

**ALÉXIA ADRIANNE VENCESLAU BRITO CARVALHO**

**DESENVOLVIMENTO DE NOVAS ESTRATÉGIAS VACINAIS CONTRA O  
VÍRUS CHIKUNGUNYA UTILIZANDO A PROTEÍNA ESTRUTURAL 2 (E2)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira

São Paulo

2019

## RESUMO

Venceslau-Carvalho, A. A. **Desenvolvimento de novas estratégias vacinais contra o vírus Chikungunya utilizando a proteína estrutural 2 (E2)**. 2019. 67p. Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

O vírus Chikungunya (CHIKV), transmitido por mosquitos do gênero *Aedes*, é um arbovírus emergente responsável por causar a febre Chikungunya, uma doença considerada incapacitante. As manifestações clínicas típicas incluem febre alta, erupções cutâneas e artralgia, sendo que esta última pode se manifestar durante muitos meses após doença, causando severos impactos sobre o paciente. A proteína estrutural 2 (E2) é uma proteína do envelope responsável pela ligação do vírus aos receptores celulares, promovendo sua entrada na célula hospedeira por endocitose, o que a torna um importante determinante antigênico. Contudo, antígenos recombinantes baseados em proteínas possuem, de maneira geral, baixa imunogenicidade, o que pode ser solucionado com a associação do antígeno a nanopartículas e adjuvantes. Tendo em vista a falta de uma vacina licenciada contra o CHIKV, o objetivo desse trabalho foi desenvolver um novo antígeno com capacidade para induzir imunidade protetora para infecções pelo CHIKV a partir da proteína estrutural 2 (E2) combinado a um sistema de entrega baseado em Vesículas lipídicas Nanomultilamelares (NMVs). Para isso proteínas derivadas da E2 do CHIKV foram expressas em linhagens recombinantes de *Escherichia coli* BL21 (DE3). As proteínas recombinantes foram produzidas, principalmente, na fração insolúvel do extrato bacteriano. Das três construções avaliadas duas ( $\Delta E2$  e  $\Delta E2.1$ ) apresentaram solubilidade, rendimento satisfatório (9 a 14,5 mg de proteína por litro de cultura) e antigenicidade preservada. A proteína com maior rendimento ( $\Delta E2.1$ ) foi escolhida para ensaios de imunização utilizando camundongos C57BL/6. As formulações empregaram o antígeno  $\Delta E2.1$  combinado ao adjuvante monofosforil lipídico A (MPLA) associado a NMVs. Os resultados mostraram que a formulação  $\Delta E2.1$ -NMV+MPLA foi capaz de induzir altos títulos de anticorpos IgG sérico E2.1-específicos e com perfil de subclasses equilibrado. Os anticorpos gerados mostraram capacidade de neutralização do CHIKV *in vitro*. Desta forma, os resultados obtidos no presente estudo revelam uma formulação promissora para o desenvolvimento de uma vacina de subunidade contra o CHIKV.

**Palavra-Chave:** Chikungunya vírus; Arbovírus; Lipossomas; Vacina de subunidade, NMVs; MLVs; Monofosforil Lipídio A; MPLA.

## ABSTRACT

VENCESLAU-CARVALHO, A. A. **Development of new vaccine strategies against Chikungunya virus using structural protein 2 (E2)**. 2019. 67p. Master's thesis (Biology of Host-Pathogen) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

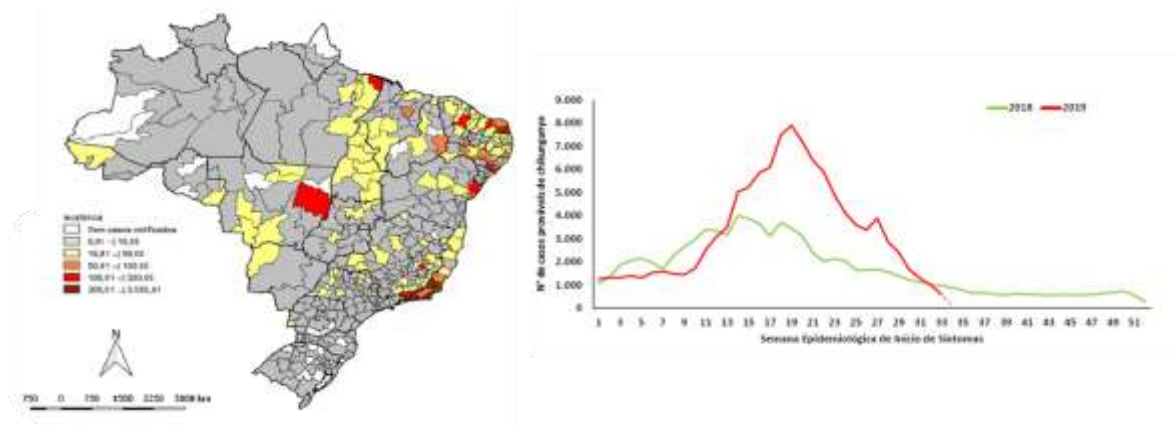
Chikungunya virus (CHIKV), transmitted by *Aedes* mosquitoes, is an emerging arbovirus responsible for causing Chikungunya fever, a disabling disease. As usual clinical symptoms are high fever, rash and arthralgia, which can persist for several months after the acute phase of the disease inflicting serious deleterious impacts on the health of the patient. The structural protein 2 (E2) is an envelope protein responsible for the binding of the virus to cellular receptors, promoting entry into the host cell by endocytosis and, thus, representing an important antigenic determinant. However, recombinant antigens based in purified proteins generally have low immunogenicity that can be overcome with the combination of the antigens with nanoparticles and adjuvants. Considering the lack of a licensed CHIKV vaccine, the aim of the present study was the development of a new antigen with the capability to induce protective immunity to infection using the envelope protein 2 (E2) in combination with a delivery system based on nanomultilamellar lipid vesicles (NMVs). For that purpose, proteins derived from CHIKV E2 were expressed in recombinant strains of *Escherichia coli* BL21 (DE3). The recombinant proteins were produced and accumulated mainly at the insoluble fraction of the bacterial extract. Two out of three constructs ( $\Delta$ E2 and  $\Delta$ E2.1) presented partial solubility, reasonable production yields (9 to 14.5 mg protein per liter culture) and preserved antigenicity. The protein with higher yield ( $\Delta$ E2.1) was chosen for immunization experiments using C57BL/6 mice. The tested vaccine formulations employed the  $\Delta$ E2.1 antigen in combination with monophosphoryl lipid A (MPLA) and NMVs. The results obtained with  $\Delta$ E2.1-NMV + MPLA were capable to induce high antigen-specific serum IgG and balanced subclass profile. The anti-  $\Delta$ E2.1 antibodies were capable to neutralize CHIKV under in vitro conditions. Thus, the results obtained in the present study show a promising vaccine formulation that may contribute to the development of a subunit vaccine against CHIKV.

