



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**

Flávia Fonseca Bagno

**PRODUÇÃO HETERÓLOGA, EM SISTEMA PROCARIOTO, DE
PROTEÍNAS ESTRUTURAIS DOS VÍRUS ZIKA E CHIKUNGUNYA E
AVALIAÇÃO DE SEU POTENCIAL PARA O USO EM FERRAMENTAS
DIAGNÓSTICAS**

Belo Horizonte
Fevereiro de 2018.

Flávia Fonseca Bagno

**PRODUÇÃO HETERÓLOGA, EM SISTEMA PROCARIOTO, DE
PROTEÍNAS ESTRUTURAIS DOS VÍRUS ZIKA E CHIKUNGUNYA E
AVALIAÇÃO DE SEU POTENCIAL PARA O USO EM FERRAMENTAS
DIAGNÓSTICAS**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito necessário à formação como Mestre em Microbiologia.

Orientação: Prof. Flávio Guimarães da Fonseca

Belo Horizonte
Fevereiro de 2018.

043 Bagno, Flávia Fonseca.

Produção heteróloga, em sistema procarioto, de proteínas estruturais dos vírus Zika e Chikungunya e avaliação de seu potencial para o uso em ferramentas diagnósticas [manuscrito] / Flávia Fonseca Bagno. – 2018.
146 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientação: Prof. Flávio Guimarães da Fonseca.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Infecções por Arbovirus. 3. Zika virus. 4. Vírus Chikungunya. 5. Proteínas Recombinantes. 6. Diagnóstico. I. Fonseca, Flávio Guimarães da. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE FLAVIA FONSECA BAGNO
Nº REGISTRO: 2016658368
Relatora e Suplente: Profa. Dr. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli

Às 14:00 horas do dia 19 de fevereiro de 2018, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Tatiane de Carvalho Izidoro Toledo (UFMG), Eliseu Soares de Oliveira Rocha (Katal Biotecnológica Ind. e Com. LTDA) e o Prof. Flávio Guimarães da Fonseca - Orientador, para julgar o trabalho final "Produção Heteróloga, Em Sistema Procarioto, De Proteínas Estruturais Dos Vírus Zika E Chikungunya E Avaliação De Seu Potencial Para O Uso Em Ferramentas Diagnósticas", da aluna **Flavia Fonseca Bagno**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Simone Gonçalves dos Santos - Subcoordenadora do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 19 de fevereiro de 2018.

Prof. Dr^a. Tatiane de Carvalho Izidoro Toledo

Prof. Dr. Eliseu Soares de Oliveira Rocha

Prof. Flávio Guimarães da Fonseca (Orientador)

Simone Gonçalves dos Santos
Subcoordenadora

“We are, each of us, a multitude. Within us, is a little universe.”

Carl Sagan, Cosmos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao professor Flávio pela orientação, pela compreensão e pela confiança em mim depositada. Agradeço também a professora Edel, pelos ensinamentos e por ser tão solícita sempre.

Às instituições financiadoras, CNPq, CAPES e FAPEMIG, por fornecerem as bases para a realização deste trabalho.

À banca examinadora, Dr. Eliseu Rocha e Dra. Tatiane Toledo, pela disponibilidade e prestatividade.

Agradeço também àqueles que estiveram comigo, de alguma forma, nesta jornada...

Aos meus pais, *in memoriam*, Marcia e Eduardo. Sem vocês, eu nada seria.

À minha avó Maria e a minha Tia Mary por tudo que fizeram por mim, por me acolherem e por ficarem do meu lado, sempre.

Ao Cauê, por ser esse companheiro incrível e por me fazer sorrir até nos momentos difíceis, e à minha segunda família: Danilo, Rejane, Seu Antônio, Dona Cida, Dona Wanda e membros Emilio/Moraes e Ltda. Vocês me receberam de braços abertos e de um jeito que jamais esquecerei. Obrigada por tudo!

À Alice, Anderson, Ângela, João, Raissa, Tânia, Tiago e Victor pelos ensinamentos, pelas ideias, e por me ajudarem nos experimentos. A vocês e aos demais membros do LVBA, agradeço também pelo dia-a-dia de trabalho e pelos momentos de descontração.

À Thaianne, pela parceria durante o mestrado e pela amizade, que tenho certeza que durará bem mais que isso.

Às meninas do CT vacinas: Fernanda, Marta, Natalia, Lara, Tati, por compartilharem comigo suas experiências, espaço de trabalho e comemoração de fim de ano.

Ao pessoal do CsF, flatfamily e agregados, obrigada por dividirem comigo um momento tão especial, e por manterem nossa amizade mesmo à distância.

Aos amigos de longa data: Carlinha, Gabriel, Leo Brasil, e Leo Pedone. São mais de 10 anos de amizade, de momentos bons e de desafios. Obrigada pela força, pela parceria e por vibrarem comigo a cada conquista!

À Anninha, minha grande parceira da graduação, que morro de saudades!

À Jô, que veio como uma luz no fim do túnel no final do meu mestrado.

A todos vocês, dedico:

*“É bonito ser amigo, mas confesso: é tão difícil aprender!
E por isso eu te suplico paciência.
Vou encher teu rosto de lembranças,
Dá-me tempo, de acertar nossas distâncias.”*

(José Fernandes de Oliveira, Poema do Amigo Aprendiz)

RESUMO

1 As arboviroses tem se tornado um problema de saúde pública, causando grandes
2 epidemias mundialmente. As semelhanças clínicas, a reatividade cruzada e a co-
3 circulação de arbovírus no Brasil, como o vírus da Dengue (DENV), Chikungunya
4 (CHIKV), Zika (ZIKV) e Febre amarela (YFV) dificultam o diagnóstico dessas
5 infecções, sendo necessário o desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico.
6 Pesquisas anteriores mostraram que proteínas do envelope desses arbovírus são
7 imunodominantes e associadas à geração de anticorpos, sendo, portanto,
8 estrategicamente importantes para o diagnóstico sorológico dessas infecções. Este
9 estudo teve como objetivo expressar, em sistema procariótico, proteínas do ZIKV e
10 CHIKV com potencial antigênico. As sequências nucleotídicas codificadoras de ZIKV-
11 E, CHIKV-E1 e CHIKV-E2 foram analisadas *in silico*, sintetizadas comercialmente,
12 clonadas em pET-21 e expressas em *Escherichia coli* linhagem BL21(DE3). As
13 proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade e avaliadas
14 quanto ao seu potencial antigênico em Western-blot, utilizando soros de camundongo
15 infectados, e ELISA, a partir do soro de pacientes humanos. Os ensaios de Western-
16 blot confirmaram a reatividade das proteínas produzidas, sendo as mesmas
17 reconhecidas tanto pelo anticorpo anti-his quanto por soros de camundongos
18 infectados. Os resultados de ELISA demonstraram que, dentre as proteínas
19 produzidas, CHIKV-E1 apresentou grande potencial para o diagnóstico sorológico da
20 infecção, ao passo que as demais necessitam de mais aperfeiçoamento. Dado que as
21 proteínas foram geradas com sucesso e as análises iniciais de CHIKV-E1 são
22 promissoras, novos estudos deverão ser realizados, visando um melhor emprego
23 dessas proteínas para um diagnóstico específico de infecções por CHIKV e ZIKV.

Palavras-chave: arboviroses, Zika virus, Chikungunya virus, diagnóstico, proteínas recombinantes.

ABSTRACT

1 Arboviruses have become a public health problem causing large
2 epidemics worldwide. The clinical similarities, cross-reactivity and cocirculation of the
3 arboviruses in Brazil such as Dengue virus (DENV), Chikungunya virus (CHIKV), Zika
4 virus (ZIKV), and Yellow fever virus (YFV) have complicated the diagnosis of these
5 infections, highlighting the need of new diagnostic tools. In previous studies, envelope
6 proteins of these viruses have been shown to be immunodominant and associated with
7 the generation of antibodies, and are, therefore, strategically important in serological
8 diagnosis. This study aimed to express ZIKV and CHIKV proteins with antigenic
9 potential in prokaryotic system. The nucleotide coding sequences of the ZIKV-E,
10 CHIKV-E1 e CHIKV-E2 were analyzed *in silico*, commercially synthesized, cloned in
11 pET-21 and expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3). Recombinant proteins were
12 purified by affinity chromatography and evaluated for their antigenic potential in mice
13 and human sera. Western blot assays confirmed the reactivity of the recombinant
14 proteins, which were recognized by the anti-his and antibodies in the infected mice
15 sera. Among the proteins produced, CHIKV-E1 showed a great potential for serological
16 diagnosis considering the ELISA results, while the others require additional
17 improvement. Since proteins have been successfully generated and the initial CHIKV-
18 E1 analyzes are promising, further studies should be carried out, looking for a better
19 use of these proteins in specific diagnosis of CHIKV and ZIKV infections.

Keywords: arboviruses, *Zika virus*, *Chikungunya virus*, diagnosis, recombinant proteins.

LISTA DE ABREVIATURAS

aa(s)	Aminoácido(s)
Ae.	Gênero de mosquito <i>Aedes</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APS	Persulfato de amônio
Asn	Asparagina
BH-TEC	Parque Tecnológico de Belo Horizonte
BSA	Albumina sérica bovina, (<i>bovine serum albumin</i>)
c	Proteína estrutural do capsídeo viral
CDC	Centers for Disease Control and Prevention (Estados Unidos)
CHIKV	<i>Chikungunya virus</i>
crio-ME	Microscopia crio-eletrônica
CT-Vacinas	Centro de Tecnologia de Vacinas e Diagnóstico
ddH₂O	Água duplamente destilada (<i>Double Distilled Water</i>)
DENV	<i>Dengue virus</i>
DI/DII/DIII	Domínios protéicos
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DO	Densidade ótica
E	Proteína do envelope de ZIKV
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E1/E2	Proteína do envelope 1/ Proteína do envelope 2 (CHIKV)
EDTA	Etilenodiaminotetracetato
ELISA	Teste Imunoenzimático (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)

et al	Do latim, <i>et alii</i> , que significa, e outros
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
GBS	<i>Guillain - Barré syndrome</i>
His	Histidina
IFN	Interferon
IgG/ IgM	Imunoglobulinas G e M
IPTG	Isopropil- β -D-Tiogalactopiranosídeo
JEV	<i>Japanese encephalitis virus</i>
LB	Meio de cultura Luria Bertani
M	Proteína estrutural da membrana viral
NaCl	Cloreto de sódio
NAT	Teste de Ácido Nucleico (<i>Nucleic Acid Testing</i>)
NCP	Proteína do nucleocapsídeo
NS	Proteínas não estruturais de flavivírus
nsP	Proteínas não estruturais de alfavírus
nt	Resíduo de nucleotídeo
OMS	Organização Mundial de Saúde (= <i>WHO</i>)
ORF	Fase aberta de leitura, do inglês <i>Open Reading Frame</i>
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pE	Proteína precursora de E - ZIKV
pE2	Glicoproteína precursora de E2
pH	Potencial hidrogeniônico

PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i> , um inibidor de protease
poli-A	Poliadenilada
prM	Proteína precursora de M
PRNT	Teste de neutralização de redução de placas (<i>Plaque Reduction Neutralization Test</i>)
PVDF	Fluoreto de polivinilideno (<i>polyvinylidene difluoride</i>)
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa quantitativa
RdRp	RNA-polimerase dependente de RNA (<i>RNA-dependent RNA polymerase</i>)
RE	Retículo endoplasmático
RSEs	Elementos de sequências repetidas (<i>Repeated Sequence Elements</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic Acid</i>)
RT	Transcrição reversa (<i>Reverse Transcription</i>)
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase antecedida de transcrição reversa
SCVZ	Síndrome congênita do vírus Zika
SDS	Dodecilsulfato de sódio (<i>Sodium Dodecyl Sulphate</i>)
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de Dodecilsulfato de Sódio e Poliacrilamida
SPOV	<i>Spondweni virus</i>
TBEV	<i>Tick-borne encephalitis virus</i>
TGN	Rede trans-Golgi
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UTR	Região não traduzida, do inglês <i>Untranslated Region</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

UNIDADES DE MEDIDAS

% Percentagem

°C Graus Celsius

Da, kDa Dalton, Quilodalton

g Aceleração da gravidade

h, min, s Horas, minutos, segundos

pb, kb Pares de base, quilobases

L, mL, µL Litro, mililitro, microlitro

**m, cm, mm, nm,
µm** Metro, centímetro, milímetro, nanômetro, micrômetro

M, mM Molar, milimolar

psi Pressão (do inglês *pound force per square inch*)

qsp Quantidade suficiente para

rmp Rotações por minuto

V Volts

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Número amostral de soros de pacientes utilizados nos ensaios de ELISA, considerando as proteínas de CHIKV.	74
Tabela 2- Número amostral de soros de pacientes utilizados nos ensaios de ELISA para ZIKV-E.....	74
Tabela 3- Referência para a classificação dos resultados pelos testes de ELISA....	76
Tabela 4 - Resultados gerados pelo programa PROVEAN para avaliação de diferenças de aminoácidos em sequências da proteína CHIKV-E1	80
Tabela 5- Análises de porção transmembrana e hidrofobicidade para CHIKV-E1....	82
Tabela 6- Análises de porção transmembrana e hidrofobicidade para CHIKV-E2....	84
Tabela 7- Análises de porção transmembrana e hidrofobicidade para ZIKV-E.....	85
Tabela 8 - Propriedades físico-química das proteínas construídas	90
Tabela 9- Resultado dos ELISAs utilizando as proteínas recombinantes.....	105
Tabela 10 - Resultados dos parâmetros utilizados para a avaliação do desempenho das proteínas produzidas em teste ELISA.	107

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Diagnóstico clínico para Dengue, Zika e Chikungunya segundo recomendações do Ministério da Saúde.	50
Quadro 2- Soluções utilizadas para o preparo de células competentes.....	67
Quadro 3 - Soluções utilizadas para a extração de DNA plasmidial.....	69
Quadro 4 - Parâmetros para avaliar o desempenho das proteínas no ELISA.....	76
Quadro 5- Sequências finais das proteínas truncadas de CHIKV e ZIKV.	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição Mundial do ZIKV considerando regiões de risco. Adaptado de CDC (2018).....	22
Figura 2 - Organização do genoma de Flavivirus e função das proteínas virais.....	24
Figura 3 - Esquema estrutural de um flavivírus.	25
Figura 4 - Arranjo proteína E na superfície do ZIKV.....	26
Figura 5 - Dímero da proteína E em forma de fita.	27
Figura 6 - Ciclo replicativo de um flavivírus.....	29
Figura 7 - Países e territórios onde casos de Chikungunya foram reportados.....	38
Figura 8 - Genoma de um Alphavirus.....	39
Figura 9 - Estrutura do CHIKV.....	41
Figura 10 - Diagrama de fita do heterodímero p62-E1.....	42
Figura 11 - Diagrama do ciclo multiplicativo do CHIKV.....	44
Figura 12 – Possibilidades de diagnóstico laboratorial por detecção do RNA viral e Sorologia (detecção de IgM e IgG) para ZIKV e CHIKV.....	51
Figura 13 - Delineamento experimental da Fase I.....	61
Figura 14 - Mapas dos plasmídeos sintéticos desenvolvidos com as sequências dos genes de interesse.	63
Figura 15 - Delineamento experimental da Fase II.....	66
Figura 16 - Delineamento experimental da Fase III.....	73
Figura 17 - Análise filogenética de sequências brasileiras considerando os genótipos detectados no país.....	78
Figura 18 – Alinhamento, pelo Clustal Omega, entre as sequências consenso geradas a partir dos genótipos Asiático e ESCA para escolha de uma sequência única de trabalho de CHIKV-E1.....	79
Figura 19 - Alinhamento, pelo Clustal Omega, para escolha de uma sequência única de trabalho de CHIKV-E2.	81

Figura 20 - Análise in silico de hidrofobicidade (Protscale), tendência a porção transmembrana (TMHMM Server) e tendência a desordem estrutural (IUPRED) para a proteína CHIKV-E1.	83
Figura 21 - Análise in silico de hidrofobicidade (Protscale), tendência a porção transmembrana (TMHMM Server) e tendência a desordem estrutural (IUPRED) para a proteína CHIKV-E2.	84
Figura 22 - Análise in silico de hidrofobicidade (Protscale), tendência a porção transmembrana (TMHMM Server) e tendência a desordem estrutural (IUPRED) para a proteína ZIKV-E.	86
Figura 23 – Alinhamento, pelo Clustal Omega, comparando as sequências de CHIKV-E1 e CHIKV-E2 antes e após a otimização e remoção das porções transmembrana.....	87
Figura 24 – Alinhamento, pelo Clustal Omega, comparando as sequências de ZIKV-E antes e após a otimização e remoção das porções transmembrana.	88
Figura 25 - Predição da estrutura tridimensional para CHIKV-E1.....	91
Figura 26 - Predição da estrutura tridimensional para CHIKV-E2.....	92
Figura 27 - Predição da estrutura tridimensional para ZIKV-E.....	92
Figura 28 - Análise das sequências para ZIKV-E pelo BepiPred-2.0.....	93
Figura 29 - Análise das sequências para CHIKV-E1 e CHIKV-E2 pelo BepiPred-2.0.....	94
Figura 30 - Análise eletroforética em gel de agarose 1,0% dos produtos da digestão.....	95
Figura 31 -Padronização da indução de ZIKV-E (50 kDa).....	97
Figura 32 - Padronização da indução de CHIKV-E2(42 kDa).	98
Figura 33 - Padronização da indução de CHIKV-E1 (46 kDa)..	99
Figura 34 - Teste de solubilidade da proteína CHIKV-E1 em ureia (.	99
Figura 35 - Purificação de ZIKV-E,.....	100
Figura 36 - Purificação de CHIKV-E2.....	100
Figura 37 - Purificação de CHIKV-E1.....	101
Figura 38 -Western-blot mostrando a reação entre a proteína ZIKV-E e os anticorpos comerciais Anti-His (1) e Panflavi 4G2 A5 (2) e pool de soros de camundongos infectados por ZIKV (3).	102
Figura 39 - Western-blot mostrando a reação entre a proteína CHIKV-E1 e o anticorpo comercial Anti-His (1) - [Marcador Precision Plus Protein Dual Color Standards (Biorad) corado com DAB e cloranaphтол] e pool de soros de camundongos infectados por CHIKV (2) –	

[Marcador PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) corado com Luminata (Millipore)]. Neste último caso, utilizou-se o extrato bruto.....	102
Figura 40 - Western-blot mostrando a reação entre a proteína CHIKV-E2 e o anticorpo comercial Anti-His (1) e pool de soros de camundongos infectados por CHIKV (2).	103
Figura 41 - Curvas de titulação dos antígenos ZIKV-E (IgM) e CHIKV-E1(IgG) com soros positivos e negativos.....	104
Figura 42 - Média das absorvâncias obtidas nos testes de ELISA comparando os resultados obtidos testando-se a antigenicidade das proteínas produzidas com soros de pacientes positivos e negativas.....	104
Figura 43 - Resultados dos ELISAS (IgG) de CHIKV-E1 para os antígenos.	105
Figura 44 - Resultados dos ELISAS (IgG) de CHIKV-E2 para os antígenos.	106
Figura 45 - Resultados do ELISA (IgM) para ZIKV	106

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA	19
1.1. Arbovírus	19
1.1.1. <i>Zika virus</i> (ZIKV) – família <i>Flaviviridae</i>	20
1.1.1.1. Epidemiologia do ZIKV	21
1.1.1.1. Genoma	23
1.1.1.2. Estrutura	24
1.1.1.2.1. Proteína E	26
1.1.1.3. Ciclo de multiplicação do ZIKV	28
1.1.1.4. Febre Zika	29
1.1.1.4.1. Mecanismos de transmissão do ZIKV	29
1.1.1.4.2. Manifestações clínicas em infecções por ZIKV	31
1.1.1.4.3. Complicações em decorrências de infecção por ZIKV	32
1.1.2. <i>Chikungunya virus</i> (CHIKV) – família <i>Togaviridae</i>	35
1.1.2.1. Epidemiologia do CHIKV	36
1.1.2.2. Organização genômica do CHIKV	38
1.1.2.3. Estrutura	40
1.1.2.3.1. Proteínas E1 e E2	41
1.1.2.4. Ciclo de multiplicação viral do CHIKV	43
1.1.2.5. Febre Chikungunya	45
1.1.1.5.1. Transmissão e mecanismos de patogenicidade	45
1.1.1.5.2. Manifestações clínicas	46
1.1.1.5.3. Complicações em decorrência de infecções por CHIKV	47
1.2. 1. Diagnóstico das infecções por ZIKV	53
1.2.2. Diagnóstico das infecções por CHIKV	55
2. JUSTIFICATIVA	57
3. OBJETIVOS	60
3.2. Objetivo geral	60
3.3. Objetivos específicos	60
4. METODOLOGIA	61
4.1.1. Fase I: Análises de Bioinformática	61
4.1.2. Construção dos genes das proteínas de interesse	61
4.1.3. Análises <i>in silico</i> das proteínas produzidas	64
4.1.4. Predição da antigenicidade das proteínas	65
4.2. Fase II: Produção das proteínas recombinantes	66

4.2.1. Preparo de células competentes	66
4.2.2. Transformação em XL10 por choque térmico.....	67
4.2.3. Extração de DNA plasmidial <i>in house</i>	68
4.2.4. Digestão do DNA plasmidial.....	69
4.2.5. Transformação em BL21(DE3).....	70
4.2.6. Indução das proteínas recombinantes.....	70
4.2.7. Purificação das proteínas por cromatografia de afinidade	71
4.2.8. SDS-PAGE	71
4.2.9. Quantificação das proteínas recombinantes.....	72
4.3. Fase III – Verificação da antigenicidade das proteínas recombinantes	73
4.3.1. Obtenção de soros para testes de Western-Blot e ELISA.....	73
4.3.2. Western-Blot	74
4.3.3. Ensaio de ELISA Indireto	75
4.3.3.1. Análise dos dados e avaliação do desempenho das proteínas no ELISA	76
5. RESULTADOS	78
5.1. Fase I: Análises de Bioinformática	78
5.1.1. Construção das sequências sintéticas de CHIKV-E1, CHIKV-E2 e ZIKV-E.....	78
5.1.2. Análises de porção transmembrana, hidrofobicidade e desordem estrutural.....	81
5.1.3. Análises físico-químicas e estruturais das proteínas construídas	88
5.1.4. Predição da antigenicidade das proteínas.....	93
5.2. Fase II: Produção das proteínas recombinantes	95
5.2.1. Digestão dos plasmídeos com enzimas de restrição.....	95
5.2.2. Padronização da Indução das proteínas	96
5.2.3. Purificação das proteínas produzidas.....	100
5.3. Fase III- Verificação da antigenicidade das proteínas produzidas	101
5.3.1. Western-Blot	101
5.3.2. ELISA.....	103
6. DISCUSSÃO.....	110
7. CONCLUSÃO	115
8. PERSPECTIVAS	116
9.1. REFERÊNCIAS	117

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Arbovírus

1 Arbovírus (uma contração de *arthropod-borne virus*) é o termo que define
2 ecologicamente os vírus que são transmitidos entre hospedeiros vertebrados e
3 artrópodes hematófagos (WHO, 1967). O modo mais comum de transmissão acontece
4 de forma horizontal, pela inoculação de saliva infectada durante a picada do mosquito
5 vetor (Musso & Gubler, 2016).

6 Os arbovírus que causam doenças em humanos e outros animais de sangue
7 quente são membros de cinco famílias virais: *Bunyaviridae*, *Togaviridae*, *Flaviviridae*,
8 *Reoviridae* e *Rhabdoviridae*. A maioria causa zoonoses que normalmente são
9 dependentes de espécies animais não-humanas para a propagação de seus agentes
10 etiológicos. Muitas espécies animais são reservatórios de arbovírus (Novella *et al.*,
11 2011); sendo que, os humanos, salvo algumas exceções (*Dengue virus* – DENV ou
12 *Chikungunya virus* - CHIKV), são hospedeiros finais ou acidentais (Kenney & Brault,
13 2014). Entretanto, alguns arbovírus se adaptaram completamente aos seres humanos
14 e podem se manter em um ciclo de replicação mosquito-homem-mosquito que
15 independe de reservatórios não-humanos (Gubler, 2002).

16 Na última metade do século, houve uma ressurgência no número de arbovírus,
17 como o vírus do Nilo Ocidental (WNV, *West Nile virus*), DENV e CHIKV. A capacidade
18 dos arbovírus de se adaptarem a novos vetores pode ter influenciado em sua
19 expansão geográfica (Gubler, 2002). Como exemplo DENV e CHIKV, que eram
20 geralmente transmitidos por mosquitos silvestres, se adaptaram aos mosquitos da
21 espécie *Aedes aegypti* que são encontrados nas grandes cidades. Outros fatores que
22 podem estar associados a expansão de arboviroses incluem a falta de eficácia no
23 controle dos vetores (Gubler, 2011); mudanças genéticas - como já verificadas para o
24 ZIKV (Pettersson *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016; Zhu, *et al.*, 2016), CHIKV (Tsetsarkin
25 *et al.*, 2014), DENV (Bennett *et al.*, 2010) e WNV (Malkinson *et al.*, 2002)-; uso
26 descontrolado de inseticidas (Gubler, 1988); mudanças climáticas; perturbações dos

1 sistemas naturais - geralmente associados ao crescimento global das populações
2 humanas com extensiva urbanização - (Gould & Higgs, 2009); entre outros.

3 Dentre os arbovírus circulantes no Brasil, dois são temas deste trabalho.
4 Amostras de CHIKV pertencentes a linhagens de origem asiática e Leste-Centro-Sul
5 africana (ECSA) (Teixeira *et al.*, 2015; Nunes *et al.*, 2015) circulam no país desde
6 setembro de 2014. E, mais recentemente, em maio de 2015, foi detectado o ZIKV,
7 embora se tenha indícios de que ele foi introduzido no país em 2013 (Faria *et al.*,
8 2016).

9 Casos de febre pelos vírus Chikungunya e Zika são de notificação compulsória
10 e estão presentes na Lista Nacional de Notificação Compulsória de Doenças, Agravos
11 e Eventos de Saúde Pública. No Brasil, o Ministério da Saúde registrou quase 700 mil
12 casos prováveis de infecções por ZIKV e CHIKV entre os anos de 2016 e 2017,
13 entretanto, cerca de metade não foi confirmada (Secretaria de Vigilância em Saúde,
14 2016). Dentre as principais causas da diferença entre casos prováveis e confirmados
15 reside o fato de que o diagnóstico diferencial é muitas vezes inacessível. Além disso
16 tais viroses são indistinguíveis entre si do ponto de vista clínico e apresentam sintomas
17 muito semelhantes aos da Febre do Dengue, doença já estabelecida previamente no
18 Brasil.

19 Não existe tratamento específico nem vacinas disponíveis para infecções por
20 ZIKV e CHIKV. Recomenda-se, em casos sintomáticos, o uso de acetaminofeno
21 (paracetamol) ou dipirona para o controle da febre e manejo da dor. O uso de ácido
22 acetil salicílico (AAS) é contra-indicado devido ao risco de hemorragia.

23 As febres Chikungunya e Zika são causadas por vírus de famílias diferentes,
24 mas que possuem algumas espécies de vetores em comum. Os tópicos a seguir
25 revisarão mais especificamente sobre os vírus que foram alvo deste projeto.

1.1.1. *Zika virus* (ZIKV) – família *Flaviviridae*

26 O ZIKV pertence à família *Flaviviridae*, que compreende patógenos virais
27 responsáveis por causar doenças e óbitos em seres humanos e animais. Esta família

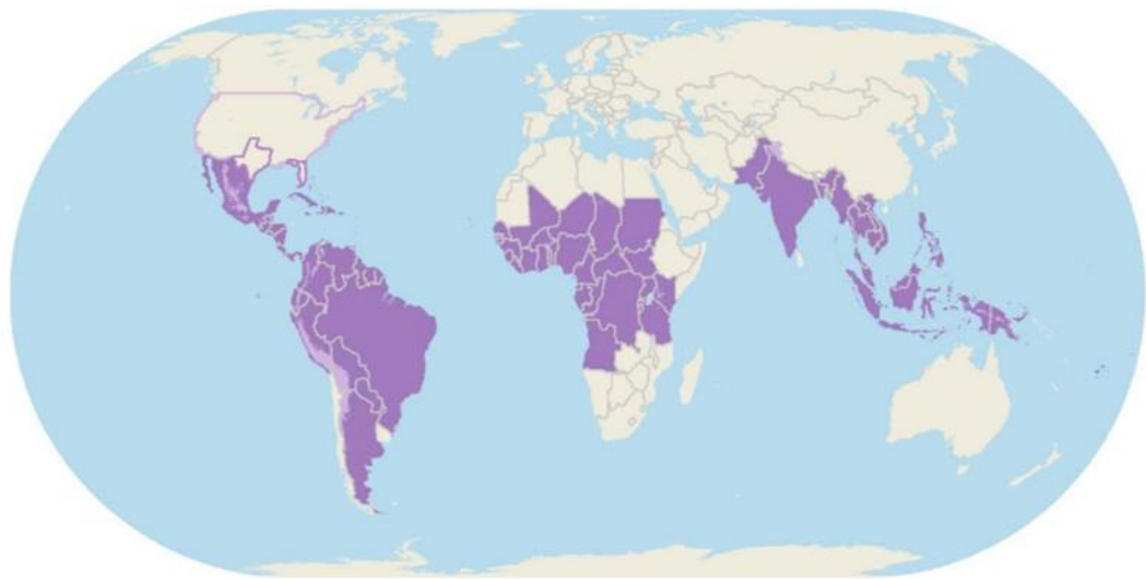
1 consiste de três gêneros: *Flavivirus*, *Pestivirus* e *Hepacivirus*. O gênero *Flavivirus*, ao
2 qual pertence o ZIKV, contém mais de 70 vírus, incluindo *Dengue virus*, *Japanese*
3 *encephalitis virus* (JEV), *Tick-borne encephalitis virus* (TBEV), *West Nile virus* (WNV)
4 e *Yellow fever virus* (YFV). Dentro do gênero, estes vírus podem ainda ser
5 subdivididos em complexos antigênicos de acordo com critérios sorológicos, ou em
6 grupos, clados ou espécies com base na filogenética molecular (Kuno *et al.*, 1998).

1.1.1.1. Epidemiologia do ZIKV

7 O ZIKV foi isolado pela primeira vez em 1947 na floresta de Zika, no Uganda,
8 a partir de uma amostra de soro de um macaco *Rhesus* durante um estudo de
9 vigilância da febre-amarela. Subsequentemente, em 1948, o ZIKV foi isolado de
10 mosquitos (Dick *et al.*, 1952) e quatro anos mais tarde, também na região da Tanzânia,
11 foi identificado em humanos (MacNamara, 1954). A partir de então, evidências da
12 doença causada pelo ZIKV em humanos foram reportadas em outros países africanos,
13 como Egito, República Centro-Africana, Serra Leoa e Gabão e em partes da Ásia
14 incluindo Índia, Malásia, Filipinas, Tailândia, Vietnã e Indonésia (Hayes, 2009).

15 O primeiro surto sistemático relatado de febre Zika ocorreu em 2007, na ilha
16 Yap, nos Estados Federados da Micronésia (Duffy *et al.*, 2009), seguido por uma
17 epidemia maior na Polinésia Francesa, em 2013, com uma estimativa de 30.000
18 infecções sintomáticas (Musso *et al.*, 2014). Um estudo epidemiológico de Posen e
19 colaboradores (2016) declarou que, provavelmente, o ZIKV foi endêmico por décadas
20 em partes da África subsaariana e da Ásia, chegando a mais de 50% de
21 soroprevalência em países desses continentes.

22 A distribuição mundial do ZIKV tem se expandido com o tempo, registrando
23 surtos na África, Américas, Ásia e Oceania (Figura 1). De acordo com Musso e
24 colaboradores (2016) o ZIKV seguiu claramente o mesmo caminho de DENV e
25 CHIKV, espalhando-se para países infestados pelos vetores *Aedes aegypti* e *Aedes*
26 *albopictus*.



Estados Unidos

- Estados que reportaram casos de ZIKV previamente
- Áreas sem risco conhecido de infecção por ZIKV

Demais países

- Áreas com risco de infecção por ZIKV
- Áreas de risco com baixa probabilidade de infecção pelo ZIKV
- Áreas sem risco conhecido de infecção por ZIKV

Figura 1 - Distribuição Mundial do ZIKV considerando regiões de risco. Adaptado de CDC (2018).

1 Algumas hipóteses têm sido propostas para explicar os grandes surtos de ZIKV
 2 na América Latina. Primeiramente, as condições climáticas decorrentes do evento *El*
 3 *Niño*, em 2015, no nordeste da América do Sul (Paz & Semenza, 2016), aliadas a
 4 abrangente distribuição de seus vetores (Marcondes *et al.*, 2015) podem ter
 5 contribuído para a rápida dispersão do ZIKV. Cidades densamente povoadas e
 6 populações que até então não tinham contato com o vírus, também são grandes alvos
 7 da infecção. Além disso, fatores virológicos também podem estar associados à rápida
 8 expansão da epidemia de ZIKV, como o evento de recombinação putativo na região
 9 de NS2B entre ZIKV e o vírus de Spondweni (SPOV) (Zhu *et al.*, 2016). Entretanto,

1 ainda se sabe pouco porque infecções esporádicas de ZIKV foram identificadas antes
2 de 2013 e surtos de larga escala têm ocorrido desde 2014 (revisto por Shi *et al.*, 2016).

3 O Brasil foi o primeiro país das Américas a relatar um surto de ZIKV, em maio
4 de 2015. Inicialmente, acreditava-se que o vírus tivesse sido introduzido durante a
5 Copa do Mundo de 2014 (junho a julho) (Zanluca *et al.*, 2015) ou durante um festival
6 de canoagem realizado no Rio de Janeiro em agosto do mesmo ano (Musso *et al.*,
7 2016). Entretanto, Faria e colaboradores (2016) mostraram que o ZIKV provavelmente
8 circulou no país por mais de um ano antes de ser detectado. Verificou-se que o surto
9 brasileiro provavelmente teve origem a partir de uma única introdução do vírus nas
10 Américas, em meados de 2013, durante a Copa das Confederações. A data estimada
11 de origem coincide com um aumento de viajantes de áreas endêmicas para o Brasil
12 bem como com surtos relatados nas ilhas do Pacífico. Além disso, esse estudo
13 constatou que as amostras coletadas nas Américas estão intimamente relacionadas
14 entre si e compartilham um ancestral com a linhagem que circulou na Polinésia
15 Francesa em novembro de 2013.

16 Dados da OMS revelaram que até agosto de 2017, 48 países e territórios nas
17 Américas relataram a transmissão autóctone do ZIKV (PAHO/WHO, 2017).

1.1.1.1. Genoma

18 Os flavivírus são vírus de genoma composto por RNA de fita simples e
19 orientação positiva, envelopados por uma bicamada lipídica derivada do hospedeiro e
20 rodeados por 180 cópias de duas glicoproteínas (Mukhopadhyay *et al.*, 2005). O
21 genoma possui uma fase aberta de leitura (ORF) que codifica uma única poliproteína.
22 A porção 5' inicial do genoma codifica três proteínas estruturais – nucleocapsídeo (c),
23 membrana (M, expressa como prM, precursora de M) e envelope (E). Sete proteínas
24 não estruturais (NS) são codificadas pela porção remanescente (NS1, NS2A, NS2B,
25 NS3, NS4A, NS4B e NS5) participando na replicação viral, montagem do vírus e
26 modulação da resposta imunológica do hospedeiro. O ZIKV possui um genoma de
27 aproximadamente 11 kb, com um *cap* na extremidade 5' e não possui cauda poli-A
28 (Lindenbach *et al.*, 2007) (Figura 2).

