada com análise de verossimilhança utilizando o software IQ-TREE (<http://www.iqtree.org/>), valores de bootstrap acima de 90 destacados nos nodos principais. Todas as sequências desse estudo estão apresentadas na árvore no formato genótipo/número de acesso /país/ano de isolamento. **(63)**

3.3. Ensaio imunoenzimático qualitativo para os anticorpos IgG anti-CHIKV

O protocolo para a detecção de anticorpos IgG, foi desenvolvido pelo EuroImmun (Euroimmun®, Lübeck, Germany). Na primeira etapa foi adicionado 100 µl do calibrador 2, controles positivo e negativo e 100 µl de amostras diluída 1:100 nos poços da microplaca cobertas com antígenos (proteínas estruturais recombinantes) do vírus Chikungunya. Após adicionar as amostras a placa foi incubada por 1 hora à 37°C. Na segunda etapa a placa foi lavada 3 vezes com 300 µl de solução de lavagem em cada poço e após a lavagem foi adicionado 100ul de conjugado enzimático (IgG anti-humano marcado com peroxidase) nos poços da

microplaca. A placa foi incubada à temperatura ambiente (18 a 25 °C) por 30 minutos. Na terceira etapa a placa foi lavada 3 vezes com 300 µl de solução de lavagem e após a lavagem foi adicionado 100 µl de solução substrato/cromógeno em cada poço da microplaca seguindo de incubação à temperatura ambiente (18 a 25 °C) por 15 minutos. Na quarta etapa foi adicionado 100 µl de solução de parada em cada poço da microplaca e em seguida foi realizada a medição fotométrica à 450nm e 620nm. A interpretação dos resultados foi realizada seguindo as instruções do protocolo.

3.4. Ensaio imunoenzimático quantitativo para os anticorpos IgG anti-CHIKV

O protocolo para a detecção de anticorpos IgG, foi desenvolvido pelo EuroImmun (Euroimmun®, Lübeck, Germany). Na primeira etapa foi adicionado 100 µl dos calibradores 1, 2, 3, controles positivo e negativo e 100 µl de amostras diluída 1:100 nos poços da microplaca cobertas com antígenos (proteínas estruturais recombinantes) do vírus Chikungunya. Após adicionar as amostras a placa foi incubada por 1 hora à 37°C. Na segunda etapa a placa foi lavada 3 vezes com 300 µl de solução de lavagem em cada poço e após a lavagem foi adicionado 100ul de conjugado enzimático (Ig anti-humano marcado com peroxidase) nos poços da microplaca. A placa foi incubada à temperatura ambiente (18 a 25 °C) por 30 minutos. Na terceira etapa a placa foi lavada 3 vezes com 300 µl de solução de lavagem e após a lavagem foi adicionado 100 µl de solução substrato/cromógeno em cada poço da microplaca seguindo de incubação à temperatura ambiente (18 a 25 °C) por 15 minutos. Na quarta etapa foi adicionado 100 µl de solução de parada em cada poço da microplaca e em seguida foi realizada a medição fotométrica à 450nm e 620nm. A interpretação dos resultados foi realizada seguindo as intruções do protocolo.

3.5. Modelagem computacional

A modelagem de proteínas estruturais do CHIKV foi realizada utilizando a estratégia de homologia com base em estruturas com cristalografia disponível no Protein Data Bank (PDB). Esta etapa foi realizada utilizando o software I-TASSER v5.1 (64) para comparação dos resultados, cada modelo gerado foi analisado com relação aos Z-scores e diedros e comparações em termos de desvios de carbonos-alfa por resíduo.

As predições de epitopos conformacionais e lineares foram realizadas com base no alinhamento de sequências de diferentes isolados de CHIKV (número de acesso: [KP164572](#), [KJ796852](#), [KY055011](#), [HM045817](#)) e utilizando o pacote de programas do site ExPaSY (65). Os epitopos conformacionais foram obtidos após a análise das estruturas modeladas no algoritmo de predição Discotope 2.0 (<http://tools.iedb.org/discotope>) que integra de forma linear a combinação de dois scores, um a partir da escala de hidrofobicidade /hidrofilicidade e um score de propensão de epitopos que é baseado no cálculo de acessibilidade de superfície e área de contato dos resíduos (66,67). Os epitopos lineares foram obtidos após análise das estruturas modeladas no algoritmo de predição ElliPro (<http://tools.iedb.org/ellipro/>) (66,67) que é baseado no índice de protrusão dos resíduos. Foram utilizados os softwares Pymol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC.) e Jalview (www.jalview.org) para edição e indicação dos epitopos conformacionais e lineares nas proteínas modeladas e nas sequências alinhadas respectivamente para cada uma das proteínas estruturais de CHIKV.

3.6. ELISA indireto à Base de Peptídeos

3.6.1 Padronização ELISA indireto à Base de Peptídeos

Para a padronização do ELISA indireto utilizando peptídeos sintéticos como antígenos foi utilizado um pool de soros de 15 amostras IgG positivo Chikungunya identificadas pelo teste EuroImmun e como controle negativo um soro reativo inespecífico comercial IgG negativo para vírus Chikungunya pelo teste EuroImmun. Os peptídeos P1 à P9 correspondentes a proteína E2 e os peptídeos P10 e P11 correspondentes a proteína E3 foram diluídos em tampão PBS filtrado (1M pH 7,4) à uma concentração final de 200 µg/ml, a partir dessa diluição foram realizadas diluições seriadas de fator 100x até a concentração de 0,2 fg/ml para se obter uma curva de diluição dos antígenos. As diluições de peptídeos foram utilizadas para a sensibilização da placa de Elisa de 96 poços (Greiner Bio) sendo adicionados 50µl de solução por poço, as placas foram encubadas em temperatura ambiente até os poços secarem. Como referência de background foram utilizados poços sem peptídeos apenas com a solução de bloqueio. Para etapa de bloqueio foram testadas diferentes soluções sendo o melhor bloqueio obtido a partir da solução de Leite em pó 5% albumina 1% e Tween20 0,05% diluídos em PBS1x (pH7,4), sendo adicionados 200µl por poço seguido de incubação overnight à 4°C ou à 37°C por duas horas. Após a solução de bloqueio ser retirada foi adicionado 50µl de soro diluído (1:100) em solução de lavagem PBS 1x (pH, 7,4) e incubação de 1 hora à 37 °C Os poços foram esvaziados e a placa lavada 3 vezes com 200µl por poço de solução de lavagem e após a lavagem foi adicionado 50µl de conjugado enzimático (Ig anti-humano marcado com peroxidase 1:12.000) nos poços da placa e incubação por 1 hora à 37°C. Após a incubação a placa foi lavada 4 vezes com 200 µl de solução de lavagem e após a lavagem foi adicionado 100 µl de solução

substrato/cromógeno em cada poço da microplaca seguindo de incubação à temperatura ambiente (18 a 25 °C) por 15 minutos. Na última etapa foi adicionado 100 µl de solução de parada em cada poço da microplaca e em seguida foi realizada a medição fotométrica à 450nm. E por último foi realizada análise dos resultados de densidade óptica.

3.6.2 ELISA indireto à Base de Peptídeos padronizado

Nesta etapa foi utilizado soros individuais de 10 amostras IgG positivo Chikungunya identificadas pelo teste EuroImmun e como controle negativos soros individuais de 8 amostras IgG negativo para vírus Chikungunya pelo teste EuroImmun.

Os peptídeos P1 à P9 correspondentes a proteína E2 e os peptídeos P10 e P11 correspondentes a proteína E3 foram diluídos em tampão PBS filtrado (1M pH 7,4) à uma concentração final de 20 µg/ml. As diluições de peptídeos foram utilizadas para a sensibilização da placa de Elisa de 96 poços (Greiner Bio) sendo adicionados 50µl de solução por poço, as placas foram incubadas em temperatura ambiente até os poços secarem. Como referência de background foram utilizados poços sem peptídeos apenas com a solução de bloqueio. Para o bloqueio foi utilizado solução de Leite em pó 5% albumina 1% e Tween20 0,05% diluídos em PBS 1x (pH 7,4), sendo adicionados 50µl por poço seguido de incubação overnight à 4°C ou à 37°C por duas horas. Após a solução de bloqueio ser retirada foi adicionado 50µl de soro diluído (1:100) em solução de lavagem PBS 1x (pH, 7,4) e incubação de 1 hora à 37 °C Os poços foram esvaziados e a placa lavada 3 vezes com 200µl por poço de solução de lavagem e após a lavagem foi adicionado 50µl de conjugado enzimático (Ig anti-humano marcado com peroxidase 1:12.000) nos poços da placa e incubação por 1 hora à 37°C. Após a incubação a placa foi lavada 4 vezes com 200 µl de