**Keyword:** Chikungunya virus; Arbovirus; Liposomes; Subunit vaccine; NMVs; MLVs; Monophosphoryl Lipid A; MPLA.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Vírus Chikungunya

O vírus Chikungunya (CHIKV) é um Alphavírus da família *Togaviridae*, transmitido por mosquitos e causador da febre chikungunya. A doença foi descrita pela primeira vez em 1952 na Tanzânia durante um surto inicialmente atribuído ao vírus Dengue e após surtos esporádicos na África e na Ásia entre as décadas de 60 e 70, ganhou destaque devido às epidemias ocorridas no Quênia em 2004, Ilhas Reunião - Oceano Índico em 2005 e no Caribe em 2013 e mais recentemente na América do Sul (1–3). Quatro linhagens de CHIKV circulam por todo o mundo: a linhagem do Leste, Central e Austral (ECSA), a linhagem da África Ocidental, a linhagem asiática e a linhagem do Oceano Índico (IOL), dentre essas, a da Ásia e da ECSA co-circulam nas regiões Norte, Nordeste desde 2014 e mais recentemente na região Sudeste do Brasil (4–6). O vírus geralmente circula em um ciclo silvático entre primatas não humanos e mosquitos de espécies do gênero *Aedes*. E a transmissão ao homem ocorre através de picadas de seus principais vetores, os mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, encontrados em regiões tropicais/subtropicais e temperadas, respectivamente, num ciclo urbano (2,7). Até o momento, foram reportados casos de infecção pelo CHIKV em mais de 100 países/territórios em todo o mundo (8), sendo que no Brasil, entre 2014 e 2019, foram relatados 589.076 casos prováveis de infecção pelo CHIKV (9,10). No mesmo período cerca de 495 óbitos foram confirmados, sendo o ano de 2016 aquele com maior incidência: 114 casos a cada 100 mil habitantes (10). A região Nordeste apresentou maior concentração de casos e óbitos, principalmente o estado do Ceará. No entanto, nos anos de 2018 e 2019, os maiores índices foram registrados na região Sudeste, com maior concentração no estado do Rio de Janeiro que no período de 30/12/2018 a 24/08/2019 apresentou 47 óbitos relacionados à infecção pelo CHIKV (Figura 1). No Brasil foram registrados 57 óbitos, valores superiores aos registrados no mesmo período em 2018 (Figura 1) (9,10).



**Figura 1. Distribuição de incidência de casos prováveis de *Chikungunya* por Região e Casos prováveis de *Chikungunya*, por semana epidemiológica.** Ministério da Saúde. Boletins Epidemiológicos Semanas Epidemiológicas 1 a 34, disponível em: [www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos](http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos).

O nome *Chikungunya* é derivado de uma palavra na língua Makonde que significa “aqueles que se dobram”, fazendo referência a postura curvada que os acometidos possuem graças aos sintomas da doença (3). As manifestações clínicas desta doença variam de assintomáticas até complicações atípicas ou raras. As manifestações clínicas sistêmicas típicas incluem febre alta, artralgia, erupções cutâneas, dor de cabeça, dor nas costas, náuseas, vômitos, inchaço nas articulações, mialgia, linfo-adenopatia, fadiga e anorexia, enquanto que as manifestações raras incluem complicações neurológicas incluindo convulsões febris, encefalopatias agudas meningoencefalite, além de hepatite fulminante, insuficiência renal aguda, insuficiência respiratória, e miocardite (11). As complicações raras são mais observadas em pacientes idosos, grávidas, crianças e podem ocorrer em associação com outras doenças, como hipertensão, doenças cardiovasculares ou respiratórias (3,11). A dor nas articulações persistente causada pela infecção do CHIKV é muitas vezes debilitante, podendo se manifestar durante anos promovendo um reumatismo duradouro e conseqüentemente perda significativa na qualidade de vida do acometido (11). A poliartralgia é, portanto, uma característica da maioria dos casos da doença sendo considerada o sintoma mais incapacitante.