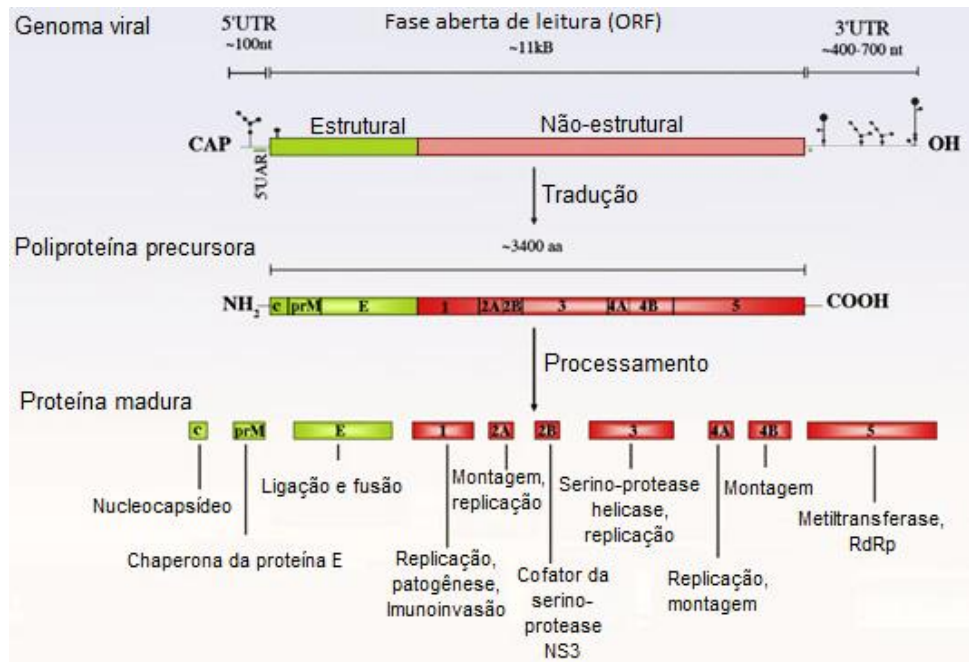


Figura 2 - Organização genômica dos flavivírus e função das proteínas virais. A única fase aberta de leitura codifica uma poliproteína precursora que é co- e pós-traducionalmente clivada em três proteínas estruturais (verde) e sete proteínas não-estruturais (vermelho). Na figura são indicadas estruturas secundárias e terciárias do RNA entre as regiões 5'UTR e 3'UTR, não traduzidas. aa, aminoácidos; C, proteína do capsídeo; CS, Sequência de Cristalização; E, envelope; M, membrana; RdRp, RNA-dependente de RNA-polimerase; VR, região variável. Adaptado de Fernandez-Garcia *et al.*, 2009.

1.1.1.2. Estrutura

- 1 Em relação à estrutura, os flavivírus são envelopados, possuem morfologia
- 2 esférica e aproximadamente 50 nm de diâmetro (Figura 3). Suas proteínas de
- 3 superfície (M e E) são arranjadas de maneira que conferem uma simetria icosaédrica
- 4 à partícula viral, consistindo de 60 unidades de repetição (Kostyuchenko *et al.*, 2016).

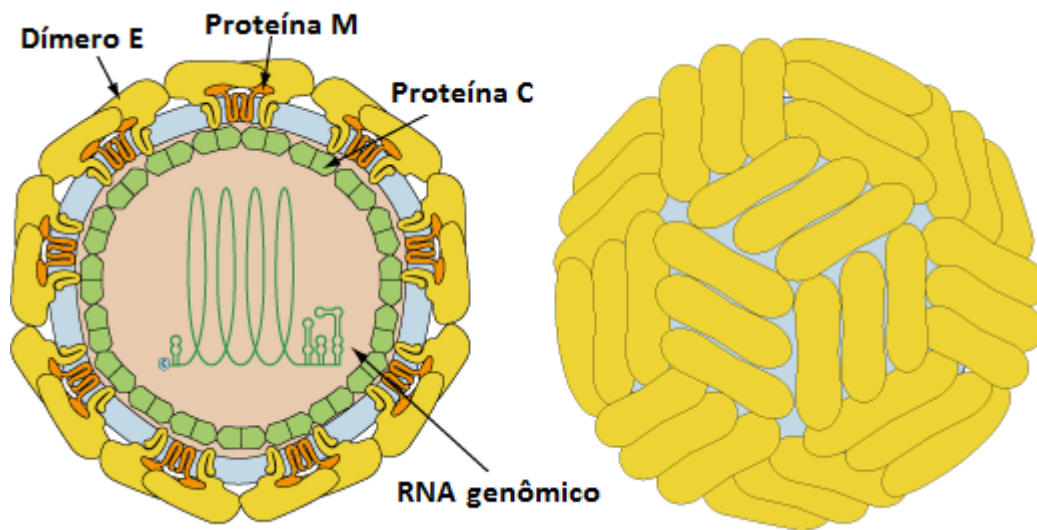


Figura 3 - Esquema estrutural de um flavivírus. Os flavivírus são envelopados, possuem morfologia esférica e aproximadamente 50 nm de diâmetro. As proteínas de superfície (M e E) são dispostas em simetria icosaédrica. Fonte: Viralzone (2016).

1 Estudos de crio-microscopia eletrônica (crio-ME) revelaram que a arquitetura
 2 global do ZIKV é semelhante à de outros flavivírus. A partícula viral mostrou-se
 3 estruturalmente estável, mesmo quando incubadas a 40 °C, contrastando com a
 4 proteína E do *Dengue virus* sorotipo 3 (DENV3) menos termicamente estável. Este
 5 fato também pode ter contribuído para a maior infectividade do ZIKV comparado com
 6 DENV sorotipos 2 e 4 (DENV2 e DENV4) em diferentes temperaturas (Kostyuchenko
 7 *et al.*, 2016). A crio-ME revelou também que o ZIKV possui uma superfície mais
 8 compacta que o DENV e sugere que esta estabilidade pode ajudá-lo a sobreviver em
 9 condições mais extremas (uma vez que foi verificada a presença do ZIKV em amostras
 10 de sêmen, saliva e urina) (revisto por Sirohi & Kuhn, 2017).

11 Sirohi e colaboradores (2016) constataram, também por crio-ME, diferenças
 12 estruturais na região ao redor do sítio de glicosilação Asn154 (aproximadamente 10
 13 aminoácidos) em cada uma das 180 glicoproteínas do envelope viral do ZIKV, uma
 14 região que aparenta ser importante para sua fixação nos receptores das células
 15 hospedeiras, além de ser capaz de influenciar no tropismo celular e na evolução da
 16 doença. Esta região varia não só entre isolados de ZIKV, mas também em outros
 17 membros da mesma família e sugere que mudanças neste local pode influenciar na
 18 transmissão do vírus.

1.1.1.2.1. Proteína E

1 A proteína E do ZIKV é a principal proteína envolvida na interação da partícula
 2 viral com os receptores celulares e na fusão das membranas (Kostyuchenko *et al.*,
 3 2016). Ela está disposta como dímeros, arranjados de três em três, paralelos uns aos
 4 outros formando uma estrutura em forma de balsa. Um total de 30 dessas estruturas
 5 cobrem a superfície viral (Figura 4).

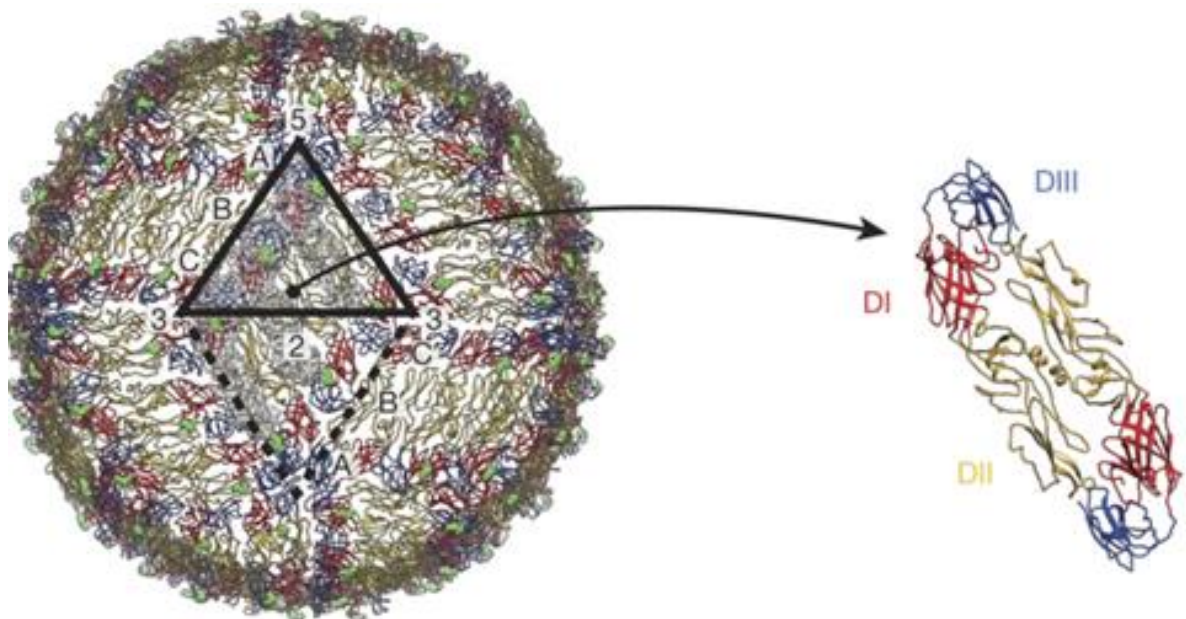


Figura 4 - Arranjo proteína E na superfície do ZIKV. As três proteínas E individuais (A, B e C) em uma unidade assimétrica (triângulo preto) são indicados por superfícies transparentes. Adaptado de Kostyuchenko e colaboradores (2016).

6 A porção externa da proteína E contém três domínios: DI, responsável pelas
 7 alterações conformacionais necessárias para a entrada viral e que atua como uma
 8 ponte entre DII e DIII; DII, que contém um laço de fusão (*fusion loop*) que interage
 9 com a membrana endossomal; e DIII, que aparentemente, está envolvido na ligação
 10 a receptores celulares. Acredita-se que dobra DI-DII é importante para o giro de DII
 11 expor o *loop* durante a fusão. A extremidade carboxi-terminal do ectodomínio de E é
 12 a região da haste α -helicoidal que se encontra na membrana viral (Kostyuchenko *et*
 13 *al.*, 2016) (Figura 5).

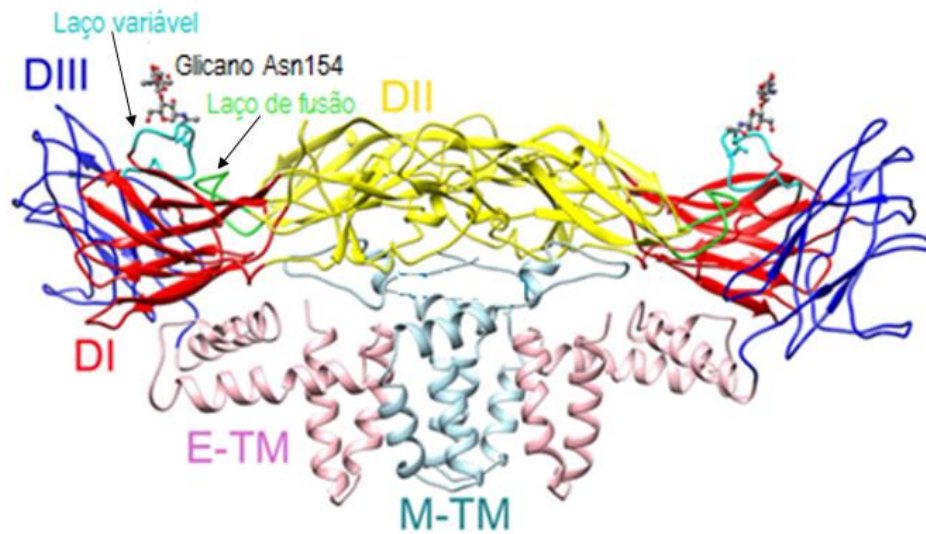


Figura 5 - Dímero da proteína E do ZIKV em forma de fita. As cores são de acordo com os domínios: domínio I (vermelho), domínio II (amarelo) e de domínio III (azul). Os laços de fusão, glicanos Asn154 e os laços variáveis são destacados. Domínios E e M transmembranares são mostrados em rosa e azul claro, respectivamente. Adaptado de Sirohi e colaboradores (2016).

1

2 Comparações estruturais e genômicas do ZIKV com outros flavivírus mostram
 3 que algumas partes da proteína E assemelham-se aos vírus neurovirulentos, como
 4 WNV e JEV, enquanto outras porções são semelhantes ao DENV. Uma diferença
 5 estrutural entre o ZIKV e outros flavivírus é um *loop* de aminoácidos expostos à
 6 superfície da partícula (Figura 5). Esta sequência da proteína E, que é ligada a um
 7 glicano, pode estar envolvida na regulação do tropismo celular e citopatogênese do
 8 ZIKV (Sirohi *et al.*, 2016). O neurotropismo do WNV tem sido associado à glicosilação
 9 numa posição semelhante, enquanto no caso do DENV, ocorre uma interação entre
 10 os açúcares presentes no capsídeo viral e os receptores (Beasley *et al.*, 2005). No
 11 entanto, Goo e colaboradores (2018) demonstraram que os resíduos que envolvem a
 12 proteína E regulam a antigenicidade do ZIKV independentemente da presença de
 13 glicosilação.

14 A contribuição da proteína E para a patologia dos flavivírus ainda não é
 15 totalmente compreendida (Kostyuchenko *et al.*, 2016). O que se sabe até então, é que
 16 ela é uma proteína imunodominante e está associada a geração de anticorpos

1 imunoprotetores, e também é importante para o diagnóstico sorológico da infecção
2 (Dai *et al.*, 2016), fatos que a levaram a ser alvo deste projeto.

1.1.1.3. Ciclo de multiplicação do ZIKV

3 De maneira geral, foi demonstrado que o ciclo de multiplicação dos flavivirus
4 ocorre no citoplasma da célula hospedeira. Os vírus penetram na célula-alvo por
5 endocitose mediada por clatrin, ocorrendo então a fusão da membrana viral com a
6 membrana da célula hospedeira formando endossomos. O ambiente ácido do
7 endossomo leva a mudanças conformacionais na glicoproteína E, induzindo a fusão
8 dessas membranas (Figura 6) (Bressanelli *et al.*, 2004). Assim que o RNA é liberado
9 ele é traduzido em uma poliproteína que será posteriormente processado dando
10 origem às proteínas estruturais e não estruturais. A RNA-polimerase dependente de
11 RNA (RdRp), NS5, copia a fita complementar de RNA (senso negativo) a partir do
12 RNA genômico, que irá servir de molde para a síntese de novas fitas positivas de RNA
13 genômico. (Brinton, 2002). Víriões imaturos são montados dentro do retículo
14 endoplasmático (RE), onde o RNA viral é complexado com a proteína C e empacotado
15 dentro de uma bicamada lipídica derivada do RE contendo heterodímeros para as
16 proteínas prM e E. A proteína prM previne uma fusão prematura do vírus durante seu
17 transporte para fora da célula e há autores que apontam que ela pode atuar como
18 chaperona, auxiliando na montagem da proteína E (Lorenz *et al.*, 2003). Após ser
19 transportado pela via secretória, ocorre a maturação do vírion na porção trans do
20 Golgi (TGN) a partir da clivagem de prM, dando origem à proteína M (Fernandez-
21 Garcia *et al.*, 2009). Partículas maduras e infecciosas são então lançadas por exocitose
22 no meio extracelular.

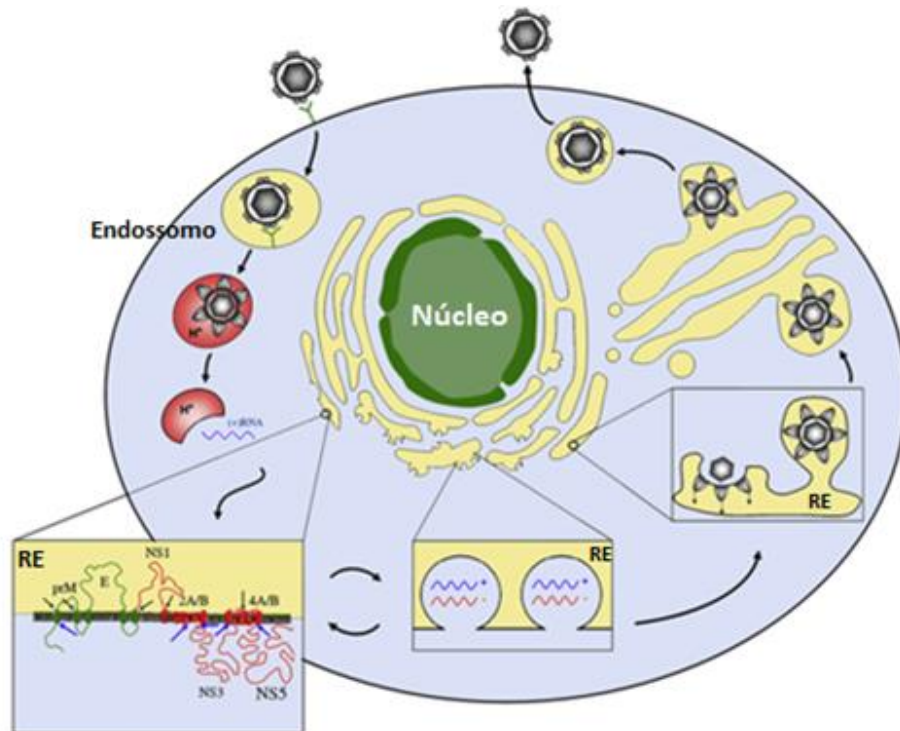


Figura 6 - Ciclo replicativo de um flavivírus. Os vírus fixam-se à superfície da célula hospedeira e, subsequentemente, entram na célula por endocitose mediada por clatrina. A acidificação da vesícula endossomal provoca alterações conformacionais no vírus, fusão das membranas virais e celulares, e desmontagem da partícula. Uma vez que o genoma é libertado para o citoplasma, o RNA genômico, de sentido positivo, é traduzido em uma única poliproteína que é processada co- e pós-traducionalmente por proteases virais e do hospedeiro. A replicação do genoma ocorre em membranas intracelulares e a montagem do vírion ocorre na superfície do retículo endoplasmático (RE) quando as proteínas estruturais e o RNA recém-sintetizado brotam para dentro do lúmen do RE. As partículas virais resultantes não-infecciosas são transportadas através da rede trans-Golgi (TGN). As partículas virais imaturas são clivadas resultando em partículas infecciosas maduras. Os vírions maduros são posteriormente liberados por exocitose. Adaptado de Fernandez-Garcia e colaboradores (2009).

1.1.1.4. Febre Zika

1.1.1.4.1. Mecanismos de transmissão do ZIKV

- 1 O ZIKV é transmitido primariamente pela picada de fêmeas do mosquito vetor.
- 2 Os vetores mais importantes, de acordo com a literatura, até o presente momento,
- 3 são mosquitos do gênero *Aedes*, família *Culicidae*. O primeiro isolamento do ZIKV foi
- 4 na espécie *Aedes africanus*, em 1948. Desde então, o vírus foi isolado de sete outras
- 5 espécies de *Aedes* e ainda em mosquitos de outros gêneros, como *Mansonia*,
- 6 *Eretmapodites*, *Anopholes* e *Culex*. Embora o ZIKV tenha sido isolado de várias
- 7 espécies de mosquitos, as pesquisas publicadas que avaliam a competência vetorial

1 utilizam basicamente duas espécies: *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. Tais espécies
2 são ativas durante o dia e estão amplamente distribuídos nas regiões tropicais e
3 subtropicais do mundo, sendo o *A. albopictus* propenso a regiões mais temperadas
4 (revisto por Song *et al.*, 2017).

5 Além do ciclo clássico do ZIKV, que envolve vetores, existem outras formas de
6 transmissão. A propagação direta entre seres humanos foi documentada por vias
7 perinatal, sexual e através da amamentação ou transfusão de sangue. Foi constatado
8 que o ZIKV pode passar de uma mãe infectada para o feto durante a gravidez,
9 evidenciado não apenas pela detecção de RNA viral no líquido amniótico (Calvet *et*
10 *al.*, 2016) e no soro de gestantes, mas também por sondagem de RNA viral, proteínas
11 ou partículas no cérebro, placenta ou soro de recém-nascidos com microcefalia
12 (revisto por Song *et al.*, 2017).

13 No Brasil, o RNA viral do ZIKV foi detectado em um paciente que recebeu
14 sangue de um doador assintomático, que apresentou sintomas alguns dias depois
15 (Vasconcelos, 2015; revisto por Silva & Souza, 2016). Saliva e urina também foram
16 apontados como veículos para transmissão do ZIKV, uma vez que partículas viáveis
17 foram isoladas a partir de dois pacientes em fase aguda no Brasil (Bonaldo *et al.*,
18 2016). Outros flavivírus já foram detectados em amostras de urina de indivíduos
19 infectados, mas culturas *in vitro* falharam em mostrar qualquer evidência de replicação
20 competente do vírus (Barzon, *et al.*, 2013; Domingo *et al.*, 2011).

21 O ZIKV também pode ser transmitido sexualmente de uma pessoa infectada
22 para seu parceiro. A transmissão de indivíduos do sexo masculino para o feminino é
23 a mais comum (D'Ortenzio *et al.*, 2016), mas também houve relatos de transmissão
24 sexual de mulheres para homens (Davidson *et al.*, 2016) e de homens para homens
25 (Deckard *et al.*, 2016). Oliveira e colaboradores (2016) relataram um caso em que o
26 ZIKV pode ter sido sexualmente transmitido de um homem para sua parceira, e esta,
27 em período gestacional, transmitiu para o seu bebê, que apresentou viremia por 67
28 dias após o nascimento. Em um estudo de revisão de Moreira e colaboradores (2017)
29 foi relatado que os sintomas da febre Zika iniciam-se, em média, 13 dias após a
30 transmissão sexual. O RNA viral e o vírus infeccioso foram detectados no sêmen, por
31 até 188 e 69 dias, respectivamente, após o surgimento dos sintomas.

1 A transmissão vertical do ZIKV também pode ocorrer no útero ou perinatal
2 (Bernard *et al.*, 2014; revisto por Atif *et al.*, 2016). Embora a transmissão de outros
3 flavivírus pela amamentação já tenha sido descrita anteriormente (Barthel *et al.*, 2013;
4 Hinckley *et al.*, 2007), a passagem do ZIKV através da amamentação ainda não é
5 amplamente aceita. As recomendações da OMS para amamentação até os primeiros
6 6 meses de vida permanecem válidas mesmo no contexto atual da transmissão do
7 ZIKV.

8 Colt e colaboradores (2017) publicaram um estudo no qual o RNA do ZIKV e
9 algumas partículas virais foram detectadas no leite materno de três mães infectadas,
10 sugerindo um potencial risco de transmissão. Entretanto, os próprios autores declaram
11 que mais evidências são necessárias para distinguir a transmissão através da
12 amamentação, de outras rotas de transmissão perinatal. Um estudo publicado no final
13 de 2017 relatou um caso de uma mãe que, durante o período de amamentação,
14 apresentou sintomas de infecção por ZIKV. Amostras dela e do recém-nascido, até
15 então assintomático, foram coletadas e confirmou-se a presença do ZIKV em ambos
16 os casos. Como os pacientes não tiveram histórico de viagens recentes e vivem em
17 um local de baixo risco de transmissão do mosquito, os autores acreditam que os
18 resultados deste estudo evidenciam a ocorrência de transmissão durante a
19 amamentação (Blohm *et al.*, 2018).

20 A transmissão direta, embora improvável, pode ocorrer através da pele ou de
21 mucosas, como exemplificado pelo caso de um paciente que apresentou, em seu
22 soro, uma carga viral estimada de 2×10^8 cópias do genoma viral por mL
23 (Swaminathan *et al.*, 2016).

24 Como declarado por Song e colaboradores (2017), embora transmissões não
25 vetoriais sejam consideradas incomuns nos casos de ZIKV, mais estudos são
26 necessários para identificar os fatores de risco envolvidos nestas rotas.

1.1.1.4.2. Manifestações clínicas em infecções por ZIKV

27 Aproximadamente 80% das infecções causadas pelo ZIKV são
28 assintomáticas. Quando presentes, os sintomas mais comuns são manchas na pele
29 (ou *rash*) maculopapulares pruriginosas ou não (90%), febre baixa (65%), artralgias -

1 dores nas articulações - (65%), conjuntivite não purulenta (55%), mialgias - dores
2 musculares- (48%), cefaleia e dor retro-orbital (39%) (Vorou, 2016 e Chang *et al.*,
3 2016). Existem ainda sintomas adicionais e raramente observados como náuseas,
4 diarreia, ulceração da mucosa, dor abdominal, prurido e trombocitopenia (Zammarchi
5 *et al.*, 2015, revisto por Plourde & Bloch, 2016).

6 Brasil e colaboradores (2016.a) relataram um estudo que acompanhou
7 pacientes com infecção aguda por ZIKV em unidades de saúde no Rio de Janeiro. Os
8 sintomas mais comumente relatados nos primeiros quatro dias da doença foram
9 erupções cutâneas, prurido, prostração, dor de cabeça e artralgia (com ou sem edema
10 associado). Embora a febre não tenha sido observada na apresentação na maioria
11 dos pacientes, 36% relataram história de febre não duradoura ou a ocorrência de um
12 pico de febre única no primeiro dia da infecção.

13 Com exceção de fetos e recém-nascidos, manifestações severas e letalidade
14 em decorrência do ZIKV são geralmente baixas. Os sintomas da febre Zika passam
15 geralmente de 2 a 7 dias (Shankar *et al.*, 2017). As principais complicações
16 associadas à infecção pelo ZIKV serão abordadas a seguir.

1.1.1.4.3. Complicações em decorrências de infecção por ZIKV

17 A capacidade de vários membros da família *Flaviviridae* de causar sérios
18 danos neurológicos devido às habilidades de neuroinvasão e neurovirulência já foram
19 registrados (Sips *et al.*, 2012).

20 Brasil e colaboradores (2016.b) acompanharam o período gestacional de
21 mulheres infectadas pelo ZIKV. Apesar dos sintomas clínicos leves nas mães, ficou
22 constatado que a infecção por ZIKV durante a gravidez é prejudicial para o feto e está
23 associada à morte fetal, à restrição do seu crescimento e a anormalidades do sistema
24 nervoso central. Em se tratando de recém-nascidos cujas mães foram infectadas pelo
25 ZIKV, o conjunto de sintomas decorretes é denominado Síndrome Congênita do Vírus
26 Zika (SCVZ) (Melo *et al.*, 2016.a).

27 De acordo com Calvet e colaboradores (2016.), a microcefalia é a
28 característica clínica mais reportada em suspeitas da SCVZ, e está entre os mais

1 graves e irreversíveis danos neurológicos causados por infecção pelo ZIKV. Segundo
2 Silva e Souza (2016), a microcefalia é caracterizada por uma redução do perímetro
3 cefálico, sendo que esta condição ocorre devido a um desenvolvimento inadequado
4 e/ou destruição das células neurais. Em contrapartida, embora a microcefalia tenha
5 sido amplamente evidenciada em relação à infecção por ZIKV, no estudo de Brasil e
6 colaboradores (2016.b) envolvendo 117 recém-nascidos expostos ao ZIKV, foi
7 ressaltado que outras ocorrências como calcificações cerebrais e restrição do
8 crescimento fetal foram mais frequentemente detectadas.

9 Em um estudo que acompanhou 11 crianças com SCVZ, foram identificadas
10 deficiências neurológicas em todos os pacientes, incluindo microcefalia, redução do
11 volume cerebral, ventriculomegalia, hipoplasia cerebelar, lisencefalia, hidrocefalia e
12 sequência deformativa associada a acinesia fetal. Dessa forma, Melo e colaboradores
13 (2016) concluíram que a microcefalia é apenas um dos sinais clínicos da SCVZ. E, tal
14 como acontece com outras infecções intra-uterinas, é possível que os casos
15 notificados de microcefalia representem apenas as crianças mais gravemente
16 afetadas e, que os recém-nascidos com consequências menos aparente - que podem
17 afetar não apenas o perímetro cerebral, mas também outros órgãos -, ainda não foram
18 diagnosticados.

19 Embora infecções por ZIKV tenham sido confirmadas em numerosos casos
20 de microcefalia (Mlakar *et al.*, 2016; Martines, 2016; Calvet *et al.*, 2016) não se sabe
21 ao certo quantos desses casos foram causados diretamente pelo vírus. Isso porque
22 foram relatadas poucas investigações detalhadas para a exclusão de outros
23 patógenos associados a más-formações congênitas, tais como infecções congênitas
24 por citomegalovírus, rubéola e Vírus Varicela-Zoster.

25 A patogênese da microcefalia devido a infecção por ZIKV foi bastante
26 estudada nos últimos dois anos. Cugola e colaboradores (2016) mostraram o potencial
27 patogênico de um isolado brasileiro do ZIKV, pertencente ao genótipo Asiático,
28 durante o desenvolvimento do feto em modelos animais. Esta pesquisa concluiu que
29 o ZIKV infecta primeiramente a placenta e, em seguida, o cérebro do feto, onde ele
30 atinge preferencialmente células progenitoras neurais, diminuindo sua viabilidade e
31 crescimento. Isto resulta na inibição da proliferação celular e da diferenciação, na

1 apoptose neuronal, no afinamento do córtex e em características macroscópicas
2 semelhante à microcefalia. Além deste estudo outros pesquisadores também
3 abordaram a relação de causalidade entre a infecção pelo ZIKV e a microcefalia
4 (Garcez *et al.*, 2016; Nguyen, *et al.*, 2016; Miner *et al.*, 2016).

5 Richard e colaboradores (2018) publicaram que o ZIKV pode infectar
6 eficientemente células-chave da barreira placentária que entram em contato
7 diretamente com a corrente sanguínea fetal, o que os vírus relacionados como DENV
8 ou WNV não são capazes de fazer. Foi demonstrado que o receptor tirosina quinase
9 AXL é o principal cofator de entrada do ZIKV em células endoteliais da veia umbilical
10 humana e que o ZIKV usa o AXL com uma eficiência muito maior do que DENV ou
11 WNV.

12 Gladwyn-ng e colaboradores (2017) contribuíram para elucidar os
13 mecanismos do ZIKV associados à microcefalia. Eles demonstraram que o ZIKV
14 desencadeia o estresse do retículo endoplasmático e respostas a proteínas mal-
15 dobradas no córtex cerebral de fetos humanos infectados. Além disso, após
16 inoculação de ZIKV em embriões de camundongos, verificou-se que o ZIKV
17 desencadeia o estresse do retículo endoplasmático em cérebros de embriões *in vivo*
18 e leva a apoptose de neurônios.

19 Em adultos, a infecção por ZIKV tem sido relacionada à síndrome de Guillain
20 - Barré (GBS) (Cao-Lormeau *et al.*, 2016; Dirlikov *et al.*, 2016; do Rosario *et al.*, 2016;
21 Dos Santos *et al.*, 2016), embora uma associação linear ainda não tenha sido
22 observada (Atif *et al.*, 2016). A GBS é uma polirradiculoneuropatia que pode ser
23 causada por infecções, muitas das quais envolvem flavivírus (Leis & Stokic, 2012) e
24 outros arbovírus tais como CHIKV (Lebrun *et al.*, 2009). A GBS é caracterizada por
25 parestesia na extremidade de membros superiores e inferiores, fraqueza muscular
26 ascendente e paralisia, que pode evoluir para distúrbios respiratórios e de deglutição
27 e eventualmente, morte (Oehler *et al.*, 2014).

28 Em julho de 2015, quatro meses após a confirmação da circulação do ZIKV
29 no Brasil, o diagnóstico de GBS foi confirmado em 55% dos pacientes que procuraram
30 hospitais e postos de saúde no estado da Bahia, sendo que 62% destes pacientes
31 relataram ter apresentado sintomas de infecção pelo ZIKV. Entretanto, muitos casos

1 com suspeita de infecção pelo ZIKV não foram confirmados em laboratório, e deve-se
2 ressaltar que muitos países, inclusive o Brasil, são caracterizados pela circulação
3 simultânea de outros arbovírus que também podem causar a GBS (revisito por Silva e
4 Souza, 2016).

5 Clinicamente, a síndrome de Guillain-Barre (GBS) predominou entre as
6 regiões afetadas pela epidemia do ZIKV, mas o espectro de doenças neurológicas
7 nos adultos aparece mais amplo, pois casos de encefalopatia, encefalite, meningite,
8 mielite e convulsões também foram relatados (Muñoz *et al.*, 2017).

9 Em julho de 2015, foram relatados 42 casos de GBS na Bahia, sendo que
10 42% tinham histórico consistente com infecção por ZIKV (PAHO/WHO, 2016). De
11 novembro de 2015 a março de 2016, a Colômbia registrou um aumento de 211% na
12 incidência de GBS em relação a incidência antes da introdução do ZIKV no país. Além
13 disso, estudos epidemiológicos apontaram que a incidência estimada de GBS
14 aumentou entre 2,0 e 9,8 vezes no ano de 2016 em 7 países nas Américas que
15 presenciaram a epidemia do ZIKV (Dos Santos *et al.*, 2016).

16 Uma outra complicação neurológica que merece destaque, a
17 meningoencefalite, foi relatada em infecções por ZIKV em pacientes adultos (Carteux
18 *et al.*, 2016) e durante um experimento envolvendo macacos *Rhesus* (Dudley *et al.*,
19 2016). O RNA viral foi detectado no líquido cefalorraquidiano sugerindo que a
20 replicação do vírus pode ser, eventualmente, associada à invasão do sistema nervoso
21 central (SNC). Papa e colaboradores (2017) demonstraram que o ZIKV infecta
22 eficientemente células endoteliais microvasculares do cérebro humano resultando em
23 liberação de partículas de vírus infecciosas, sendo capazes de acessar o SCN.

1.1.2. *Chikungunya virus* (CHIKV) – família *Togaviridae*

24 O CHIKV é um membro da família *Togaviridae*, pertencente ao gênero
25 *Alphavirus*, o qual é composto de vários sorocomplexos agrupados de acordo com
26 propriedades antigênicas (Calisher e Karabatsos, 1988; revisito por Burt *et al.*, 2012).
27 CHIKV pertence ao complexo antigênico *Semliki Florest*, juntamente com outros
28 *Alphavirus* transmitidos por mosquitos. Acredita-se que este vírus tenha se originado

1 na África, onde duas linhagens geneticamente distintas foram identificadas, uma
2 linhagem do Oeste/Leste/Centro e uma do Sul, que inclui um genótipo asiático
3 (Powers *et al.*, 2000; revisto por Burt *et al.*, 2012).