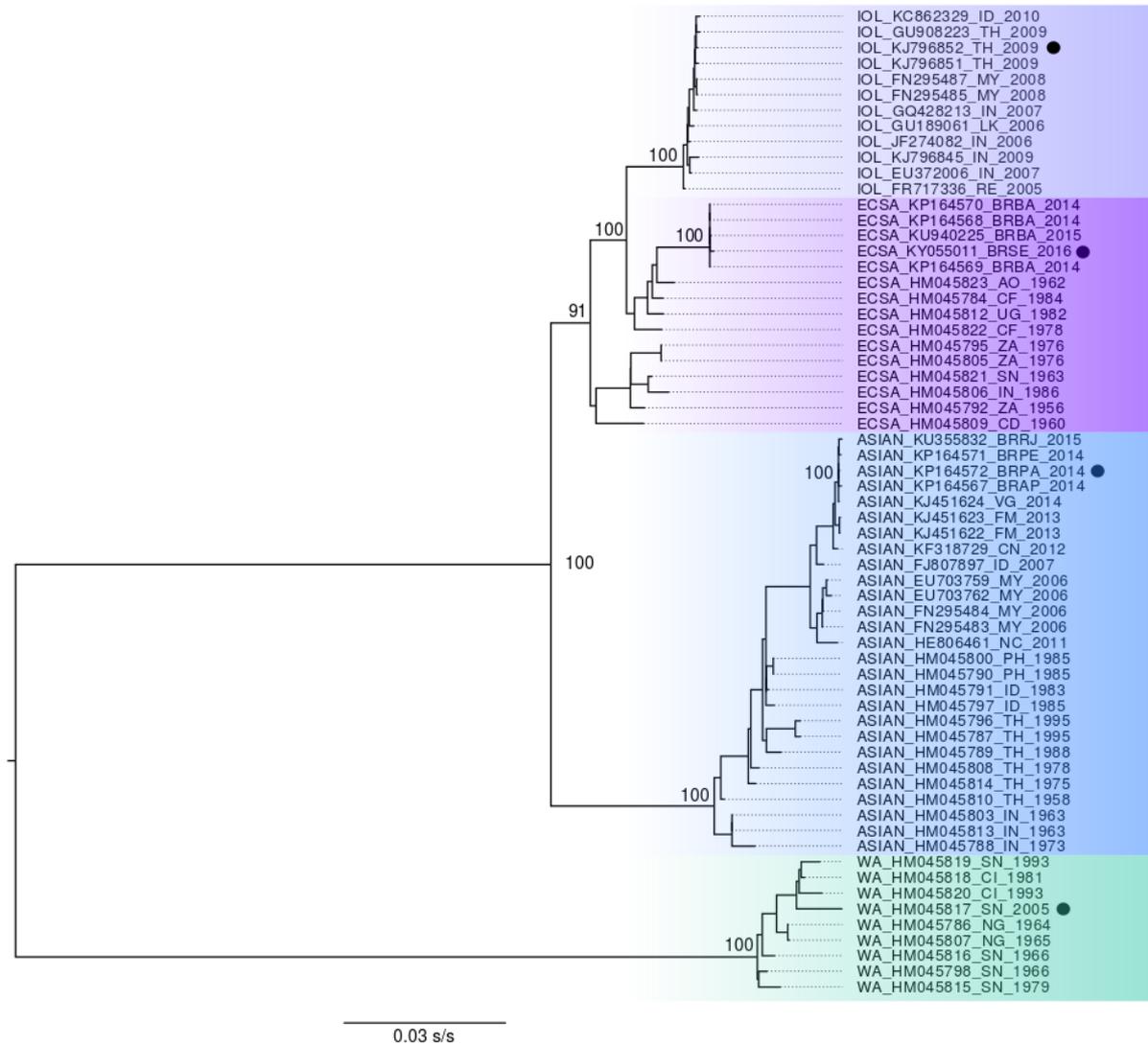
solução de lavagem e após a lavagem foi adicionado 100 µl de solução substrato/cromógeno em cada poço da microplaca seguindo de incubação à temperatura ambiente (18 a 25 °C) por 15 minutos. Na última etapa foi adicionado 100 µl de solução de parada em cada poço da microplaca e em seguida foi realizada a medição fotométrica à 450nm. E por último foi realizado análise dos resultados de densidade óptica.

3.7. Análises Estatísticas

Todos os experimentos foram realizados em triplicatas amostrais. Todos os dados foram apresentados como médias e desvio padrão. Diferenças nas respostas entre o grupo analisado e o grupo controle foram analisados usando testes estatísticos apropriados. Para análise de performance de classificador foi realizada uma curva ROC (*Receiver Operating Characteristic curve*) para cada peptídeo com intervalo de confiança de 95%, sensibilidade corresponde a taxa de verdadeiros positivos e especificidade a taxa de verdadeiros negativos.

4. Resultados

Figura 9. Árvore filogenética representando os genótipos do vírus Chikungunya.



Reconstrução filogenética do vírus Chikungunya, com 63 sequências de genomas completo. Cor verde o genótipo WA (oeste africano), cor azul genótipo Asiático, cor violeta genótipo ECSA (leste-central-sul- Africano) e cor cinza a linhagem IOL(Linhagem do Oceano Indico).

Tabela 1 Sorologia das amostras para o vírus Chikungunya.

	IgM Negativo	IgM Positivo	IgG Negativa	IgG Positivas	EuroImmun Título IgG CHIKV	Desvio Padrão
	CHIKV	CHKV	CHIKV	CHIKV	UR/mL (média)	
Pool de soros (Padronização)	18	0	0	18	181	0,001
Peptídeo 1	18	0	8	10	160,41	46,87
Peptídeo 2	18	0	8	10	160,41	46,87
Peptídeo 3	19	0	9	10	160,41	46,87
Peptídeo 4	19	0	9	10	160,41	46,87
Peptídeo 5	19	0	9	10	160,41	46,87

As proteínas de superfície de vírus de RNA são alvos de anticorpos neutralizantes. A entrada dos Alphavirus nas células ocorre através de endocitose mediada por receptores celulares, as proteínas E3 e E2 têm a função de ligação aos receptores celulares e a proteína E1 é a proteína responsável pela fusão de membranas na vesícula endossomal.

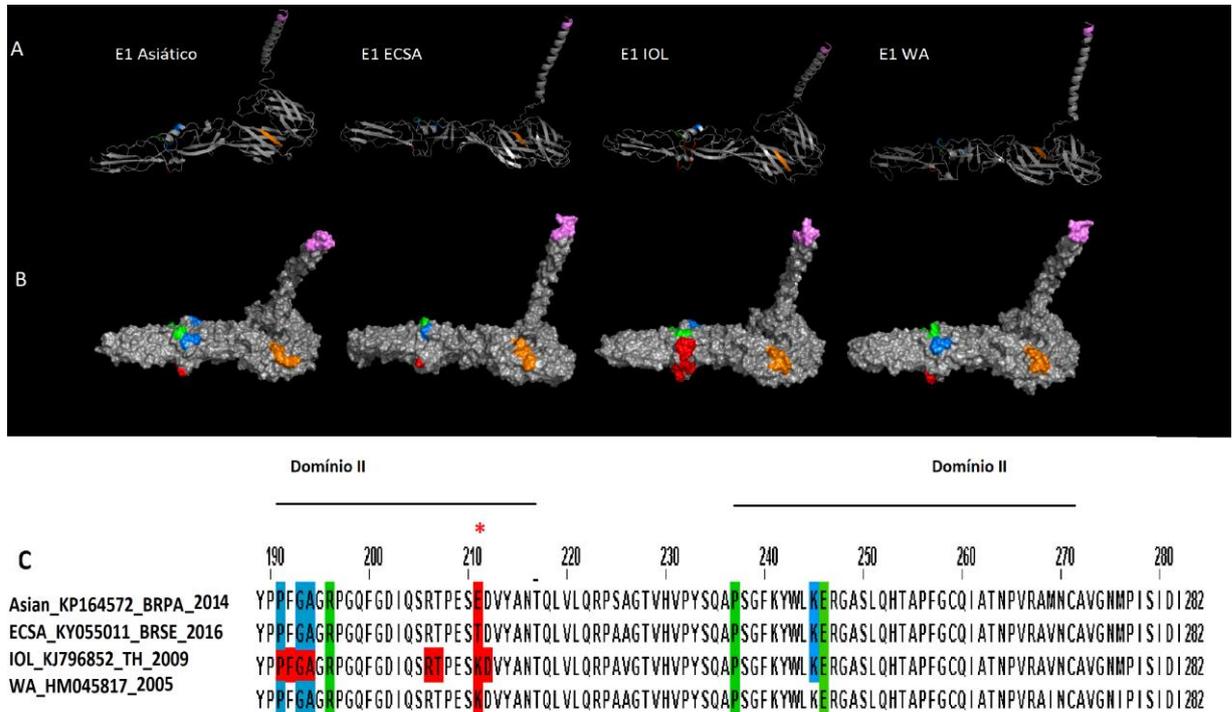
Com o objetivo de identificar os epitopos alvos dos anticorpos específicos da classe IgG anti CHIKV foram utilizadas 18 amostras de soro de pacientes CHIKV IgG positivas coletadas no estado de Sergipe no ano de 2016 (TABELA1) e caracterizadas com ensaio imunoenzimático quantitativo desenvolvido pela EuroImmun.

Para mapear os epitopos inicialmente foram obtidas 63 sequências de genomas completos do vírus Chikungunya depositadas nos bancos de dados público. Essas sequências foram utilizadas em uma reconstrução filogenética, com alto valor de suporte (Figura 9) para identificação dos genótipos e linhagens do vírus Chikungunya.

A partir dessa filogenia foram obtidas quatro sequências de referência para cada um dos genótipos Oeste Africano (WA), Asiático(Asian) ,Leste-Central-Sul-Africano (ECSA) e a linhagem do Oceano Índico (IOL),com os respectivos números de acesso [KP164572](#), [KJ796852](#), [KY055011](#), [HM045817](#). Os genomas das sequências de referências foram traduzidos em sequências de aminoácidos e as regiões correspondentes as proteínas estruturais E3, E2 e E1 foram separadas e modeladas individualmente utilizando o software I-tasser v5.1. Com as estruturas obtidas na modelagem foi realizado o mapeamento de

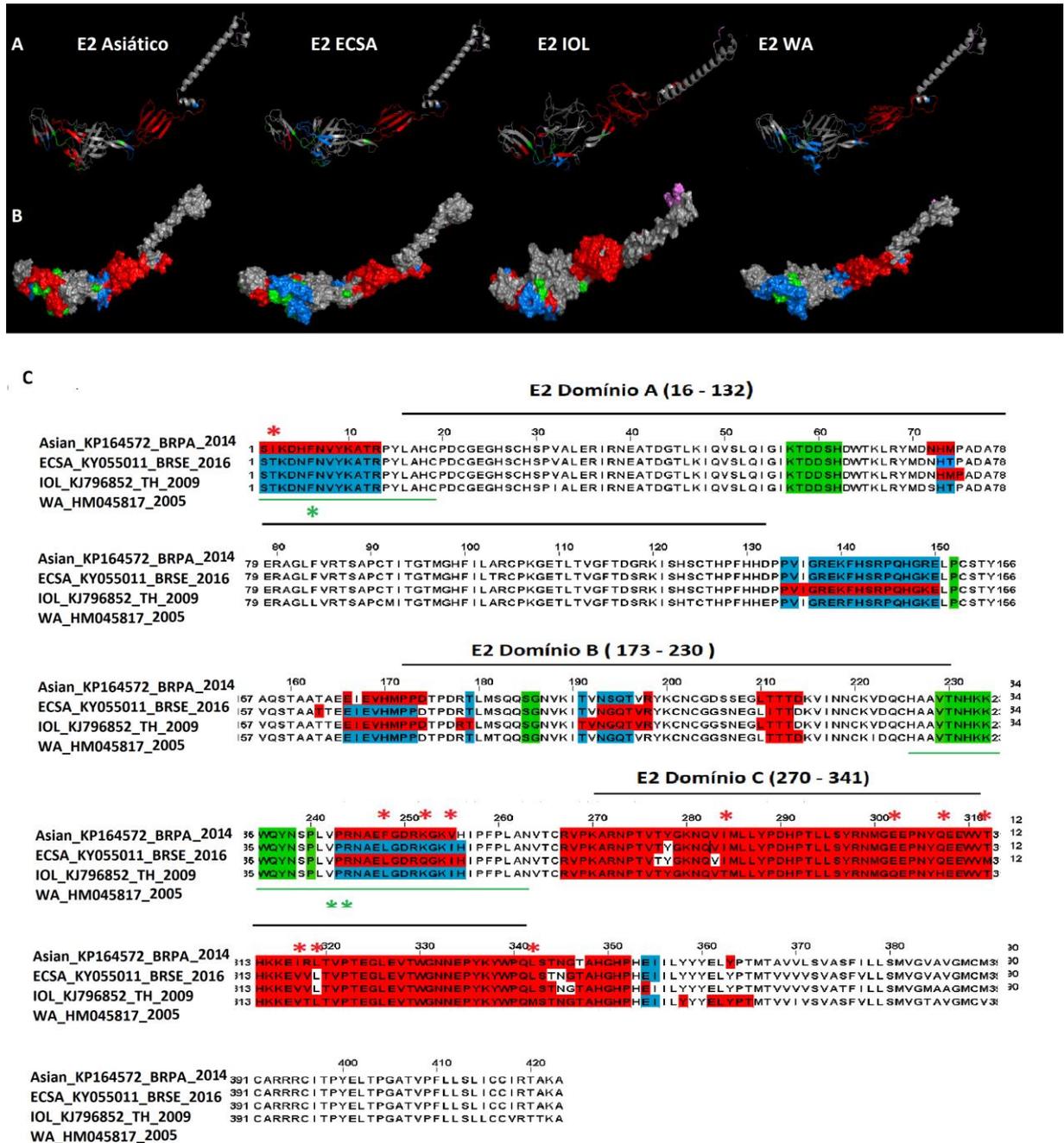
epitopos conformacionais e lineares para proteínas estruturais utilizando os preditores DISCOTOPE2.0 e ELLIPRO (Figuras 10,11,12 e 13).