## 1.2. O genoma do Vírus *Chikungunya*

O genoma do CHIKV é caracterizado por ser um vírus envelopado de 70nm de diâmetro que possui como material genético um RNA de fita simples com orientação positiva, com aproximadamente 11.8kb (6). Este é constituído por uma região não traduzível seguida por um trecho responsável pela codificação de 4 proteínas não estruturais (nsP1-4) e 5 proteínas estruturais (C, E1, E2, E3 e 6K) e uma sequência não traduzida com cauda poli-A (12). A tradução das proteínas é coordenada por duas regiões abertas de leitura separadas, sendo

inicialmente produzidas as proteínas não estruturais (nsP) e, posteriormente, as proteínas estruturais (Figura 2 e 3). As nsP são caracterizadas por apresentarem altos níveis de conservação entre Alphavírus, quando comparadas com as proteínas estruturais, que em contrapartida, são mais antigênicas (13). A proteína nsP1 possui função de metiltransferase e modula a atividade de protease da proteína nsP2, que por sua vez tem a função de helicase e também é responsável por processar a poliproteína não-estrutural. A função da nsP3 parece estar relacionada com a síntese da fita negativa de RNA, enquanto que a proteína nsP4 tem função RNA polimerase RNA-dependente (14). Ou seja, as proteínas não estruturais são necessárias para a transcrição e replicação do RNA viral, enquanto que as proteínas estruturais são necessárias para a formação do vírus e traduzidas a partir de RNA genômico (Figura 2 e 3).

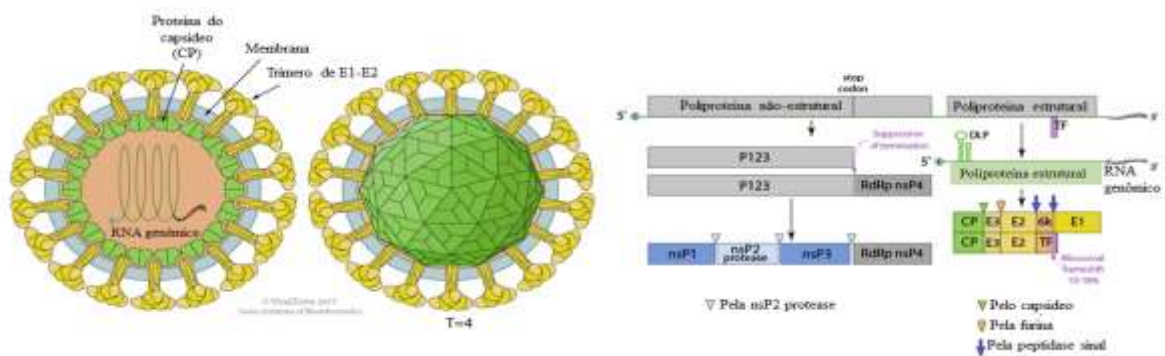


Figura 2. Representação esquemática da estrutura dos Alphavírus e organização genômica do vírus Chikungunya e seus produtos proteicos. Adaptado de [viralzone.expasy.org](http://viralzone.expasy.org).

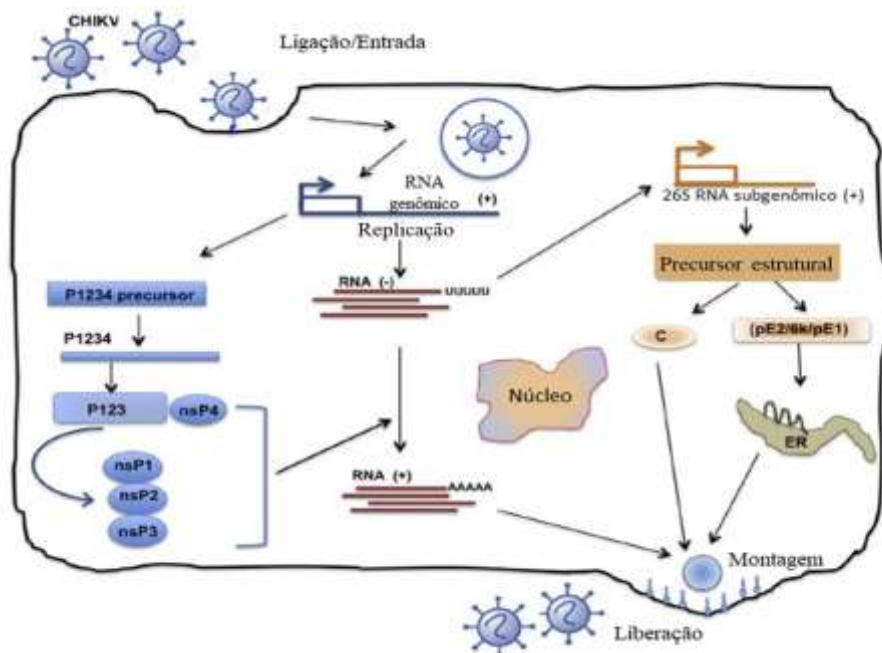


Figura 3. Ciclo replicativo do CHIKV. Thiberville, S. et. al, 2013, (15). Adaptado.