1.1.2.1. Epidemiologia do CHIKV

4 Isolado primeiramente de um paciente durante um surto febril numa área de
5 fronteira entre Moçambique e Tanzânia em 1952 (Robinson, 1955) o nome
6 Chikungunya é derivado de uma palavra de origem local que significa "contorcer-se",
7 ou "que se curva para cima", em referência à postura inclinada desenvolvida como
8 resultado de um dos sintomas da doença (revisto por Sun *et al.*, 2013).

9 Antes de 2000, grandes surtos de CHIKV foram raros, mas a partir da
10 epidemia de 2005 na Ilha *Réunion*, território francês localizado no Oceano Índico,
11 surtos tornaram-se mais frequentes e evidências genéticas sugerem possíveis
12 mecanismos de adaptação evolutiva do vírus ao mosquito vetor (Burt *et al.*, 2012).

13 Análises filogenéticas indicam que o CHIKV se originou na África há mais de
14 500 anos (Powers *et al.*, 2010), e uma linhagem comum divergiu em dois ramos
15 distintos, denominados Oeste Africano (WA - *West African*) e Leste-Centro-Sul
16 Africano (ECSA - *East Central South African*) (Powers & Logne, 2007). A linhagem
17 WA foi associada principalmente a pequenos focos em países localizados no oeste
18 da África. Em contraste, a linhagem ECSA espalhou-se para novas regiões causando
19 epidemias urbanas significativas. Estima-se que o primeiro isolado da linhagem ECSA
20 fora da África tenha ocorrido entre 70 e 150 anos atrás na Ásia (Powers *et al.*, 2010).
21 O vírus continuou a circular nesta área, evoluindo independentemente da linhagem
22 ECSA em um genótipo denominado Asiático (*Asian*) distinto, o que causou numerosos
23 surtos de CHIKV nesta região (Volk *et al.*, 2010). A linhagem do Oceano Índico (IOL -
24 *Ocean Indian Lineage*) surgiu no Quênia em 2004 como uma linhagem descendente
25 da ECSA, iniciando uma das maiores epidemias de CHIKV registradas com expansão
26 para áreas muito além da faixa histórica do vírus (Souza *et al.*, 2017). Durante esta
27 epidemia, o vírus espalhou-se para várias ilhas do Oceano Índico, Índia e partes do

1 Sudeste Asiático, levando a mais de 6 milhões de casos estimados (Schuffenecker *et*
2 *al.*, 2006; revisto por Silva & Dermody, 2017).

3 O padrão epidemiológico do CHIKV inclui alguns casos esporádicos e alguns
4 epidêmicos na África Ocidental, de Camarões ao Senegal, assim como em vários
5 outros países africanos (República Centro-Africana, África do Sul, Angola, Nigéria,
6 República Democrática do Congo, África do Sul, Malawi, Guiné e Uganda). Uma série
7 de epidemias ocorreu entre 1960 e 1990 (Pialoux *et al.*, 2007).

8 Ao longo dos anos, surtos de CHIKV foram relatados em países da África,
9 Ásia, Europa e oceanos Índico e Pacífico. O vírus espalhou-se para quase 40 países
10 em todo o mundo (revisto por Wahid *et al.*, 2017). Johansson e colaboradores (2014)
11 atribuem a ampla distribuição do CHIKV à alta prevalência de seus vetores, sua
12 eficiência na transmissão e à maior incidência de migração de pessoas nos últimos
13 anos.

14 No final de 2013, a primeira transmissão local do vírus nas Américas foi
15 identificada em países e territórios do Caribe. Até 2016, 45 países ou territórios em
16 todas as Américas (Figura 7), relataram mais de 1,7 milhões de casos suspeitos à
17 Organização Pan-Americana da Saúde (CDC-a, 2016). Um relatório divulgado no final
18 do ano passado pela OMS, revelou que em 2017 foram descritos 61. 613 casos
19 suspeitos e 123.087 casos confirmados de infecções por CHIKV nas Américas
20 (transmissão autóctone) (PAHO/WHO, 2017).

21 O primeiro caso de transmissão autóctone do CHIKV no Brasil foi relatado em
22 setembro de 2014, no Oiapoque (Amapá), e identificado como pertencente ao
23 genótipo Asiático. No mesmo mês, um surto causado por um genótipo diferente, o
24 ECSA, foi relatado na cidade de Feira de Santana, Bahia (Nunes *et al.*, 2015).

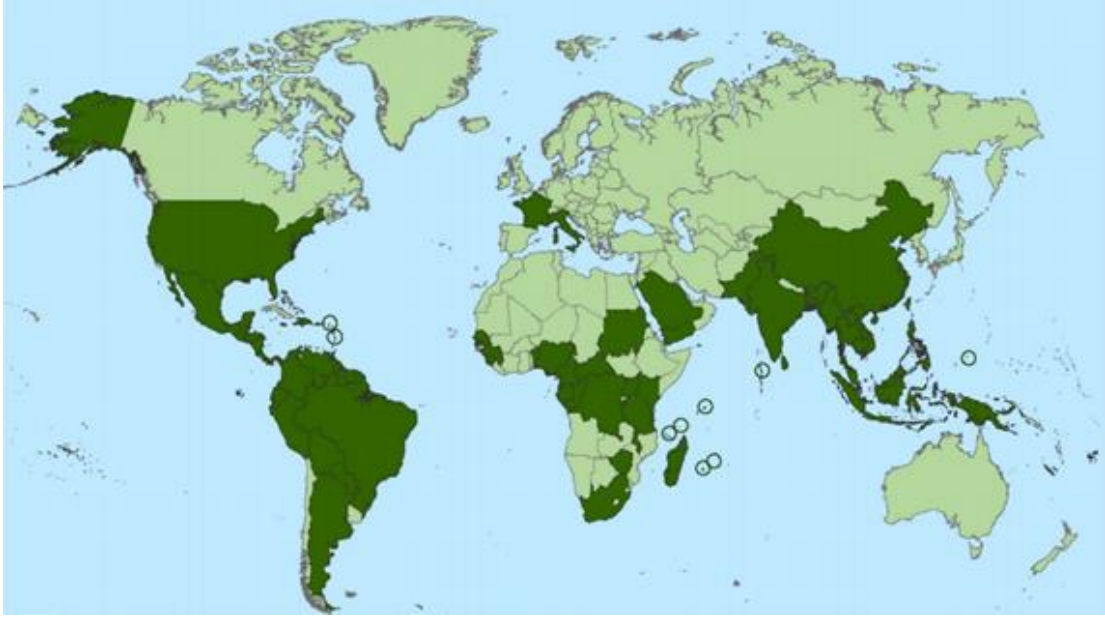


Figura 7 - Países e territórios onde casos de Chikungunya foram reportados. Em verde-escuro são representados os países que constataram a circulação autóctone do vírus, sendo que regiões em que somente casos importados foram documentados não foram incluídas. Adaptado de <https://www.cdc.gov/chikungunya/geo/>. Última atualização em maio 2016. Segundo a CDC, não foram constatados casos de transmissão local nos demais países desde então.

1

1.1.2.2. Organização genômica do CHIKV

2 Os alfavírus possuem RNA linear, de cadeia simples, polaridade positiva e
 3 com aproximadamente 12 Kb. O genoma é organizado em 5' cap-nsP1-nsP2-nsP3-
 4 nsP4-(junção)-C-E3-E2-6k-E1-poly(A)-3' e possui duas fases abertas de leitura
 5 (ORFs), sendo que duas versões de poliproteínas não-estruturais podem ser
 6 traduzidas: nsP123 (mais abundante) e nsP1234 (em menor quantidade). A outra
 7 ORF, separada da primeira por uma região de junção (J), codifica uma segunda
 8 poliproteína que, por processamento proteolítico, origina as proteínas estruturais [C,
 9 E1, PE2 (E3+E2) e 6K] (Khan *et al.*, 2002). O genoma possui um *cap* na extremidade
 10 5' e é poliadenilado na região 3' (Figura 8).

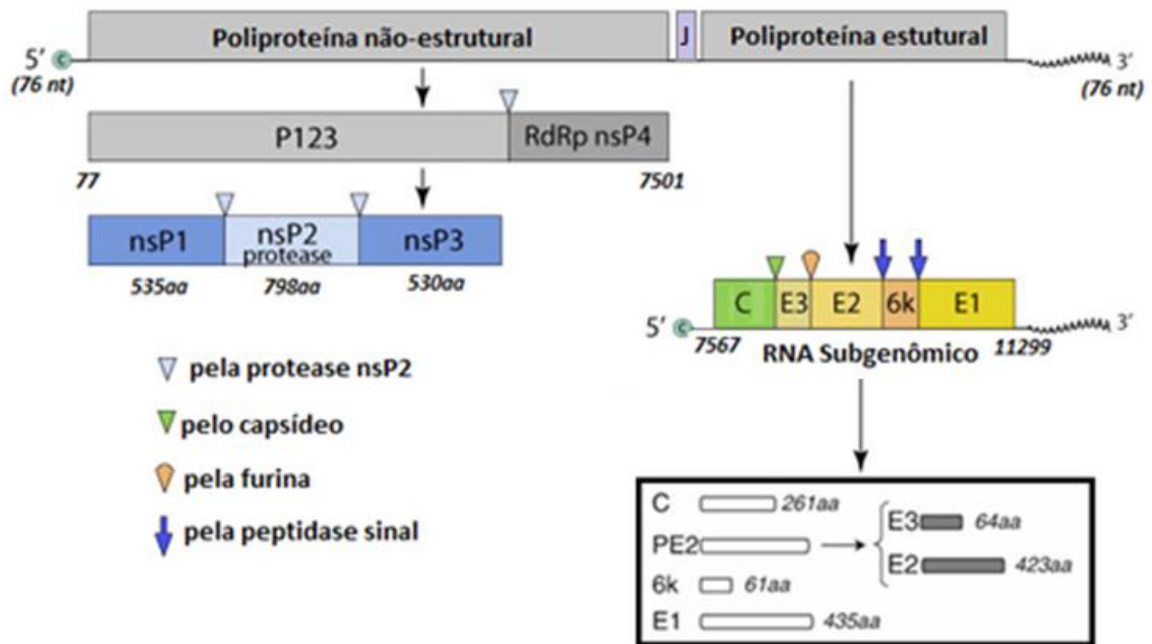


Figura 8 - Genoma de um *Alphavirus*, gênero que inclui o CHIKV mostrando as poliproteínas iniciais e seus produtos após o processamento. Adaptado de Viralzone (2016) e Solignat *et al.* (2009).

1

2 As proteínas estruturais (C, E1, E2, E3 e 6k) são produzidos a partir do RNA
3 subgenômico 26S, como uma única poliproteína, que sofre clivagem e modificações
4 pós-traducionais para formar as três proteínas principais C, E2, E1 e as duas menores,
5 E3 e 6k, que estão envolvidas na encapsidação viral e brotamento.

6 A proteína do capsídeo compreende 261 aminoácidos (30 kDa) de
7 comprimento, é expressa como uma parte da poliproteína estrutural e possui um
8 domínio autoprotease conservado na extremidade C-terminal, que auxilia na sua
9 liberação da cadeia poliproteica após a síntese das proteínas estruturais (Goh *et al.*,
10 2015).

11 A região codificante dos alfavírus é flanqueada nas extremidades 5' e 3' por
12 sequências não traduzidas, sendo 5'UTR e 3'UTR, respectivamente. A primeira, forma
13 duas estruturas *stem-loop* e age como um promotor para a síntese de RNA genômico
14 e antigenômico. Já a região 3'-UTR é descrita por conter vários motivos conservados
15 de atuação em *cis*, nomeados elementos de sequências repetidas (do inglês, *repeated*

1 *sequence elements* - RSEs), que regulam a síntese de RNA viral (revisto por Solignat
2 *et al.*, 2009).

3 O genoma de CHIKV possui ainda, uma sequência de 19 nucleotídeos,
4 precedendo a cauda poli-A, que é altamente conservada entre os alfavírus e que
5 aparenta ser uma sequência de reconhecimento da replicase viral (revisto por Solignat
6 *et al.* 2009).

1.1.2.3. Estrutura

7 De acordo com Solignat e colaboradores (2009), os alfavírus estão entre os
8 vírus envelopados mais simples. Como outros membros do gênero *Alphavirus*, CHIKV
9 é um vírus que possui cerca de 60-70 nm de diâmetro, esférico e revestido por um
10 envelope lipídico onde estão inseridas as glicoproteínas virais E1 e E2. Estas, por sua
11 vez, estão associadas em heterodímeros que formam 80 trímeros, arranjados em
12 simetria icosaédrica e que se projetam da superfície do vírion como “espículas”.

13 No CHIKV, o envelope viral reveste o nucleocapsídeo constituído pela
14 proteína C (Figura 9). O capsídeo é rodeado por uma bicamada lipídica derivada da
15 membrana plasmática de células hospedeiras e seus aminoácidos N-terminais contêm
16 resíduos carregados positivamente que se associam com o RNA genômico
17 reconhecendo-o para o empacotamento durante a montagem da proteína do
18 nucleocapsídeo (NCP) (Hong *et al.*, 2006). A região carboxi-terminal da NCP tem uma
19 estrutura semelhante a quimotripsina e atua como uma proteinase auto catalítica
20 durante o processamento da poliproteína estrutural. Além disso, há uma região
21 hidrofóbica no domínio C-terminal da NCP que se liga a 33 aminoácidos da cauda
22 citoplasmática de E2. Esta, por sua vez, interage de forma eficaz com as proteínas do
23 núcleo interno com aqueles na superfície do vírion. Esta associação de E2 com o
24 nucleocapsídeo é essencial para a montagem da partícula viral (revisto por Solignat
25 *et al.*, 2009).

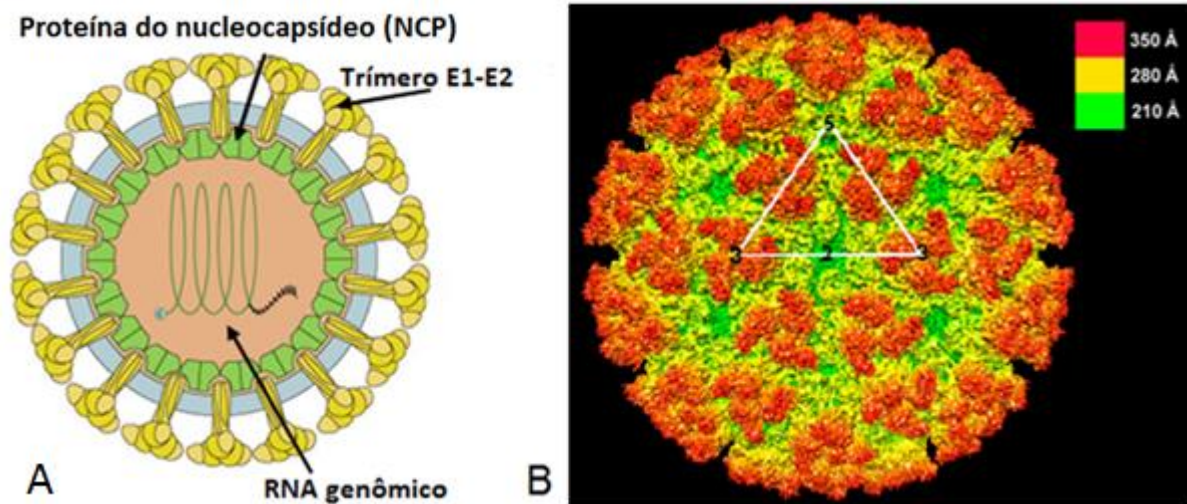


Figura 9 - Estrutura do CHIKV. A: Esquema geral de um alfavírus, adaptado de Viralzone (2016). B: Crio microscopia eletrônica (crio- ME) de partículas semelhantes a vírus Chikungunya (virus-like particles - VLPs), ectodomínio colorido de acordo com a distância radial a partir do centro do vírus (Sun *et al.*, 2013).

1.1.2.3.1. Proteínas E1 e E2

1 As proteínas do envelope ajudam na fixação do vírus à célula hospedeira
 2 durante a infecção, sendo altamente conservadas entre os alfavírus.
 3 Consequentemente, são consideradas alvos antigênicos (Van Duijl-Richter *et al.*,
 4 2015). Enquanto a primeira impulsiona a fusão de membranas (Yathi *et al.*, 2011), a
 5 segunda interage com receptores da célula hospedeira (van den Doel *et al.*, 2014),
 6 ambas fazendo parte portando, do primeiro contato vírus-célula, sendo responsáveis
 7 pelo reconhecimento e geração de anticorpos. Além disso, segundo Jin e
 8 colaboradores (2015), as proteínas do envelope, mais especificamente E1 e E2,
 9 parecem ser imunodominantes durante a montagem da resposta. Por esses fatores,
 10 elas possuem um potencial sorodiagnóstico considerável, razão pela qual foram
 11 selecionadas como propósito deste projeto.

12 A proteína E1 de CHIKV é constituída de 435 aminoácidos (45 kDa) que são,
 13 em grande parte cobertos por E2 no envelope viral (revisto por Murugan &
 14 Sathishkumar, 2016). O ectodomínio E1 consiste de três domínios β -barril, sendo que
 15 o domínio I localiza-se entre os domínios II e III, com o peptídeo de fusão localizado
 16 na extremidade distal do domínio II (Voss *et al.*, 2010) (Figura 10).

1 Por sua vez, a proteína E2 possui 423 aa e consiste em três domínios do tipo
 2 imunoglobulina de conformações distintas, sendo A, o domínio de ligação do receptor,
 3 localizado entre os domínios B e C (Li *et al.*, 2010). No vírus maduro, o domínio B
 4 abrange o *loop* de fusão no domínio II de E1. O vírus torna-se fusogênico em pH ácido
 5 quando um conjunto de três moléculas E1 combinam-se para formar um trímero após
 6 a expulsão das três proteínas E2 do centro da “espícula”. As três alças de fusão são
 7 então expostas para posterior inserção na membrana da célula hospedeira (Gibbons
 8 *et al.*, 2004).

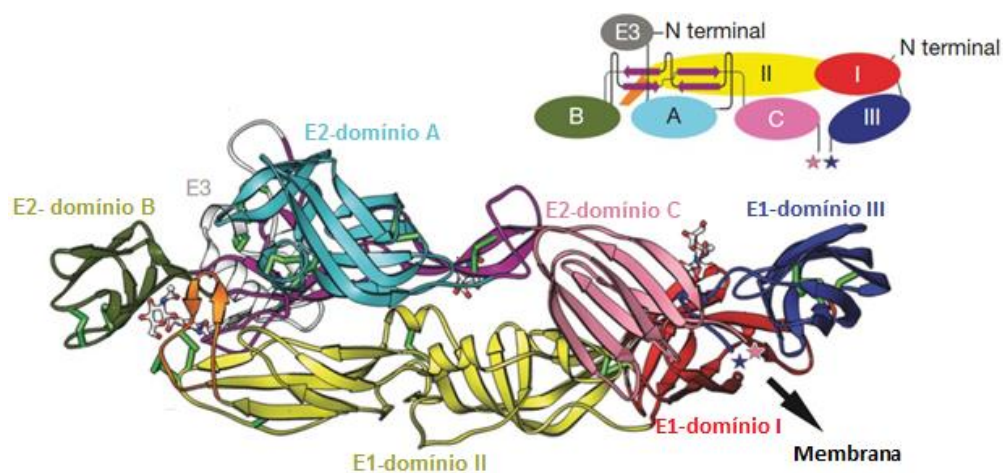


Figura 10 - Diagrama de fita do complexo formado pelas proteínas do envelope do CHIKV. Domínios I, II e III de E1 são mostrados em vermelho, amarelo e azul-escuro, respectivamente. Domínio A, B e C de E2 são mostrados em turquesa, verde e cor-de-rosa e E3 em cinza. Adaptado de Voss *et al.*, (2010).

9 Muitos estudos têm analisado a interação de anticorpos com alfavírus (revisto
 10 por Li *et al.*, 2010) e indicaram que a maioria dos anticorpos neutralizantes se ligam a
 11 E2, uma vez que esta glicoproteína é mais exposta na superfície viral do que E1.

12 De acordo com Sun e colaboradores (2013), uma mutação adaptativa na
 13 proteína E1 (E1-A226V) permitiu que o CHIKV se replicasse de forma mais eficiente
 14 em *Aedes albopictus*, sendo considerado a principal razão para a sua recente
 15 disseminação extensiva, infectando milhões de pessoas na África e Ásia (Tsetsarkin
 16 *et al.*, 2014).

1.1.2.4. Ciclo de multiplicação do CHIKV

1 O CHIKV entra nas células por endocitose, através de um mecanismo
2 dependente de colesterol, pela interação da glicoproteína E2 do envelope viral com
3 receptores celulares ainda não identificados (Bernard *et al.*, 2010). Uma vez exposto
4 ao pH ácido dos endossomos, as glicoproteínas do envelope sofrem rearranjos
5 conformacionais. O domínio B de E2 dissocia-se da ponta do domínio II de E1,
6 expondo o *loop* de fusão (Li *et al.*, 2010). Em seguida, E1 forma um homotrímero,
7 expondo ainda mais os *loops* de fusão de cada monômero para inserção na
8 membrana do hospedeiro (Gibbons *et al.*, 2004).

9 Por se tratar de um genoma de RNA senso positivo, o material genético é
10 diretamente traduzido pela maquinaria de tradução da célula hospedeira, podendo
11 originar duas poliproteínas diferentes nsP123 e nsP1234. Nos alfavírus, a replicação
12 do RNA viral ocorre em associação com vacúolos citoplasmáticos e endossomos. As
13 proteínas não estruturais possuem efeitos moduladores na célula hospedeira. Em
14 células de vertebrados infectadas por alfavírus, é possível verificar uma inibição da
15 expressão das proteínas celulares mediada por nsP2 (Ng & Hapuarachchi, 2010). Um
16 esquema com as etapas do ciclo de multiplicação do CHIKV pode ser visto na Figura
17 11.

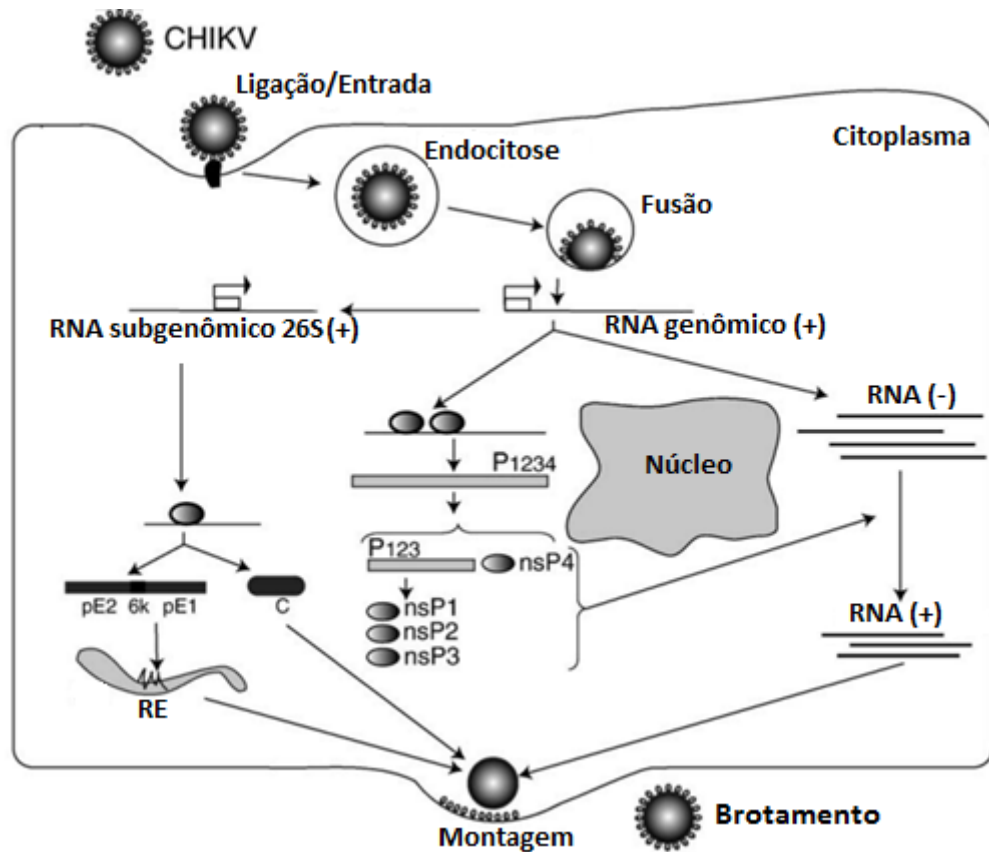


Figura 11 - Diagrama do ciclo multiplicativo do CHIKV. O CHIKV entra nas células por endocitose e uma vez exposto ao pH ácido dos endossomos, as glicoproteínas do envelope sofrem rearranjos conformacionais, favorecendo a fusão de membrana do vírus com a membrana endossomal hospedeiro e expondo o genoma viral no citoplasma. O material genético é diretamente traduzido pela maquinaria de tradução da célula hospedeira, podendo originar duas poliproteínas diferentes nsP123 e nsP1234. O RNA genômico é traduzido para uma poliproteína, que é clivada em proteínas não-estruturais necessárias para a síntese de RNA (transcrição e replicação). O RNA subgenômico 26S origina as proteínas estruturais. Os vírions brotam do retículo endoplasmático, são transportadas para o aparelho de Golgi e deixam a célula pela via secretória. Adaptado de Solignat *et al.* (2009).

- 1 O RNA subgenômico 26S é o que dá origem às proteínas estruturais dos
- 2 alfavírus. No CHIKV, esta ORF codifica uma poliproteína precursora (C-E2-6K-E1)
- 3 que é processada por enzimas celulares e virais, para dar origem às proteínas
- 4 estruturais individualizadas. Primeiramente, é sintetizada a proteína do capsídeo (C),
- 5 que possui um domínio alfa-hélice envolvido na montagem do nucleocapsídeo, um
- 6 domínio de ligação ao RNA, um domínio de protease serínica, e uma região de ligação
- 7 à proteína E2. A proteína C funciona como autoprotease promovendo sua separação
- 8 da poliproteína. A extremidade amina da poliproteína restante funciona como
- 9 sequência sinal conduzindo à translocação da glicoproteína precursora de E2 (pE2)
- 10 para o retículo endoplasmático (RE). A poliproteína pE2-6K-E1 traduzida é clivada

1 pela peptidase sinal celular para gerar a glicoproteína pE2, 6K e a glicoproteína E1.
2 Em seguida, pE2 e E1 formam heterodímeros que são transportados para a superfície
3 celular e pE2 é clivada por uma enzima da rede trans-Golgi, a furina, gerando E2 e E3
4 (revisto por Pinto, 2013).

5 Diferentemente das etapas de entrada, as fases de montagem e brotamento
6 dos alfavírus são menos conhecidas. Sabe-se que as glicoproteínas do envelope e o
7 capsídeo são necessários para a montagem da partícula viral e sua liberação a partir
8 da superfície de células infectadas (Soonsawad *et al.*, 2010).

1.1.2.5. Febre Chikungunya

1.1.1.5.1. Transmissão e mecanismos de patogenicidade

9 A transmissão do CHIKV ocorre principalmente pela picada de fêmeas dos
10 mosquitos *Aedes aegypti* ou *Aedes albopictus* infectados, mas também foi constatada
11 a possibilidade de transmissão vertical durante a gestação (Gerardin *et al.*, 2008).

12 O *Ae. aegypti* encontra-se em regiões de temperaturas mais elevadas, ao
13 passo que o *Ae. albopictus* tem uma distribuição geográfica mais ampla ocorrendo
14 tanto em climas tropicais, como temperados. Outros mosquitos, como *Culex*
15 *annulirostris* e *Mansonia africana*, também foram associados à transmissão do CHIKV,
16 enquanto que estudos envolvendo mosquitos do gênero *Anopheles* não
17 demonstraram a capacidade de transmissão do CHIKV (revisto por Rougeron *et al.*,
18 2015).

19 Após a picada do mosquito, o vírus multiplica-se e dissemina-se para o fígado
20 e articulações, por meio da corrente sanguínea. Durante a fase intradérmica, o CHIKV
21 infecta as células mais comuns de tecido conjuntivo, células epiteliais e fibroblastos
22 dérmicos. Estas células têm se mostrado como suscetíveis à infecção e permitem a
23 reprodução viral. Devido a sua ampla distribuição entre os órgãos e tecidos, e sua
24 capacidade de migração pelos sistemas linfático e sanguíneo, acredita-se que os
25 monócitos são os maiores responsáveis pela disseminação do vírus e pela infecção
26 sistêmica (Thon-Hon *et al.*, 2012).

1 Os principais sítios de infecção secundária são os músculos e as articulações,
2 assim como as células endoteliais do fígado e o cérebro, podendo levar a hepatite e
3 encefalopatia (revisto por Rougeron *et al.*, 2015). Durante a fase aguda, a carga viral
4 pode chegar a 10^8 partículas virais/mL de sangue, e a concentração plasmática de
5 interferon do tipo I (IFN-I) atinge de 0,5-2 ng/mL, acompanhada por uma robusta
6 indução de outras citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (revisto por Schwartz &
7 Albert, 2010).

8 A partir de dados da epidemia na Ilha *Réunion*, a taxa de letalidade da febre
9 Chikungunya foi estimada em 1: 1000 (Renault *et al.*, 2008), sendo que a maioria das
10 mortes ocorreu em casos de recém-nascidos, idosos e adultos com problemas clínicos
11 subjacentes, tais como hipertensão, diabetes ou doença cardiovascular (revisto por
12 Schwartz & Albert, 2010; CDC, 2015).

13 No período entre 2016 e 2017, foram confirmados 385 casos de óbito em
14 decorrência da febre Chikungunya no Brasil, (Secretaria de Vigilância em Saúde,
15 2018).

16 **1.1.1.5.2. Manifestações clínicas**

17 Diferentemente do ZIKV, a maioria dos casos de infecção em humanos pelo
18 CHIKV são sintomáticos (85 a 95% dos casos), causando uma síndrome aguda de
19 artralgia que pode evoluir para reumatismo inflamatório crônico e debilitante (Hua &
20 Combe, 2017). Geralmente, ocorre infecção dos tecidos linfoides e do fígado
21 associada à ausência de sinais clínicos relevantes, mas quando a infecção atinge os
22 músculos é muito comum haver sintomas de artrite (revisto por Burt *et al.*, 2012).

23 A transmissão do vírus é seguida por um período de incubação médio de 3-7
24 dias (variação de 1-12 dias), apresentando então, em 80% dos casos (Queyriaux *et*
25 *al.*, 2008), febre alta, calafrios, artrite e mialgia graves, comumente acompanhadas de
26 dores de cabeça e fotofobia (revisto por Schwartz & Albert, 2010). Outros sintomas da
27 febre Chikungunya que podem ocorrer são conjuntivite, náuseas, vômitos e erupções
28 maculo-papulares. Complicações mais raras podem incluir uveíte, retinite, miocardite,
29 hepatite, nefrite, lesões de pele, hemorragia, meningoencefalite, mielite, síndrome de

1 Guillain-Barré e paralisia do nervo craniano. Os exames clínico-laboratoriais podem
2 indicar linfopenia, trombocitopenia, além de elevadas taxas de creatinina e
3 transaminases hepáticas. Os sintomas em geral desaparecem após 7-10 dias (CDC,
4 2015), mas existe a possibilidade de um estágio crônico. Neste caso, há relatos de
5 pacientes que apresentaram sintomas que persistiram por três meses a até 15 anos
6 após a fase aguda da infecção (Martí-Carvajal *et al.*, 2017).

7 Apesar da baixa taxa de mortalidade (como relatado no item 1.1.2.5.1),
8 infecções por CHIKV podem apresentar impactos clínicos e econômicos substanciais,
9 associados, principalmente, a complicações a longo prazo, como apresentado no
10 tópico a seguir.

1.1.1.5.3. Complicações em decorrência de infecções por CHIKV

11 Apesar dos sintomas serem passageiros na maioria dos casos, há relatos de
12 pacientes que desenvolveram artralgia persistente, durando meses ou até anos, cuja
13 probabilidade de acontecer foi associada à idade (Sissoko *et al.*, 2009). Em alguns
14 casos foram reportadas complicações neurológicas, cardiovasculares, hepáticas,
15 renais e oculares (Economopoulou *et al.*, 2009).

16 Estudos relataram manifestações reumáticas em até 50% dos pacientes
17 adultos (durando de 6 meses a 1 ano) que consistiram, geralmente, em artrites
18 afetando extremidades como tornozelos, pulsos e falanges) (revisado por Lisa, 2017).

19 No Brasil, um estudo acompanhou 22 pacientes diagnosticados com febre
20 Chikungunya com sinais de envolvimento neurológico. Foram destacados níveis de
21 consciência alterados em quase metade dos pacientes, além de convulsões
22 epilépticas (3 casos) e delírios persecutórios (4 casos) (Martins *et al.*, 2016).

23 Alguns estudos sugerem que pacientes com infecção pelo CHIKV apresentam
24 maiores riscos de complicações graves da doença quando também possuem
25 comorbidades como diabetes, doenças cardíacas e hipertensão (Jean-Baptiste *et al.*,
26 2016, Alvarez *et al.*, 2017, Badawi *et al.*, 2018).

1 A epidemia de CHIKV na Ilha *Réunion* forneceu a primeira evidência de morte
2 em adultos, no contexto de condições médicas do paciente (doenças
3 cardiovasculares, neurológicas e respiratórias) (revisto por Lisa, 2017). Ainda durante
4 este surto na Ilha *Réunion*, foi registrado um aumento de 22% de casos de GBS
5 (Lebrun *et al.*, 2009). Este fenômeno também foi observado na epidemia que ocorreu
6 na Polinésia Francesa durante os anos 2014-2015¹ (Oehler *et al.* 2015). Além disso,
7 durante esta mesma epidemia, constatou-se a transmissão vertical do CHIKV,
8 causando encefalopatias em recém-nascidos, sendo atribuída a nove casos (Gérardin
9 *et al.*, 2008). Consequências neurocognitivas também foram identificadas em
10 neonatos expostos ao CHIKV, causando atrasos no desenvolvimento neurológico,
11 paralisias cerebrais e microcefalia (Gerardin *et al.*, 2014).

12 Em 2015, foram relatados oito casos de infecção congênita por CHIKV na
13 Colômbia. Os recém-nascidos desenvolveram sintomas graves, incluindo dificuldade
14 respiratória, sepse, enterocolite necrosante, meningoencefalite, miocardite, edema,
15 erupção cutânea e pericardite. Dos oito casos, três vieram a óbito (Villamil-Gómez *et*
16 *al.*, 2015).

17 Torres e colaboradores (2016) acompanharam 169 recém-nascidos
18 sintomáticos com febre Chikungunya em três diferentes países da América Latina. As
19 complicações graves incluíram meningoencefalia, miocardite, convulsões e
20 insuficiência respiratória. No Brasil, o estudo de Bandeira e colaboradores (2016)
21 relatou um caso de encefalite associada a transmissão vertical do CHIKV. Além deste
22 trabalho, Lyra e colaboradores (2016) descreveram dois casos de infecção congênita
23 por CHIKV em neonatos que nasceram após um surto em Salvador, na Bahia. Os
24 recém-nascidos tiveram complicações perinatais, tais como erupções cutâneas, febre,
25 sepse e distúrbios hemodinâmicos. Em ambos os casos houve necessidade de
26 cuidados intensivos.