Figura 10 Predição epitopos conformacionais para a proteína E1 de CHIKV.



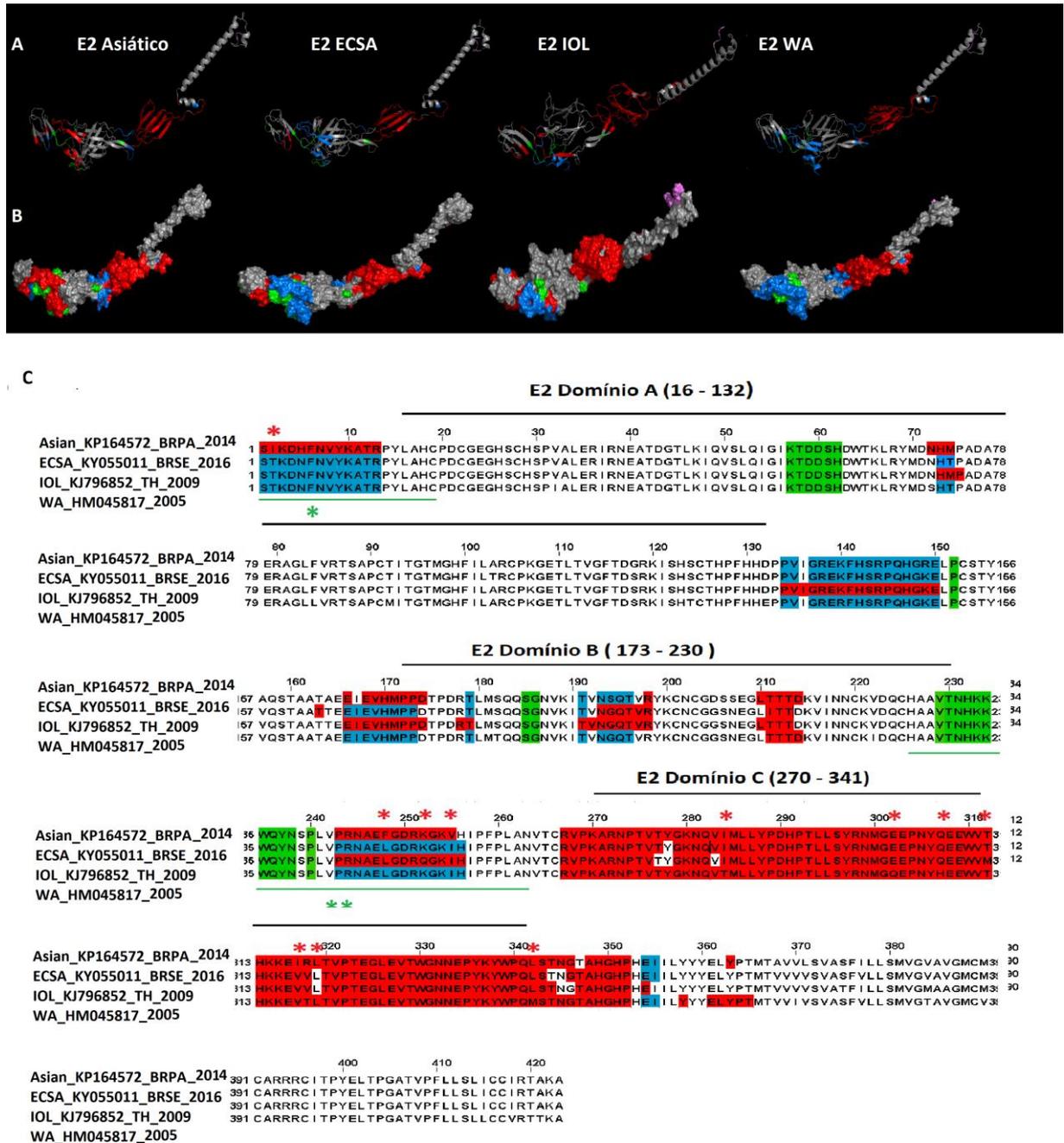
Na parte superior **A**- Epitopos destacados nas estruturas secundárias para os genótipos Asiático, ECSA, IOL e WA. **B**- Epitopos destacados na superfície da proteína E1. **C**- Alinhamento das sequências das proteínas E1 correspondente aos quatro genótipos com os epitopos marcados. Cor verde epitopos compartilhados entre todos os genótipos. Cor azul epitopos comum a mais de um genótipo. Cor vermelha epitopo único de cada genótipo. Cor laranja primeiros 5 aminoácidos da região N-terminal. Cor violeta últimos 5 aminoácidos da região C-terminal. * Mudanças de aminoácidos nas regiões preditas como epitopos.

Figura 11 Predição epitopos conformacionais para a proteína E2 de CHIKV.



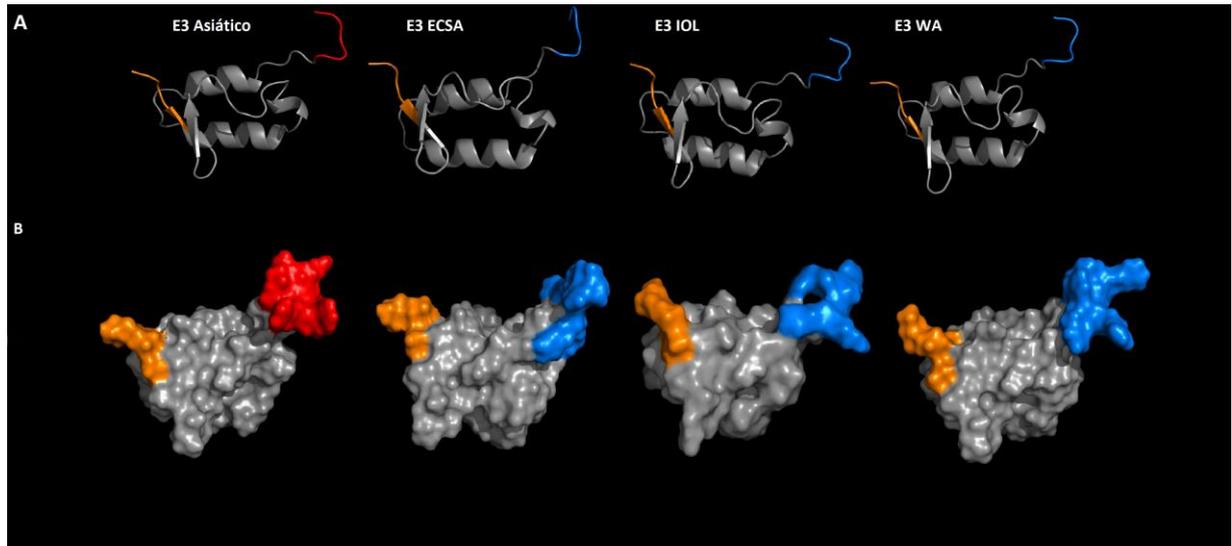
Na parte superior **A**- Epitopos destacados nas estruturas secundárias para os genótipos Asiático, ECSA, IOL e WA. **B**- Epitopos destacados na superfície das proteínas E2. **C**- Alinhamento das sequências das proteínas E2 correspondente aos quatro genótipos com os epitopos destacados. Cor verde epitopos compartilhados entre todos os genótipos. Cor azul epitopos comum a mais de um genótipo. Cor vermelha epitopo único de cada genótipo. Cor violeta últimos 5 aminoácidos da região C-terminal. *- Mudanças de aminoácidos nas regiões preditas como epitopos. *, ** Epitopos de CHIKV já identificados e descritos.

Figura 12. Predição epitopos lineares para a proteína E2 de CHIKV.



Na parte superior **A**- epitopos destacados nas estruturas secundárias para os genótipos Asiático, ECSA, IOL e WA. **B**- epitopos destacados na superfície da proteínas E2. **C**- Alinhamento das sequências das proteínas E2 correspondente aos quatro genótipos com os epitopos destacados. Cor verde epitopos compartilhados entre todos os genótipos. Cor azul epitopos comum a mais de um genótipo. Cor vermelha epitopo único de cada genótipo. *- Mudanças de aminoácidos nas regiões preditas como epitopos. *, ** Epitopos de CHIKV já identificados e descritos.

Figura 13 Predição epitopos conformacionais para a proteína E3 de CHIKV.