A glicoproteína E2 é responsável pela ligação da partícula viral com a célula hospedeira, que entra por meio de endocitose mediada por clatrina (16). Os receptores celulares relacionados a esse processo ainda não estão bem definidos. No vírus a proteína E2 está associada com a proteína E1 na forma de heterodímeros. Ao ser endocitada pela célula, o pH ácido presente nos endossomas promove modificações na proteína E1, dissociação das duas proteínas e fusão do envelope com a membrana celular. Assim, o núcleo-capsídeo é liberado no citosol e ocorre a replicação do RNA viral (Figura 3) (15). A E2 está organizada em três domínios, A, B e C, sendo os domínios A e B os responsáveis pela ligação aos receptores das células alvo (16,17). A análise de anticorpos E2-específico permitiu a identificação de 4 epítopos para células B importantes no delineamento de estratégias vacinais (18–20). Assim, essa glicoproteína se destaca por ser um alvo importante tanto para o desenvolvimento de vacinas de subunidades como para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico sorológicos.

### **1.3. Respostas imunológicas desencadeadas pelo vírus**

Após a transmissão, o CHIKV se replica na pele e depois se dissemina para o fígado e as articulações. Já foi relatada a presença do vírus em fibroblastos musculares, articulares e da pele, sendo também encontrado nas camadas epiteliais e endoteliais de muitos órgãos, incluindo o fígado, baço e cérebro (21–23). Pacientes com infecção aguda e crônica do vírus Chikungunya têm altas concentrações de citocinas circulantes e quimiocinas como, por exemplo, as citocinas pró-inflamatórias (INF $\alpha$ , INF $\gamma$ , IL6), citocinas anti-inflamatórias (antagonista do receptor da IL1, IL4 e IL10) e outras quimiocinas, tais como proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) (24). Pacientes também desenvolvem uma resposta de anticorpos robusta com concentrações de IgM detectáveis dias após a infecção e IgG neutralizante mensurável já na segunda semana de infecção (13).

### **1.4. Estratégias voltadas para o controle do CHIKV**

O tratamento da infecção pelo CHIKV envolve principalmente o uso de drogas anti-inflamatórias para alívio sintomático. O diagnóstico da doença é feito pelo isolamento do vírus, detecção do material genético por RT-PCR e ELISA reconhecidos como ferramentas de laboratório para a detecção específica da infecção do CHIKV em amostras de paciente infectados (25). Várias estratégias vacinais vem sendo estudadas visando à indução de anticorpos neutralizantes, o correlato de proteção melhor estabelecido para infecções pelo vírus, dentre elas estão: vírus inativados, vírus atenuados, VLPs (do inglês Vírus-Like Particles), vírus

quiméricos, vacinas de DNA e vacinas de subunidades com proteínas recombinantes (25–27) (21–23). Grande parte das estratégias exploradas leva à geração de anticorpos com capacidade de induzir proteção contra o CHIKV em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* (28–31). No entanto, apenas duas vacinas chegaram a estudos de fase clínica mais avançados em 2016: uma vacina usando vírus inativado e a outra baseadas em VLPs, fase II e fase I respectivamente (25–27,29). No entanto, até o presente momento, não existe nenhuma vacina licenciada ou medicamento antiviral disponível contra o CHIKV.

#### **1.4.1. Estratégias vacinais de subunidades para controle do CHIKV**

As vacinas de subunidade são aquelas que utilizam apenas fragmentos do patógeno como, proteínas, peptídeos, polissacarídeos ou açúcares, a fim de induzirem uma resposta antígeno-específica. Elas representam alternativas seguras para a prevenção de infecções virais já que não há a utilização do patógeno inteiro, como por exemplo, nas vacinas de vírus atenuados que podem ocorrer algum tipo de reversão da patogenicidade viral. Em relação ao CHIKV, os antígenos mais explorados em estratégias vacinais são as proteínas estruturais (C, E1, E2 e E3) em diferentes combinações. Dentre essas se destaca a E2. O uso desta proteína em sua forma recombinante foi capaz de induzir anticorpos neutralizantes e elevados níveis de proteção quando utilizada em associação com o adjuvante hidróxido de alumínio (Alum) (18,25,32). Além disso, epítomos identificados na E2, em especial em sua região N-terminal, são imunodominantes para anticorpos neutralizantes em macacos e humanos (13,19,20), sendo que diferentes domínios da proteína podem influenciar a imunidade antiviral (17). Apesar de promissor, o sucesso no uso de vacinas de subunidades depende da adoção de adjuvantes adequados que aumentem a imunogenicidade de antígenos purificados e sistema de entrega que levem ao melhor direcionamento do antígeno a células do sistema imunológico (33,34). Neste cenário, a utilização de nanopartículas associadas, ou não, a adjuvantes, pode assumir um papel importante na potencialização de respostas imunológicas induzidas por vacinas de subunidades.

#### **1.4.2. Nanopartículas e vacinas**

A utilização de nanopartículas com diferentes composições químicas podem ser empregadas em uma ampla variedade de formulações vacinais com aplicações terapêuticas ou profiláticas (35). As nanopartículas são capazes de direcionar antígenos às células específicas e influenciar na modulação de respostas inerentes à imunidade inata e/ou adquirida devido a características como tamanho, composição e carga. Nanopartículas também permitem a



proteção e a liberação controlada do antígeno carregado favorecendo o recrutamento de células para o sítio de inoculação (36–39). A aplicação de nanopartículas nas infecções por Alphavírus ainda é recente e limitada à utilização de VLPs formados a partir das proteínas estruturais de CHIKV e produzidos em baculovírus ou em células de mamíferos (40–42).