¹ Ressalta-se que este foi o segundo surto de GBS desencadeado por um arbovírus na Polinésia Francesa dentro de dois anos, sendo que o primeiro ocorreu durante o surto da febre Zika, de 2013 a 2014 (Oehler *et al.* 2014).

1.2. Diagnóstico das infecções por ZIKV e CHIKV

1 O Ministério da Saúde publicou um guia recomendando que o diagnóstico
2 clínico das arboviroses circulantes no país seja feito em comparação com outras
3 doenças febris agudas associadas à artralgia, como mostrado no Quadro 1. O
4 documento ressalta que o médico deve ficar atento para causas potencialmente fatais
5 e que exijam uma conduta medicamentosa específica imediata (Ministério da Saúde,
6 2017).

Quadro 1- Diagnóstico clínico para Febre do Dengue, Zika e Chikungunya segundo recomendações do Ministério da Saúde.

Sinais/Sintomas	Dengue	Zika	Chikungunya
Febre	> 38°C	Sem febre ou subfebril ($\leq 38^\circ\text{C}$)	Febre alta > 38°C
Duração	4 a 7 dias	1-2 dias subfebril	2-3 dias
Rash	Surge a partir do quarto dia	Surge no primeiro ou segundo dia	Surge 2-5 dias
Frequência	30% a 50% dos casos	90% a 100% dos casos	50% dos casos
Mialgia (Frequência)	+++	++	+
Artralgia (frequência)	+	++	+++
Intensidade da dor articular	Leve	Leve/Moderada	Moderada/Intensa
Edema da articulação	Raro	Frequente e leve intensidade	Frequente e de moderada a intenso
Conjuntivite	Raro	50% a 90% dos casos	30%
Cefaleia	+++	++	++
Hipertrofia ganglionar	+	+++	++
Discrasia hemorrágica	++	ausente	+
Risco de morte	+++	+*	++
Acometimento Neurológico	+	+++	++
Leucopenia	+++	+++	+++
Linfopenia	Incomum	Incomum	Frequente
Trombocitopenia	+++	Ausente (raro)	++

Fonte: Brito & Cordeiro (2016); revisto por Ministério da Saúde (2017). * Pode haver risco de morte nos casos neurológicos como a GBS decorrente Da Febre do Zika ou para crianças com malformações congênicas graves

1 Testes laboratoriais para detecção dos arbovírus podem ser realizados a partir
 2 de métodos moleculares e sorológicos. Os primeiros, incluem o isolamento do vírus e
 3 a detecção do genoma viral pelas técnicas de PCR convencional e qRT-PCR, e são
 4 considerados como o padrão ouro na identificação viral, uma vez que são capazes de
 5 fornecer um diagnóstico precoce da infecção. Já os métodos sorológicos, baseados
 6 na detecção indireta do vírus a partir de anticorpos (IgM e IgG), apesar de algumas
 7 limitações, são considerados procedimentos de aplicabilidade clínica imediata e são
 8 em geral, mais indicados em casos de epidemia. Além disso, os imunodiagnósticos
 9 desempenham um papel importante devido à alta proporção de infecções
 10 assintomáticas no caso do ZIKV, e por apresentarem uma ampla janela de detecção
 11 (Munoz-Jordan, 2017) (Figura 12).

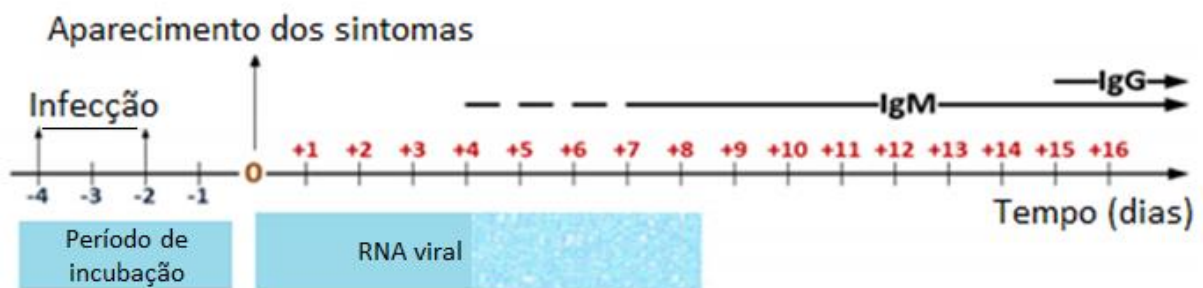


Figura 12 – Possibilidades de diagnóstico laboratorial por detecção do RNA viral e Sorologia (detecção de IgM e IgG) para ZIKV e CHIKV.

12 Nos EUA, a FDA emitiu uma autorização de uso emergencial de ferramentas
 13 para o diagnóstico de infecções por CHIKV e ZIKV, incluindo o ensaio Trioplex Real-
 14 Time RT-PCR (rRT-PCR) e o MAC-ELISA, distribuídos pelo CDC para laboratórios
 15 qualificados. Entretanto, a falta de acesso por alguns países a esses kits, como
 16 relatado por Galo e colaboradores (2017), tornaram o desenvolvimento de técnicas *in-*
 17 *house* uma prioridade.

18 Dentre as alternativas, o teste de neutralização por redução de placas (PRNT)
 19 mede os títulos de anticorpos neutralizantes específicos do vírus, e deve ser efetuado
 20 utilizando vários flavivírus relacionados para excluir resultados falso-positivos do

1 ELISA. Nas infecções primárias de flavivírus, o PRNT também pode ser empregado
2 para identificar o vírus infectante (Rabe *et al.*, 2016). Porém, durante o surto da
3 Micronésia, também foram constatadas reações cruzadas entre flavivírus por este
4 método (Lanciotti *et al.*, 2008). O teste deve ser realizado em laboratórios de
5 biossegurança nível 2 para ZIKV ou 3 para CHIKV e requer equipamentos especiais
6 e de contenção, raros no contexto de países em desenvolvimento. Além disso os
7 métodos sorológicos apresentam uma limitação considerável: o diagnóstico só é
8 confiável após o fim da janela imunológica, ou seja, o intervalo de tempo entre a
9 infecção pelo vírus a produção de anticorpos, necessária para a detecção da resposta
10 humoral (CDC-b, 2016).

11 No início de 2016, a Fiocruz divulgou um teste discriminatório para Dengue,
12 Zika e Chikungunya, desenvolvido em parceria com Instituto de Biologia Molecular do
13 Paraná e sob coordenação do Ministério da Saúde. O kit NAT (*Nucleic Acid Testing*)
14 para as três arboviroses é semelhante ao que já vem sendo usado no Brasil para
15 detecção dos Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e da Hepatite C (HCV), em
16 triagens de bolsas de sangue destinadas à transfusão. Este teste permite realizar a
17 identificação simultânea do material genético dos três vírus e, por ser baseado na
18 amplificação de ácidos nucleicos, é apropriado para o diagnóstico dessas infecções
19 ainda em fase aguda, sendo complementar a sorologia (IOC/Fiocruz, 2016). Em
20 dezembro do mesmo ano, a Anvisa liberou a produção do kit NAT para
21 DENV/ZIKV/CHIKV, e os primeiros lotes para distribuição em larga escala começaram
22 a ser produzidos para atendimento ao SUS (Castro, 2016).

23 No início de 2017, o Ministério da Saúde disponibilizou, por meio do Sistema
24 Único de Saúde (SUS), testes sorológicos da Bahiafarma para o diagnóstico das
25 infecções por ZIKV e CHIKV. Esta foi a primeira e ainda é a única empresa brasileira
26 a fabricar este tipo de teste. Estão disponíveis os testes Zika IgG/IgM (combo), Zika
27 NS1 e Chikungunya IgM (SESAB, 2017).

1.2. 1. Diagnóstico das infecções por ZIKV

1 Ainda que os testes de indivíduos sintomáticos forneçam informações úteis
2 para identificar casos positivos, assim como alertar comunidades e fortalecer sistemas
3 de vigilância, a necessidade de detecção do ZIKV não se limita a infecções
4 sintomáticas. Grande parte dos indivíduos infectados com o ZIKV são assintomáticos
5 e, devido ao risco de anormalidades congênitas associadas à infecção por ZIKV
6 (Rather *et al.*, 2017) a viremia prolongada em mulheres grávidas (Meaney-Delman *et*
7 *al.*, 2016) e a transmissão sexual documentada (Russell *et al.*, 2017) destaca-se a
8 relevância dos algoritmos de teste para grupos de indivíduos assintomáticos.

9 Para as pessoas com suspeita de Zika um resultado positivo de uma qRT-
10 PCR confirma a presença do ZIKV, mas um resultado negativo não exclui a
11 possibilidade de infecção (Rabe *et al.*, 2016). Nesses casos, ELISA e PRNT podem
12 identificar infecções recentes por ZIKV (CDC-b, 2016). Entretanto, testes sorológicos
13 envolvendo o ZIKV podem ser difíceis de interpretar devido a reatividade cruzada com
14 outros flavivírus, o que pode impedir a identificação específica do vírus causador da
15 infecção (Lanciotti *et al.*, 2008). Isso ocorre principalmente quando a pessoa foi
16 infectada anteriormente por um flavivírus ou mesmo foi vacinada contra vírus da
17 mesma família para os quais há vacinas disponíveis, como é o caso da febre amarela,
18 gerando um problema em relação ao manejo clínico (Keasey *et al.*, 2017; Munoz-
19 Jordan, 2017).

20 Orientações atuais do CDC recomendam o teste de mulheres grávidas com
21 possível exposição ao ZIKV (sendo necessário o monitoramento durante 12 semanas
22 após viagens a regiões epidêmicas), e de todas as pessoas sintomáticas e com
23 suspeita de exposição. Além disso, recomenda-se o teste para gestante em áreas
24 com transmissão contínua, tanto para o aconselhamento de gestantes, como para a
25 verificação da saúde do bebê. Para pessoas sintomáticas infectadas pelo ZIKV, o RNA
26 viral pode ser detectado precocemente pelo ensaio NAT, que inclui métodos baseados
27 na técnica de PCR. Neste caso, amostras de soro e urina podem ser utilizadas. O
28 teste NAT de pessoas sintomáticas não grávidas deve ser realizado em amostras
29 coletadas <14 dias após o início dos sintomas. O teste NAT não é recomendado para

1 pessoas assintomáticas não grávidas (CDC, 2017). Para mulheres grávidas há as
2 seguintes recomendações da CDC:

- 3 • Aquelas que apresentam sintomas de infecção pelo ZIKV: neste caso, o NAT deve
4 ser realizado simultaneamente com o teste de sorologia IgM.
- 5 • Mulheres grávidas assintomáticas com possível exposição contínua ao ZIKV: o
6 NAT é recomendado três vezes durante a gravidez.
- 7 • Mulheres grávidas assintomáticas com possível exposição recente ao ZIKV (por
8 exemplo, viajantes, sem exposição contínua): deve-se seguir os algoritmos de
9 testes para gestantes sintomáticas.
- 10 • Mulheres grávidas com possível exposição ao ZIKV e cujo feto apresente
11 constatações em ultrassom pré-natal compatíveis com infecção congênita pelo
12 ZIKV: o NAT deve ser realizado a partir da urina e do soro da mãe simultaneamente
13 com sorologia (IgM), seguindo-se o algoritmo de testes para gestantes
14 sintomáticas.

15 Segundo Dawes e colaboradores (2016), a detecção de RNA viral no soro é
16 viável apenas durante os primeiros dias da fase aguda da infecção, sendo possível a
17 detecção na urina por mais 2 ou 3 semanas. Num estudo de Campos e colaboradores
18 (2016), os dados mostram que a sensibilidade combinada de RT-PCR de soro e urina
19 nos primeiros 14 dias de infecção foi de 75% ao se testar infecções confirmadas por
20 sorologia.

21 Como o período virêmico do ZIKV é limitado, o CDC recomenda que os testes
22 de ácido nucleico sejam realizados até 14 dias após o aparecimento dos sintomas,
23 tanto para amostras de urina quanto de soro (revisto por Tran & Theel, 2018).

24 O Ministério da Saúde (2016b) recomenda os seguintes critérios para a
25 vigilância laboratorial do ZIKV:

- 26 • Testar amostras de todas as gestantes com suspeita de infecção por
27 ZIKV, óbitos com suspeita de serem decorrentes da infecção, e pacientes internados
28 com manifestação neurológica, com suspeita de infecção viral prévia (ZIKV, DENV e
29 CHIKV);

1 • A colheita de amostra para realização de isolamento viral ou RT-PCR
2 deverá ser realizada de acordo com os seguintes critérios:

3 - Soro: até 5 dias do início dos primeiros sintomas (fase aguda).

4 - Urina: até 8 dias do início dos primeiros sintomas.

5 • Para sorologia IgM devem ser colhidas duas amostras de soro, uma na
6 fase aguda (3 a 5 dias após o início dos sintomas) e outra na fase convalescente da
7 doença (3 a 4 semanas após a 1ª coleta).

8 O Sistema Único de Saúde (SUS) oferece o diagnóstico laboratorial para a febre
9 Zika somente para gestantes, crianças de até três anos de idade ou pacientes com
10 manifestação neurológica, sendo que, para os demais casos o diagnóstico é baseado
11 apenas nos sintomas (critério clínico-epidemiológico), que como descrito
12 anteriormente são, em sua maioria, ausentes. No final de 2016, o Ministério da Saúde
13 adquiriu 3,5 milhões de unidades de testes rápidos de Zika produzidas pela
14 Bahiafarma, com projeção para garantir o abastecimento da rede do SUS por doze
15 meses (Mendes & Maciel, 2016).

1.2.2. Diagnóstico das infecções por CHIKV

16 Uma variedade de ferramentas laboratoriais, incluindo métodos virológicos,
17 genéticos e sorológicos podem ser utilizados no diagnóstico de infecções por CHIKV.
18 A escolha do método depende principalmente do momento da coleta da amostra (An
19 *et al.*, 2017).

20 O diagnóstico laboratorial de infecções por CHIKV geralmente é realizado a
21 partir de amostras de soro ou plasma para detectar o vírus, ácido nucleico viral,
22 imunoglobulinas e anticorpos neutralizantes. Técnicas de cultivo podem detectar o
23 CHIKV nos primeiros 3 dias após o surgimento dos sintomas (Schwartz & Albert,
24 2010). O diagnóstico pelo isolamento do vírus é altamente específico (100%), mas
25 não sensível o suficiente. Também é limitado pela exigência de laboratórios de
26 biossegurança de nível 3, equipe altamente treinada e tempo necessário de 1-2

1 semanas. Assim sendo, não é rotineiramente utilizado (Panning *et al.*, 2008; revisto
2 por An *et al.*, 2017.; Ministério da Saúde, 2017).

3 Durante os primeiros 8 dias de infecção, o RNA viral pode ser identificado no
4 soro, sendo que o período de maior viremia vai do 1º ao 5º dia (Ministério da Saúde,
5 2017). Vários métodos de RT-PCR estão disponíveis e foram descritos na literatura,
6 mas são de sensibilidade variável (Laurent *et al.*, 2007; Santhosh *et al.*, 2007; Joseph
7 *et al.*, 2008; Panning *et al.*, 2009; Cecilia *et al.*, 2015; Johnson *et al.*, 2016) podendo
8 chegar a 100%.

9 Os testes de RT-PCR de amostras clínicas também podem ser utilizados para
10 genotipagem, permitindo comparações com amostras de vírus de várias fontes
11 geográficas. Embora a detecção de RNA viral seja útil para a identificação rápida do
12 vírus infeccioso, essa técnica é limitada pela estreita janela de detecção. Assim,
13 amostras coletadas durante a primeira semana após o início dos sintomas devem ser
14 testadas por métodos sorológicos e virológicos (WHO, 2017).

15 Uma semana após o aparecimento dos primeiros sintomas, a viremia é
16 controlada pelo sistema imunológico do hospedeiro. Normalmente, os anticorpos
17 contra o vírus são detectados a partir do final da primeira semana (CDC, 2017). Neste
18 estágio, o diagnóstico do CHIKV é possível pela detecção específica de IgM e IgG, a
19 partir de testes sorológicos, tais como o ELISA. Imunoglobulinas do tipo IgM são
20 detectáveis de 5-7 dias após o início da infecção, sendo mais elevadas no período de
21 3 a 5 semanas e persistem por cerca de 2 meses. A detecção de IgG pode ocorrer de
22 7-10 dias após o início da infecção (normalmente após o fim da viremia) e
23 permanecendo por meses ou anos (Johnson *et al.*, 2016; Silva e Dermody, 2017).

24 O Ministério da Saúde recomenda a investigação por sorologia a partir do
25 quinto dia para IgM e sexto dia para IgG. Uma outra estratégia de confirmação é a
26 sorologia pareada. Neste caso, duas amostras devem ser coletadas, uma na fase
27 aguda e outra, 15 dias após a primeira coleta. A reatividade específica é constatada
28 por um aumento de 4 vezes no título dos anticorpos (Ministério da Saúde, 2017).

29 Um teste ideal para infecções de CHIKV em fase aguda é uma combinação
30 de métodos genéticos com outros métodos de diagnóstico que funcionam após o

1 período de viremia. No algoritmo de teste desenvolvido pelo CDC (EUA), amostras
2 coletadas dentro de 6 dias após o início dos sintomas são testadas com RT-PCR
3 inicialmente. As amostras que foram coletadas mais tarde e aquelas que
4 apresentaram resultados negativos para o RT-PCR são testadas com ELISA de
5 captura de IgM (MAC-ELISA) (Johnson *et al.*, 2016).

6 É importante ressaltar que, em testes sorológicos, já foi constatada a reação
7 cruzada do CHIKV com outros membros do complexo antigênico *Semliki Forest*, entre
8 eles o *Mayaro virus* (Hassing *et al.*, 2010). Dessa forma, em regiões onde esses vírus
9 co-circulam testes adicionais podem ser necessários.

2. JUSTIFICATIVA

1 As arboviroses têm representado um grande desafio à saúde pública,
2 principalmente em países tropicais como o Brasil. Nos últimos anos, foram registrados
3 surtos de duas destas infecções até então consideradas de pouca importância, as
4 febres Zika e Chikungunya. O Ministério da Saúde registrou mais de quase 700 mil
5 casos prováveis de infecções por ZIKV e CHIKV no país entre 2016 e 2017, entretanto,
6 uma parcela considerável não foi confirmada.

7 Dentre as principais causas da diferença entre casos prováveis e confirmados
8 reside o fato de que tais viroses são indistinguíveis entre si do ponto de vista clínico
9 e, juntamente com a Febre do Dengue apresentam sintomas muito semelhantes,
10 dificultado o diagnóstico e exigindo análises laboratoriais precisas. Este fato adquiriu
11 importância emergencial, principalmente em razão da associação do ZIKV a
12 complicações neurológicas como a microcefalia e outros sinais clínicos característicos
13 da síndrome congênita do vírus Zika (SCVZ), levando a Organização Mundial da
14 Saúde a declarar a emergência do ZIKV como uma ameaça médica global em 2015.
15 Apesar deste cenário ter sido parcialmente controlado graças a políticas de
16 prevenção, sendo o fim da emergência nacional em saúde pública pelo ZIKV ter sido
17 declarado em maio de 2017, ainda há muito o que ser feito neste contexto.

18 Com um número maior de casos de óbitos registrados em adultos, a febre
19 Chikungunya também pode apresentar complicações. Em alguns casos foram
20 constatadas consequências neurológicas, cardiovasculares, renais, hepáticas e
21 oculares. Além disso, verificou-se a possibilidade de transmissão vertical do CHIKV,
22 originando encefalopatias nos recém-nascidos.

23 Até o momento, não existe tratamento eficaz nem vacina para as infecções
24 por ZIKV e CHIKV. Deste modo, a resposta de saúde pública concentra-se sobretudo
25 no controle e na prevenção, especialmente em mulheres grávidas. A diferenciação
26 destas viroses do ponto de vista laboratorial é uma necessidade urgente para a
27 adequação das políticas de saúde. Testes do tipo *point of care*, embora prontamente
28 disponíveis para a clínica, apresentam uma série de limitações como a baixa
29 especificidade e sensibilidade. Estudos revelaram a ocorrência de reatividade

1 sorológica cruzada entre ZIKV e outros flavivírus, tais como o DENV e o vírus da Febre
2 Amarela, ambos co-circulantes no Brasil. Ao mesmo tempo, indícios de imprecisão
3 envolvendo kits disponíveis para o diagnóstico do ZIKV já foram relatados.

4 Diante das limitações dos atuais ensaios laboratoriais para a detecção de tais
5 infecções, devido ao período curto de viremia e os requisitos associados aos testes
6 mais elaborados como RT-PCR, faz-se necessário o desenvolvimento de testes mais
7 sensíveis, específicos, rápidos, e que além disso, sejam de fácil execução e baixo
8 custo. Um teste antigênico apresentando como alvo anticorpos do paciente contra
9 uma proteína viral circulante, é passível de constituir a base de testes de diagnóstico
10 importantes. As proteínas E1 e E2 de CHIKV bem como a proteína E de ZIKV,
11 apresentam potencial para compor esse tipo de teste, uma vez que fazem parte do
12 envelope e portando estão envolvidas com o reconhecimento da partícula viral pela
13 célula hospedeira, o que gera anticorpos passíveis de detecção e diagnóstico.

3. OBJETIVOS

3.2. Objetivo geral

Produzir proteínas que constituem o envelope dos vírus Chikungunya (CHIKV) e Zika (ZIKV) em sistema procarioto e avaliar o potencial das mesmas como ferramentas diagnósticas.

3.3. Objetivos específicos

- a) Construir, a partir de análises *in silico*, plasmídeos contendo os genes codificadores das proteínas E1 e E2 de CHIKV (CHIKV-E1 e CHIKV-E2) e da proteína E de ZIKV (ZIKV-E).
- b) Expressar as proteínas CHIKV-E1, CHIKV-E2 e ZIKV-E em *Escherichia coli*.
- c) Purificar as proteínas de interesse por cromatografia de afinidade.
- d) Verificar a antigenicidade das proteínas produzidas por Western-Blot e ELISA.

4. METODOLOGIA

4.1.1. Fase I: Análises de Bioinformática

- 1 A fase inicial deste projeto consistiu no desenho dos genes codificadores das
- 2 proteínas de interesse (ZIKV-E, CHIKV-E1 e CHIKV-E2), considerando sua expressão
- 3 em sistema procarioto, conforme exibido na Figura 13.

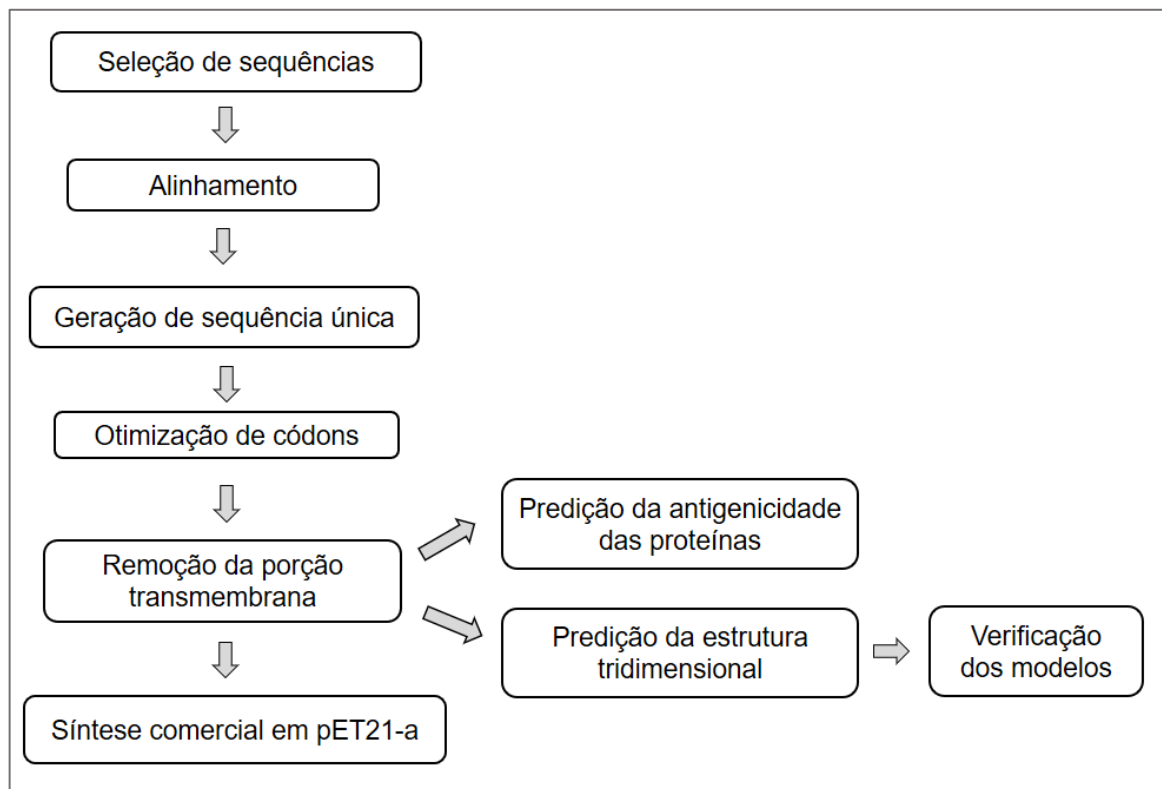


Figura 13- Delineamento experimental da Fase I.

4.1.2. Construção dos genes das proteínas de interesse

- 4 Baseado no papel imunológico descrito na literatura (Jin *et al.*, 2015; Dai *et al.*,
- 5 2016), optou-se por produzir proteínas com base nas sequências dos genes
- 6 codificadores para as proteínas E1 e E2 de CHIKV e E de ZIKV.

- 7 Genomas virais depositados no banco de dados *GenBank*
- 8 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) até novembro de 2016 foram alinhados no

1 software MEGA7. Os critérios de seleção das sequências foram: anotação completa
2 do gene e ausência de nucleotídeos indefinidos na sequência.

3 Para o desenho do gene da proteína E do ZIKV, optou-se por trabalhar com
4 sequências isoladas mundialmente, num total de 148. A sequência utilizada como
5 referência foi a de número de acesso KU940228, isolada da Bahia, sendo que, após
6 o alinhamento múltiplo e delimitação da porção codificadora da proteína E, uma
7 sequência consenso foi gerada a partir do software *cons* (EMBOSS -
8 <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/cons>).

9 As sequências utilizadas como referência para CHIKV foram KX262994.1
10 (genótipo Asiático) e KJ679578 (genótipo ECSA), sendo que ambas, após análise pelo
11 Blastn, apresentaram 100% de identidade com amostras brasileiras.

12 Para o desenho dos genes de E1 e E2 de CHIKV trabalhou-se com amostras
13 brasileiras (42 sequências) e estrangeiras pertencentes aos genótipos circulantes no
14 Brasil, sendo 112 sequências pertencentes ao genótipo Asiático e 274 sequências ao
15 genótipo ECSA. Uma análise filogenética foi realizada pelo software MEGA7 (método
16 *Neighbor-Joining*) para classificar amostras brasileiras de genótipos até então não
17 definidos no *GenBank* e uma árvore filogenética foi criada com auxílio da plataforma
18 online iTOL (Letunic & Bork, 2016). Foi gerada uma sequência consenso para cada
19 grupo (Grupo 1: amostras brasileiras, Grupo 2: amostras do genótipo *Asian* e Grupo
20 3: amostras do genótipo *ECSA*). Essas sequências foram comparadas entre si para a
21 geração de uma sequência única para cada proteína.

22 As sequências finais codificadoras de ZIKV-E, CHIKV-E1 e CHIKV-E2 foram
23 códon-otimizadas para a expressão em *E. coli* pelos softwares *Atgme*
24 (<http://atgme.org/>) (Daniel *et al.*, 2015) e OptimumGene™ - *Codon Optimization*
25 (Genescript). Após a tradução das sequências pelo *Translate Tool*
26 (<https://web.expasy.org/translate/>) elas foram analisadas pelo algoritmo Blast-P
27 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) para verificar a similaridade
28 das sequências construídas com sequências de proteínas já depositadas.

29 Em seguida, foram feitas análises de porção transmembrana e hidrofobicidade
30 pelos softwares *TMHMM* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) e *ProtScale* -

1 *ExPasy* (<http://web.expasy.org/ProtScale/>, opções *Transmembrane tendency* e *Hphob.*
 2 *-Kyte & Doolittle*). A partir dessas predições, foram determinados pontos de corte para
 3 a geração das proteínas sem seus domínios transmembrana.

4 Finalmente, as sequências das proteínas construídas foram sintetizadas
 5 comercialmente pela empresa Fastbio (Ribeirão Preto, SP), novamente otimizadas e
 6 subclonadas em vetor de expressão pET-21a (+) entre os sítios de *NdeI* e *XhoI*,
 7 adicionando uma metionina inicial e uma cauda de histidina (Figura 14).
 8 As sequências antes e após a otimização e corte da porção transmembrana foram
 9 alinhadas pela ferramenta online *Clustal Omega* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Ao longo deste trabalho, as proteínas produzidas serão tratadas como
 10 ZIKV-E, CHIKV-E1 e CHIKV-E2.
 11

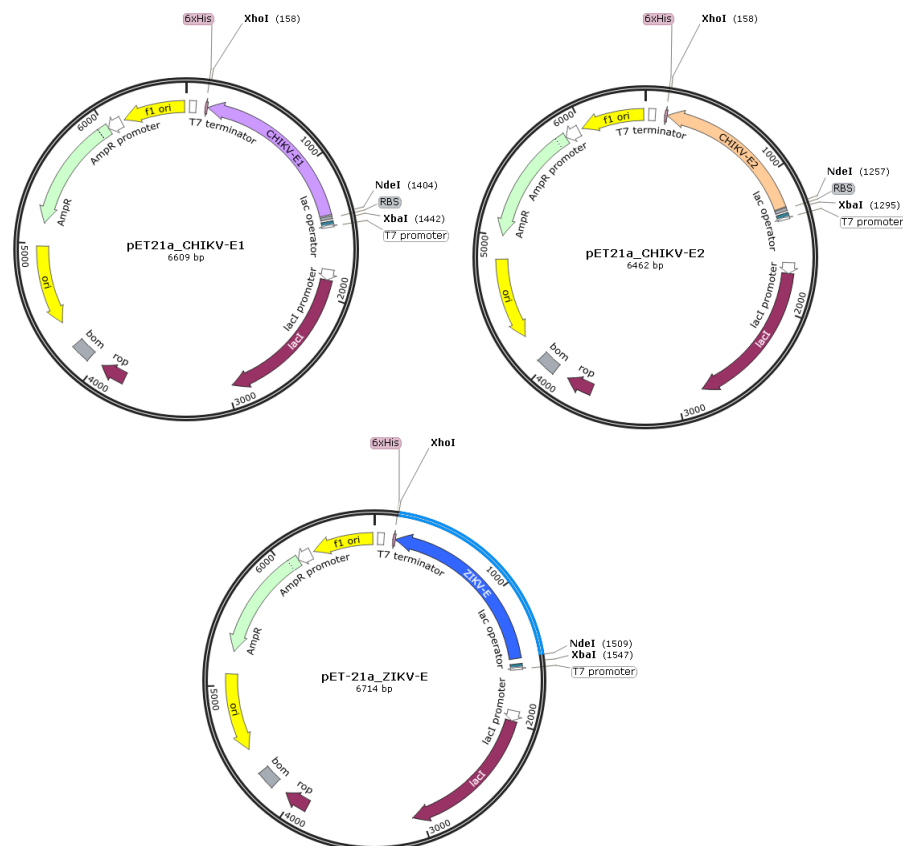


Figura 14 - Mapas dos plasmídeos sintéticos desenvolvidos com as sequências dos genes de interesse. Figura gerada a partir do programa SnapGene (GSL Biotech).

4.1.3. Análises *in silico* das proteínas produzidas

1 Após as modificações para inserção dos genes das proteínas de interesse no
2 plasmídeo de expressão, as estruturas dessas moléculas foram estudadas *in silico*.
3 Para avaliar as propriedades físico-químicas utilizou-se a ferramenta Protparam
4 (Gasteiger, 2005) e a estrutura secundária foi analisada pelo BepiPred
5 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>).

6 A estrutura tridimensional foi predita pelo software *I-Tasser*
7 (<http://zhang.bioinformatics.ku.edu/I-TASSER>). O *I-Tasser* (*Iterative Threading*
8 *ASSEMBly Refinement*) é uma plataforma para a predição de estrutura tridimensional
9 de proteínas por meio de uma abordagem denominada *threading*. *Threading* refere-
10 se a um procedimento de bioinformática para identificar proteínas a partir de modelos
11 de bancos de dados de estrutura já resolvidos que tenham uma estrutura semelhante
12 ou motivo estrutural similar à da sequência consultada (Roy *et al.*, 2010). Após as
13 predições pelo *I-Tasser* foi selecionado o melhor modelo para cada proteína
14 baseando-se no valor obtido de *C-score* indicado pelo programa.

15 A qualidade do modelo gerado pelo *I-Tasser* foi validada utilizando as
16 plataformas online *ProSA-web* e *RAMPAGE*. O *ProSA-web* é uma ferramenta utilizada
17 para verificar possíveis erros em modelos 3D de estruturas de proteínas. Seu índice
18 de qualidade (*Z-score*) é fornecido a partir de um gráfico que mostra pontuações de
19 todas as cadeias de proteínas determinadas experimentalmente (por raio-X ou RMN),
20 disponíveis no PDB, relacionando-as com a pontuação do modelo proposto (Sippl,
21 1993; Wiederstein & Sippl, 2007).

22 O *RAMPAGE* é uma ferramenta para gerar gráficos de Ramachandran, uma
23 forma de visualizar a distribuição da torção dos ângulos em uma proteína. Para isso,
24 ele descreve as rotações da cadeia principal em torno das ligações entre N-C α
25 (chamada Phi, ϕ) e C α -C (chamada Psi, ψ). Com ele, é possível ter uma visão geral
26 dos ângulos das regiões permitidas e não permitidas, sendo um importante indicador
27 da qualidade de estruturas tridimensionais (Lovell *et al.*, 2002).

4.1.4. Predição da antigenicidade das proteínas

1 A antigenicidade das proteínas desenhadas foi avaliada a partir do servidor
2 online VexiJen V2.0 (<http://www.ddphpharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>)
3 utilizando um *threshold* de 0,4 (70% acurácia, 84% sensibilidade e 56%
4 especificidade). Esta ferramenta permite a classificação do antígeno exclusivamente
5 com base nas propriedades físico-químicas da proteína (Doytchinova & Flower, 2007).
6 Para avaliar *in silico* o potencial uso das proteínas como ferramenta de
7 diagnóstico, as sequências foram submetidas aos programas BepiPred
8 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>), para a predição de epítomos lineares de
9 célula B (Jespersen *et al.*, 2017), e IUPred (<http://iupred.enzim.hu/>), para a predição
10 de desordem estrutural intrínseca, indicando ausência de estrutura secundária e,
11 conseqüentemente, regiões de possível interação com anticorpos (Dosztányi, 2005).
12 Com o intuito de avaliar o potencial da proteína como um todo, optou-se por um
13 *threshold* de 0,35 no programa BepiPred, que fornece alta sensibilidade (97%). A
14 análise pelo IUPRED foi feita a partir da opção *long disorder*, que prediz a desordem
15 global independente do contexto, abrangendo pelo menos 30 resíduos consecutivos
16 desordenados.