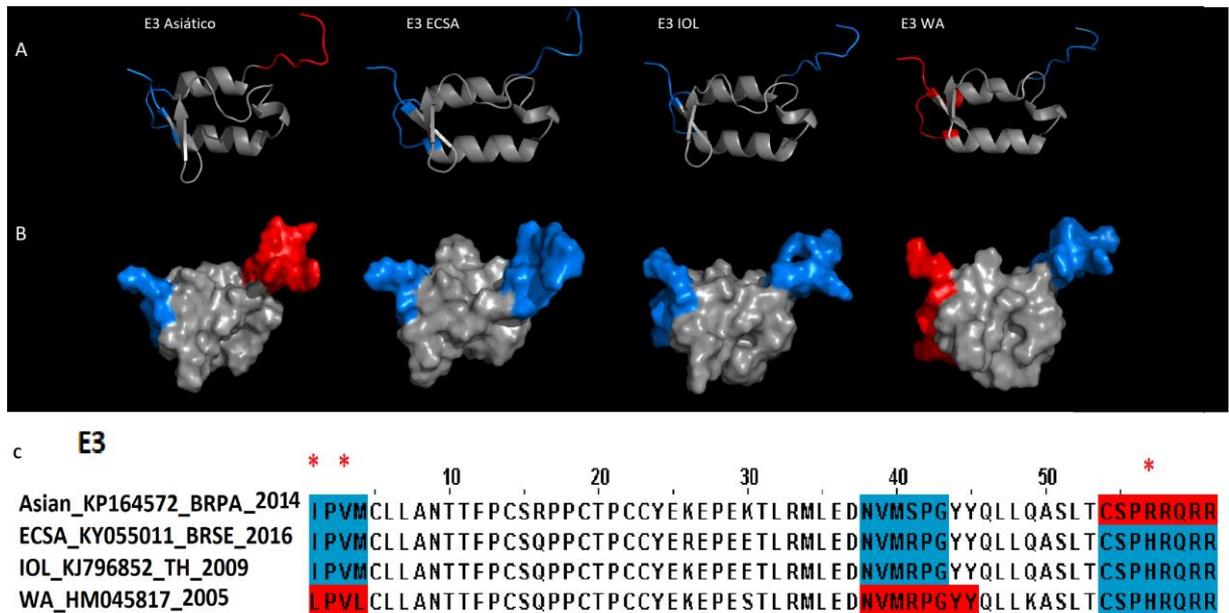


c

		10	20	30	40	50	*																																																		
Asian_KP164572_BRPA_2014	I	P	V	M	C	L	L	A	N	T	T	F	P	C	S	R	P	P	C	T	P	C	C	Y	E	K	E	P	E	K	T	L	R	M	L	E	D	N	V	M	S	P	G	Y	Y	Q	L	L	Q	A	S	L	T	C	S	P	RRQRR
ECSA_KY055011_BRSE_2016	I	P	V	M	C	L	L	A	N	T	T	F	P	C	S	Q	P	P	C	T	P	C	C	Y	E	R	E	P	E	T	L	R	M	L	E	D	N	V	M	R	P	G	Y	Y	Q	L	L	Q	A	S	L	T	C	S	P	HRQRR	
IOL_KJ796852_TH_2009	I	P	V	M	C	L	L	A	N	T	T	F	P	C	S	Q	P	P	C	T	P	C	C	Y	E	K	E	P	E	T	L	R	M	L	E	D	N	V	M	R	P	G	Y	Y	Q	L	L	Q	A	S	L	T	C	S	P	HRQRR	
WA_HM045817_2005	L	P	V	L	C	L	L	A	N	T	T	F	P	C	S	Q	P	P	C	T	P	C	C	Y	E	K	E	P	E	T	L	R	M	L	E	D	N	V	M	R	P	G	Y	Y	Q	L	L	K	A	S	L	T	C	S	P	HRQRR	

Na parte superior **A**- epitopos destacados nas estruturas secundárias para os genótipos Asiático, ECSA, IOL e WA. **B**- epitopos destacados na superfície da proteínas E3. **C**- Alinhamento das sequências das proteínas E3 correspondente aos quatro genótipos com os epitopos destacados. Cor azul epitopos comum a mais de um genótipo. Cor vermelha epitopos único de cada genótipo. Cor laranja primeiros 5 aminoácidos da região N-terminal *- Mudanças de aminoácidos nas regiões preditas como epitopos. Cor laranja N-terminal.

Figura 14 Predição epitopos lineares para a proteína E3 de CHIKV.



Na parte superior **A-** epitopos destacados nas estruturas secundárias para os genótipos Asiático, ECSA, IOL e WA. **B-** epitopos destacados na superfície da proteínas E3. **C-** Alinhamento das sequências das proteínas E3 correspondente aos quatro genótipos com os epitopos destacados. Cor azul epitopos comum a mais de um genótipo. Cor vermelha epitopos único de cada genótipo. Cor laranja primeiros 5 aminoácidos da região N-terminal. *- Mudanças de aminoácidos nas regiões preditas como epitopos.

A predição de epitopos conformacionais para a proteína E1 (Figura 10) obteve epitopos curtos predominando na região do Domínio II, demonstrando o baixo potencial imunogênico dessa proteína para o reconhecimento antigênico mediado por linfócitos B.

A predição de epitopos conformacionais e lineares para proteína E2 (Figura 11 e 12) identificou epitopos de tamanhos variáveis distribuídos ao longo de todos os domínios. A proteína E2 apresentou o maior potencial imunogênico dentre as proteínas estruturais, gera anticorpos protetores durante todo o curso da infecção (47) e apresentou epitopos conformacionais e lineares em regiões variáveis e conservadas nas duas predições sendo o principal alvo da resposta imunológica.

Na predição de epitopos conformacionais e lineares para a proteína E3 (Figura 13 e 14) obteve-se epitopos curtos em ambas as predições. Na região C-terminal foi identificado

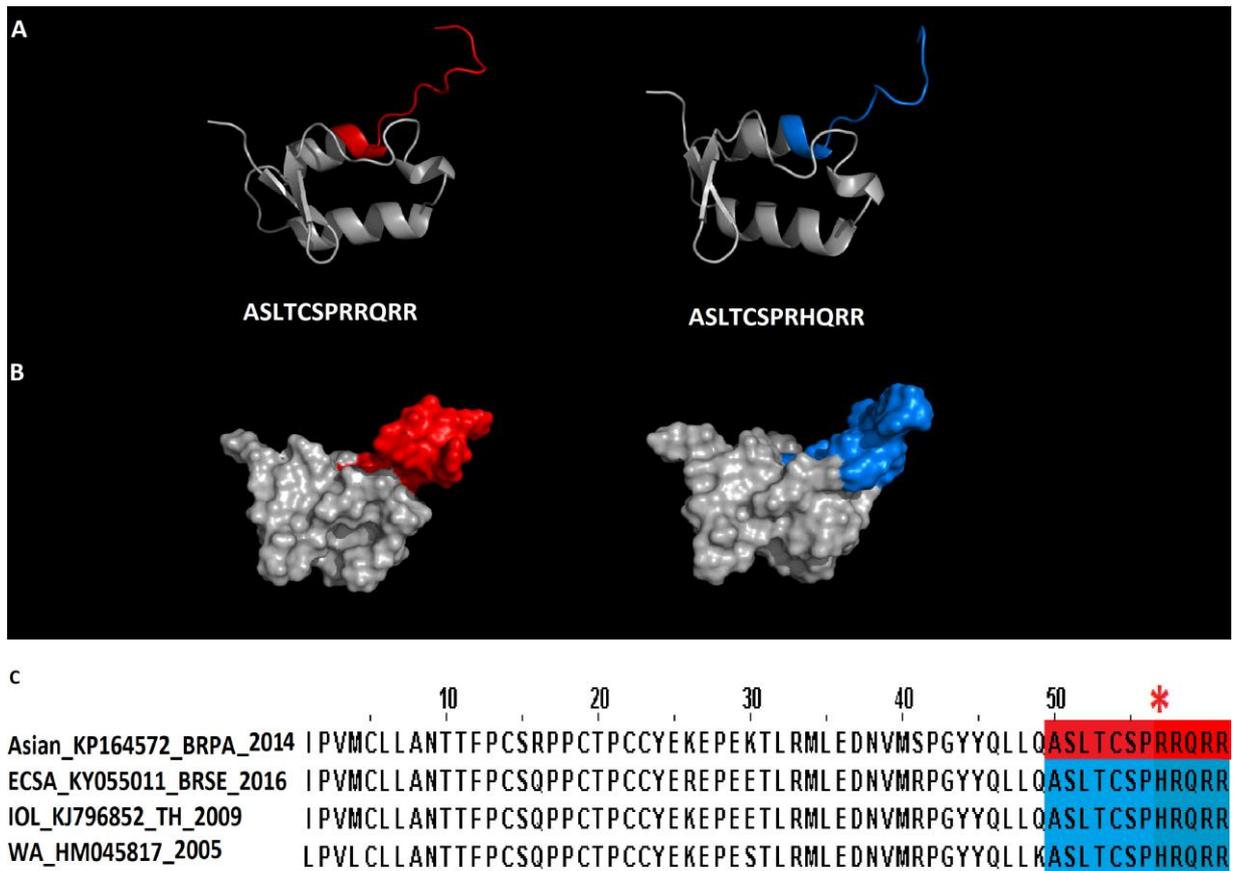
um potencial epitopo na posição 57 a 61 e se observou diferença na composição apenas para o genótipo Asiático.

Com os resultados obtidos nas predições combinados com as informações obtidas na pesquisa publicadas por Kam et al. 2012 e priorizando epitopos conservados entre todos os genótipos, foi selecionado um painel de 11 peptídeos lineares P1 à P9 com tamanho de 18 aminoácidos correspondentes a proteína E2 e P10 e P11 com tamanho 12 aminoácidos correspondente à proteína E3 (Tabela 2). Os peptídeos, P3, P4, P5, P8 e P9 são conservados entre todos os genótipos. Os peptídeos P1, P6 e P10 correspondem aos genótipos WA, ECSA e a linhagem IOL (semiconservados), sendo os peptídeos P2, P7 e P11 variantes desses peptídeos correspondentes ao genótipo Asiático.

Tabela 2 Oligopeptídeos lineares sintéticos correspondentes às regiões imunogênicas das proteínas E3 e E2 do vírus Chikungunya.