Os MLVs (do inglês Multilamellar Lipids Vesicles), também conhecidos como Lipossomas Multilamelares, são vesículas lipídicas compostas por duas ou mais bicamadas de fosfolípídeos intercaladas entre si. São compostos anfifílicos com reduzida ou nenhuma toxicidade, facilidade de preparo e armazenamento, baixo custo, além de serem biodegradáveis. Permitem o carregamento de drogas e antígenos acoplados ou ancorados em sua superfície, assim como incorporados na porção hidrofóbica ou hidrofílica, de acordo com a natureza do antígeno e suas propriedades físico-químicas (34,35). Tais plataformas possuem um perfil de segurança e capacidade de direcionamento de respostas imunológicas, uma vez que permitem a utilização de moléculas ligantes de receptores específicos presentes nas células alvos. A capacidade desses sistemas em promover um efeito depósito e uma cinética de liberação controlada protegendo o antígeno de degradação antes de seu reconhecimento por células do sistema imune, como as células apresentadoras de antígenos (APCs) (36–39).

Podem também acabar influenciando na modulação de respostas imunológicas devido a características como: tamanho, composição e carga (36–39,43,44). O tamanho de partícula dos lipossomas possivelmente influencia a sua biodistribuição, afetando a resposta imune induzida, uma vez que foi demonstrado que os lipossomas de menor tamanho são eliminados mais rapidamente do sítio de inoculação que os lipossomas de tamanho maior, o que sugere que lipossomas de tamanho maior, que escapam do local de inoculação, são mais efetivamente retidos nos gânglios linfáticos podendo ser fagocitados por células inatas como macrófagos, do que os lipossomas de tamanho menor, que vão para o sangue (43). *Brewer e colaboradores* (36), observaram que partículas menores com cerca de 150nm induzem respostas do tipo Th2 onde citocinas ajudam a ativar células B, resultando na produção de anticorpos, e quando estas partículas são maiores, >225 nm, uma resposta Th1 é induzida, ou seja ativam macrófagos e participam na geração de linfócitos T citotóxicos, resultando em uma resposta imune mediada por células. No entanto vale ressaltar que o efeito do tamanho das nanopartículas na resposta imune também depende de outros fatores, como a via de administração e a composição lipídica das mesmas. Outro parâmetro relacionado com a influência das nanopartículas na resposta imune gerada no contexto vacinal, é a composição das vesículas que afeta a carga que elas

possuem na sua superfície (37,38,44). Os fosfolipídeos mais utilizados na produção dessas vesículas lipídicas são aqueles que em solução aquosa conseguem formar uma bicamada estável, como por exemplo, as fosfatidilcolinas, que apresentam estabilidade em tampões com variações tanto na concentração de sal quanto no pH; colesterol (que é encontrado naturalmente nas membranas lipídicas celulares) que influencia na permeabilidade e rigidez das membranas; além de lipídeos catiônicos ou aniônicos, que vão estar afetando na carga da nanopartícula (39,40,44,45).

As NMVs (do inglês nanomultilamellar lipids vesicles) são uma nova classe de vesículas lipídicas de tamanho nanométrico (de 50 nm) que se apresentam usualmente com duplas bicamadas lipídicas, graças às ligações de hidrogênio que ocorrem por meio do lipídeo DPGG (Dipalmitoyl phosphatidyl glycerine) presente na sua composição, que faz com que haja uma estrutura estável em duas camadas(46,47). Os grupos hidroxila presentes na estrutura dessas nanopartículas podem interagir com outras nanopartículas do mesmo perfil se agregando em partículas maiores de 1 a 10 µm por forças auto-ativas (46). *Rodrigues-Jesus M.J. e colaboradores* (47), caracterizaram as NMVs, como um sistema de entrega eficiente em uma formulação vacinal com uma forma recombinante da subunidade B da toxina Shiga (Stx2B) produzida por algumas cepas enterohemorrágicas de *Escherichia coli* (EHEC) que resultou na indução de anticorpos séricos capazes de neutralizar as atividades tóxicas da toxina nativa. Em outro trabalho *Fotoran W.L. e colaboradores* (46) mostraram que esse modelo de nanopartículas melhorou o efeito da de dois principais medicamentos antimaláricos, cloroquina e artemisinina contra *P. falciparum*, o agente causador da forma mais perigosa da malária. Os dois trabalhos citados indicaram a capacidade deste sistema de entrega em ocasionar efeito depósito no sítio de inoculação, uma cinética de liberação do antígeno, além da proteção do antígeno antes do seu reconhecimento por células do sistema imune.

### **1.4.3. Adjuvantes**

Adjuvantes são uma alternativa para aumentar a imunogenicidade de antígenos, reduzir a quantidade de antígeno por dose e número de doses da vacina, além de melhorar a eficácia da vacina em indivíduos imunocomprometidos (idosos e crianças) (48). Lipopolissacarídeos (LPS) são encontrados em bactérias gram-negativas e possuem forte efeitos adjuvantes mas a elevada toxicidade impede o seu uso em vacinas. Neste contexto, o monofosforil lipídio A (MPL), uma forma detoxificada do Lipido A presente no LPS, é um adjuvante desprovido de atividades tóxicas mas com efeito imuno-estimulador preservado e aprovado para uso em vacinas (45,48).

O MPLA age pela interação com receptores do tipo TLR-4, presentes em APCs, e elevação da produção de citocinas pró-inflamatórias. Esse adjuvante induz a produção de anticorpos IgG2a e um perfil tipo Th1 em camundongos (45,48). O MPLA pode ser utilizado na composição de nanopartículas lipídicas para induzir uma resposta imunológica mais eficaz (33,35,45–48).