4.2. Fase II: Produção das proteínas recombinantes

1 Os experimentos laboratoriais da Fase II (Figura 15) foram executados no
 2 Laboratório de Virologia Básica e Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas (LVBA),
 3 situado na UFMG e no Centro de Tecnologia de Vacinas e Diagnóstico (CT Vacinas),
 4 sediado no Parque Tecnológico de Belo Horizonte (BH-TEC).

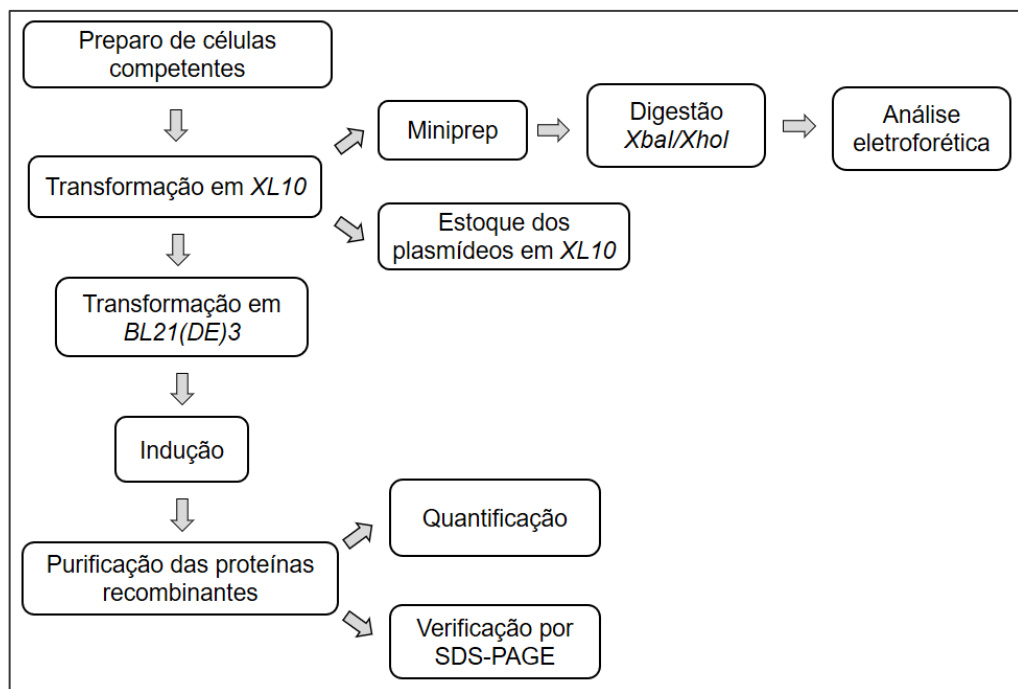


Figura 15- Delineamento experimental da Fase II.

4.2.1. Preparo de células competentes

5 Foram preparadas células competentes de *E. coli* das linhagens XL10 e
 6 BL21(DE3), para clonagem e expressão dos plasmídeos, respectivamente.

7 O procedimento de quimiocompetência das células foi executado conforme o
 8 protocolo habitual do Laboratório de Virologia Básica e Aplicada da UFMG. As células
 9 sementes foram descongeladas no gelo e transferidas para tubos de centrífuga de 50
 10 mL com 5 mL de meio LB líquido e incubadas *overnight* (37°C, 200 rpm) em agitador
 11 orbital (Thermo Scientific, EUA). No dia seguinte, as culturas foram inoculadas em
 12 *erlenmeyers* de 1L contendo 200 mL de meio LB e incubadas a 37 °C em agitador

1 orbital a 200 rpm até a D.O. atingir um valor entre 0,4 e 0,6. Posteriormente, as
 2 culturas foram transferidas para tubos, incubadas no gelo por 20 min e centrifugadas
 3 (Jouan, rotor fixo, 2700 g, 4 °C, 15 min). O sedimento foi suspenso em solução de
 4 CaCl₂ (Quadro 2), sendo novamente incubado no gelo e centrifugado como no passo
 5 anterior. Em seguida, o sedimento foi ressuspenso em solução de CaCl₂ com glicerol
 6 (Quadro 2) para o preparo de alíquotas de 100 µL que foram armazenadas a -80 °C.

Quadro 2- Soluções utilizadas para o preparo de células competentes.

CaCl₂ (100 mM)	CaCl₂ (100 mM) com glicerol
CaCl ₂ _____ 1,11 g	CaCl ₂ _____ 0,11 g
HEPES _____ 0,24 g	HEPES _____ 0,024 g
H ₂ O destilada qsp 100mL	Glicerol 99% _____ 1, 01 mL
	H ₂ O destilada qsp 10mL

7 A competência das bactérias preparadas foi avaliada por transformação com
 8 pUC18 (controle positivo), por choque térmico, assim como descrito no item 4.2.2,
 9 para o plasmídeo de trabalho.

4.2.2. Transformação em XL10 por choque térmico

10 O plasmídeo sintetizado comercialmente foi entregue liofilizado sendo
 11 ressuspenso em água livre de nucleasse para uma concentração final de 100 ng/µL,
 12 de acordo com as recomendações do fabricante.

13 Da alíquota de 100 µL de células XL10 competentes preparadas
 14 anteriormente, foram separados 10 µL para o controle negativo e 90 µL de células
 15 foram transformadas com 1 µL de plasmídeo. Os dois tubos (controle negativo e
 16 trabalho) foram incubados no gelo por 30 min, sendo feito o choque térmico em banho-
 17 maria a 42 °C por 40 segundos e incubados novamente no gelo por 2 min. Adicionou-

1 se 900 μL de meio LB líquido no tubo trabalho e 90 μL no controle sendo o volume
2 transferido para tubos de 50 mL e incubados por 1 h, 200 rpm,
3 37 °C em agitador orbital (Thermo Scientific, EUA). Em seguida, as culturas foram
4 semeadas (20 μL e 100 μL) em placas de Petri contendo meio LB sólido com
5 ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e incubadas *overnight* a 37 °C em estufa (Thermo Scientific,
6 EUA).

4.2.3. Extração de DNA plasmidial *in house*

7 Para confirmar a transformação e o tamanho dos insertos foi feita uma
8 miniprep manual seguindo-se o protocolo estabelecido no LVBA, que utiliza as
9 soluções descritas no Quadro 3. Para o preparo do pré-inóculo clones transformados
10 crescidos em meio seletivo (ampicilina) foram coletados e ressuspensos em 5 mL
11 de meio líquido com antibiótico (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampicilina) em tubos de 50 mL e
12 submetidos a incubação *overnight* em agitador orbital (37 °C, 200 rpm). No dia
13 seguinte, a cultura foi centrifugada (1000 g, 10 min, temperatura ambiente). O
14 sedimento foi ressuspensado em 200 μL de solução I sendo adicionado, em sequência,
15 400 μL da solução II com homogeneização suave por 3 minutos. Em seguida,
16 adicionou-se 400 μL de solução III e homogeneizou-se por inversão. As amostras
17 foram transferidas para tubos de microcentrífuga, incubados no gelo (30 minutos) e
18 centrifugados (10.000 g, 4°C, 15 min). Em seguida, o sobrenadante
19 (aproximadamente 800 μL) foi transferido para tubos contendo 600 μL de isopropanol
20 gelado, com posterior homogeneização por inversão. Os tubos foram novamente
21 centrifugados (10.000 g, 4°C, 15 min), sendo o sobrenadante descartado e o
22 sedimento tratado com 500 μL de etanol 70%. Após uma nova centrifugação, o
23 sobrenadante foi descartado e o sedimento foi seco em banho maria (52 °C) sendo
24 em seguida, ressuspensado em 20 μL de água *nuclease-free* e quantificado em
25 espectrofotômetro (NanoVue Plus, GE Healthcare Life Sciences).

Quadro 3 – Soluções utilizadas para a extração de DNA plasmidial

Solução I - GT/RNase	
Glicose – 50 mM – 0,45 g Tris HCl – 25 mM- 1,97 (pH 8,0) EDTA – 10 mM- 0,18 g (pH 8,0) H ₂ O MiliQ – qsp 50 mL <ul style="list-style-type: none"> • Filtração (filtro 0,45 µM) e adição de RNase para concentração final 150 µg/mL. • Armazenamento a 4 °C. 	
Solução II – Lise	Solução III – Neutralização
SDS – 1% - 0,5 g NaOH 10 N- 1 mL H ₂ O Miliq – qsp 50 mL <ul style="list-style-type: none"> • Armazenamento a 4 °C. 	Acetato de potássio- 3M - 6,5 g H ₂ O Miliq – qsp 50 mL <ul style="list-style-type: none"> • Correção do pH para 4,8. • Armazenamento a 4 °C.

4.2.4. Digestão do DNA plasmidial

1 Após a quantificação, o produto da miniprep manual foi digerido com as
 2 enzimas de restrição *Xba*I e *Xho*I (Promega, EUA) sendo o procedimento realizado de
 3 acordo com as recomendações do fabricante.

4 Inicialmente, os reagentes foram misturados por pipetagem (exceto o DNA)
 5 sendo o conteúdo distribuído em tubos de 0,2 mL. Para cada reação foram
 6 adicionados 2 µL do tampão D (10x), 0,2 µL de albumina sérica bovina acetilada (BSA,
 7 10 mg/mL), 0,5 µL de *Xba*I e 0,5 µL de *Xho*I (ambas a 10 U/µL) e ddH₂O 15,8 µL. O
 8 DNA foi adicionado individualmente em cada tubo (1µL, correspondente a 0,2-1,5 µg)
 9 e homogeneizado, sendo o volume total da reação de 20 µL. O tempo de restrição foi
 10 de 3 h, a 37°C.

1 O produto da digestão foi analisado em gel de agarose 1% com brometo de
2 etídeo (0.5 µg/mL) e comparado aos padrões *Quick-Load 100 bp DNA Ladder* (New
3 England Biolabs) e *EZ Load 1 kb Molecular Ruler* (Bio-rad).

4.2.5. Transformação em BL21(DE3)

4 De forma semelhante a transformação em XL10 para o estoque de
5 plasmídeos foram utilizadas células competentes de *E. coli* da linhagem BL21(DE3)
6 para expressão das proteínas seguindo-se o mesmo protocolo descrito no item 4.2.2.

4.2.6. Expressão das proteínas recombinantes

7 Inicialmente, o procedimento de indução da expressão foi realizado em
8 pequena escala, e, após a padronização das condições ideais, foram obtidas
9 proteínas recombinantes em grandes quantidades.

10 Na primeira etapa da padronização, clones bacterianos da linhagem
11 BL21(DE3) transformados com os plasmídeos contendo os genes de interesse foram
12 crescidos em meio LB suplementado com ampicilina (100 µg/mL) sob agitação a
13 180rpm, a 37°C até atingir $DO_{600} = 0,6$. Posteriormente, foi adicionado o IPTG (1 mM)
14 e a cultura foi incubada no agitador a 37°C por 5 horas. O sedimento celular foi obtido
15 por centrifugação (20 min, 6000 x g) e a expressão das proteínas recombinantes foi
16 avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) como descrito
17 no item 4.2.8.

18 Os melhores clones foram selecionados para a etapa seguinte de
19 padronização variando o tempo de indução (1 a 5 horas ou *overnight*) e a
20 concentração de IPTG (0,5 a 2mM). Após a determinação da melhor condição de
21 expressão para cada proteína, foi feita sua produção em larga escala. Clones
22 selecionados foram utilizados para o preparo do pré-inoculo, que após crescimento
23 overnight a 37°C, foram adicionados a 500 mL de meio LB suplementado com
24 ampicilina (100 µg/mL) e após atingir a DO_{600} desejada (0,6) foram induzidos de
25 acordo com os resultados da padronização.

4.2.7. Purificação das proteínas por cromatografia de afinidade

1 Após a indução da expressão das proteínas recombinantes, as culturas foram
2 centrifugadas a 10,000 x g por 10 minutos a 4°C. Os sedimentos bacterianos foram
3 ressuspendidos em tampão de lise gelado (6 ou 8M Ureia, Imidazol 30 mM em PBS
4 1X, pH 8,0) correspondente a 10% do volume inicial da cultura. Para evitar problemas
5 de viscosidade, foi adicionado DNase (1 mg/mL, sendo 1 µL por cada mL de
6 suspensão de células). Posteriormente, os lisados foram submetidos à prensa
7 francesa (Prench Press Cell Disrupter, Thermo Electron Corporation, EUA) ou
8 homogeneizador da alta pressão (Emulsiflex, Avestin, Canadá) de 7.000 a 10.000 psi
9 repedindo o processo por três vezes. O extrato celular foi recolhido num tubo e
10 mantido em gelo sendo posteriormente clareado por centrifugação (10.000 x g, 4°C,
11 45 min) e filtragem (filtro de seringa, 0,45 µm).

12 Os lisados bacterianos foram purificados por cromatografia de afinidade, com o
13 kit HisTrap HP System (GE Healthcare Life Sciences) no aparelho ÄKTAprime plus
14 (GE Healthcare Life Sciences), seguindo as instruções do fabricante, pela opção
15 *Method Run*, aba *Template* opção *Affinity* (AC). A coluna foi lavada inicialmente com
16 água Milli-Q (Merk Millipore), por 5x o volume da coluna. A etapa de equilíbrio consistiu
17 na lavagem da coluna com tampão A (6 ou 8M Ureia, Imidazol 30 mM em PBS 1X, pH
18 8,0). Em seguida, a amostra foi injetada no aparelho através do *loop*, e a eluição foi
19 realizada com gradiente do tampão B (6 ou 8M Ureia, Imidazol 500 mM em PBS 1X,
20 pH 8,0) – de 0 a 100% – sendo coletadas alíquotas de 1,0 mL e armazenadas a 4°C.

4.2.8. SDS-PAGE

21 As amostras resultantes dos ensaios de expressão e purificação foram
22 submetidas a separação eletroforética em gel de poliacrilamida. Os géis foram
23 preparados a partir de uma solução estoque 30% acrilamida/0,8% bis-acrilamida. O
24 gel de resolução foi preparado para uma concentração final de 12% de acrilamida,
25 Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, 0,1% de APS, 0,1% de SDS e 0,04% de TEMED. O gel de
26 concentração consistiu em 5% de acrilamida, Tris-HCl 1 M, pH 6,8, 0,1% de APS, de

1 SDS e 0,1% TEMED. Foi utilizado o marcador MWSDS 70L (M.w.14kDa-70kDa)
2 (SIGMA, EUA).

3 O tampão de corrida foi preparado a partir de Tris-HCl 25 mM; Glicina 192
4 mM; SDS 0,1% (pH 8,3) e o gel foi submetido a uma voltagem de 60 V até passagem
5 das amostras pelo gel de empilhamento sendo então aplicada a voltagem de 100 V.
6 Após a corrida o gel foi deixado em solução fixadora (40% de metanol e 10% de ácido
7 acético) por 30 min ou *overnight* e subsequentemente corado por Coomassie Blue
8 [Azul Coomassie R-250 (BioRad, EUA) 50 % de metanol e 10% de ácido acético] por
9 15 min e descorados com uma solução de 10% de metanol e 7% de ácido acético.

4.2.9. Quantificação das proteínas recombinantes

10 As proteínas purificadas foram quantificadas pelo método 2D Quant Kit (GE
11 Healthcare Life Sciences). O procedimento foi realizado em placas de 96 poços de
12 acordo com as recomendações do fabricante. A absorbância foi mensurada em
13 espectrofotômetro de microplacas (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific) a 480 nm
14 e a quantificação foi estabelecida em função da curva-padrão da proteína BSA, de
15 concentração conhecida, considerando-se os resultados obtidos para cada amostra.

4.3. Fase III – Verificação da antigenicidade das proteínas recombinantes

1 Esta fase consistiu na constatação da purificação das proteínas por reação com
 2 anticorpos comerciais em ensaios de Western-blot. Além disso, as proteínas em
 3 estudo foram testadas quanto a capacidade de detectar anticorpos em amostras de
 4 soros de animais e pacientes infectados (Figura 16).

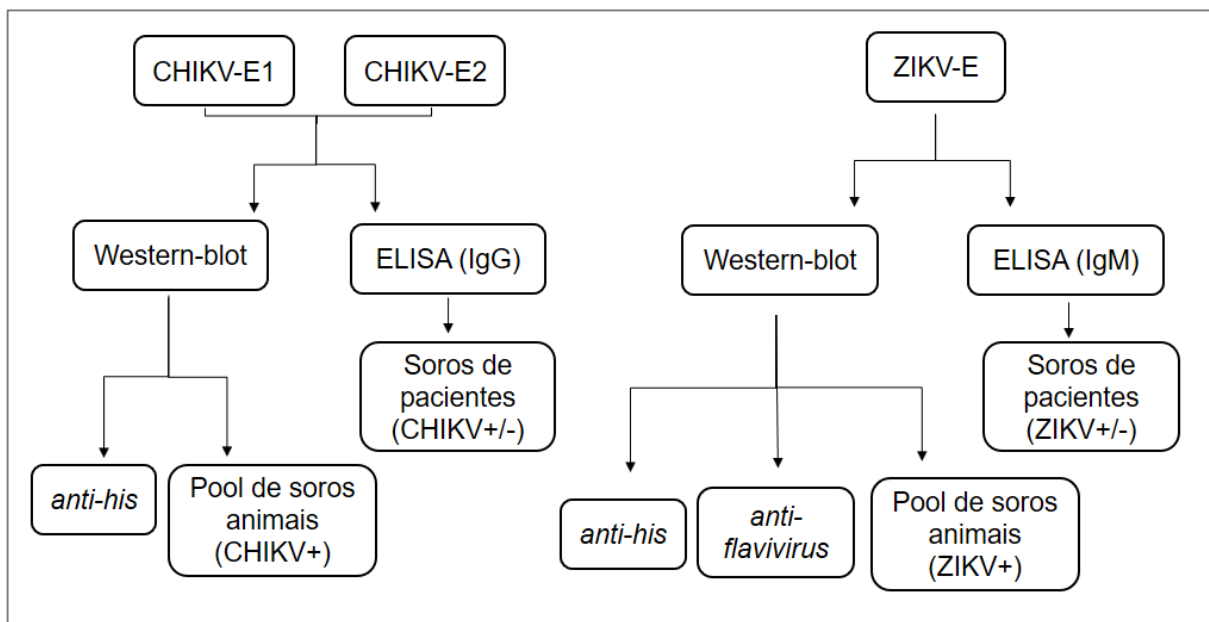


Figura 16 - Delineamento experimental da Fase III.

4.3.1. Obtenção de soros para testes de Western-Blot e ELISA

5 Soros de animais infectados e de pacientes foram obtidos em parceria com
 6 outros laboratórios e instituições. Soro de fêmeas de camundongos da linhagem
 7 BALB/c foram cedidos gentilmente pela professora Dra. Silva Sardi, da Universidade
 8 Federal da Bahia. Os animais foram infectados com 7 semanas, pela via intravenosa
 9 com 1×10^6 PFU do ZIKV, sendo o sangue coletado após 35 dias de infecção por
 10 punção da veia cava inferior.

11 No caso do soro animais infectados por CHIKV, a parceria foi feita com o
 12 laboratório da professora Danielle da Glória de Souza do Laboratório de Biologia

1 Molecular de Microrganismos (Departamento de Microbiologia UFMG). Animais
 2 C57BL/6 com 4 semanas de idade foram infectados por via intraplantar com 1×10^6
 3 PFU de CHIKV sendo o soro coletado após 37 dias.

4 Soros de pacientes infectados por DENV, ZIKV e CHIKV, além de amostras
 5 negativas foram obtidos em parceria com o Serviço de Virologia e Riquetsioses da
 6 Fundação Ezequiel Dias (Funed), Belo Horizonte, através da colaboração com o Dr.
 7 Glauco Carvalho. Nem todas as amostras negativas haviam sido caracterizadas
 8 para CHIKV, havendo necessidade de recharacterização pelo Kit comercial da
 9 EuroImmun (Anti-Chikungunya Virus ELISA IgG Lot 50604AM). Amostras de ZIKV e
 10 DENV foram caracterizadas pela FUNED por sorologia de IgM, enquanto o kit
 11 comercial para CHIKV utilizado detecta imunoglobulinas do tipo IgG, o que justifica a
 12 metodologia empregada neste projeto. Os números amostrais para os ELISAs de
 13 CHIKV estão indicados na Tabela 1 e, para ZIKV-E, na Tabela 2.

Tabela 1- Número amostral de soros de pacientes utilizados nos ensaios de ELISA, considerando as proteínas de CHIKV.

		CHIKV-E1	CHIKV-E2
Soros CHIKV	IgG +	16	34
	IgG -	16	25
Total		32	59

Tabela 2- Número amostral de soros de pacientes utilizados nos ensaios de ELISA para ZIKV-E.

		ZIKV-E
Soros ZIKV	IgM +	36
	IgM -	32
Soros DENV	IgM +	26
	Total	94

4.3.2. Western-Blot

14 A antigenicidade das proteínas produzidas foi avaliada por western-blot, em
 15 que as amostras foram submetidas a corrida eletroforética por SDS-PAGE [Marcador
 16 *Precision Plus Protein Dual Color Standards* (Biorad) ou *PageRuler Plus Prestained*

1 *Protein Ladder* (Thermo Scientific)] e posteriormente transferidas para membranas de
2 fluoreto de polivinilideno (PVDF) (GE Healthcare, HybondTM-P) por 2 horas a um
3 potencial elétrico constante de 100 V, no aparelho Mini Trans-Blot[®] Electrophoretic
4 Transfer Cell (Bio-Rad). A membrana foi tratada com tampão de bloqueio 2,5% [2,5%
5 (p/v) de leite desnatado em pó em PBS-T (PBS 1X + 0,1% de Tween 20)] overnight a
6 4°C, e posteriormente lavadas com PBS-T por três vezes, sendo trocada a cada 5
7 minutos.

8 A reação foi feita com anticorpo anti-histidina (*anti-his* 1:2500, Sigma Aldrich)
9 e com pool de soros (1:50) de camundongos infectados. Para ZIKV-E, além destes
10 também foi testado o anticorpo comercial antinflavivirus (4G2, 1:2500, Merk), sendo,
11 para todos os casos, a incubação por 1-2h. Em seguida, a membrana foi novamente
12 lavada e incubada com anticorpo secundário (*anti-mouse* 1:2000, Sigma Aldrich) por
13 1 hora.

14 A revelação foi feita com DAB (0,01 g em 10 ml PBS 1x) e cloronaphtol (0,005
15 g diluído em 1,66 ml de metanol + 8,32 ml PBS 1 X) ou com adição de 1 mL do
16 reagente Luminata *Classico Western HRP substrate* (Millipore) sobre a membrana.

4.3.3. Ensaios de ELISA Indireto

17 Placas de ELISA 96 poços (Costar, EUA) foram sensibilizadas overnight a 4
18 °C com as proteínas recombinantes diluídas em tampão carbonato (Na₂CO₃ 0,16%,
19 NaHCO₃ 0,24% e pH 9,6). Após a padronização, optou-se pelas seguintes
20 concentrações: ZIKV-E 400 ng/poço, CHIKV-E1 250 ng/poço e CHIKV-E2 500
21 ng/poço. Em seguida da sensibilização as placas foram lavadas com 350 µL de PBS-
22 T (PBS 1X + 0,1% de Tween 20) por 5 vezes na lavadora sendo adicionado em
23 sequência 280 µL/poço de solução de bloqueio (leite em pó 5% diluído em PBS-T) e
24 incubando a temperatura ambiente, por 2 horas. As amostras de soro foram diluídas
25 na contração 1:100 em solução de PBS-T + 0,5 % leite em pó.
26 As placas foram novamente lavadas como descrito anteriormente sendo adicionadas
27 as amostras diluídas (100 µL/poço) e incubadas por 45 min a 37°C. Em seguida, as
28 placas foram novamente lavadas para posterior adição do anticorpo secundário.

1 Foram utilizados anticorpos *anti-IgG-human-peroxidase* (1:40.000, Sigma Aldrich) e
 2 *anti-IgM-human-peroxidase* (1:10.000, Sigma Aldrich) sendo aplicado 100 µL/poço e
 3 incubado por 30 minutos a 37°C com posterior lavagem. Aplicou-se 100 µL/poço de
 4 solução de TMB comercial incubando a temperatura ambiente no escuro por 10
 5 minutos. A reação foi parada com solução de H₂SO₄ 0,5 M e a absorbância foi
 6 verificada em leitor de ELISA a 450 nm no aparelho Multiskan Go (Thermo Fisher
 7 Scientific).

4.3.3.1. Análise dos dados e avaliação do desempenho das proteínas no ELISA

8 Para organização e análise dos dados gerados pelo ELISA foi utilizado o
 9 programa Microsoft Excel 2016 e o software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Inc,
 10 EUA). O desempenho das proteínas recombinantes foi avaliado pela razão entre a
 11 média das absorbâncias encontradas para as amostras positivas dividida pela média
 12 das absorbâncias das amostras negativas. Também foram avaliados os parâmetros
 13 de sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo
 14 negativo (VPN) e acurácia (AC), como mostrado na Tabela 3 e no Quadro 4.

Tabela 3- Referência para a classificação dos resultados pelos testes de ELISA

Classificação dos Soros	Resultado do ELISA		Total
	Positivo	Negativo	
Positivos	Verdadeiro positivo (A)	Falso negativo (C)	A+C
Negativos	Falso Positivo (B)	Verdadeiro negativo (D)	B+D
Total	A+B	C+D	A+B+C+D

Quadro 4 - Parâmetros para avaliar o desempenho das proteínas no ELISA.

$$\text{Especificidade: } E = \frac{D}{(B+D)}$$

$$\text{Sensibilidade: } S = \frac{A}{(A+C)}$$

$$\text{Valor Preditivo Positivo: } VPP = \frac{A}{(A+B)}$$

$$\text{Valor Preditivo Negativo: } VPN = \frac{D}{(C+D)}$$

$$\text{Acurácia: } AC = \frac{(A+D)}{(A+B+C+D)}$$

- 1 O valor de *cutoff* foi definido com base na melhor relação de sensibilidade e
- 2 especificidade utilizando a curva ROC (*Receiver Operator Curve*) obtida pelo
- 3 GraphPad Prism 7.0. Com base neste programa, a exatidão do teste pode ser avaliada
- 4 pela área sob a curva ROC (AUC) da seguinte forma:
- 5 - AUC > 0,7: teste com desempenho satisfatório
- 6 - AUC < 0,5: teste incapaz de discriminar amostras positivas de negativas.

5. RESULTADOS

5.1. Fase I: Análises de Bioinformática

5.1.1. Construção das sequências sintéticas de CHIKV-E1, CHIKV-E2 e ZIKV-E

1 Para a escolha das sequências de CHIKV foi necessário separar as amostras
 2 quanto ao genótipo. Amostras de CHIKV isoladas no Brasil não caracterizadas
 3 genotipicamente (até o período da construção dos genes) foram analisadas pelo
 4 programa MEGA7. A árvore filogenética que classifica as sequências isoladas no país
 5 é apresentada na Figura 17. A partir desta análise foi possível definir os grupos de
 6 sequências de acordo com o genótipo.

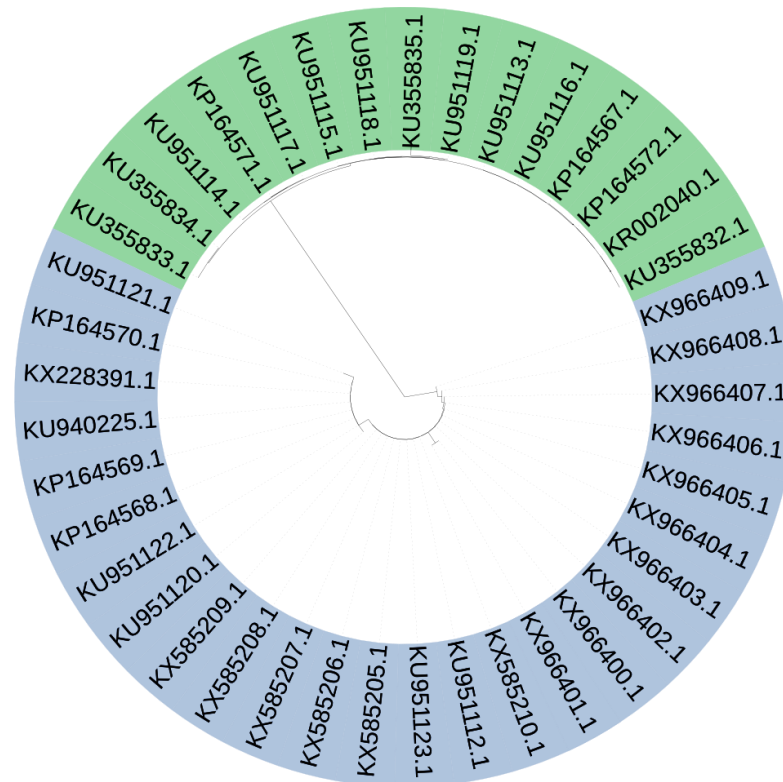


Figura 17 - Análise filogenética de sequências brasileiras considerando os genótipos detectados no país. Em verde as sequências de genótipo ESCA e em azul as sequências pertencentes ao genótipo Asiático. Figura gerada com auxílio da plataforma online iTOL.

1 Ao alinhar as sequências de aminoácido geradas a partir dos consensos para
 2 os genótipos Asiático e ECSA, verificou-se que proteína E1 é bastante similar entre
 3 eles (Figura 18).

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

E1_consenso_ASIAN    YEHVTVIPNTVGVPYKTLVNRPGYSPMWLEMLLSVTLEPTLSLDYITCEYKTVIPSPYV
E1_consenso_ECSA    YEHVTVIPNTVGVPYKTLVNRPGYSPMWLEMLLSVTLEPTLSLDYITCEYKTVIPSPYV
*****

E1_consenso_ASIAN    KCCGTAECKDKNLPDYSCKVFTGVYPFMWGGAYCFDAENTQLSEAHVEKSESCKTEFAS
E1_consenso_ECSA    KCCGTAECKDKNLPDYSCKVFTGVYPFMWGGAYCFCDTENTQLSEAHVEKSESCKTEFAS
*****

E1_consenso_ASIAN    AYRAHTASASAKLRVLYQGNNITVTAYANGDHAVTVKDAKFIVGPMSSAWTPFDNKIVVY
E1_consenso_ECSA    AYRAHTASASAKLRVLYQGNNITVAAYANGDHAVTVKDAKFIVGPMSSAWTPFDNKIVVY
*****

E1_consenso_ASIAN    KGDVYNMDYPPFGAGRPGQFGDIQSRTPESEKDVYANTQLVLRPQAVGTVHVPYSQAPSGF
E1_consenso_ECSA    KGDVYNMDYPPFGAGRPGQFGDIQSRTPESEKDVYANTQLVLRPQAVGTVHVPYSQAPSGF
*****

E1_consenso_ASIAN    KYWLKERGASLQHTAPFGCQIATNPVRAVNCAVGNMPSIDIDPEAAFRVVDAPSLTDM
E1_consenso_ECSA    KYWLKERGASLQHTAPFGCQIATNPVRAMNCAVGNMPSIDIDPEAAFRVVDAPSLTDM
*****

E1_consenso_ASIAN    CEVPACTHSSDFGGVAIKYAASKKGGKCAVHSMTNAVIREAEIEVEGNSQLQISFSTAL
E1_consenso_ECSA    CEVSACTHSSDFGGVAIKYAASKKGGKCAVHSMTNAVIREAEIEVEGNSQLQISFSTAL
**

E1_consenso_ASIAN    ASAEFRVQVCSTQVHCAAECHEPPKDHIVNYPASHTTLGVQDISATAMSWQKITGGVGLV
E1_consenso_ECSA    ASAEFRVQVCSTQVHCAAECHEPPKDHIVNYPASHTTLGVQDISATAMSWQKITGGVGLV
*****

E1_consenso_ASIAN    VAVAALILIVVLCVSFSRH
E1_consenso_ECSA    VAVAALILIVVLCVSFSRH
*****

```

Figura 18 – Alinhamento, pelo Clustal Omega, entre as sequências consenso geradas a partir dos genótipos Asiático e ESCA para escolha de uma sequência única de trabalho de CHIKV-E1.

4 Com a utilização da ferramenta PROVEAN (Choi *et al.*, 2012) - capaz de prever
 5 se substituições de aminoácidos tem um impacto na função biológica de uma proteína-
 6 foi possível constatar que nenhuma diferença entre as sequências é significativa.
 7 (Tabela 4). Diante deste fato, optou-se por uma sequência para CHIKV-E1 gerada a
 8 partir do consenso de amostras do genótipo Asiático e ECSA, incluindo as amostras
 9 isoladas no Brasil.

Tabela 4 - Resultados gerados pelo programa PROVEAN para avaliação de diferenças de aminoácidos em sequências da proteína CHIKV-E1

Variação	PROVEAN score	Predição (cutoff= -2.5)
N72S	-0.401	Neutro
A98T	0.423	Neutro
T145A	-1.272	Neutro
K211E	-1.342	Neutro
V226A	2.126	Neutro
V269M	0.532	Neutro
E284D	2.804	Neutro
P304S	1.135	Neutro

1 No caso de CHIKV-E2 observou-se que a consenso gerada considerando as
 2 sequências do genótipo Asiático era idêntica a consenso brasileira e estas
 3 apresentavam algumas divergências em relação à consenso ECSA. Concluiu-se,
 4 portanto, que o ideal seria trabalhar apenas com o genótipo Asiático (incluindo as
 5 amostras isoladas no Brasil pertencentes a este grupo) (Figura 19).

6 A sequência final de cada proteína foi submetida a busca por similaridade
 7 utilizando-se o algoritmo Blast-P e nos três casos houve resultados de 100% de
 8 identidade com amostras isoladas no Brasil.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

E2_consenso_ASIAN      SIKDHFNVYKATRPYLAHCPDCGEGHSCHSPVALERIRNEATDGTLLKIQVSLQIGIKTDD
E2_consenso_BRASIL    SIKDHFNVYKATRPYLAHCPDCGEGHSCHSPVALERIRNEATDGTLLKIQVSLQIGIKTDD
E2_consenso_ECSEA     STKDNFNVYKATRPYLAHCPDCGEGHSCHSPVALERIRNEATDGTLLKIQVSLQIGIKTDD
* **,*****

E2_consenso_ASIAN      SHDWTKLR YMDNHMPADAERAGLFVRTSAPCTITGTMGHFILARCPKGETLTVGFTDGRK
E2_consenso_BRASIL    SHDWTKLR YMDNHMPADAERAGLFVRTSAPCTITGTMGHFILARCPKGETLTVGFTDGRK
E2_consenso_ECSEA     SHDWTKLR YMDNHMPADAERAGLFVRTSAPCTITGTMGHFILARCPKGETLTVGFTDSRK
*****

E2_consenso_ASIAN      ISHSCTHPFHDPVIGREKFHSRPQHGRELPCSTYAQSTAATAEEIEVHMPPDTPDRTL
E2_consenso_BRASIL    ISHSCTHPFHDPVIGREKFHSRPQHGRELPCSTYAQSTAATAEEIEVHMPPDTPDRTL
E2_consenso_ECSEA     ISHSCTHPFHDPVIGREKFHSRPQHGKELPCSTYVQSTAATTEEIEVHMPPDTPDRTL
*****

E2_consenso_ASIAN      MSQQSGNVKITVNSQTVRYKCNCGDSSEGLTTTDKVINNCKVDQCHAAVTNHKKWQYNP
E2_consenso_BRASIL    MSQQSGNVKITVNSQTVRYKCNCGDSSEGLTTTDKVINNCKVDQCHAAVTNHKKWQYNP
E2_consenso_ECSEA     MSQQSGNVKITVNGQTVRYKCNCGGSNEGLTTTDKVINNCKVDQCHAAVTNHKKWQYNP
*****

E2_consenso_ASIAN      LVPRNAEFGDRKGKVHIPPFLANVTCRVPKARNPTVYGNQVIMLLYPDHPTLLSYRNM
E2_consenso_BRASIL    LVPRNAEFGDRKGKVHIPPFLANVTCRVPKARNPTVYGNQVIMLLYPDHPTLLSYRNM
E2_consenso_ECSEA     LVPRNAELGDRQGGKIHIPFLANVTCRVPKARNPTVYGNQVIMLLYPDHPTLLSYRNM
*****

E2_consenso_ASIAN      GEEPNYQEEWVTHKKEIRLTVPTGLEVTWGNNEPYKYWPQLSTNGTAHGHPHEIILYYY
E2_consenso_BRASIL    GEEPNYQEEWVTHKKEIRLTVPTGLEVTWGNNEPYKYWPQLSTNGTAHGHPHEIILYYY
E2_consenso_ECSEA     GEEPNYQEEWVMHKKEVVLTVPTEGLEVTWGNNEPYKYWPQLSTNGTAHGHPHEIILYYY
*****

E2_consenso_ASIAN      ELYPTMTAVVLSVASFILLSMVGAVGMCMARRRCITPYELTPGATVPFLLSLICCI RT
E2_consenso_BRASIL    ELYPTMTAVVLSVASFILLSMVGAVGMCMARRRCITPYELTPGATVPFLLSLICCI RT
E2_consenso_ECSEA     ELYPTMTVVVSVATFILLSMVGMAAGMCMARRRCITPYELTPGATVPFLLSLICCI RT
*****

E2_consenso_ASIAN      AKA
E2_consenso_BRASIL    AKA
E2_consenso_ECSEA     AKA
***

```

Figura 19 - Alinhamento, pelo Clustal Omega, para escolha de uma sequência única de trabalho de CHIKV-E2.