Proteína	Posição	Sequência do peptídeo	Genótipo
E3	2788-2799	ASLTCSPRRQRR	Asiático
	2788-2799	ASLTCSPHRQRR	ECSA, WA
E2	2800-2818	STKDNFVYKATRPYLAHC	ECSA, WA
	2800-2818	SIKDHFNVYKATRPYLAHC	Asiático
	2812-2828	TRPYLAHCPDCGEGHSC	Asiático, ECSA, WA
	2848-2865	IQVSLQIGIKTDDSHDWT	
	3026-3043	HAAVTNHKKWQYNSPLVP	Asiático, ECSA, WA
	3042-3059	VPRNAELGDRKGKIHIPF	ECSA, WA
	3042-3059	VPRNAEFGDRQGKVHIPP	Asiático
	3060-3077	PLANVTCRVPKARNPTVT	Asiático, ECSA, WA
	3190-3208	CARRRCITPYELTPGATV	WA

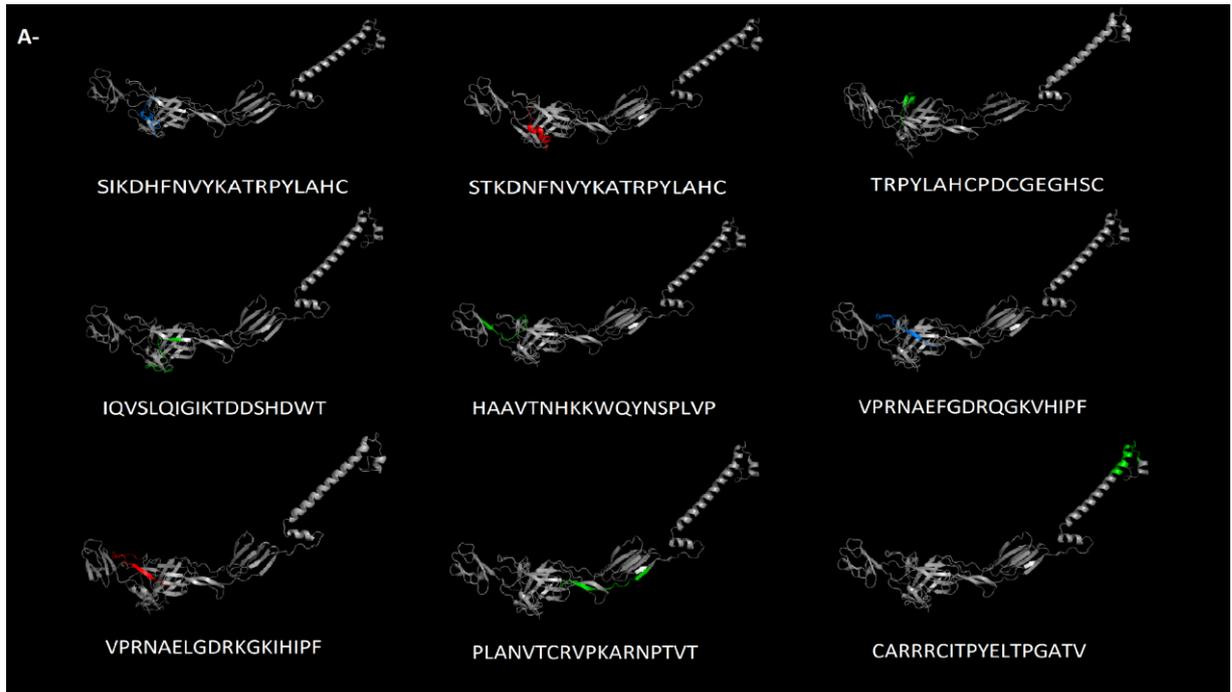
Figura 4 Peptídeos sintetizados destacados na estrutura da proteína E3.



Na parte superior **A**, epitopos destacados nas estruturas secundárias para os genótipos Asiático à esquerda, ECSA, IOL e WA à direita. **B**, epitopos destacados na superfície da proteína E#. **C**- Alinhamento das sequências das proteínas E3 correspondente aos quatro genótipos com os epitopos sintetizados destacados entre todos os genótipos. Cor azul epitopos comum a mais de um genótipo. Cor vermelha epitopos único de cada genótipo. *- Mudanças de aminoácidos nas regiões preditas como epitopos

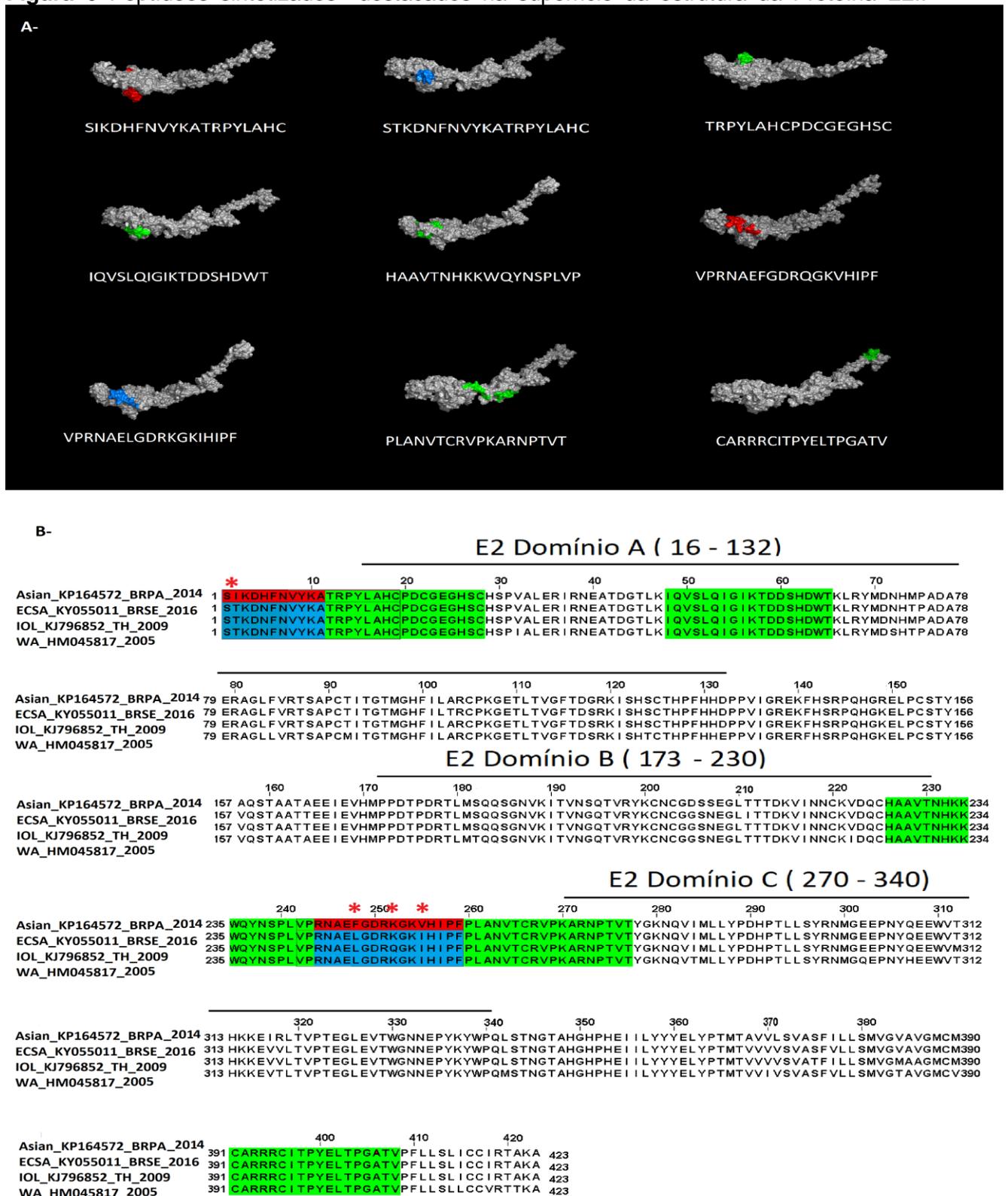
Para mapear os epitopos e verificar a reatividade sorológica das amostras CHIKV IgG positivo, os 11 peptídeos selecionados foram sintetizados e localizados nas estruturas modeladas (Figuras 15,16 e 17), e posteriormente utilizados no ensaio imunoenzimático indireto à base de peptídeos.

Figura 5 Peptídeos sintetizados destacados na estrutura secundária da proteína E2.



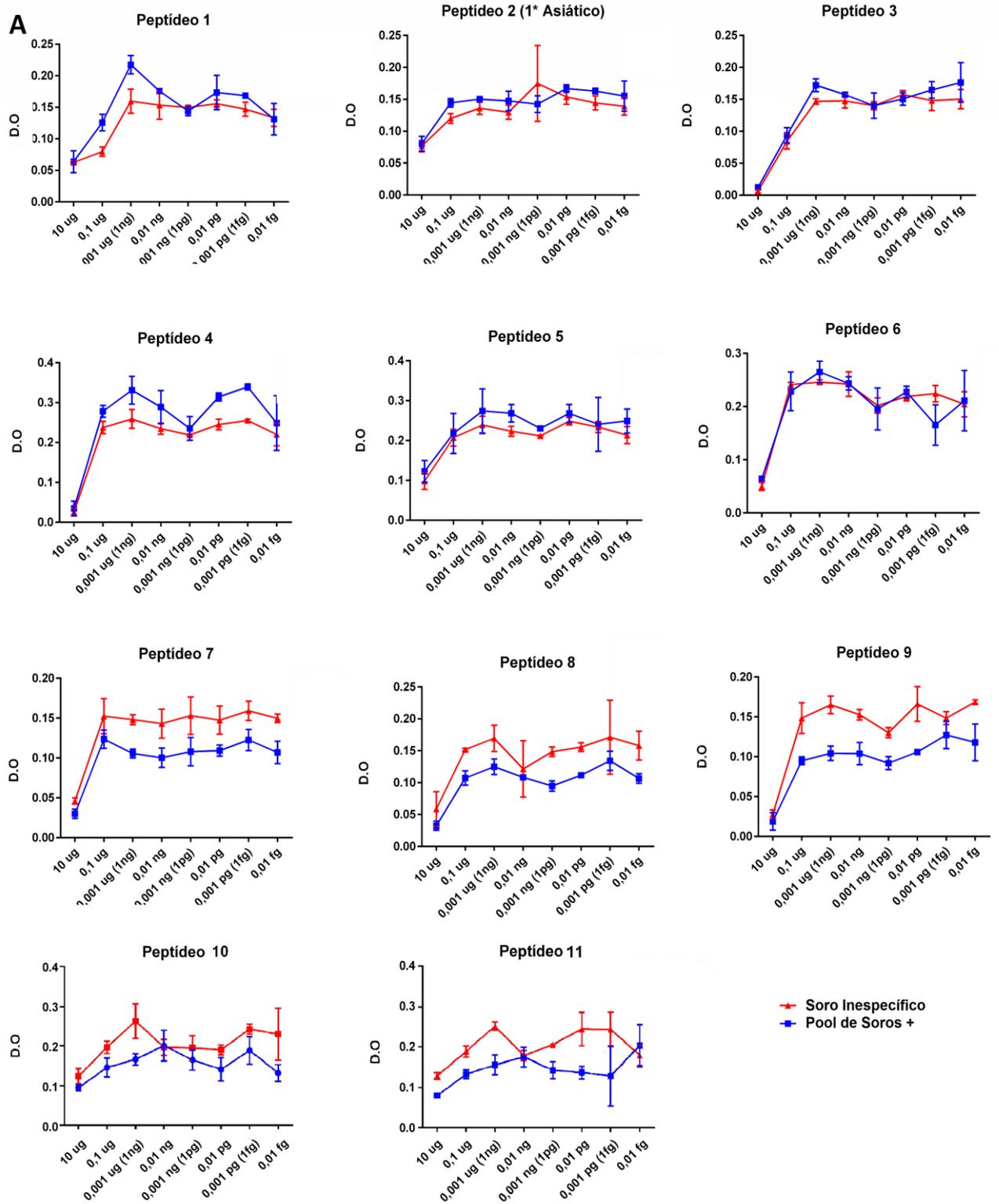
A, epitopos sintetizados destacados nas estruturas secundárias. Cor verde epitopos conservados entre todos os genótipos. Cor azul epitopos comum a mais de um genótipo. Cor vermelha epitopo único de cada genótipo

Figura 6 Peptídeos sintetizados destacados na superfície da estrutura da Proteína E2..