## 6. CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos nesse projeto podemos concluir que:

- As proteínas E2,  $\Delta$ E2 e  $\Delta$ E2.1 foram expressas em linhagens de *E. coli*, sendo apenas as proteínas  $\Delta$ E2 e a  $\Delta$ E2.1 obtidas em forma solúvel, com elevado grau de pureza e rendimento considerável após as etapas de purificação sendo compatíveis à realização de ensaios de imunização;
- A proteína recombinante  $\Delta$ E2.1 foi incorporada com sucesso em NMVs associadas com o adjuvante MPLA.
- A imunização de camundongos C57/BL6 por via i.m. demonstrou que a formulação baseada em  $\Delta$ E2.1-NMV+MPLA resultou em maiores títulos de anticorpos antígeno-específico e o perfil equilibrado de subclasses de IgG.
- A formulação  $\Delta$ E2.1-NMV+MPLA também foi a que gerou anticorpos capazes de neutralizar do o CHIKV.
- Os resultados, em conjunto, demonstram a obtenção de um novo antígeno alvo assim como uma nova formulação vacinal capaz de conferir proteção contra o CHIKV.

## 8. REFERÊNCIAS

1. Burt FJ, Rolph MS, Rulli NE, Mahalingam S, Heise MT. Chikungunya: A re-emerging virus. In: *The Lancet*. 2012. p. 662–71.
2. Fischer M, Erin Staples J. Chikungunya virus spreads in the Americas — Caribbean and South America, 2013-2014. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. Department of Health and Human Services; 2014. p. 500–1.
3. Robinson MC. Clinical Features. Vol. 49, *Communications An Epidemic Of Virus Disease In Southern Province, Tanganyika Territory*. 1955.
4. Teixeira MG, Andrade AMS, Da Costa MCN, Castro JSM, Oliveira FLS, Goes CSB, et al. East/central/South African genotype chikungunya virus, Brazil, 2014. Vol. 21, *Emerging Infectious Diseases*. Centers for Disease Control and Prevention (CDC); 2015. p. 906–8.
5. Nunes MRT, Faria NR, de Vasconcelos JM, Golding N, Kraemer MUG, de Oliveira LF, et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Med*. 2015 Apr 30;13(1).
6. Souza TML, Vieira YR, Delatorre E, Barbosa-Lima G, Luiz RLF, Vizzoni A, et al. Emergence of the East-Central-South-African genotype of Chikungunya virus in Brazil and the city of Rio de Janeiro may have occurred years before surveillance detection. *Sci Rep*. 2019 Dec 1;9(1).
7. Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE, Higgs S. A single mutation in Chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog*. 2007 Dec;3(12):1895–906.
8. CDC. Countries and territories where chikungunya cases have been reported. Cdc [Internet]. 2016;2018. Available from: <http://www.cdc.gov/chikungunya/geo/index.html>
9. *Epidemiol B. Boletim Epidemiológico*. 2018;49(Tabela 1):1–14.
10. Brasil M da S. *Boletim Epidemiológico 13: Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, chikungunya e Zika) até a Semana Epidemiológica 12 de 2019*. Secr Vigilância em Saúde Ministério da Saúde Bras [Internet]. 2019;50(10):1–13. Available from: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/marco/25/2019-013-Monitoramento-dos-casos-de-arboviroses-publicacao-25-03-2019.pdf>
11. Simon F, Javelle E, Oliver M, Leparç-Goffart I, Marimoutou C. Chikungunya Virus Infection. *Curr Infect Dis Rep* [Internet]. 2011 Jun 6 [cited 2019 Oct 25];13(3):218–28. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11908-011-0180-1>
12. Lum FM, Ng LFP. Cellular and molecular mechanisms of chikungunya pathogenesis. Vol. 120, *Antiviral Research*. Elsevier B.V.; 2015. p. 165–74.

13. Kam Y-W, Lee WWL, Simarmata D, Harjanto S, Teng T-S, Tolou H, et al. Longitudinal Analysis of the Human Antibody Response to Chikungunya Virus Infection: Implications for Serodiagnosis and Vaccine Development. *J Virol.* 2012 Dec 1;86(23):13005–15.
14. Tripathi NK, Priya R, Shrivastava A. Production of recombinant Chikungunya virus envelope 2 protein in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014 Jan 1;98(6):2461–71.
15. Thiberville SD, Moyon N, Dupuis-Maguiraga L, Nougairede A, Gould EA, Roques P, et al. Chikungunya fever: Epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. Vol. 99, *Antiviral Research.* 2013. p. 345–70.
16. Li L, Jose J, Xiang Y, Kuhn RJ, Rossmann MG. Structural changes of envelope proteins during alphavirus fusion. *Nature.* 2010 Dec 2;468(7324):705–8.
17. Weger-Lucarelli J, Aliota MT, Kamlangdee A, Osorio JE. Identifying the Role of E2 Domains on Alphavirus Neutralization and Protective Immune Responses. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015 Oct 16;9(10).
18. Weber C, Büchner SM, Schnierle BS. A Small Antigenic Determinant of the Chikungunya Virus E2 Protein Is Sufficient to Induce Neutralizing Antibodies which Are Partially Protective in Mice. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015 Apr 23;9(4).
19. Kam YW, Lum FM, Teo TH, 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 Apr;4(4):330–43.
20. Kam YW, Lee WWL, Simarmata D, Le Grand R, Tolou H, Merits A, et al. Unique epitopes recognized by antibodies induced in chikungunya virus-infected non-human primates: Implications for the study of immunopathology and vaccine development. *PLoS One.* 2014 Apr 22;9(4).
21. Talarmin F, Staïkowsky F, Schoenlaub P, Risbourg A, Nicolas X, Zagnoli A, et al. [Skin and mucosal manifestations of chikungunya virus infection in adults in Reunion Island]. *Med Trop (Mars)* [Internet]. 2007 Apr [cited 2019 Oct 25];67(2):167–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17691437>
22. Couderc T, Chrétien F, Schilte C, Disson O, Brigitte M, Guivel-Benhassine F, 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).
23. Mourya D, Mishra A. Chikungunya fever. *Lancet* [Internet]. 2006 Jul [cited 2019 Oct 25];368(9531):186–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014067360669017X>
24. Teng TS, Kam YW, Lee B, Hapuarachchi HC, Wimal A, Ng LC, et al. A systematic meta-analysis of immune signatures in patients with acute chikungunya virus infection. *J Infect Dis.* 2015 Jun 15;211(12):1925–35.