5.1.2. Análises de porção transmembrana, hidrofobicidade e desordem estrutural

- 1 Após a definição de cada sequência de proteína a ser produzida, estas ainda
- 2 foram adaptadas para uma melhor expressão em vetor procarioto. Para isso, elas
- 3 foram códon otimizadas e tiveram suas porções transmembrana removidas.

1 Para a proteína CHIKV-E1 a predição de porção transmembrana pela
 2 ferramenta TMHMM 2.0 indicou a presença de regiões transmembrana a partir do
 3 resíduo de aminoácido 414 (com 59% de probabilidade deste resíduo pertencer a
 4 porção transmembrana). As análises pelo *ProtScale* mostraram uma tendência a
 5 transmembrana a partir do aa 423 e de hidrofobicidade a partir do aminoácido 416
 6 (Tabela 5, Figura 20).

Tabela 5- Análises de porção transmembrana e hidrofobicidade para CHIKV-E1

# aa	TMHMM			<i>ProtScale</i> (Expasy)	
	Interna	Membrana	Externa	Transmembrana	Hidrofobicidade
411	0,032	0,008	0,960	-0,004	0,044
412	0,031	0,021	0,947	-0,181	-0,211
413	0,025	0,282	0,693	0,033	0,344
414	0,019	0,592	0,388	-0,158	0,400
415	0,009	0,831	0,160	-0,111	0,356
416	0,002	0,914	0,084	0,249	1,211
417	0,000	0,982	0,017	0,789	2,111
418	0,000	0,991	0,008	0,612	1,811
419	0,000	0,997	0,002	0,803	2,356
420	0,000	0,999	0,001	0,867	2,600
421	0,000	1,000	0,000	0,930	2,844
422	0,000	1,000	0,000	0,977	2,800
423	0,000	1,000	0,000	1,217	3,344
424	0,000	1,000	0,000	1,217	3,344
425	0,000	1,000	0,000	1,280	3,378

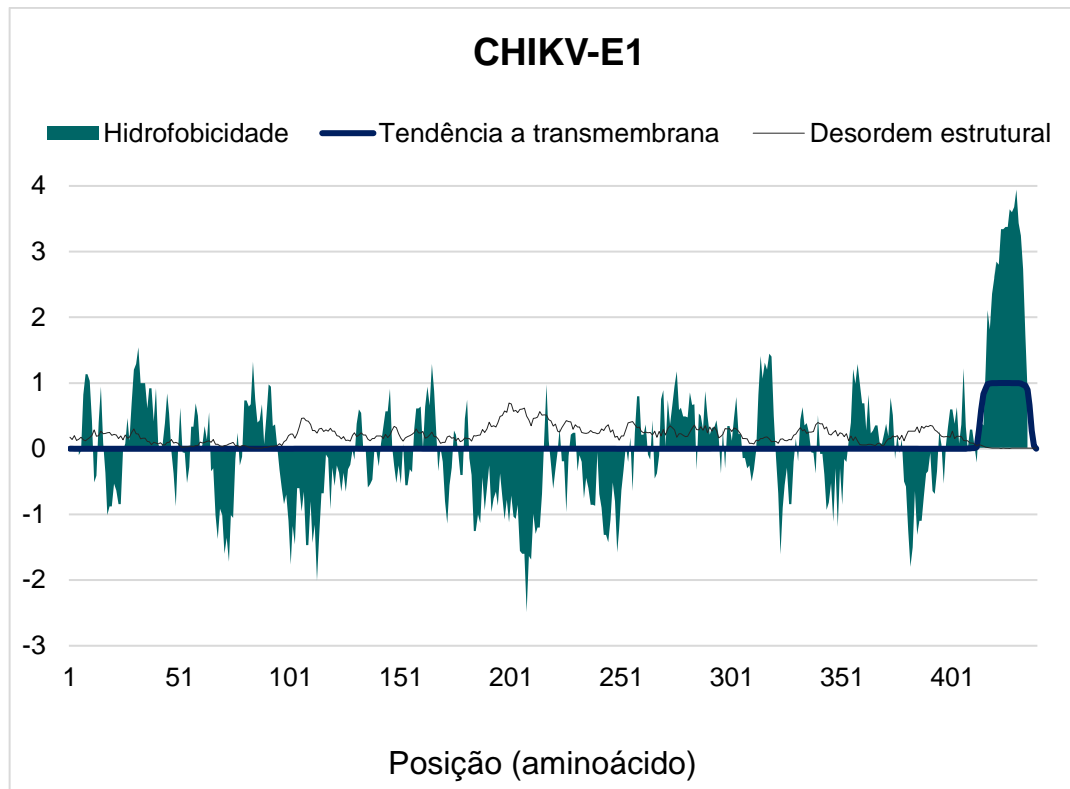
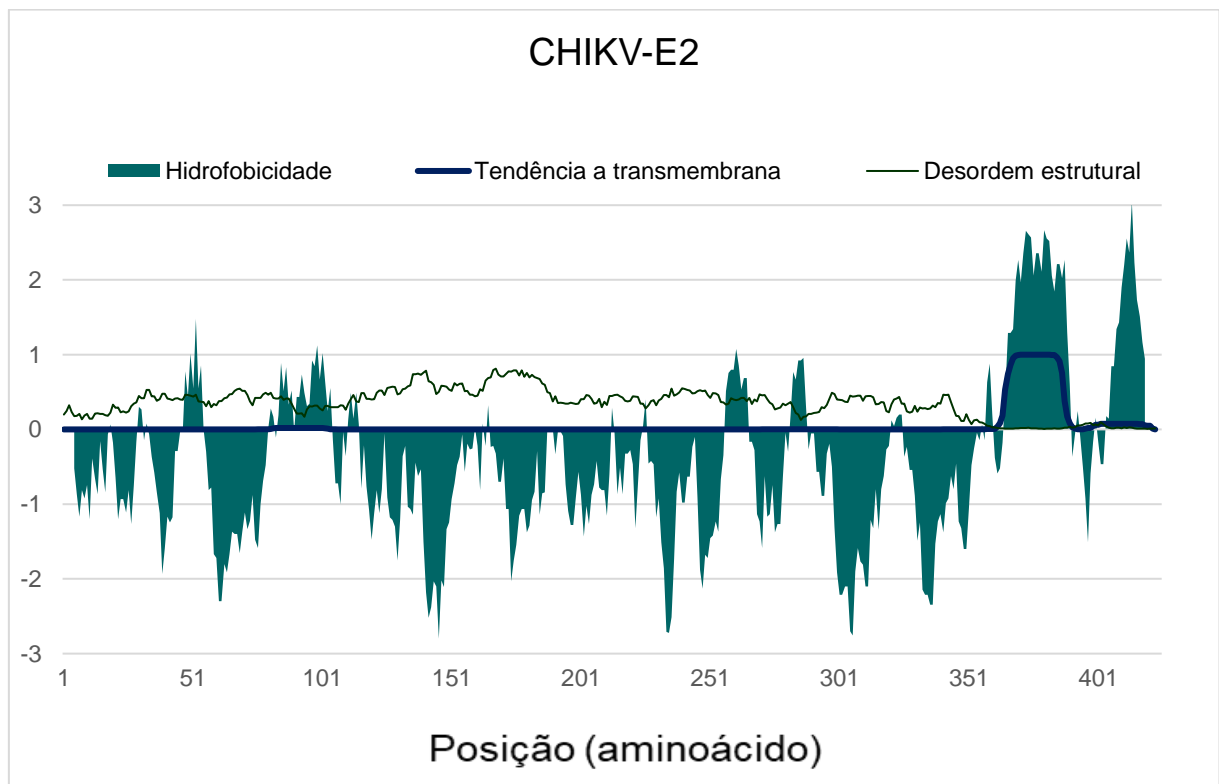


Figura 20 - Análise *in silico* de hidrofobicidade (*ProtScale*), tendência a porção transmembrana (TMHMM Server) e tendência a desordem estrutural (IUPRED) para a proteína CHIKV-E1.

- 1 Para CHIKV-E2, a predição de porção transmembrana pela ferramenta
- 2 TMHMM 2.0 indicou a presença de regiões transmembranas a partir do resíduo de aa
- 3 365 (com 53% de probabilidade deste resíduo pertencer a porção transmembrana).
- 4 Análises de tendência a porção transmembrana e hidrofobicidade pelo *ProtScale*
- 5 indicaram uma tendência a transmembrana a partir do aa 373, e a análise de
- 6 hidrofobicidade apresentou um score >1 a partir o aa 366 (Tabela 6, Figura 21).

Tabela 6- Análises de porção transmembrana e hidrofobicidade para CHIKV-E2

# aa	TMHMM			ProtScale (ExPASy)	
	Interna	Membrana	Externa	Transmembrana	Hidrofobicidade
364	0,012	0,184	0,804	-0,044	-0,178
365	0,011	0,531	0,458	0,057	0,433
366	0,010	0,742	0,248	0,534	1,289
367	0,008	0,863	0,128	0,534	1,289
368	0,003	0,955	0,043	0,421	1,344
369	0,001	0,985	0,014	0,737	1,989
370	0,000	0,996	0,004	0,814	2,267
371	0,000	0,998	0,002	0,600	1,967
372	0,000	0,999	0,001	0,856	2,356
373	0,000	0,999	0,001	1,032	2,656
374	0,000	0,999	0,001	1,079	2,611

**Figura 21** - Análise *in silico* de hidrofobicidade (*ProtScale*), tendência a porção transmembrana (TMHMM Server) e tendência a desordem estrutural (IUPRED) para a proteína CHIKV-E2.

1 Para ZIKV-E, a predição de porção transmembrana pela ferramenta TMHMM
 2 2.0 indicou a presença de regiões transmembranas a partir do resíduo de aa 456 (com
 3 60% de probabilidade deste resíduo pertencer a porção transmembrana). Análises de
 4 tendência a porção transmembrana e hidrofobicidade pelo *ProtScale* (Expasy, scale
 5 Hphob. / Kyte & Doolittle), apresentaram diferentes pontos de corte prováveis.
 6 Enquanto o primeiro mostrou uma tendência a TM a partir do aa 459, a análise de
 7 hidrofobicidade mostrou picos estreitos acima de score=1 ao longo de quase toda a
 8 extensão da proteína, apresentando um pico mais amplo após o aa 449 (Tabela 7,
 9 Figura 22).

Tabela 7- Análises de porção transmembrana e hidrofobicidade para ZIKV-E

# aa	TMHMM			<i>ProtScale</i> (Expasy)	
	Interna	Membrana	Externa	Hidrofobicidade	Transmembrana
445	0,028	0,005	0,967	0,467	0,069
446	0,028	0,006	0,965	0,000	-0,154
447	0,028	0,009	0,962	0,244	-0,091
448	0,028	0,015	0,957	0,878	0,336
449	0,028	0,017	0,955	1,233	0,577
450	0,028	0,020	0,953	0,300	-0,027
451	0,027	0,022	0,951	0,567	0,074
452	0,026	0,027	0,947	1,378	0,481
453	0,025	0,038	0,936	1,189	0,482
454	0,025	0,043	0,931	0,833	0,241
455	0,007	0,368	0,625	0,833	0,241
456	0,003	0,596	0,402	0,844	0,354
457	0,002	0,668	0,330	0,556	0,253
458	0,001	0,832	0,167	0,144	0,203
459	0,001	0,918	0,081	0,889	0,808

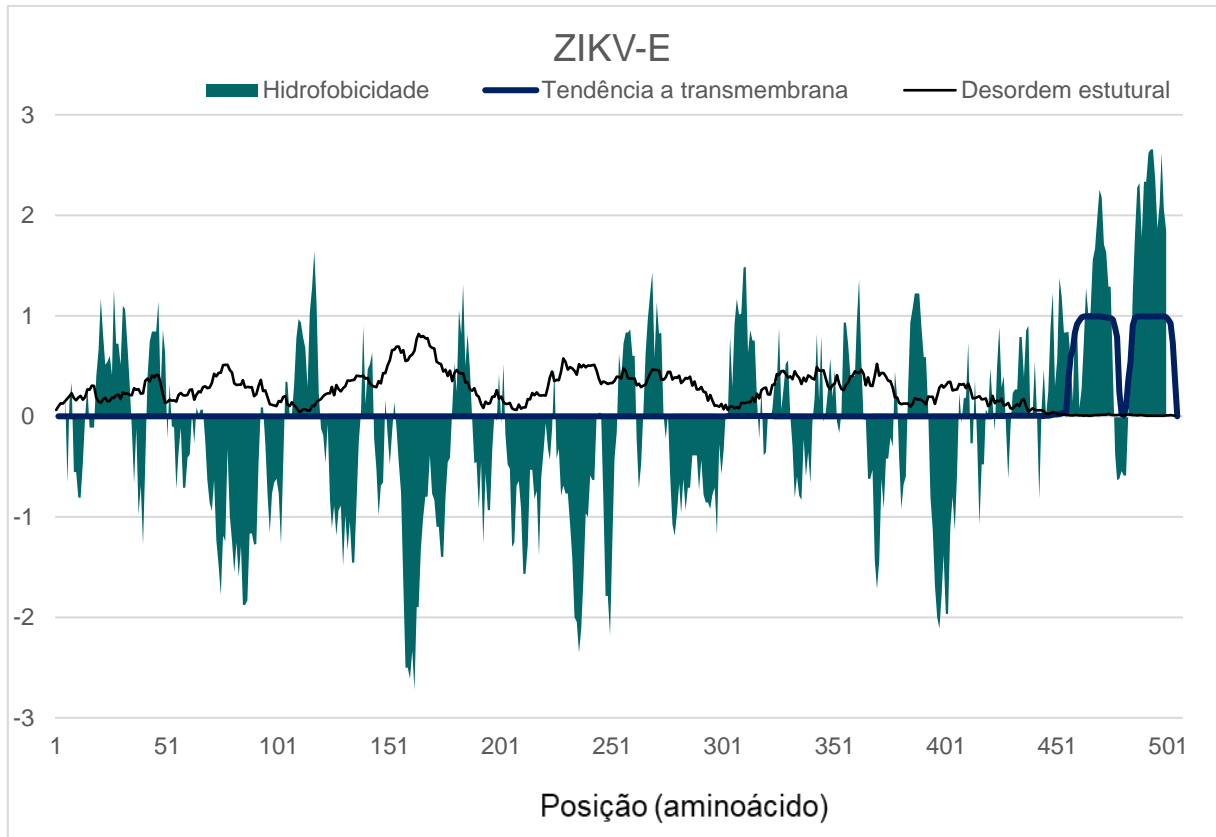


Figura 22 - Análise *in silico* de hidrofobicidade (*ProtScale*), tendência a porção transmembrana (TMHMM Server) e tendência a desordem estrutural (IUPRED) para a proteína ZIKV-E.

1 As previsões de tendência a desordem estrutural pelo IUPRED mostraram que
 2 as proteínas em estudo possuem desordem intermediária ao longo de suas estruturas
 3 (Figuras 20, 21 e 22). Neste tipo de análise, valores próximos a 1 indicam ausência
 4 de estrutura terciária ou uma maior linearidade. Moléculas lineares apresentam
 5 maiores chances de interação com anticorpos, e, portanto, melhor probabilidade de
 6 sucesso como ferramentas de diagnóstico.

7 Após a remoção das porções transmembrana, os genes foram códon-
 8 otimizados para uma melhor expressão em sistema procarioto. Como pode ser visto
 9 nas Figuras 23 e 24, a comparação entre as sequências antes e após a otimização
 10 revela que este processo não alterou as sequências de aminoácidos.

CHIKV-E1	YEHVTVIPNTVGVYPYKTLVNRPGYSPMVL E M E L L S V T L E P T L S L D Y I T C E Y K T V I P S P Y V
CHIKV-E1_otimizada_sem_TM	YEHVTVIPNTVGVYPYKTLVNRPGYSPMVL E M E L L S V T L E P T L S L D Y I T C E Y K T V I P S P Y V *****
CHIKV-E1	KCCGTAECKDKSLPDYSCKVFTGVYPFMWGGAYCFCDTENTQLSEAHVEKSESKTEFAS
CHIKV-E1_otimizada_sem_TM	KCCGTAECKDKSLPDYSCKVFTGVYPFMWGGAYCFCDTENTQLSEAHVEKSESKTEFAS *****
CHIKV-E1	AYRAHTASASAKLRVLYQGNNITVAAYANGDHAVTVKDAKFIVGPMSSAWTPFDNKIVVY
CHIKV-E1_otimizada_sem_TM	AYRAHTASASAKLRVLYQGNNITVAAYANGDHAVTVKDAKFIVGPMSSAWTPFDNKIVVY *****
CHIKV-E1	KGDVYNDYPPFAGRPGQFGDIQSRTPES EDVYANTQLVLQRPSAGTVHVPYSQAPSGF
CHIKV-E1_otimizada_sem_TM	KGDVYNDYPPFAGRPGQFGDIQSRTPES EDVYANTQLVLQRPSAGTVHVPYSQAPSGF *****
CHIKV-E1	KYWLKERGASLQHTAPFGCQIATNPVRAMNCAVGNMPSIDIPDAAFTRVVDAPSLTDM
CHIKV-E1_otimizada_sem_TM	KYWLKERGASLQHTAPFGCQIATNPVRAMNCAVGNMPSIDIPDAAFTRVVDAPSLTDM *****
CHIKV-E1	CEVSACTHSSDFGGVAIIKYYAASKK GKCAVHSM TNAV T I R E A E I E V E G N S Q L Q I S F S T A L
CHIKV-E1_otimizada_sem_TM	CEVSACTHSSDFGGVAIIKYYAASKK GKCAVHSM TNAV T I R E A E I E V E G N S Q L Q I S F S T A L *****
CHIKV-E1	ASAEFRVQVCSTQVHCAA ECHPPKD H I V N Y P A S H T T L G V Q D I S A T A M S W V Q K I T G G V G L V
CHIKV-E1_otimizada_sem_TM	ASAEFRVQVCSTQVHCAA ECHPPKD H I V N Y P A S H T T L G V Q D I S A T A M S W V Q K I ----- *****
CHIKV-E1	VAAALILIVL CVSFSRH
CHIKV-E1_otimizada_sem_TM	-----
CHIKV-E2	SIKDFNVYKATRPYLAHCPDCGEGHSCHSPVALERIRNEATDGT L K I Q V S L Q I G I K T D D
CHIKV-E2_otimizada_sem_TM	SIKDFNVYKATRPYLAHCPDCGEGHSCHSPVALERIRNEATDGT L K I Q V S L Q I G I K T D D *****
CHIKV-E2	SHDWTKLRYMDNHMPADAERAGLFVRTSAPCTITGTMGHFILARCPKGETLTVGFTDGRK
CHIKV-E2_otimizada_sem_TM	SHDWTKLRYMDNHMPADAERAGLFVRTSAPCTITGTMGHFILARCPKGETLTVGFTDGRK *****
CHIKV-E2	ISHSCTHPFHDPPIVIGREKFHSRPQHGRELPCSTYAQSTAATAEEIEVHMPPDTPDRTL
CHIKV-E2_otimizada_sem_TM	ISHSCTHPFHDPPIVIGREKFHSRPQHGRELPCSTYAQSTAATAEEIEVHMPPDTPDRTL *****
CHIKV-E2	MSQQSGNVKITVNSQTVRYKNCGDSEGLTTTDKVINNCKVDQCHAAVTNHKKWQYN
CHIKV-E2_otimizada_sem_TM	MSQQSGNVKITVNSQTVRYKNCGDSEGLTTTDKVINNCKVDQCHAAVTNHKKWQYN *****
CHIKV-E2	LVPRNAEFGRKGVHIFPLANVTCRVKARNPTVYGNQVIMLLYPDHTLLSYRNM
CHIKV-E2_otimizada_sem_TM	LVPRNAEFGRKGVHIFPLANVTCRVKARNPTVYGNQVIMLLYPDHTLLSYRNM *****
CHIKV-E2	GEEPNYQEEWTHKKEIRLTVPT E G L E V T W G N N E P Y K Y W P Q L S T N G T A H G H P H E I I L Y Y Y
CHIKV-E2_otimizada_sem_TM	GEEPNYQEEWTHKKEIRLTVPT E G L E V T W G N N E P Y K Y W P Q L S T N G T A H G H P H E I I L Y Y Y *****
CHIKV-E2	ELYPTMTAVLSVASFILLSMVGAVGMCARRRCITPYELTPGATVPFLLSLICIR
CHIKV-E2_otimizada_sem_TM	ELYP----- ****
CHIKV-E2	AKA
CHIKV-E2_otimizada_sem_TM	---

Figura 23 – Alinhamento, pelo Clustal Omega, comparando as sequências de CHIKV-E1 e CHIKV-E2 antes e após a otimização e remoção das porções transmembrana.


```

ZIKV-E          IRCIGVSNRDFVEGMSGGTWVDVLEHGGCVTVMAQDKPTVDIELVTTTVSNMAEVRSYC
ZIKV-E_otimizada_sem_TM  IRCIGVSNRDFVEGMSGGTWVDVLEHGGCVTVMAQDKPTVDIELVTTTVSNMAEVRSYC
*****

ZIKV-E          YEASISDMASDSRCPTQGEAYLDKQSDTQYVCKRTLVDRLGWNGCGFLFKGSLVTCAKFA
ZIKV-E_otimizada_sem_TM  YEASISDMASDSRCPTQGEAYLDKQSDTQYVCKRTLVDRLGWNGCGFLFKGSLVTCAKFA
*****

ZIKV-E          CSKMTGKSIQPENLEYRIMLSVHGSQHSQMIVNDTGHETDENRAKVEITPNSPRAEATL
ZIKV-E_otimizada_sem_TM  CSKMTGKSIQPENLEYRIMLSVHGSQHSQMIVNDTGHETDENRAKVEITPNSPRAEATL
*****

ZIKV-E          GFGSLGLDCEPRTGLDFSDLYLTMNKHVLVHKEWFHDIPLWHAGADTGTPHWNNKE
ZIKV-E_otimizada_sem_TM  GFGSLGLDCEPRTGLDFSDLYLTMNKHVLVHKEWFHDIPLWHAGADTGTPHWNNKE
*****

ZIKV-E          ALVEFKDAHAKRQTVVVLGSQEGAVHTALAGALEAEMDGAKGRLSSGHLKCRCLKMDKRLR
ZIKV-E_otimizada_sem_TM  ALVEFKDAHAKRQTVVVLGSQEGAVHTALAGALEAEMDGAKGRLSSGHLKCRCLKMDKRLR
*****

ZIKV-E          KGVSYSLCTAAFTFTKIPAETLHGTVTVEVQYAGTDGPCKVPAQMAVDMQTLTPVGRLLIT
ZIKV-E_otimizada_sem_TM  KGVSYSLCTAAFTFTKIPAETLHGTVTVEVQYAGTDGPCKVPAQMAVDMQTLTPVGRLLIT
*****

ZIKV-E          ANPVITESTENSKMMLELDPPFGDSYIVIGVGEKKITHHWHRSGSTIGKAFEATVRGAKR
ZIKV-E_otimizada_sem_TM  ANPVITESTENSKMMLELDPPFGDSYIVIGVGEKKITHHWHRSGSTIGKAFEATVRGAKR
*****

ZIKV-E          MAVLGDTAWDFGSVGGALNSLKGHIHQIFGAAFKSLFGGMSWFSQILIGTLLMWLGLNTK
ZIKV-E_otimizada_sem_TM  MAVLGDTAWDFGSVGGALNSLKGHIHQI-----
*****

ZIKV-E          NGSISLMCLALGGVLIFLSTAVSA
ZIKV-E_otimizada_sem_TM  -----

```

Figura 24 – Alinhamento, pelo Clustal Omega, comparando as sequências de ZIKV-E antes e após a otimização e remoção das porções transmembrana.

5.1.3. Análises físico-químicas e estruturais das proteínas construídas

- 1 As sequências finais das proteínas, sem domínios transmembrana e após a
- 2 inserção de seus respectivos genes nos sítios *NdeI* e *XhoI* são expostas a seguir, no
- 3 Quadro 5.

Quadro 5- Sequências finais das proteínas truncadas de CHIKV e ZIKV.**CHIKV-E1**

MYEHVTVIPNTVGVVYKTLVNRPGYSPMVLEMELLSVTLEPTLSLDYITCEYKTVI
 PSPYVKCCGTAECKDKSLPDYSCKVFTGVYPFMWGGAYCFCDTENTQLSEAHV
 EKSECKTEFASAYRAHTASASAKLRVLYQGNNITVAAYANGDHAVTVKDAKFIV
 GPMSSAWTPFDNKIVVYKGDVYNMDYPPFGAGRPGQFGDIQSRTPESEDVYAN
 TQLVLQRPSAGTVHVPYSQAPSGFKYWLKERGASLQHTAPFGCQIATNPVRAM
 NCAVGNMVISIDIPDAAFTRVVDAPSLTDMSCSEVSACTHSSDFGGVAIIKYAASKK
 GKCAVHSMTNAVITIREAEIEVEGNSQLQISFSTALASAEFRVQVCSTQVHCAAEC
 HPPKDHIVNYPASHTTLGVQDISATAMSWVQKILEHHHHHH

CHIKV-E2

MSIKDHFNVYKATRPYLAHCPDCGEGHSCHSVALERIRNEATDGTLKIQVSLQI
 GIKTDDSHDWTKLRYMDNHMPADAERAGLFVRTSAPCTITGTMGHFILARCPKG
 ETLTVGFTDGRKISHSCTHPFHHDPPVIGREKFHSRPQHGRELPCSTYAQSTAAT
 AEEIEVHMPPDTPDRTLMSQQSGNVKITVNSQTVRYKCNCGDSSEGLTTTDDKVI
 NNCKVDQCHAAVTNHKKWQYNSPLVPRNAEFGDRKGKVHIPPPLANVTCRVPK
 ARNPTVTYGNQVIMLLYPDHPTLLSYRNMGEEPNYQEEWVTHKKEIRLTVPTE
 GLEVTWGNNEPYKYWPQLSTNGTAHGHPHEIILYYYELYPLEHHHHHH

ZIKV-E

MIRCIGVSNRDFVEGMSGGTWVDVVLEHGGCVTVMAQDKPTVDIELVTTTTVSNM
 AEVRSYCYEASISDMASDSRCPTQGEAYLDKQSDTQYVCKRTLVDRGWGNGC
 GLFGKGSVLTCAKFACSKKMTGKSIQPENLEYRIMLSVHGSQHSQMIVNDTGHE
 TDENRAKVEITPNSPRAEATLGGFGSLGLDCEPRTGLDFSDLYLTMNNKHWLV
 HKEWFHDIPLPWHAGADTGTPHWNNKEALVEFKDAHAKRQTVVVLGSQEGAVH
 TALAGALEAEMDGAKGRLSSGHLKCRKMDKLRKLGVSYSLCTAAFTFTKIPAET
 LHGTVTVEVQYAGTDGPCKVPAQMAVDMQTLTPVGRRLITANPVITESTENSKMM
 LELDPPFGDSYIVIGVGEKKITHHWHRSGSTIGKAFEATVRGAKRMAVLGDTAWD
 FGSVGGALNSLGKGIHQILEHHHHHH

1 Para avaliar as propriedades físico-químicas de CHIKV-E1, CHIKV-E2 e ZIKV-
 2 E, utilizou-se a ferramenta ProtParam (ExPASy) capaz de estimar o peso molecular de
 3 cada proteína com base em sua sequência de aminoácidos. Como pode ser visto na
 4 Tabela 8, as proteínas possuem cerca de 46, 42 e 50 kDa, respectivamente.

Tabela 8 - Propriedades físico-química das proteínas construídas

	CHIKV-E1	CHIKV-E2	ZIKV-E
Número de aminoácidos	422	373	457
Peso Molecular (kDa)	46	42	50
Ponto isoelétrico (pI)	6,12	7,39	6,36

5 Os resultados das predições de estrutura secundária serão apresentados no
 6 tópico 5.1.4, a seguir, juntamente com as análises de predição de epítomos por se
 7 tratar do mesmo software utilizado.

8 Para predições da estrutura tridimensional utilizou-se a plataforma *I-Tasser*
 9 sendo selecionado, para cada proteína, o modelo de maior *C-score*, parâmetro que
 10 indica a qualidade do modelo predito. Valores de *C-score* giram em torno de -5 a 2,
 11 sendo que valores mais elevados indicam maior confiabilidade. Os valores
 12 encontrados para CHIKV-E1, CHIKV-E2 e ZIKV-E, foram 1,23, 0,89 e 1,73,
 13 respectivamente, indicando um bom resultado nos três casos. Os modelos estão
 14 representados nas Figuras 25.A, 26.A e 27.A.

15 Em seguida, o modelo gerado pelo *I-Tasser* foi validado utilizando os
 16 programas *ProSA-web* e *RAMPAGE*. No primeiro caso, o *Z-score* indica a qualidade
 17 geral da estrutura tridimensional. Seu valor é exibido em um gráfico que contém os *Z-*
 18 *scores* de todas as cadeias de proteínas determinadas experimentalmente (por raio-
 19 X ou RMN) no PDB. As análises pelo *ProSA-web*, indicaram que os três modelos estão
 20 dentro da gama de pontuação tipicamente encontrada para proteína nativas de
 21 tamanhos similares (Figuras 25.B, 26.B e 27.B), com um *Z-score* de -6,46, -6,71 e -
 22 7,52 para CHIKV-E1, CHIKV-E2 e ZIKV-E, respectivamente.

1 Para o modelo de CHIKV-E1, o gráfico de Ramachandran obtido pelo
 2 *RAMPAGE* apresentou 85,7% de resíduos na região favorável, 11,9% na região
 3 permitida e 2,4% na região não permitida (Figura 25.C). Para o modelo de CHIKV-E2,
 4 foram 80.9% de resíduos na região favorável, 13.2% na região permitida e 5,9% na
 5 região não permitida (Figura 26.C). Por fim, para o modelo de ZIKV-E, o gráfico
 6 apresentou 80,9% de resíduos na região favorável, 14,3% na região permitida e 4.8%
 7 na região não permitida (Figura 27.C).

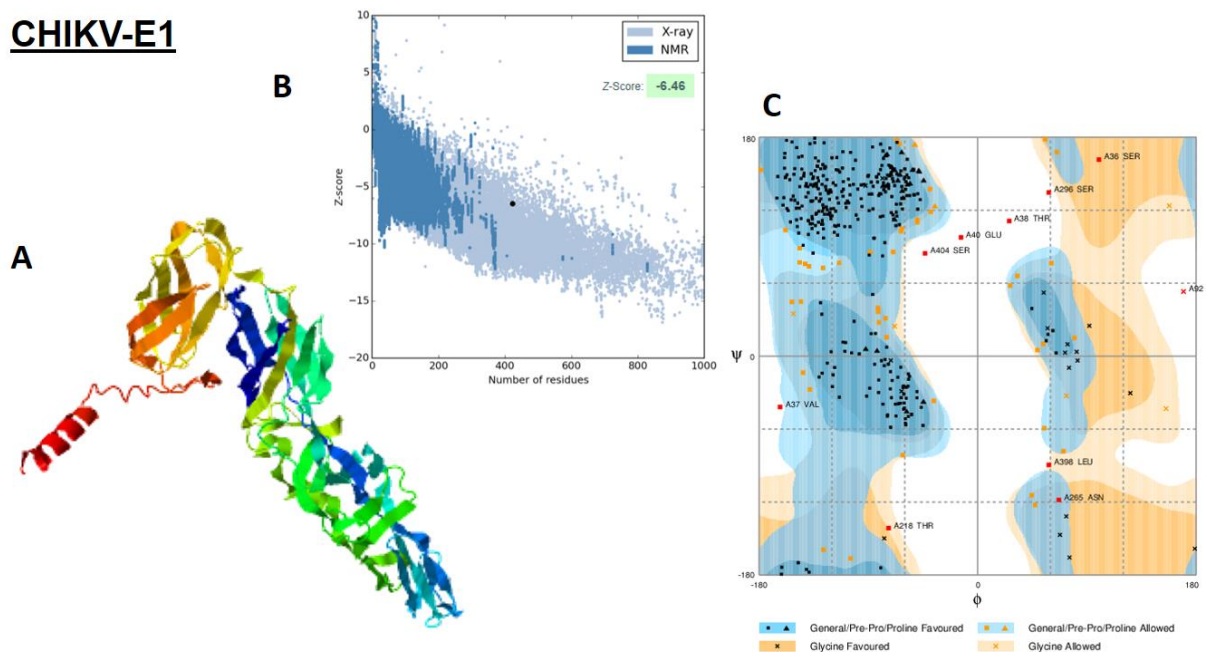


Figura 25 - Predição da estrutura tridimensional para CHIKV-E1. **A**: Representação em *cartoon* do modelo com maior C-score obtido pelo programa *I-Tasser*, **B**: Gráfico gerado pelo programa *ProSA-web* que representa a qualidade geral da predição, comparando o *Z-score* do modelo ao *Z-score* de proteínas depositadas no PDB. Grupos de estruturas obtidas por diferentes fontes (raio-X, RMN) são distinguidas por cores diferentes. **C**: Diagrama de Ramachandran gerado pelo *RAMPAGE*, em que resíduos que se encontram em regiões consideradas favoráveis, permitidas e não permitidas são representados por ícones pretos, amarelos e vermelhos, respectivamente.