Na parte superior **A-** epitopos sintetizados destacados na superfície da proteína E2 **B-** Alinhamento das sequências das proteínas E2 correspondente aos quatro genótipos com os epitopos destacados. Cor verde epitopos conservados entre todos os genótipos. Cor azul epitopos comum a mais de um genótipo. Cor vermelha epitopo único de cada genótipo. *- Mudanças de aminoácidos nas regiões preditas como epitopos. *, ** Epitopos de CHIKV já identificados e descritos.

Figura 7 Resultados da padronização do ensaio imunoenzimático indireto à base de peptídeos

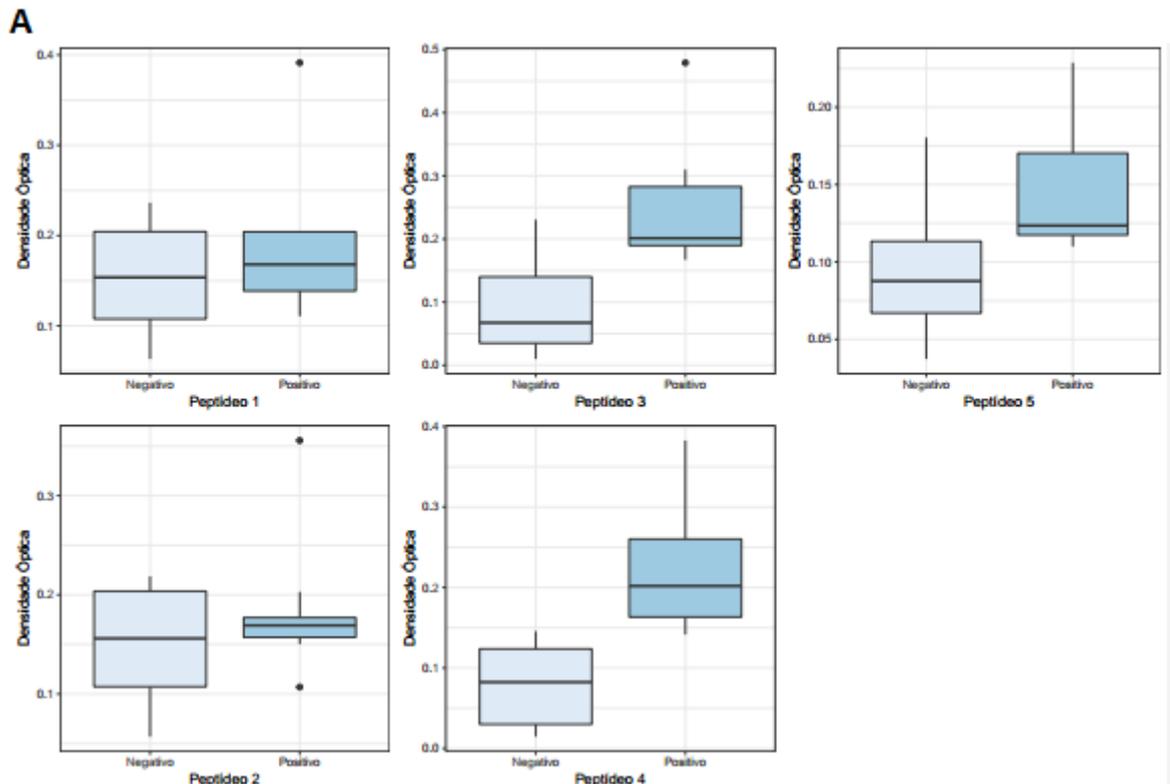


A- Peptídeos 1 à 9 da proteína E2, peptídeo 10 e 11 da proteína E3. Eixo y média de densidade óptica para o Pool de soros de pacientes IgG positivos para CHIKV e como soro humano padrão inespecífico Eixo x diluições do antígeno. Todos os ensaios realizados em triplicatas amostrais.

Para a etapa de padronização do ensaio foi utilizado um Pool de 18 soros de pacientes positivos (IgG CHIKV) (Tabela1) e soro humano IgG inespecífico utilizado como controle. Diluições seriadas dos peptídeos foram realizadas para verificar a concentração de melhor reatividade (Figura 18). A concentração de 1 ng por poço obteve a melhor reatividade e também a melhor diferença entre os soros CHIKV IgG positivo e soro humano IgG inespecífico (Figura 18), posteriormente essa concentração foi utilizada como padrão nos ensaios seguintes com amostras individuais.

A partir do ensaio de padronização dos peptídeos, verificou-se que os peptídeos P1, P2, P3, P4 e P5 foram os mais reativos e foram selecionados para serem avaliados com amostras individuais de pacientes CHIKV IgG positivos e pacientes CHIKV IgG negativos (Tabela2, Figura 19).

Figura 8 Reatividade dos peptídeos P1 à P5 da proteína E2.



A - Gráficos da reatividade dos Peptídeos P1 à P5 para amostras individuais. Boxplots azul claro representando média do grupo de pacientes CHIKV IgG negativos e boxplots azul representando a média dos pacientes CHIKV IgG positivos. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas amostrais.

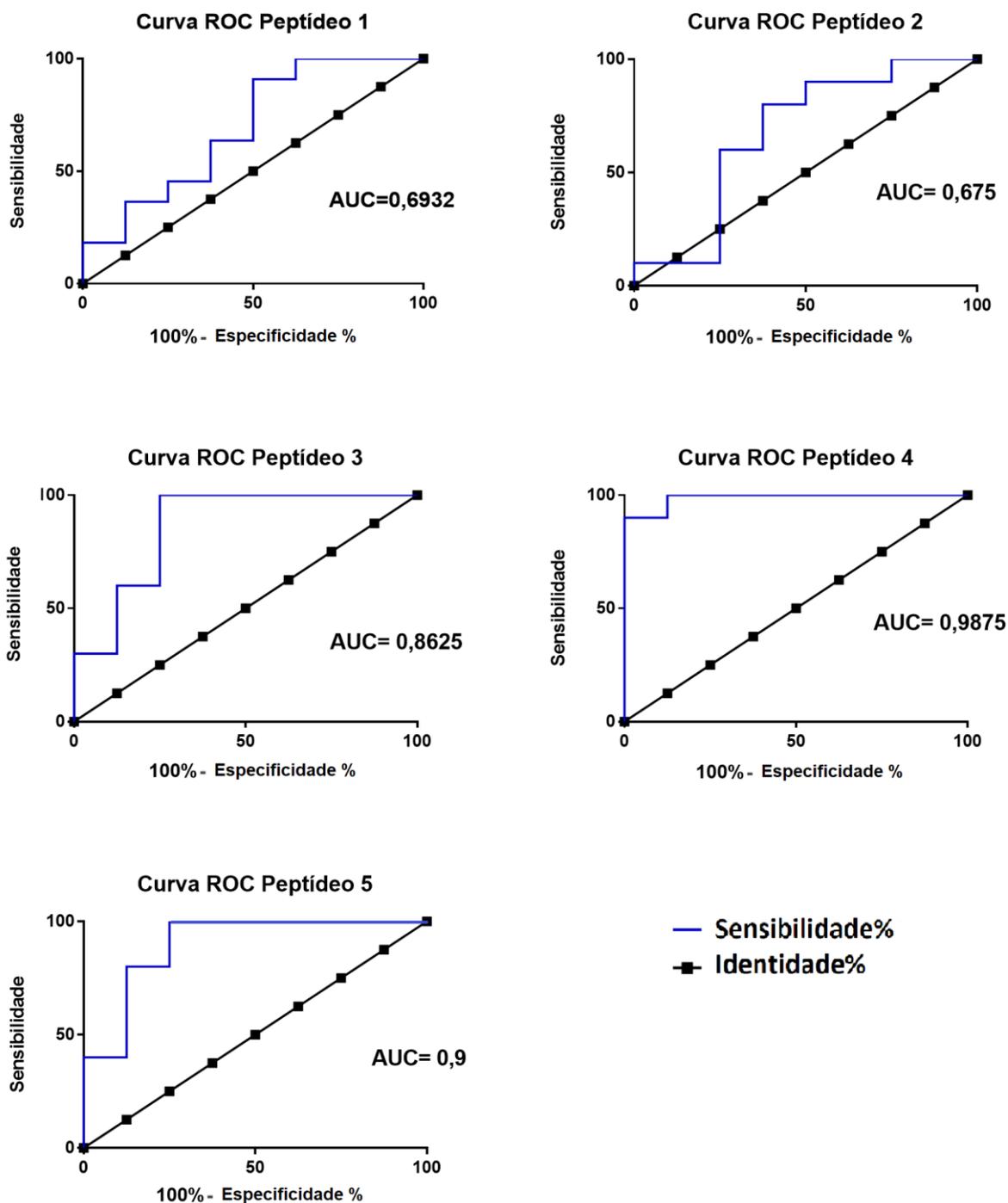
Como limiar de comparação foi estabelecido um valor de corte (treshold), média das triplicatas $+2x$ Desvio padrão. Os peptídeos P1 e P2 não obtiveram reatividade acima do valor de corte estabelecido, e não demonstraram potencial discriminante entre os grupos avaliados. Os peptídeos P3, P4 e P5 foram reativos acima do valor de corte estabelecido e demonstraram potencial discriminante entre os grupos avaliados (Tabela2 Figura19). O peptídeo P3 apresentou maior reatividade no reconhecimento entre os peptídeos que reagiram acima do valor de corte.

Tabela 3 Reatividade dos peptídeos P1 à P5 da proteína E2.