25. Kumar M, Sudeep AB, Arankalle VA. Evaluation of recombinant E2 protein-based and whole-virus inactivated candidate vaccines against chikungunya virus. *Vaccine*. 2012 Sep 21;30(43):6142–9.
26. Erasmus JH, Rossi SL, Weaver SC. Development of vaccines for chikungunya fever. In: *Journal of Infectious Diseases*. Oxford University Press; 2016. p. S488–96.
27. Saraswat S, Athmaram TN, Parida M, Agarwal A, Saha A, Dash PK. Expression and Characterization of Yeast Derived Chikungunya Virus Like Particles (CHIK-VLPs) and Its Evaluation as a Potential Vaccine Candidate. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 Jul 11;10(7).
28. Garcia-Arriaza J, Cepeda V, Hallengard D, Sorzano COS, Kummerer BM, Liljestrom P, et al. A Novel Poxvirus-Based Vaccine, MVA-CHIKV, Is Highly Immunogenic and Protects Mice against Chikungunya Infection. *J Virol*. 2014 Mar 15;88(6):3527–47.
29. Tiwari M, Parida M, Santhosh SR, Khan M, Dash PK, Rao PVL. Assessment of immunogenic potential of Vero adapted formalin inactivated vaccine derived from novel ECSA genotype of Chikungunya virus. *Vaccine*. 2009 Apr 21;27(18):2513–22.
30. Wang D, Suhrbier A, Penn-Nicholson A, Woraratanadharm J, Gardner J, Luo M, et al. A complex adenovirus vaccine against chikungunya virus provides complete protection against viraemia and arthritis. *Vaccine*. 2011 Mar 24;29(15):2803–9.
31. Ramsauer K, Schwameis M, Firbas C, Müllner M, Putnak RJ, Thomas SJ, et al. Immunogenicity, safety, and tolerability of a recombinant measles-virus-based chikungunya vaccine: A randomised, double-blind, placebo-controlled, active-comparator, first-in-man trial. *Lancet Infect Dis*. 2015 May 1;15(5):519–27.
32. Khan M, Dhanwani R, Rao PVL, Parida M. Subunit vaccine formulations based on recombinant envelope proteins of Chikungunya virus elicit balanced Th1/Th2 response and virus-neutralizing antibodies in mice. *Virus Res*. 2012 Aug;167(2):236–46.
33. O’Hagan DT, Fox CB. New generation adjuvants - From empiricism to rational design. Vol. 33, *Vaccine*. Elsevier Ltd; 2015. p. B14–20.
34. Perrie Y, Mohammed AR, Kirby DJ, McNeil SE, Bramwell VW. Vaccine adjuvant systems: Enhancing the efficacy of sub-unit protein antigens. Vol. 364, *International Journal of Pharmaceutics*. 2008. p. 272–80.
35. Smith DM, Simon JK, Baker JR. Applications of nanotechnology for immunology. Vol. 13, *Nature Reviews Immunology*. 2013. p. 592–605.
36. Brewer JM, Tetley L, Richmond J, Liew FY, Alexander J. Lipid vesicle size determines the Th1 or Th2 response to entrapped antigen. *J Immunol* [Internet]. 1998 Oct 15 [cited 2019 Oct 25];161(8):4000–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9780169>
37. Brewer JM, Pollock KGJ, Tetley L, Russell DG. Vesicle Size Influences the Trafficking, Processing, and Presentation of Antigens in Lipid Vesicles. *J Immunol*. 2004 Nov 15;173(10):6143–50.