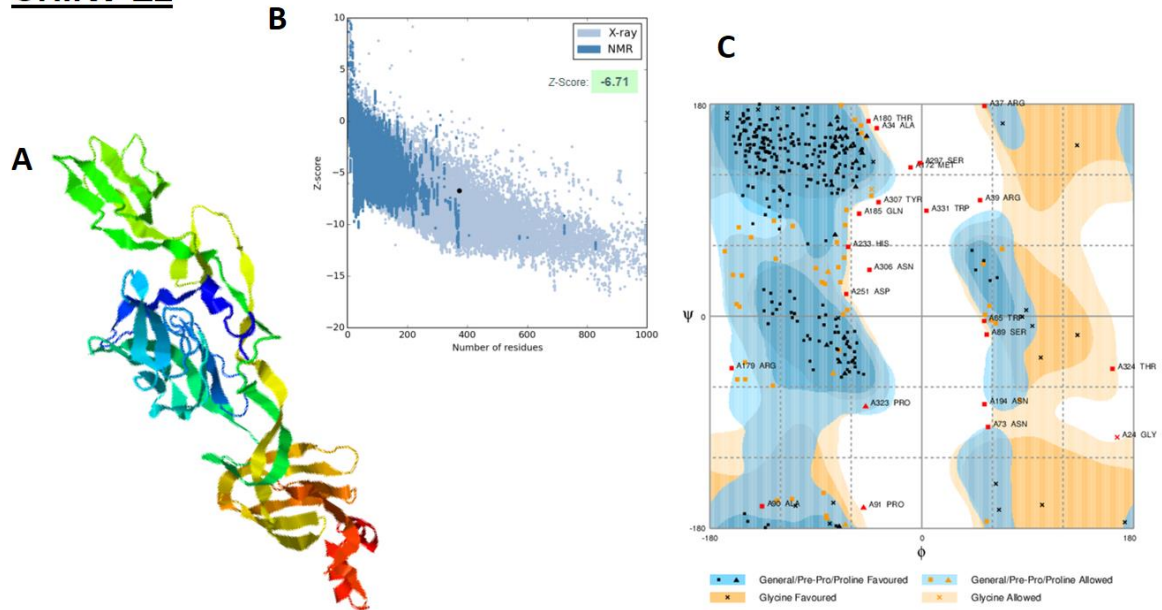
CHIKV-E2

Figura 26- Predição da estrutura tridimensional para CHIKV-E2. **A:** Representação em cartoon do modelo com maior C-score obtido pelo programa I-Tasser, **B:** Gráfico gerado pelo programa ProSA-web. **C:** Diagrama de Ramachandran gerado pelo RAMPAGE.

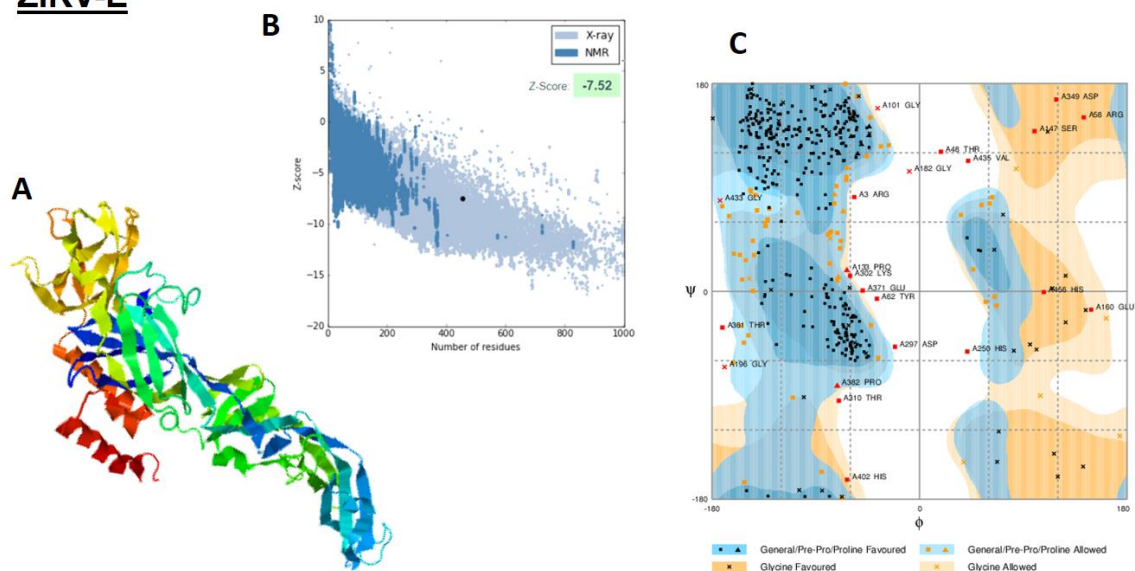
ZIKV-E

Figura 27 - Predição da estrutura tridimensional para ZIKV-E. **A:** Representação em cartoon do modelo com maior C-score obtido pelo programa I-Tasser, **B:** Gráfico gerado pelo programa ProSA-web. **C:** Diagrama de Ramachandran gerado pelo RAMPAGE.



Figura 29 - Análise das sequências para CHIKV-E1 e CHIKV-E2 pelo BepiPred-2.0 com threshold de 0,35. Regiões assinaladas com “E” indicam predições de epítomos enquanto “.” indicam regiões consideradas improváveis. Predição de estrutura secundária: *Helix* (H - gradiente rosa), *Sheet* (E – gradiente azul) e *Coil* (gradiente laranja) pelo NetsurfP.

5.2. Fase II: Produção das proteínas recombinantes

5.2.1. Digestão dos plasmídeos com enzimas de restrição

1 Após a transformação de células XL10 para o estoque dos plasmídeos
 2 contendo os genes de interesse foi feita uma extração de DNA plasmidial dos clones
 3 que cresceram em meio seletivo. Em sequência, foi realizada uma digestão dupla com
 4 as enzimas *Xba*I e *Xho*I. As reações liberaram fragmentos lineares de tamanhos
 5 esperados (em torno de 1284, 1137 e 1389 pb para CHIKV-E1, CHIKV-E2 e ZIKV-E
 6 respectivamente) (Figura 30).

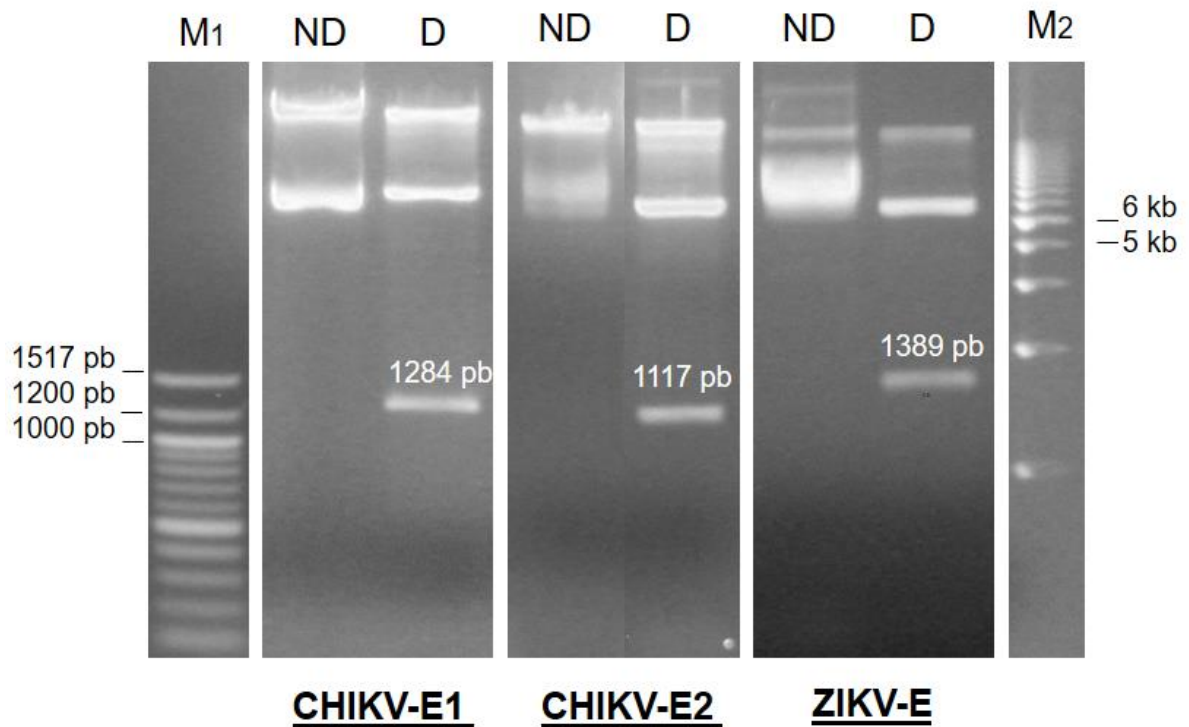


Figura 30 - Análise eletroforética em gel de agarose 1,0% dos produtos da digestão utilizando as enzimas *Xba*I e *Xho*I após extração de DNA plasmidial para a confirmação da presença dos genes de interesse no vetor pET-21a. M₁= Marcador de peso molecular 100 pb, ND= plasmídeo não digerido, D= plasmídeo digerido e M₂= Marcador de peso molecular 1 Kb.

5.2.2. Padronização da expressão das proteínas

1 No teste inicial (37°C, 5h, 1mM IPTG) as proteínas ZIKV-E e CHIKV-E2
2 apresentaram banda diferencial entre as frações induzidas (I) quando comparadas às
3 frações não induzidas (NI) (Figuras 31 e 32). O mesmo não foi possível observar para
4 a proteína CHIKV-E1 (dados não mostrados), sendo necessário testar sua expressão
5 em outras condições. Tentativas de expressão em linhagens Artic e C41 também não
6 apresentaram resultados satisfatórios. Devido à ausência de agitador a temperaturas
7 inferiores a 37 °C no LVBA, clones BL21-CHIKV-E1 foram levados ao CT vacinas
8 onde esta proteína foi induzida e purificada com sucesso.

9 Ao final das padronizações, para ZIKV-E foi escolhido o tempo de 3h, a 37°C,
10 1mM de IPTG (Figura 31), para CHIKV-E2 uma melhor indução foi observada após
11 4h, a 37°C e 2 mM de IPTG (Figura 32), enquanto para CHIKV-E1, uma melhor
12 indução foi observada em condições *overnight* a 25°C e 0,5 mM de IPTG (Figura 33).
13 As proteínas CHIKV-E1, CHIKV-E2 e ZIKV-E apresentaram peso molecular esperado
14 conforme o predito pelo ProtParam (Expasy) de 42 kDa (CHIKV-E2), 46 kDa (CHIKV-
15 E1), e 50 kDa (ZIKV-E).

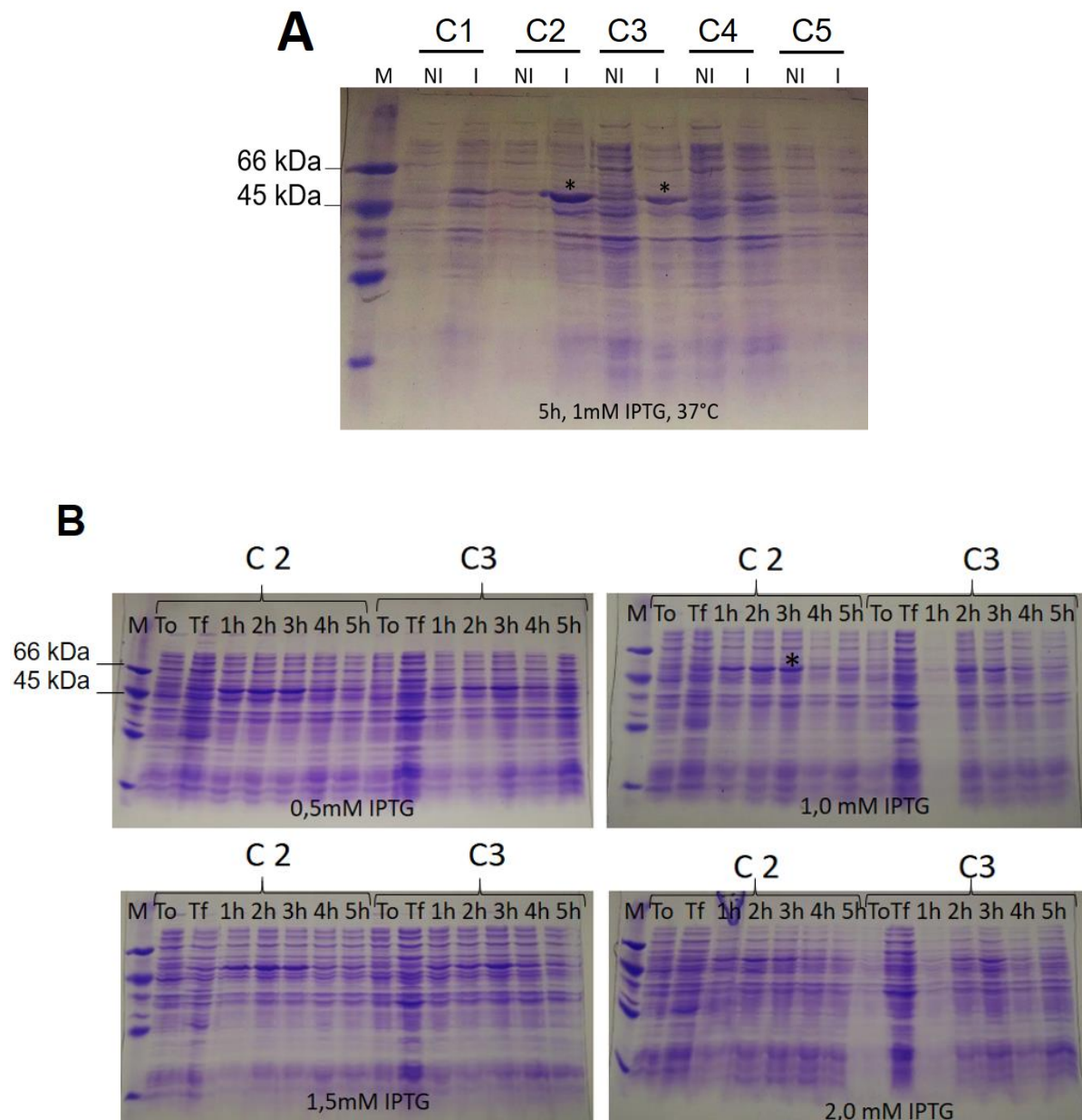


Figura 31 -Padronização da indução de ZIKV-E (50 kDa). **A:** Primeira etapa da padronização: triagem inicial de 5 clones (C1-C5). NI= fração não induzida e I = fração induzida com 1mM de IPTG. **B:** Segunda etapa da padronização: variação do tempo de indução e concentração de IPTG, comparando os clones selecionados da etapa anterior (C2 e C3) M= Marcador de peso molecular, T0= Fração não induzida coletada no tempo inicial (após DO ideal), Tf = Fração não induzida coletada no tempo final (após 5h), e frações induzidas após 1, 2, 3, 4 e 5 h. O “*” indica os clones/condições selecionados para a próxima etapa.

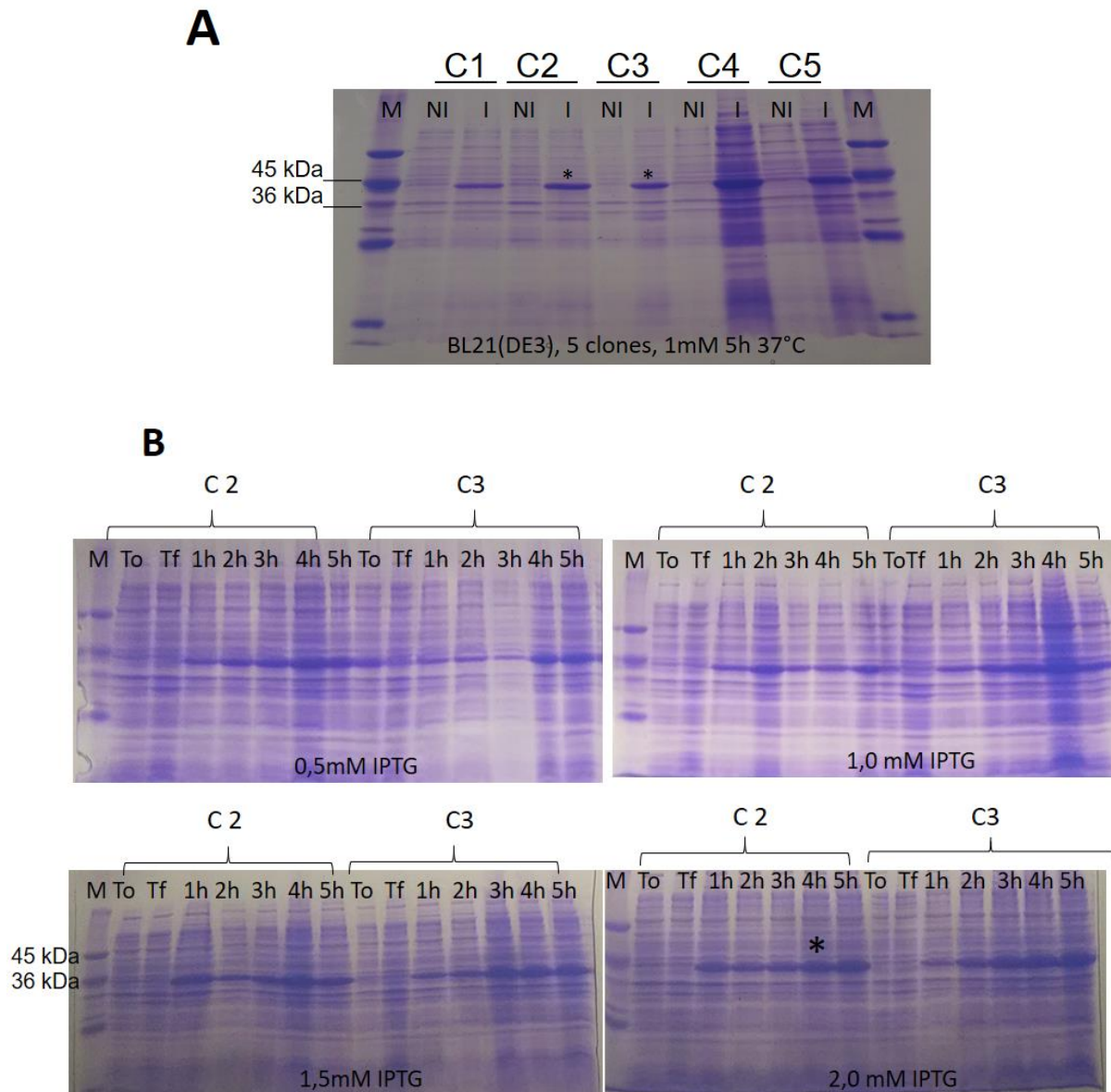


Figura 32 - Padronização da indução de CHIKV-E2(42 kDa). **A:** Primeira etapa da padronização: triagem inicial de 5 clones (C1-C5). NI= fração não induzida e I = fração induzida com 1mM de IPTG. **B:** Segunda etapa da padronização: variação do tempo de indução e concentração de IPTG, comparando os clones selecionados da etapa anterior (C2 e C3) M= Marcador de peso molecular, T0= Fração não induzida coletada no tempo inicial (após DO ideal), Tf = Fração não induzida coletada no tempo final (após 5h), e frações induzidas após 1, 2, 3, 4 e 5 h. O "*" indica os clones/condições selecionados para a próxima etapa.

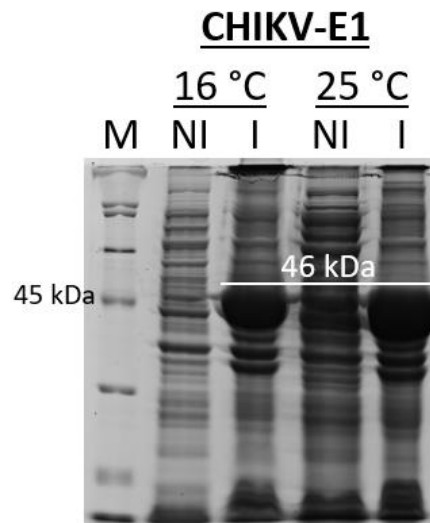


Figura 33 - Padronização da indução de CHIKV-E1 (46 kDa). M= Marcador de peso molecular, NI= fração não induzida e I = fração induzida com 0,5 mM de IPTG.

- 1 Para a proteína CHIKV-E1, como protocolo padrão do CT vacinas, foi realizado
- 2 ainda um teste de solubilidade em ureia, variando-se e as concentrações de 2, 4, 6 e
- 3 8 M. Como pode ser visto na Figura 34, a partir de 6 M de ureia já foi possível obter
- 4 grande parte da proteína em fração solúvel, sendo esta concentração a escolhida para
- 5 prosseguir com os experimentos.

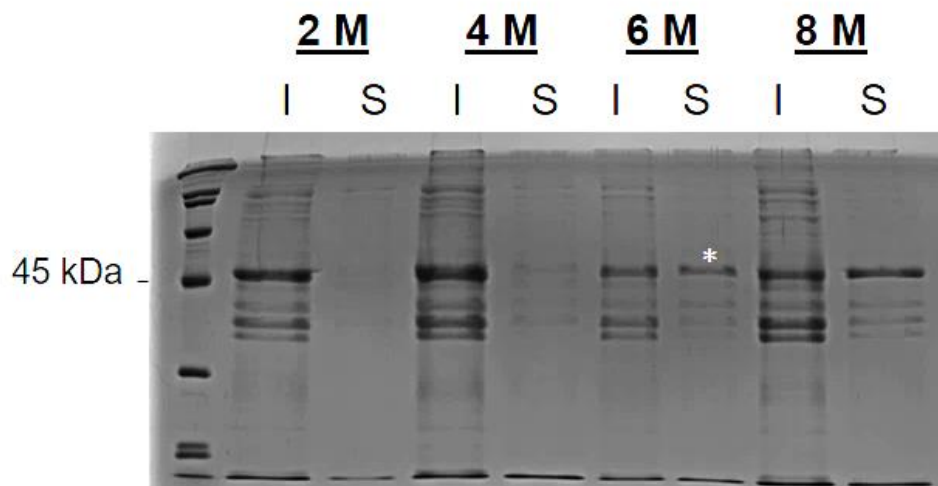


Figura 34 - Teste de solubilidade da proteína CHIKV-E1 em ureia (2, 4, 6 e 8M). I= Fração insolúvel e S= Fração solúvel.

5.2.3. Purificação das proteínas produzidas

1 Após a produção em larga escala, as culturas foram centrifugadas e o
 2 sedimento celular foi ressuspendido em tampão com ureia (8 M para ZIKV-E e CHIV-
 3 E2 e 6M para CHIKV-E1). Estas amostras foram submetidas a purificação por
 4 cromatografia de afinidade em coluna HisTrap no aparelho ÄKTA Prime Plus (GE
 5 Healthcare Life Sciences). Para examinar a qualidade da purificação, as frações
 6 purificadas foram submetidas a fracionamento em SDS-PAGE (Figuras 35, 36 e 37).

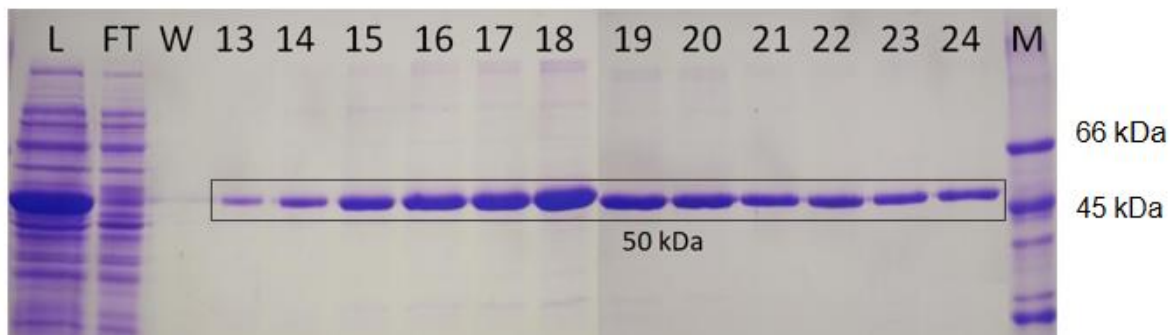


Figura 35 - Purificação de ZIKV-E, L: Extrato após a lise, FT: Fração não adsorvida, W: Lavagem, 13-24: Frações da eluição, M: Marcador de peso molecular

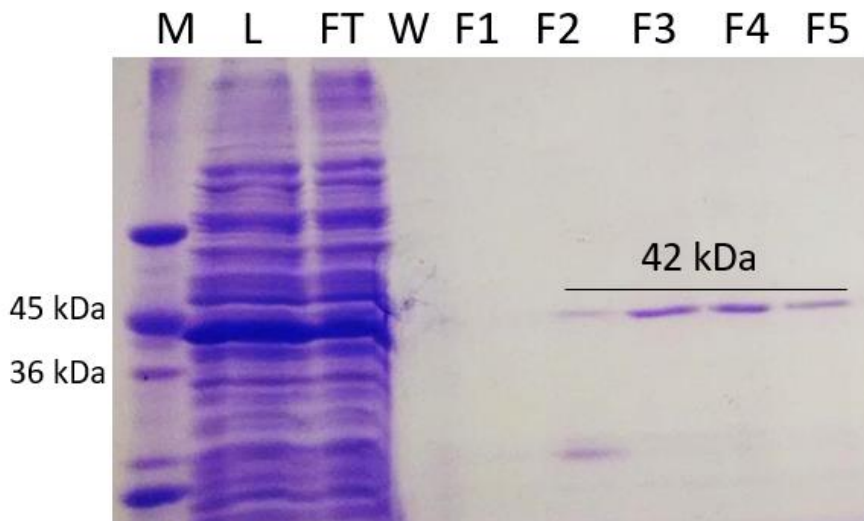


Figura 36 - Purificação de CHIKV-E2. M: Marcador de peso molecular, L: Extrato após a lise, FT: Fração não adsorvida, W: Lavagem, F1-F5: Frações da eluição.

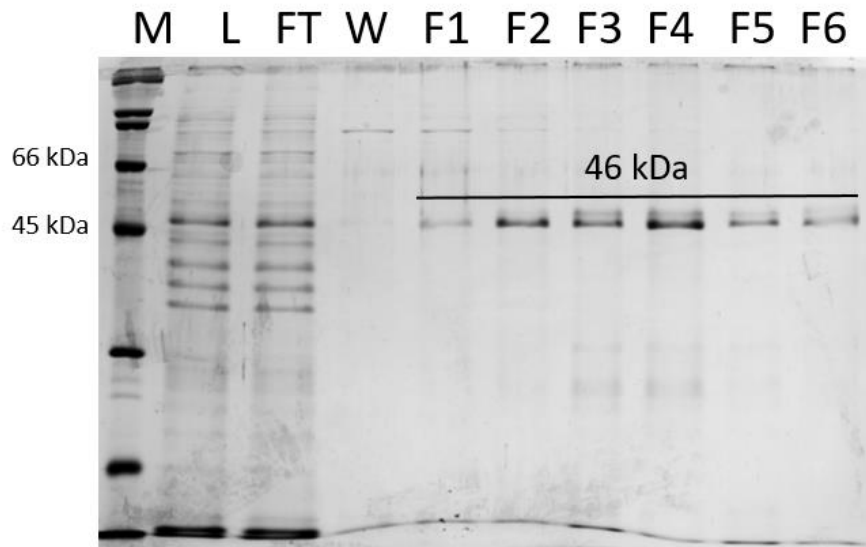


Figura 37 - Purificação de CHIKV-E1. M: Marcador de peso molecular, L: Extrato após a lise, FT: Fração não adsorvida, W: Lavagem, F1-F5: Frações da eluição.

- 1 Após a purificação, as concentrações proteicas das frações de maior
- 2 intensidade foram dosadas pelo método 2D Quant Kit (GE Healthcare Life Sciences)
- 3 e selecionadas para a utilização nos ensaios de ELISA. Os resultados obtidos foram
- 4 100 ng/ μ L para CHIKV-E1, 24 ng/ μ L para CHIKV-E2 e 110ng/ μ L para ZIKV-E.

5.3. Fase III- Verificação da antigenicidade das proteínas produzidas

5.3.1. Western-Blot

- 5 Na primeira etapa de verificação da antigenicidade das proteínas, foram
- 6 realizados ensaios de western-blot utilizando soros de camundongos infectados com
- 7 os vírus ZIKV e CHIKV. Além dos soros, as três proteínas reagiram com o anticorpo
- 8 comercial anti-histidina e ZIKV-E também foi capaz de detectar o anticorpo
- 9 monoclonal 4G2, específico para flavivírus (Figuras 38, 39 e 40).

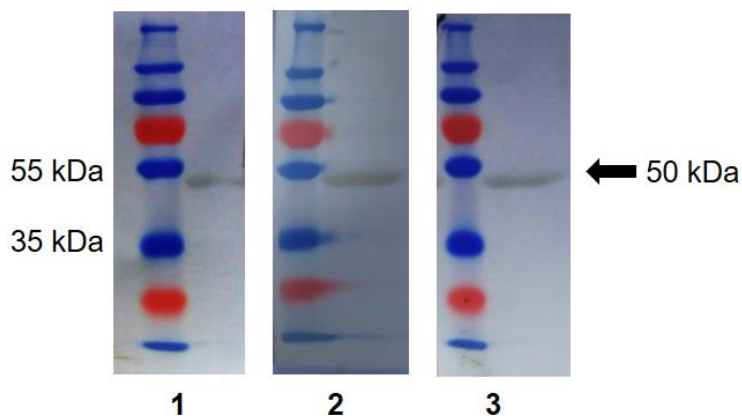


Figura 38 -Western-blot mostrando a reação entre a proteína ZIKV-E e os anticorpos comerciais Anti-His (1) e Panflavi 4G2 A5 (2) e pool de soros de camundongos infectados por ZIKV (3).

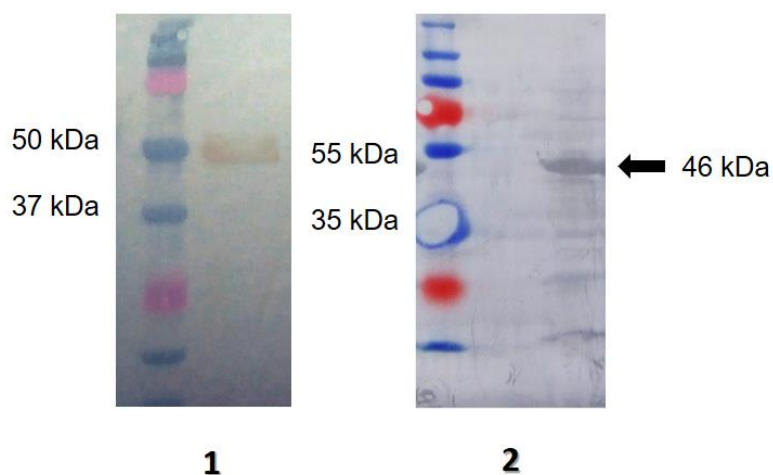


Figura 39 - Western-blot mostrando a reação entre a proteína CHIKV-E1 e o anticorpo comercial Anti-His (1) - [Marcador Precision Plus Protein Dual Color Standards (Biorad) corado com DAB e cloranaphtol] e pool de soros de camundongos infectados por CHIKV (2) – [Marcador PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) corado com Luminata (Millipore)]. Neste último caso, utilizou-se o extrato bruto.

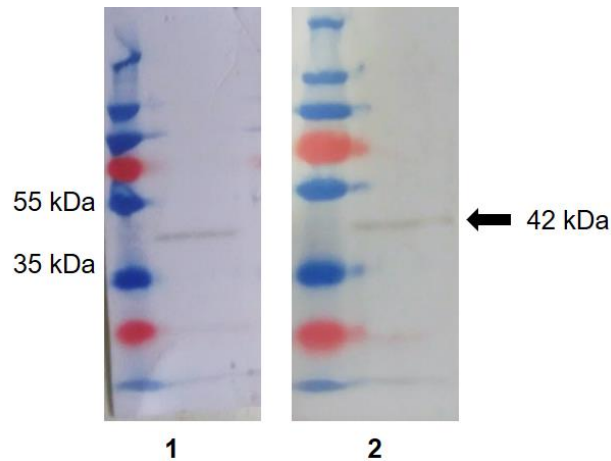


Figura 40 - Western-blot mostrando a reação entre a proteína CHIKV-E2 e o anticorpo comercial Anti-His (1) e pool de soros de camundongos infectados por CHIKV (2).

5.3.2. ELISA

1 As proteínas recombinantes CHIKV-E1, CHIKV-E2 e ZIKV-E foram purificadas
 2 por cromatografia de afinidade e utilizadas como antígenos em experimentos de
 3 ELISA para avaliar sua reatividade contra soro de pacientes.

4 As proteínas ZIKV-E e CHIKV-E1 foram tituladas com soros positivos e
 5 negativos para determinar uma melhor concentração da proteína por poço (Figura 41).
 6 Optou-se por trabalhar com as concentrações de 250ng/poço para a proteína CHIKV-
 7 E1 enquanto que para ZIKV-E, foi escolhida a concentração de 400 ng/poço. Como
 8 havia pouca proteína CHIKV-E2, ela não foi titulada e, pela sua quantificação, ela
 9 estava menos concentrada que as demais. Logo, optou-se por aplicar 500ng/poço
 10 para CHIKV-E2. Para os três casos, optou-se pela diluição dos soros de 1:100.

11 Uma primeira análise para avaliar o desempenho dos antígenos produzidos é
 12 comparar a média das absorbâncias para as amostras caracterizadas como positivas
 13 com a média das absorbâncias para as amostras caracterizadas como negativas e
 14 avaliar a razão entre elas, para verificar, no geral quão bem este antígeno distingue
 15 as amostras. Como pode ser visto na Figura 42, as proteínas CHIKV-E1 e CHIKV-E2
 16 apresentam uma razão satisfatória (razão 3,65 e 2, 51, respectivamente) ao passo
 17 que ZIKV-E não foi capaz de distinguir bem as amostras positivas e negativas (razão
 18 1,04).

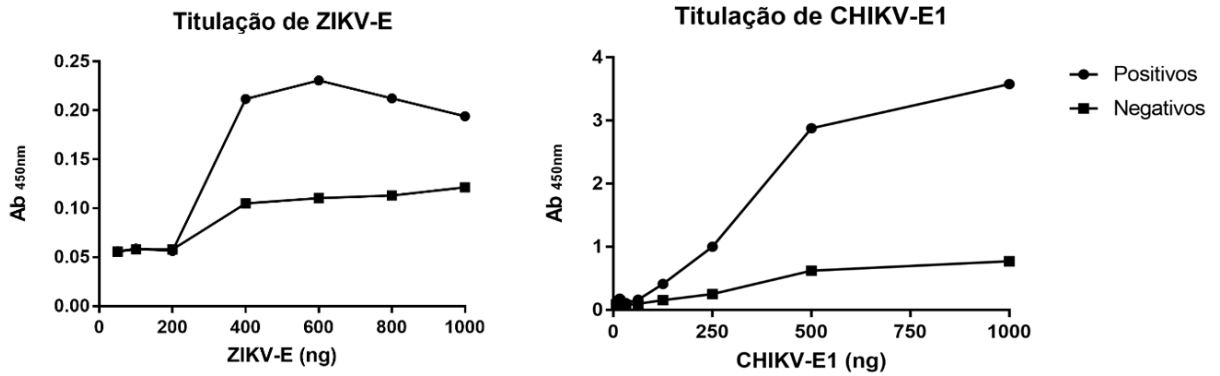


Figura 41 - Curvas de titulação dos antígenos ZIKV-E (IgM) e CHIKV-E1(IgG) com soros positivos e negativos (diluição 1:100).