Peptídeos	Amostras Negativas	Média D.O Negativos	SD Média D.O Negativos	Treshold (Média Negativos +2SD)	Amostras Positivas	Média D.O Positivos	SD Média D.O Positivos	AUC
Peptídeo 1	8	0,1472083	0,05796481	0,259851427	10	0,186745	0,07910147	0,6932
Peptídeo 2	8	0,1417084	0,05593951	0,251947747	10	0,182233	0,06566912	0,675
Peptídeo 3	9	0,085875	0,08305685	0,229217587	10	0,2447	0,09590304	0,8625
Peptídeo 4	9	0,0747084	0,05463716	0,176100494	10	0,2191	0,07385933	0,9875
Peptídeo 5	9	0,0847917	0,03219925	0,146616705	10	0,152515	0,0402032	0,9

A partir dos resultados obtidos nesse ensaio, os peptídeos P1 à P5 também foram analisados em relação a sensibilidade e especificidade através da análise de curva ROC (*Receiver Operating Characteristic curve*) (intervalo de confiança 95%) para identificar o potencial de classificação e discriminação correta entre os grupos de amostras analisados (Figura19). Os peptídeos P1 e P2 demonstraram baixo potencial de classificação correta entre os grupos analisados e geraram *AUC* (*Area under the curve*) abaixo de 0,7. Os peptídeos P3, P4 e P5 além de reativos demonstraram potencial como classificadores, com os respectivos valores *AUC* 0,82, 0,98 e 0,9

Figura 9 Curva ROC para os peptídeos 1 à 5 da proteína E2.



Intervalo de confiança 95%.

5. Discussão

Este trabalho teve como objetivo mapear os epitopos de células B das proteínas estruturais do vírus Chikungunya. E verificar a reatividade dos peptídeos lineares sintéticos correspondentes aos epitopos mapeados utilizando amostras de soro IgG positivo para CHIKV que foram coletadas no estado de Sergipe, Brasil no ano de 2016. O mapeamento de epitopos para o vírus Chikungunya, analisando diferentes coortes de pacientes em diferentes regiões geográficas e com diferentes backgrounds genéticos ajuda a identificar e definir assinaturas úteis para o desenvolvimento de ensaios sorológicos e vacinas (46-48), e até o momento não há estudos sobre o alvo da resposta imunológica dos pacientes infectados pelo vírus Chikungunya no Brasil e na América latina.

Previamente Kam et al. 2012 (48) descreveu o epitopo E2EP3, correspondente ao peptídeo P1, como um epitopo marcador da fase precoce de convalescência da infecção pelo vírus Chikungunya estudando uma coorte de pacientes no continente asiático. Nesse estudo Kam et al. 2012 sugere que um ELISA baseado no epitopo E2EP3 poderia ser usado para estudar as infecções de CHIKV anteriores e para determinar a magnitude dos surtos. Analisando esse epitopo com a coorte de pacientes amostrados, não foi possível identificar uma forte reatividade e o potencial desse epitopo como marcador para infecção pelo vírus Chikungunya. Esses resultados podem ser devido a não utilização de uma metodologia de ELISA com amplificadores de detecção como foi realizado no estudo de Kam et al. 2012. Outra razão seria o período de coleta não ser tão próxima da fase precoce de convalescência uma vez que o padrão de resposta varia ao longo do tempo e o fato da população em análise possuir diferentes backgrounds genéticos (48).

Outro importante epitopo imunodominante encontrado por Kam et al. 2012 (48) está localizado entre os aminoácidos 3025-3058 (peptídeo P5, P6 e P7) na proteína E2 e está associado a proteção no início da fase convalescente até a fase de recuperação sendo considerado um epitopo com potencial uso vacinal. A partir desse estudo Kam et al. 2012 (46,48) também concluíram que uma única alteração no aminoácido K252Q na glicoproteína E2 foi demonstrada por ensaios de ligação a ter um efeito importante na ligação do anticorpo, devido a uma redução na capacidade de ligação do anticorpo. Os peptídeos P6 e P7 são variantes da mesma sequência, P7 possui uma Lisina na posição 252 identificada previamente como uma mutação de escape, e foi fracamente reconhecida pelo Pool de soros no ensaio de padronização comparado com o peptídeo P6. OS peptídeos P6 e P7 são adjacentes ao peptídeo P5 (Figura 16 e 17) que foi mais reativo e foi selecionado para ser analisado com as amostras individuais (Figuras 18 e 19).

Os peptídeos P7, P8 e P9 foram fracamente reconhecidos pelos anticorpos específicos CHIKV IgG positivos similar aos resultados descritos por Kam et al. 2012 (48), esses peptídeos correspondem a regiões de arco entre os domínios e são acessíveis, mas demonstraram baixo potencial de reconhecimento antigênico (Figura 18)

Os peptídeos P10 e P11 correspondentes a proteína E3 também foram fracamente reconhecidos pelos anticorpos específicos CHIKV IgG e demonstraram baixo potencial de reconhecimento antigênico (Figura 18).

Os peptídeos P3, P4 e P5 são conservados entre todos os genótipos (Figuras 16 e 17) e foram os peptídeos mais reativos demonstrando o potencial de

reconhecimento antigênico dos anticorpos CHIKV IgG sendo esses os principais alvos dos anticorpos dos pacientes estudados.

O peptídeo P3 é adjacente ao epitópio descrito por Kam et al. 2012 (48) (PeptídeoP1) com uma sobreposição de 3 aminoácidos, e confirma a região N-terminal da proteína E2 sendo um dos principais alvos imunogênicos dos anticorpos específicos CHIKV IgG. Os peptídeos P4 e P5 também estão localizados em regiões imunogênicas previamente descritas, P4 no Domínio A, e P5 no final do Domínio B, em uma região de arco acessível aos anticorpos.

Os peptídeos P3, P4 e P5 além de reativos possuem potencial para serem utilizados como marcadores de ensaios sorológicos demonstrado pela análise de performance de classificadores observados nos gráficos de curva ROC (Figura 20). A performance desses peptídeos precisa ser confirmada analisando um número maior de amostras e preferencialmente coletadas em diferentes regiões, sendo este painel de peptídeos útil para identificar as regiões alvo dos pacientes infectados pelo vírus Chikungunya.

Uma metodologia com maior capacidade de detecção também é interessante e se faz necessária considerando que a técnica de Elisa indireto à base de peptídeos utilizada nesse estudo possui limitações é útil em ensaios exploratórios.

A atividade biológica desses peptídeos também pode ser analisada em ensaio de neutralização por redução de placas para identificar os epitópos com potencial neutralizante e para imunização com vacinas contendo peptídeos (46-48). Vacinas baseadas em epitópos representam uma alternativa que pode induzir uma resposta imune protetora sem induzir efeitos adversos in vivo. Esses estudos são importantes para a descoberta de epítópos de células B (I) que podem ser alvo de anticorpos

neutralizantes como realizado nesse estudo, epitopos de células T (II) que podem ser alvo de células T citotóxicas protetoras (células T CD4+ e CD8+) e epitopos reconhecido por células T CD4 + auxiliares (III) para otimizar a produção de anticorpos específicos anti-CHIKV (46-48).

As vantagens potenciais dessa abordagem incluem segurança, a capacidade de desenhar e projetar epítomos para aumentar a eficiência da vacinação e a oportunidade de projetar vacinas com maior cobertura populacional. Uma vacina de peptídeos com sequências cobrindo os diferentes genótipos tem potencial para gerar proteção contra as infecções por CHIKV a nível global (46-48)

6.Conclusão

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

Referências

1. Powers ANNM, Brault AC, Shirako Y, Strauss EG, Kang W, Strauss JH, et al. Evolutionary Relationships and Systematics of the Alphaviruses. *Am Soc Microbiol.* 2001;75(21):10118–31.
2. Strauss JH, Strauss EG. The Alphaviruses : Gene Expression , Replication , and Evolution. *Microbiol Rev.* 1994;58(3):491–562.
3. Solignat M, Gay B, Higgs S, Briant L, Devaux C. Replication cycle of chikungunya : A re-emerging arbovirus. *Virology [Internet].* 2009;393(2):183–97
4. Weaver SC, Forrester NL. Chikungunya : Evolutionary history and recent epidemic spread. *Antiviral Res.* 2015;120(May):32–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.04.016>
5. Nunes MRT, Faria NR, Vasconcelos JM De, Golding N, Kraemer MUG, Oliveira LF De, et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Med [Internet].* 2015;13(1):1–10.
6. Burt FJ, Rolph MS, Rulli NE, Mahalingam S, Heise MT. Chikungunya : a re-emerging virus. *Lancet.* 2012;379(9816):662–71
7. Weaver SC. Arrival of Chikungunya Virus in the New World : Prospects for Spread and Impact on Public Health. *Plos Neglected Trop Dis.* 2014;8(6):1–5.
8. Sissoko D, Malvy D, Ezzedine K, Renault P, Moschetti F, Pierre V. Post-Epidemic Chikungunya Disease on Reunion Island : Course of Rheumatic Manifestations and Associated Factors over a 15-Month Period. *Plos Neglected Trop Dis.* 2009;3(3):1–6.
9. Borgherini G, Poubeau P, Jossaume A, Gouix A, Cotte L, Michault A, et al. Persistent Arthralgia Associated with Chikungunya Virus : A Study of 88 Adult Patients on Reunion Island. *Clin Infect Dis.* 2008;47(4):469–75.
10. Kucharz EJ, Cebula-byrska I. European Journal of Internal Medicine Chikungunya fever. *Eur J Intern Med [Internet].* 2012;23(4):325–9
11. Leparac-Goffart I. Chikungunya in the. *Lancet.* 2014;383(12):8003.
12. Cardoso CW, Paploski IAD, Kikuti M, Rodrigues MS, Silva MMO, Campos GS, et al. Outbreak of Exanthematous Illness Associated with Zika , Chikungunya , and Dengue Viruses , Salvador , Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(12):2274–6.
13. Simizu B et al. Structural Proteins of Chikungunya Virus. *Journal Virol.* 1984;51(1):254–8.
14. Khan AH, Morita K, Parquet C, Hasebe F, Mathenge EGM, Igarashi A. Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. *J Gen Virol (2002),.* 2016;83(2002):3075–84.
15. Suomalainen M, Liljestrom P, Garoff H. Spike Protein-Nucleocapsid Interactions Drive the Budding of Alphaviruses. *J Virol.* 1992;66(8):4737–47.