38. Alinaghi A, Rouini MR, Johari Daha F, Moghimi HR. The influence of lipid composition and surface charge on biodistribution of intact liposomes releasing from hydrogel-embedded vesicles. *Int J Pharm.* 2014 Jan 1;459(1–2):30–9.
39. Schmidt ST, Foged C, Korsholm KS, Rades T, Christensen D. Liposome-based adjuvants for subunit vaccines: Formulation strategies for subunit antigens and immunostimulators. Vol. 8, *Pharmaceutics*. MDPI AG; 2016.
40. Chang LJ, Dowd KA, Mendoza FH, Saunders JG, Sitar S, Plummer SH, et al. Safety and tolerability of chikungunya virus-like particle vaccine in healthy adults: A phase 1 dose-escalation trial. *Lancet.* 2014 Dec 6;384(9959):2046–52.
41. Akahata W, Yang ZY, Andersen H, Sun S, Holdaway HA, Kong WP, et al. A virus-like particle vaccine for epidemic Chikungunya virus protects nonhuman primates against infection. *Nat Med.* 2010 Mar;16(3):334–8.
42. Metz SW, Martina BE, van den Doel P, Geertsema C, Osterhaus AD, Vlak JM, et al. Chikungunya virus-like particles are more immunogenic in a lethal AG129 mouse model compared to glycoprotein E1 or E2 subunits. *Vaccine.* 2013 Dec 9;31(51):6092–6.
43. Oussoren C, Zuidema J, Crommelin DJA, Storm G. Lymphatic uptake and biodistribution of liposomes after subcutaneous injection. II. Influence of liposomal size, lipid composition and lipid dose. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 1997 Sep 4;1328(2):261–72.
44. Watson DS, Endsley AN, Huang L. Design considerations for liposomal vaccines: Influence of formulation parameters on antibody and cell-mediated immune responses to liposome associated antigens. Vol. 30, *Vaccine.* 2012. p. 2256–72.
45. MacLeod MKL, McKee AS, David A, Wang J, Mason R, Kappler JW, et al. Vaccine adjuvants aluminum and monophosphoryl lipid A provide distinct signals to generate protective cytotoxic memory CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 May 10;108(19):7914–9.
46. Fotoran WL, Müntefering T, Kleiber N, Miranda BNM, Liebau E, Irvine DJ, et al. A multilamellar nanoliposome stabilized by interlayer hydrogen bonds increases antimalarial drug efficacy. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med [Internet].* 2019 Oct [cited 2019 Oct 25];102099. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1549963419301832>
47. Rodrigues-Jesus MJ, Fotoran WL, Cardoso RM, Araki K, Wunderlich G, Ferreira LCS. Nano-multilamellar lipid vesicles (NMVs) enhance protective antibody responses against Shiga toxin (Stx2a) produced by enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains (EHEC). *Brazilian J Microbiol.* 2019 Jan 23;50(1):67–77.
48. Petrovsky N, Aguilar JC. Vaccine adjuvants: Current state and future trends. Vol. 82, *Immunology and Cell Biology.* 2004. p. 488–96.
49. Parker JMR, Guo D, Hodges RS. New Hydrophilicity Scale Derived from High-Performance Liquid Chromatography Peptide Retention Data: Correlation of Predicted



- Surface Residues with Antigenicity and X-ray-Derived Accessible Sites. *Biochemistry*. 1986;25(19):5425–32.
50. Sambrook, J. *A Laboratory Manual*. Mol Cloning. 2001;1.
  51. Amorim JH, Porchia BFMM, Balan A, Cavalcante RCM, da Costa SM, de Barcelos Alves AM, et al. Refolded dengue virus type 2 NS1 protein expressed in *Escherichia coli* preserves structural and immunological properties of the native protein. *J Virol Methods*. 2010;167(2):186–92.
  52. Lasaro MA, Mathias-Santos C, Rodrigues JF, Ferreira LCS. Functional and immunological characterization of a natural polymorphic variant of a heat-labile toxin (LT-I) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC): RESEARCH ARTICLE. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2009 Jan;55(1):93–9.
  53. Organisation WH. Guidelines for plaque reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses. Geneva WHO [Internet]. 1385.
  54. Azami NAM, Moi ML, Takasaki T. Neutralization assay for chikungunya virus infection: Plaque reduction neutralization test. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc.; 2016. p. 273–82.
  55. Wikan N, Sakoonwatanyoo P, Ubol S, Yoksan S, Smith DR. Chikungunya virus infection of cell lines: Analysis of the east, central and south African lineage. *PLoS One*. 2012 Jan 27;7(1).
  56. Timiryasova TM, Bonaparte MI, Luo P, Zedar R, Hu BT, Hildreth SW. Optimization and validation of a plaque reduction neutralization test for the detection of neutralizing antibodies to four serotypes of dengue virus used in support of dengue vaccine development. *Am J Trop Med Hyg*. 2013 May;88(5):962–70.
  57. Yamaguchi H, Miyazaki M. Refolding techniques for recovering biologically active recombinant proteins from inclusion bodies. *Biomolecules* [Internet]. 2014;4(1):235–51. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4030991&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
  58. Sim J, Sim TS. Amino acid substitutions affecting protein solubility: High level expression of *Streptomyces clavuligerus* isopenicillin N synthase in *Escherichia coli*. *J Mol Catal - B Enzym*. 1999 Mar 11;6(3):133–43.
  59. Murby M, Samuelsson E, Nguyen TN, Mignard L, Power U, Binz H, et al. Hydrophobicity Engineering to Increase Solubility and Stability of a Recombinant Protein from Respiratory Syncytial Virus. *Eur J Biochem* [Internet]. 1995 May [cited 2019 Oct 25];230(1):38–44. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1432-1033.1995.0038i.x>
  60. Amorim JH. Desenvolvimento de vacinas de subunidades contra a dengue baseadas no domínio III da proteína E e na proteína NS1 recombinantes Desenvolvimento de vacinas de subunidades contra a dengue baseadas no domínio III da proteína E e na proteína NS1

recombinantes. Tese doutorado. 2012;

61. FDA. Common Ingredients in U.S. Licensed Vaccines | FDA [Internet]. 04/30/2018. 2018 [cited 2019 Oct 30]. Available from: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/safety-availability-biologics/common-ingredients-us-licensed-vaccines>