16. Ekstrom M, Liljestrom P, Garoff H. Membrane protein lateral interactions control Semliki Forest virus budding. *EMBO J.* 1994;13(5):1058–64.
17. Voss, James E. , Vaney M, Duquerroy S, Vonrhein C., Girar-Blanc C, Crublet E, Thompson A, Bricogne G, Félix R.. Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. *Nature.* 2010;468:0–5.
18. Gasque P, Couderc T, Lecuit M, Roques P, Ng LFP. Chikungunya Virus Pathogenesis and Immunity 1. *VECTOR-BORNE ZOONOTIC Dis.* 2015;15(4):241–50.
19. Gubler DJ. Human Arbovirus Infections Worldwide. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;951:13–24.
20. Liang G, Gao X, Gould EA. Factors responsible for the emergence of arboviruses ; strategies , challenges and limitations for their control. *Emerg Microbes Infect.* 2015;4(3):1–5.
21. Vega-rúa A, Zouache K, Girod R, Failloux A, Lourenço-de-oliveira R, Vega-rúa A, et al. High Level of Vector Competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Ten American Countries as a Crucial Factor in the Spread of Chikungunya Virus. *Journal Virol.* 2014;88(11):6294–306.
22. Tauil PL. Urbanização e ecologia do dengue Urbanization and dengue ecology. *Cad Saúde Pública.* 2001;17:99–102.
23. Ozden S, Huerre M, Riviere J, Coffey LL, Afonso P V, Mouly V, et al. Human Muscle Satellite Cells as Targets of Chikungunya Virus Infection. *PLoS One.* 2007;2(6).
24. LEMANT J et al. Serious acute chikungunya virus infection requiring intensive care during the reunion island outbreak in 2005–2006*. *Crit Care Med.* 2008;36(9):2536– 41.
25. MAVALANKAR D. Chikungunya epidemic in India : a major public-health disaster. *Lancet Infect Dis.* 2007;7(May):306–7.
26. Gérardin P, Barau G, Michault A, Bintner M, Randrianaivo H, Choker G, et al. Multidisciplinary Prospective Study of Mother-to-Child Chikungunya Virus Infections ´ union on the Island of La Re. *Plos Med.* 2008;5(3):413–23.
27. Robillard P, Boumahni B, Michault A, Fourmaintraux A, Schuffenecker I, Carbonnier M, et al. Transmission verticale materno-foetale du virus chikungunya. *Press medicale.* 2006;35(5):8–11.
28. Senanayake MP, Senanayake SM, Vidanage KK, Gunasena S, Lamabadusuriya SP. Vertical transmission in chikungunya infection. *Ceylon Med J.* 2009;54(2):47–50.
29. Le Bomin A, Hebert JC, Marty P, Delaunay P. [Confirmed chikungunya in children in Mayotte. Description of 50 patients hospitalized from February to June 2006]. *Med Trop (Mars).* 2008 Oct;68(5):491–5.
30. Valampampil JJ, Chirakkarot S, Letha S, Jayakumar C, Gopinathan KM, Valampampil JJ. Clinical Profile of Chikungunya in Infants. *Indian J Pediatr.* 2009;76(2):151–5.
31. ROBIN S et al. of Child Neurology. *J Child Neurol.* 2008;23(1028):1028–35.
32. Lewthwaite P, Vasanthapuram R, Osborne JC, Begum A, Plank JLM, Shankar MV, et al. Chikungunya Virus and Central Nervous System. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(2):329–31.

33. ECONOMOPOULOU A et al. Atypical Chikungunya virus infections : clinical manifestations , mortality and risk factors for severe disease during the ´ union 2005 – 2006 outbreak on Re. *Epidemiol Infect.* 2009;137:534–41.
34. Levine B, Hardwick M, Griffin DE. Persistence of alphaviruses in vertebrate hosts. *Trends Microbiol.* 1994;2(1):1–4.
35. Tesh RB. Arthritides caused by mosquito-borne viruses. *Annu Rev Med.* 1982;33(1):31–40.
36. Suhrbier A, Linn M La. Clinical and pathologic aspects of arthritis due to Ross River virus and other alphaviruses. *Curr Opin Rheumatol.* 2004;16(4):374–9.
37. Toivanen A. Alphaviruses : an emerging cause of arthritis ? *Curr Opin Rheumatol.* 2008;20(4):486–90.
38. Harley D, Sleight A, Ritchie S, Ev CLINMIR. Ross River Virus Transmission , Infection , and Disease : a Cross-Disciplinary Review. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(4):909–32.
39. Ng LFP, Chow A, Sun Y, Kwek DJC, Lim P, Ng L, et al. IL-1 b , IL-6 , and RANTES as Biomarkers of Chikungunya Severity. *PLoS One.* 2009;4(1):1–8.
40. Kelvin AA, Banner D, Silvi G, Moro ML, Spataro N, Gaibani P, et al. Inflammatory Cytokine Expression Is Associated with Chikungunya Virus Resolution and Symptom Severity. *Plos Neglected Trop Dis.* 2011;5(8):1–12.
41. Chow A, Her Z, Ong EKS, Chen J, Dimatatac F, Kwek DJC, et al. Persistent Arthralgia Induced by Chikungunya Virus Infection is Associated with Interleukin-6 and Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor. *J Infect Dis.* 2011;203(II):149– 57.
42. Hoarau J, Bandjee MJ, Trotot PK, Das T, Li-pat-yuen G, Dassa B, et al. Persistent Chronic Inflammation and Infection by Chikungunya Arthritogenic Alphavirus in Spite of a Robust Host Immune Response. *J Immunol.* 2015;184:5914–27.
43. WAUQUIER N et al. The Acute Phase of Chikungunya Virus Infection in Humans Is Associated With Strong Innate Immunity and T CD8 Cell Activation. *J Infect Dis.* 2011;204(1):115–23.
44. Petitedemange C, Petitedemange C, Paris C, Pierre DELU, Marie ET. Etude des cellules NK au cours des infections par le virus du Chikungunya et le virus de la Dengue 2014;88:8–232.
45. Laras K, Sukri NC, Larasati RP, Bangs MJ, Kosim R, Wandra T, et al. Tracking the reemergence of epidemic chikungunya virus in Indonesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2005;99(2):128–41.
46. KAM Y-W et al. Immuno-biology of Chikungunya and implications for disease intervention. *Microbes Infect.* 2009;11:1186–96.
47. Kam Y, Lee WWL, Simarmata D, Harjanto S, Teng T, Tolou H, et al. Longitudinal Analysis of the Human Antibody Response to Chikungunya Virus Infection : Implications for Serodiagnosis and Vaccine Development. *Journal Virol.* 2012;86(23):13005–15.
48. Kam Y, Lum F, Teo T, Lee WWL, Simarmata D, Harjanto S, et al. Early neutralizing IgG response to Chikungunya virus in infected patients targets a dominant linear epitope on the E2 glycoprotein. *EMBO Mol Med.* 2012;4:330–43.

49. Couderc T et al. A Mouse Model for Chikungunya : Young Age and Inefficient Type-I Interferon Signaling Are Risk Factors for Severe Disease. *PLoS Pathog.* 2008;4(2):1– 12.
50. Bréhin A, Rubrecht L, Navarro-sanchez ME, Maréchal V, Frenkiel M, Lapalud P, et al. Production and characterization of mouse monoclonal antibodies reactive to Chikungunya envelope E2 glycoprotein. *Virology.* 2008;371(1):185–95.
51. Lee CY, Kam Y, Fric J, Malleret B, Koh EGL, Prakash C, et al. Chikungunya Virus Neutralization Antigens and Direct Cell-to-Cell Transmission Are Revealed by Human Antibody-Escape Mutants. *PLoS Pathog.* 2011;7(12):1–15.
52. Kam Y, Simarmata D, Chow A, Her Z, Teng T, Ong EKS, et al. Early Appearance of Neutralizing Immunoglobulin G3 Antibodies Is Associated With Chikungunya Virus Clearance and Long-term Clinical Protection. *J Infect Dis.* 2012;205:1147–54.
53. Ahola T, Lampio A, Auvinen P, Ka L. Semliki Forest virus mRNA capping enzyme requires association with anionic membrane phospholipids for activity. *EMBO Journa.* 1999;18(11):3164–72.
54. Ahola T, Kujala P, Tuittila M, Blom T, Laakkonen P, Hinkkanen ARI, et al. Effects of Palmitoylation of Replicase Protein nsP1 on Alphavirus Infection. *J Virol.* 2000;74(15):6725–33.
55. Pirjo Laakkonen†, Tero Ahola and LK "a "inen F. The Effects of Palmitoylation on Membrane Association of Semliki Forest Virus RNA Capping Enzyme *. *J Biol Chem.* 1996;271(45):28567–71.
56. Bouraï M, Lucas-hourani M, Gad H, Drosten C, Jacob Y, Tafforeau L, et al. Mapping of Chikungunya Virus Interactions with Host Proteins Identified nsP2 as a Highly Connected Viral Component. *Jounal Virol.* 2012;86(6):3121–34.
57. Melton J V, Ewart GD, Weir RC, Board PG, Lee E, Gage PW. Alphavirus 6K Proteins Form Ion Channels *. *J Biol Chem.* 2002;277(49):46923–31.
58. Frank R. The SPOT-synthesis technique Synthetic peptide arrays on membrane supports — principles and applications. *J Immunol Methods.* 2002;267(1):13–26.
59. Amin N, Reyes F, Calero R, Camacho F, Acosta A, Finlay I, et al. Predicción de epítos T y B de la proteína NS4b del virus dengue tipo 3 *Materiales y Métodos. Vaccimonitor.* 2013;22(3):14–21.
60. Teng T, Kam Y. Host response to Chikungunya virus and perspectives for immune-based therapies. *Future Virol.* 2011;6(8):975–84.
61. Warter L, Lee CY, Thiagarajan R, Lebecque S, Lin RTP, Ng LFP, et al. Chikungunya Virus Envelope-Specific Human Monoclonal Antibodies with Broad Neutralization Potency. *J Immunol.* 2011;186(5):3258–64.
62. Mcllellan JS, Pancera M, Carrico C, Gorman J, Julien J, Khayat R, et al. with broadly neutralizing antibody PG9. *Nature [Internet].* 2011;480(7377):336–43.
63. Trifinopoulos J, Nguyen L, Haeseler A Von, Minh BQ. W-IQ-TREE : a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. 2016;44(April):232–5.
64. Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, J P, Zhang Y. The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nat Methods [Internet].* 2015;12(1):7–8.
65. Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A, et al. ExpASy :

- the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(13):3784–8.
66. Zhang Q, Wang P, Kim Y, Haste-andersen P, Beaver J, Bourne PE, et al. Immune epitope database analysis resource. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(2):513–8.
 67. Mukonyora M. Journal of Clinical & Cellular A Review of Important Discontinuous BCell Epitope Prediction Tools. *J Clin Cell Immunol.* 2015;6(5):1–5.