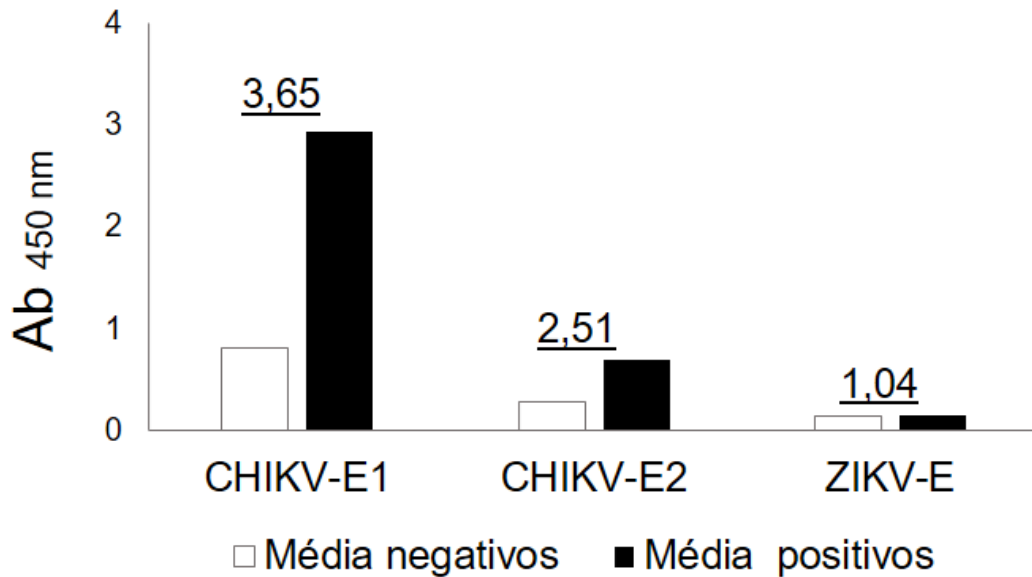


Figura 42 - Média das absorvâncias obtidas nos testes de ELISA comparando os resultados obtidos testando-se a antigenicidade das proteínas produzidas com soros de pacientes positivos e negativos. A razão (média positivos/ média negativos) para cada proteína é destacada em cada caso.

1 Os resultados dos ELISAs podem ser encontrados na Tabela 9 e a reatividade
 2 dos três antígenos recombinantes contra os soros analisados além de suas
 3 respectivas curvas ROC utilizadas na definição do valor *cutoff* estão representadas
 4 nas Figuras 43, 44 e 45).

Tabela 9- Resultado dos ELISAs utilizando as proteínas recombinantes.

		Resultado dos ELISAs								
		ZIKV-E			CHIKV-E1			CHIKV-E2		
		+	-	Total	+	-	Total	+	-	Total
Soros	Positivos	28	8	36	15	0	15	28	6	34
	Negativos	18	14	32	1	16	17	6	19	25
Total		46	22	68	16	16	32	34	25	59

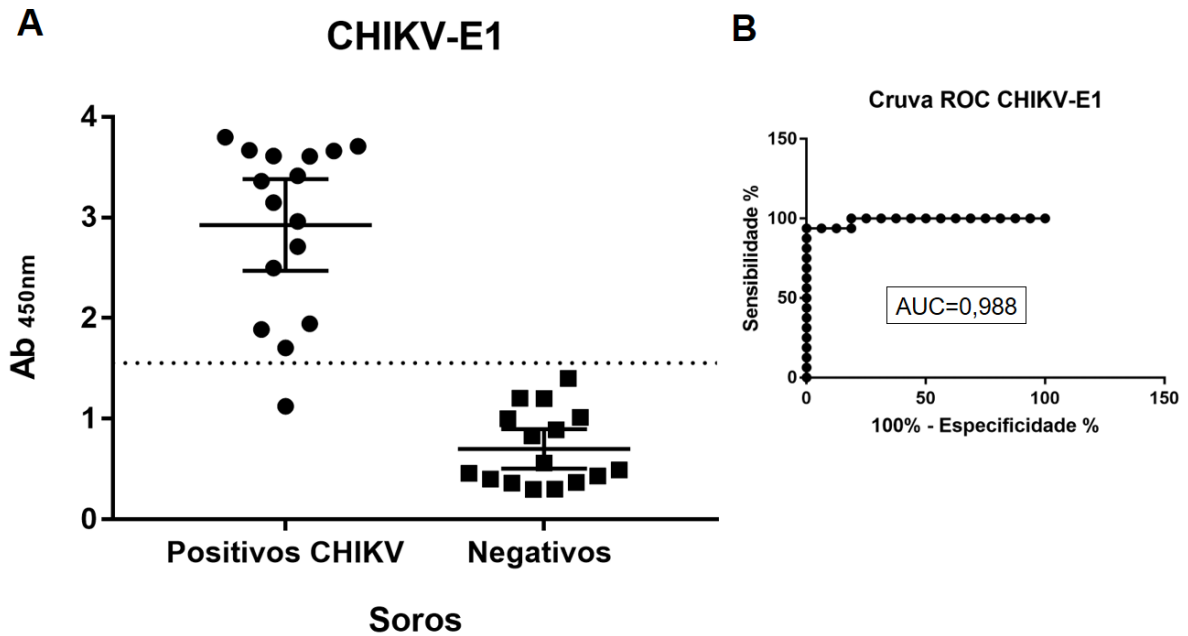


Figura 43 - Resultados dos ELISAs (IgG) de CHIKV-E1 para os antígenos (A) e suas respectivas curvas ROC (B). Em A, a linha pontilhada corresponde ao ponto de corte (*cutoff*) do experimento, determinado com base na curva ROC de cada proteína. Em B, AUC= área sob a curva ROC.

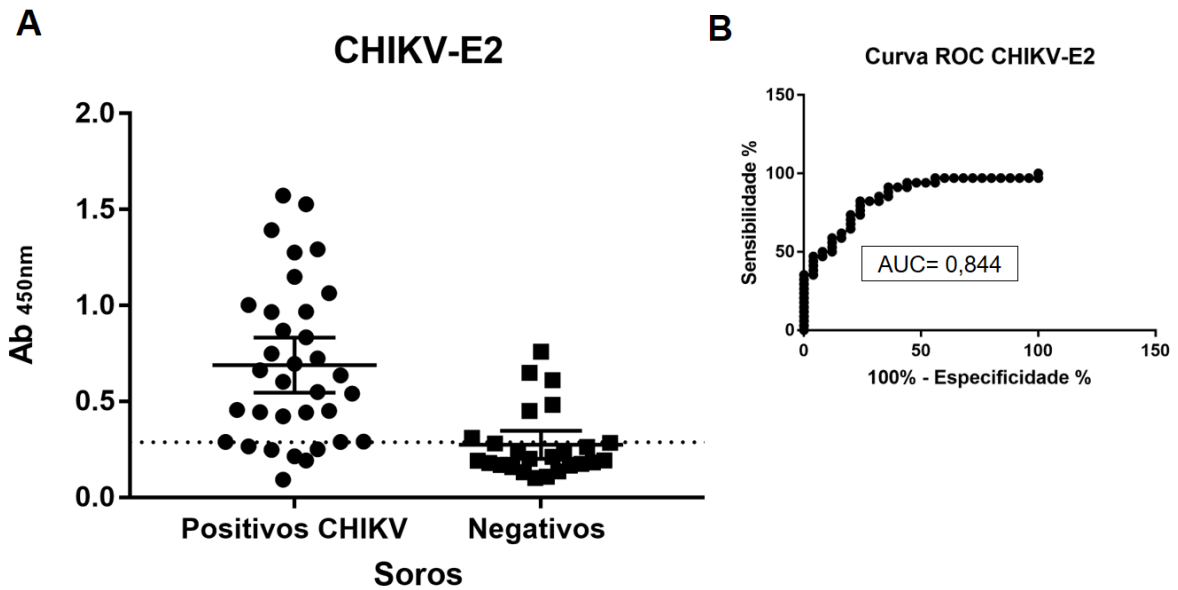


Figura 44 - Resultados dos ELISAS (IgG) de CHIKV-E2 para os antígenos (A) e suas respectivas curvas ROC (B). Em A, a linha pontilhada corresponde ao ponto de corte (cutoff) do experimento, determinado com base na curva ROC de cada proteína. Em B, AUC= área sob a curva ROC.

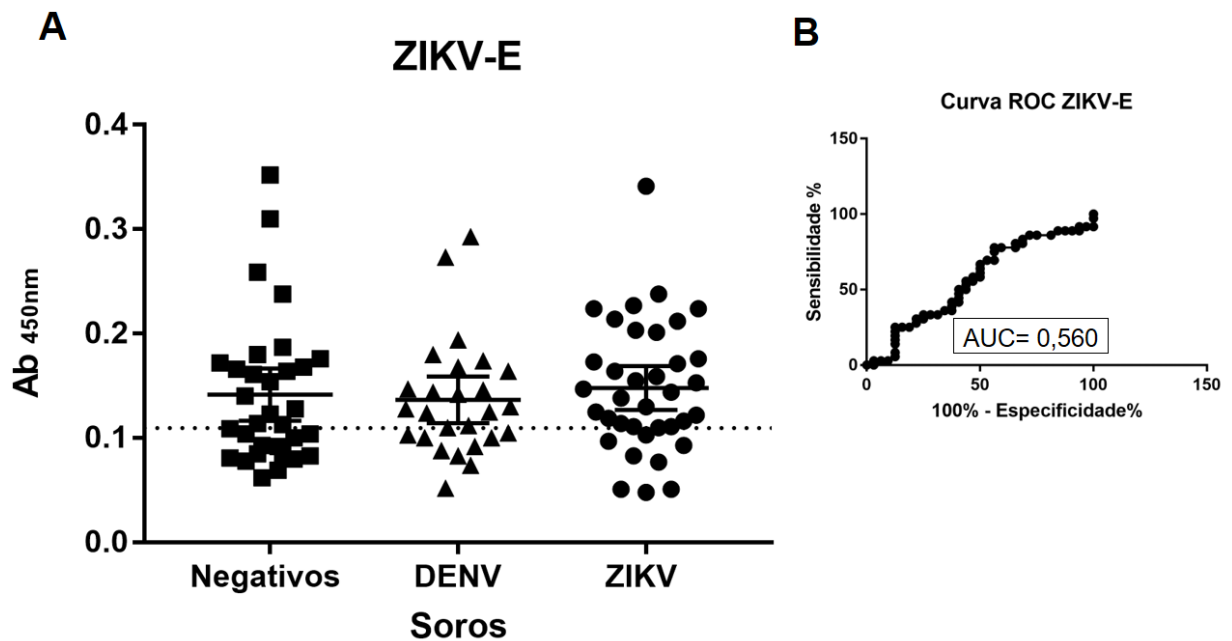


Figura 45 - Resultados do ELISA (IgM) para ZIKV (A) e sua curva ROC (B). Em A, a linha pontilhada corresponde ao ponto de corte (cutoff) do experimento, determinado com base na curva ROC de cada proteína. Em B, AUC= área sob a curva ROC.

- 1 O desempenho das proteínas recombinantes no ELISA foi avaliado ainda com
- 2 base nos parâmetros sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo

1 (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia (AC) e os resultados estão
 2 sumarizados na Tabela 10.

Tabela 10 - Resultados dos parâmetros utilizados para a avaliação do desempenho das proteínas produzidas em teste ELISA.

Antígeno	<i>Cutoff</i>	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)	AC (%)
ZIKV-E	0,110	78	44	36	47	62
CHIKV-E1	1,555	94	100	94	100	97
CHIKV-E2	0,287	82	76	82	76	80

3 Dentre as três proteínas, CHIKV-E1 apresentou melhor desempenho, tanto
 4 pela avaliação de sua curva ROC (AUC=0,988, demonstrando alta exatidão do teste)
 5 (Figura 43) quanto pelos seus demais parâmetros (Tabela 10), apresentando 15 dos
 6 16 soros de pacientes infectados com *CHIKV* acima do valor de *cutoff*, conferindo a
 7 este antígeno uma sensibilidade de 95%. Nenhum dos soros negativos testados com
 8 esta proteína apresentaram reatividade acima do *cutoff*, indicando uma especificidade
 9 de 100 %. O VPP encontrado foi de 94%, enquanto o VPN foi de 100% e a acurácia
 10 do teste foi de 97%.

11 A proteína CHIKV-E2 apresentou uma boa curva ROC (AUC= 0,844)
 12 indicando um desempenho satisfatório no teste (Figura 44). O resultado do ELISA
 13 para esta proteína indicou 28 dos 34 soros de pacientes infectados acima do valor de
 14 *cutoff*, conferindo a este antígeno uma sensibilidade de 82%. Dentre os 25 soros
 15 negativos testados, 6 apresentaram reatividade acima do *cutoff*, indicando uma
 16 especificidade de 76 % para esta proteína. O VPP encontrado foi de 82%, enquanto
 17 o VPN foi de 76%. Portanto, a acurácia do teste foi de 80%.

18 A proteína ZIKV-E apresentou resultado pouco satisfatório, com AUC = 0,560
 19 (ainda que maior que 0,5, ponto de corte para determinar se o teste é capaz de
 20 discriminar amostras positivas de negativas, este valor é inferior a 0,7, ponto que
 21 indica exatidão confiável do teste) (Figura 45). O ELISA de ZIKV-E apresentou 28 dos

1 36 soros de pacientes infectados com *ZIKV* acima do valor de *cutoff*, conferindo a este
2 antígeno uma sensibilidade de 76%. Dos 32 soros negativos testados com esta
3 proteína 18 apresentaram reatividade acima do *cutoff*, indicando uma especificidade
4 de 44%. O VPP encontrado foi de 36%, enquanto o VPN foi de 47% e a acurácia do
5 teste foi de 62%. Esta proteína apresentou alta reatividade cruzada quando testada
6 com soro de pacientes infectados com DENV, o que era esperado. Por esta razão,
7 em uma primeira análise, esta proteína não é um bom candidato ao sorodiagnóstico
8 da Febre Zika, uma vez que se objetiva a sua diferenciação da Dengue.

6. DISCUSSÃO

1 As arboviroses têm sido amplamente estudadas mundialmente, sendo motivo
2 de grande preocupação para os sistemas de saúde. O Brasil, um país onde as
3 condições ambientais favorecem a disseminação de seus vetores, tem presenciado o
4 ressurgimento de infecções como Dengue, Febre Amarela, Chikungunya e Zika,
5 sendo as duas últimas, temas deste projeto.

6 Ainda sem tratamento adequado, essas arboviroses trazem uma série de
7 preocupações. Alguns relatos de infecções por CHIKV apresentaram complicações
8 oculares, neurológicas e cardíacas podendo levar a danos permanentes ou até
9 mesmo óbito. No caso do ZIKV, as consequências mais graves envolvem a SCVZ,
10 que acomete fetos e lactentes, além de manifestações neurológicas em adultos, como
11 a GBS, mielite aguda e encefalite.

12 Dengue, Febre Amarela, Chikungunya e Zika não podem ser diferenciadas
13 clinicamente uma vez que há sobreposição de sinais e sintomas. Dessa forma, o
14 diagnóstico laboratorial é de suma importância, uma vez que as consequências a
15 longo prazo dessas infecções podem ser graves e requerem abordagens específicas.

16 O potencial de técnicas moleculares de detecção dessas infecções tem sido
17 amplamente abordado em estudos científicos e em procedimentos clínicos. Estes
18 métodos incluem o isolamento viral e técnicas de PCR, e são considerados como o
19 padrão ouro de diagnóstico. Entretanto, o uso destes métodos em países em
20 desenvolvimento ou em situações epidêmicas nem sempre é possível. Assim, os
21 métodos sorológicos, apesar de algumas limitações, ainda são uma alternativa
22 recorrente em casos de situações extremas.

23 O diagnóstico de arboviroses tem sido um desafio há décadas uma vez que a
24 detecção sorológica da infecção é comprometida pela reatividade cruzada dos
25 anticorpos induzidos por esses vírus. Para complicar ainda mais, as semelhanças
26 antigênicas entre os flavivírus também levam a respostas anamnésicas às infecções
27 primárias causadas por outro vírus da mesma família, bem como a resultados falso
28 positivos em decorrência de vacinações.

1 Com o advento da engenharia genética a partir da década de 70, presenciou-
2 se um avanço da biologia molecular impulsionando grandes pesquisas nesta área.
3 Desde então, estratégias de produção de proteínas recombinantes têm sido
4 amplamente utilizadas devido à simplicidade e produtividade (Yin *et. al.*, 2007).

5 Antígenos produzidos pela técnica do DNA recombinante tornaram-se uma
6 ferramenta poderosa para fins de diagnóstico e produção de vacinas. Esse sistema
7 de produção de proteínas heterólogas oferece inúmeras vantagens tais como
8 segurança, redução do custo de produção e possibilidade de manipulação genética.

9 A expressão de genes heterólogos em bactérias é comumente usada tanto
10 para fins comerciais como para pesquisa. A bactéria *E. coli* é o hospedeiro mais
11 comum para a produção de proteínas recombinantes, tendo como principal desafio
12 para a produção em larga escala, alcançar uma alta produtividade da proteína alvo
13 com qualidade considerável e elevada atividade biológica.

14 Neste trabalho, foi demonstrado o desenvolvimento e a avaliação de proteínas
15 com potencial para serem utilizadas na detecção de infecções por CHIKV e ZIKV.
16 Estudos *in silico* contribuíram consideravelmente para este projeto, sendo presente
17 desde as análises iniciais das sequências até a modelagem final dos genes.
18 Ferramentas como as análises de hidrofobicidade, remoção de porções
19 transmembrana e a otimização de códons, foram essenciais para o sucesso da
20 expressão dos genes em sistemas procariotos. Ensaio de predição de epítomos e
21 verificação do potencial antigênico deram suporte à seleção das proteínas a serem
22 desenvolvidas.

23 Genes para as proteínas de interesse, CHIKV-E1, CHIKV-E2 e ZIKV-E, foram
24 otimizados e subclonados em vetores pET-21a e utilizados para transformar células
25 de *E. coli* da linhagem BL21(DE3). Estes clones foram crescidos e induzidos à
26 expressão proteica por IPTG.

27 Estudos anteriores já relataram a expressão recombinante de genes dos vírus
28 Zika e Chikungunya. As proteínas do envelope desses vírus são amplamente
29 empregadas como alvos antigênicos. Cho e colaboradores (2008) relataram a
30 expressão em células de inseto (baculovírus) das proteínas E1 e E2 do CHIKV para

1 sorodiagnóstico por meio de ELISA de captura de IgM. Neste teste, as proteínas
2 recombinantes mostraram sensibilidade de 77,5% e 90% respectivamente, e a
3 especificidade para ambas foi de 100%. A linhagem BL21 (DE3) de *E. coli* também já
4 foi utilizada para expressar a proteína E2 recombinante do CHIKV, como descrito por
5 Tripathi e colaboradores (2014). Esta proteína foi posteriormente empregada em
6 ensaios de ELISA (IgM) apresentando sensibilidade de 92% e especificidade de
7 100%.

8 Proteínas do ZIKV também já foram expressas em sistemas procariotos e
9 eucariotos. Um estudo de Dai e colaboradores (2016), relata que o gene responsável
10 pelo ectodomínio da proteína E de ZIKV foi clonado no vetor pET21a com expressão
11 em *E. coli* BL21 (DE3). A proteína apresentou-se inicialmente insolúvel sendo
12 solubilizada com ureia para ser purificada a partir dos corpúsculos de inclusão. A
13 AMSBIO lançou dois novos antígenos recombinantes de ZIKV para a detecção de
14 anticorpos IgG/IgM. As proteínas recombinantes E e NS1 foram produzidas em células
15 de inseto (Sf9) (AMSBIO, 2016). Porém, o custo do produto é extremamente elevado.

16 Apesar de não apresentar conteúdo inovador, este projeto procura a
17 independência em relação as técnicas de obtenção de proteínas recombinantes, uma
18 vez que o custo das mesmas é alto no Brasil e ainda não há a produção comercial no
19 país.

20 Neste trabalho, foram seguidas as recomendações gerais para a expressão
21 heteróloga de genes em bactérias, que buscam o aumento da densidade celular com
22 o objetivo de melhorar a produção das proteínas recombinantes. Sistemas para a
23 obtenção de culturas bacterianas, especialmente em laboratórios que não possuem
24 fermentador, podem apresentar problemas, incluindo perda de plasmídeo,
25 disponibilidade limitada de oxigênio dissolvido e aumento nos níveis de dióxido de
26 carbono, provocando uma redução significativa do pH do meio. Esses problemas
27 geralmente causam uma produção menor de proteína ou mesmo ausência de
28 expressão. As medidas para resolver esses problemas envolveram a seleção de
29 colônias de alta taxa de expressão, otimização da temperatura, do tempo de
30 crescimento e da concentração do indutor.

1 Além disso, procedimentos para facilitar a expressão das proteínas em
2 sistema procaríoto, como a otimização de códons e a remoção de porções
3 transmembrana, foram realizados. Mesmo assim, uma proteína em questão, a CHIKV-
4 E1, apresentou algumas particularidades durante suas triagens de expressão. Após
5 algumas tentativas sem sucesso de indução a 37 °C dessa proteína, fez-se necessário
6 sua expressão *overnight*, a outras temperaturas.

7 Como afirmado por Ausubel (2003) a expressão de proteínas é uma ciência
8 inexata. As proteínas desenvolvidas neste projeto exibiram diferentes perfis de
9 expressão, sendo que, para cada uma, foi selecionada uma condição ideal. Como já
10 descrito na literatura, as condições de expressão bacteriana, parecem relacionar com
11 a natureza da proteína em questão (Sahdev *et al.*, 2008). Sendo assim, após as
12 padronizações, foi feita a produção em larga escala das proteínas que foram
13 submetidas à purificação.

14 A análise por SDS-PAGE mostrou um aumento pronunciado da expressão
15 das proteínas recombinantes ao se comparar o perfil de clones antes e após a
16 indução, indicando a eficiência do promotor utilizado. As três proteínas foram
17 purificadas com sucesso, apresentando o padrão de banda esperado.

18 As estratégias de purificação e detecção por western-blot exploraram
19 modificação das proteínas adquiridas por clonagem em pET-21a. Este vetor adicionou
20 uma cauda de histidina nas proteínas, permitindo sua purificação por afinidade em
21 colunas *HisTrap*. Estas colunas são pré-empacotadas com resina de sefarose
22 carregada com níquel, que se liga de forma eficiente aos resíduos de histidina em
23 condições adequadas providas pelo tampão. Além disso, os anticorpos His-tag, que
24 reconhecem as proteínas recombinantes marcadas com His, são comercialmente
25 disponíveis para estes ensaios. Portanto, a cauda de histidina fornece meios para
26 purificação e detecção precisas de proteínas recombinantes sem a necessidade de
27 anticorpos específicos.

28 Após a purificação, as proteínas foram submetidas a ensaios de western blot
29 e as três apresentaram reatividade contra anticorpos comerciais (anti-His para CHIKV-
30 E1, CHIKV-E2 e ZIKV-E e anti-flavivirus para ZIKV-E) e soros de camundongos
31 infectados, confirmando o potencial antigênico das mesmas. Estes resultados

1 permitem inferir que os passos anteriores foram bem-sucedidos e que objetivo
2 principal da pesquisa foi alcançado.

3 Vale ressaltar que a proposta inicial deste projeto não envolvia o uso das
4 proteínas produzidas em ensaios de ELISAS, devido a esperada reação cruzada entre
5 casos de Zika e Dengue. Os resultados deste ensaio para a proteína ZIKV-E, devido
6 à menor sensibilidade e especificidade, indicam que a mesma precisa ser melhor
7 caracterizada para o emprego em diagnósticos sorológicos. Seu potencial
8 demonstrado no ensaio de western blot, embora testado com soro de camundongos,
9 não condiz com os resultados obtidos no ELISA para soros humanos.

10 As proteínas recombinantes de CHIKV em estudo, ao serem testadas em
11 ELISA, foram capazes de discriminar significativamente os pacientes infectados dos
12 pacientes negativos (não infectados), sugerindo que são boas candidatas para uso
13 em sorodiagnóstico. Uma vez que a proteína CHIKV-E2 não foi titulada, acredita-se
14 que ela apresentou um resultado bastante favorável e que, com as padronizações
15 adequadas, é possível melhorar seu desempenho em testes de ELISA.

16 Em especial, a proteína CHIKV-E1, apresentou excelentes resultados para
17 todos os parâmetros analisados, superando a sensibilidade obtida por Cho (2008) de
18 77%, e de Yathi e colaboradores (2011) de 88%, com 94% de sensibilidade e 100%
19 de especificidade. Seu melhor desempenho pode estar relacionado ao fato desta
20 proteína ter sido solubilizada em um tampão com menor concentração de ureia (6M)
21 enquanto CHIKV-E2 e ZIKV-E estavam a 8M. Não obstante, nota-se que o valor de
22 *cutoff* para esta proteína se mostrou elevado, indicando que mais otimizações das
23 reações de ELISA são necessárias para que este valor seja diminuído.

24 Uma das principais prioridades da OMS para o desenvolvimento de kits de
25 diagnóstico são testes do tipo “multiplex” para os arbovírus que compartilham os
26 mesmos vetores (Bagozzi, 2016). A partir dessa consideração, as proteínas
27 desenvolvidas neste projeto, com as melhorias adequadas, poderão ser empregadas
28 na elaboração de um teste mais aperfeiçoado.

29 Os resultados apresentados nesta dissertação fazem parte de um projeto,
30 ainda em desenvolvimento, que envolve outros estudantes e pesquisadores, para a

1 geração um biossensor múltiplo, baseado em estruturas de nanobastões de ouro
2 (NBOs), capaz de detectar e diferenciar infecções por DENV, ZIKV e CHIKV.

3 Nosso grupo de pesquisa vem acumulando resultados importantes
4 envolvendo NBOs funcionalizados com proteínas recombinantes e peptídeos
5 sintéticos que podem ser considerados avanços na busca por novos candidatos
6 antigênicos para DENV e ZIKV. Trata-se de uma técnica que explora o fenômeno
7 denominado ressonância plasmônica de superfície, uma propriedade intrínseca dos
8 nanocompostos de ouro, capaz de detectar ligações de anticorpos específicos a
9 proteínas presentes na superfície dos NBOs. Uma vez que esta detecção é baseada
10 nas perturbações eletrônicas decorrentes da ligação do anticorpo às proteínas
11 aderidas ao ouro, o sistema tende a apresentar uma sensibilidade bem maior quando
12 comparado a testes convencionais, como o ELISA, sendo capaz de discriminar
13 anticorpos que reagem de forma cruzada nesses testes (Da Fonseca *et al.*, 2017).

14 Futuramente, as proteínas CHIKV-E1, CHIKV-E2 e ZIKV-E, desenvolvidas
15 neste projeto, serão empregadas na funcionalização de NBOs a fim de detectar
16 anticorpos específicos em soro de pacientes. Com isso, espera-se resultados mais
17 promissores, oferecendo maior sensibilidade e especificidade no reconhecimento das
18 ligações antígeno-anticorpo.

7. CONCLUSÃO

1 Neste estudo, foram produzidas três proteínas virais: CHIKV-E1 e CHIKV-E2 e
2 ZIKV-E. Essas proteínas foram estudadas *in silico* e adaptadas para a expressão
3 heteróloga em sistema procarioto. A linhagem BL21(DE3) de *E. coli* apresentou-se
4 como um veículo vantajoso para a expressão das proteínas de interesse devido ao
5 fácil manuseio e curto tempo de cultivo. Ainda que sob diferentes condições de
6 indução, ambas as proteínas foram expressas e purificadas de forma eficaz.

7 Considerando o propósito de utilizar as proteínas produzidas em ferramentas de
8 diagnóstico, foram realizados testes de western-blot testando-se soros de
9 camundongos infectados com os vírus CHIKV e ZIKV. As três proteínas foram
10 reativas, indicando capacidade de detectar anticorpos gerados após tais infecções
11 virais.

12 A avaliação da capacidade das proteínas produzidas de atuarem como
13 antígenos em ensaios de ELISA foi realizada utilizando soros de pacientes humanos.
14 Ainda que mais otimizações sejam necessárias para o emprego destas proteínas
15 neste tipo de ensaio, a capacidade antigênica de CHIKV-E1 apresentou grande
16 potencial para o diagnóstico sorológico da Febre Chikungunya.

8. PERSPECTIVAS

- Realizar as otimizações necessárias e validar o resultado dos ELISAs testando as três proteínas contra um banco de soros composto por um maior número de indivíduos.
- Validar por *immunoblotting* as proteínas recombinantes, CHIKV-E1, CHIKV-E2 e ZIKV-E, utilizando soros humanos.
- Identificar sequências, presentes nas proteínas estudadas, que não possuam similaridade com o proteoma de outros vírus, para gerar peptídeos e proteínas quiméricas com potencial de detectar, de forma específica, infecções por CHIKV e ZIKV.
- Utilizar as proteínas produzidas para funcionalizar nanobastões de ouro a fim de desenvolver um teste sorodiagnóstico múltiplo para arboviroses.

9. REFERÊNCIAS

- Ahmad S. S. Y., Amin, T. N., Ustianowski A. Zika virus: management of infection and risk Shazaad. *Bmj*, 17(10), 1304–9. 2016.
- Aliota, M. T., Peinado, S. A., Osorio, J. E., Bartholomay, L. C. *Culex pipiens* and *Aedes triseriatus* mosquito susceptibility to Zika virus [letter]. *Emerg Infect Dis*. 2016.
- Althaus, C. L., Low, N. How Relevant Is Sexual Transmission of Zika Virus? *PLoS Med* 13(10): e1002157. 2016.
- Alvarez, M. F., Bolívar-Mejía, A., Rodriguez-Morales, A. J., Ramirez-Vallejo, E. Cardiovascular involvement and manifestations of systemic chikungunya virus infection: a systematic review. *F1000 Res*, 6:390. 2017.
- Amsbio. Zika Virus Antigens and Antibodies. <http://www.amsbio.com/zika-virus-antigens-antibodies.aspx>. Acesso em 15/08/2016.
- An, W., Ge, N., Cao, Y., Sun, J., & Jin, X. Recent progress on chikungunya virus research. *Virologica Sinica*, 32(6), 441–453. 2017.
- Ashok-Kumar, T. CFSSP: Chou and Fasman Secondary Structure Prediction server. *Wide Spectrum: Research Journal*, 1(9):15-19. 2013.
- Atif, M., Azeem, M., Sarwar, M. R., & Bashir, A. Zika virus disease: a current review of the literature. *Infection*. 2016.
- Badawi, A., Ryoo, S. G., Vasileva, D., Yaghoubi, S. Prevalence of chronic comorbidities in chikungunya: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Infectious Diseases*, 67, 107–113. 2018.
- Bagozzi, D. WHO and experts prioritize vaccines, diagnostics and innovative vector control tools for Zika R&D. WHO Media centre. <http://www.who.int/mediacentre/news/notes/2016/research-development-zika/en/>. 2016. Acesso em 12/01/18

- Bandeira, A. C., Mph, T. D. I. F., Diseases, I., Campos, G. S., Ph, D., Sardi, S. I., Committee, C. IDCases Neonatal encephalitis due to Chikungunya vertical transmission : First report in Brazil. *IDCases*, 5, 57–59. 2016.
- Barthel, A., Gourinat, A. C., Cazorla, C., Joubert, C., Dupont-Rouzeyrol, M., & Descloux, E. Breast milk as a possible route of vertical transmission of dengue virus? *Clinical Infectious Diseases*, 57(3), 415–417. 2013.
- Barzon L1, Pacenti M, Palù G. West Nile virus and kidney disease. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 11(5), 479-87. 2013.
- Beasley, D. W., Whiteman, M. C., Zhang, S., Huang, C. Y., Schneider, B. S., Smith, D. R. Gromowski, G. D. Higgs, S., Kinney, R. M., Barrett, A. D. Envelope protein glycosylation status influences mouse neuroinvasion phenotype of genetic lineage 1 West Nile virus strains. *J. Virol.*, 79, 8339–8347. 2005.
- Bennett SN, Drummond AJ, Kapan DD, Suchard MA, Muñoz-Jordán JL, Pybus OG, Holmes EC, Gubler DJ. Epidemic dynamics revealed in dengue evolution. *Mol Biol Evol*, 27,811– 818. 2010.
- Bernard, E., Solignat, M., Gay, B., Chazal, N., Higgs, S., Devaux, C., & Briant, L. Endocytosis of chikungunya virus into mammalian cells: Role of clathrin and early endosomal compartments. *PLoS ONE*, 5(7), e11479. 2010.
- Besnard M, Lastere S, Teissier A, Cao-Lormeau V, Musso D. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Euro Surveill*. 19,20751. 2014.
- Bio-Rad. Instruction Manual, Bio-Rad Protein Assay, Rev C. <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/LIT33.pdf>. Acesso em 28/09/2016.
- Blohm, G. M., Lednicky, J. A., Márquez, M., White, S. K., Loeb, J. C., Pacheco, C. A., Jr, J. G. M. Evidence for Mother-to-Child Transmission of Zika Virus Through Breast Milk. *Clin Infect Dis*. 2018.

- Bonaldo M. C., Ribeiro I. P., Lima N. S., Santos A. A. C., Menezes L.S. R, Cruz SOD, *et al.* Isolation of infective Zika virus from urine and saliva of patients in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 10(6), e0004816. 2016.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72. 248–254. 1976.
- Braga, I. A. & Valle, D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. *Epidemiol. Serv. Saúde*, 16(2), 113-118. 2007.
- Brasil, P., Calvet, G. A., Siqueira, A. M., Wakimoto, M., de Sequeira, P. C., *et al.* Zika Virus Outbreak in Rio de Janeiro, Brazil: Clinical Characterization, Epidemiological and Virological Aspects. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 10(4): e0004636. 2016.a.
- Brasil, P., Pereira, J. P., Moreira, M. E., Nogueira, R. M. R., Damasceno, L., Wakimoto, M., Cherry, J. D. *et al.* Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *New England Journal of Medicine* 375 (24), 2321–2334. 2016.b.
- Bressanelli, S., Stiasny, K., Allison, S. L., Stura, E. a Duquerroy, S., Lescar, J., ... Rey, F. a. Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. *The EMBO Journal*, 23(4), 728–738. 2004.
- Bressanelli, S., Stiasny, K., Allison, S.L., Stura, E.A., Duquerroy, S., Lescar, J., Heinz, F.X., and Rey, F.A. Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. *EMBO J.* 23, 728–738. 2004.
- Brinton, M.A. The molecular biology of West Nile Virus: a new invader of the western hemisphere. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 371–402. 2002.
- Brito, C., Cordeiro, M. T. One year after the Zika virus outbreak in Brazil: from hypotheses to evidence. *Rev Soc Bras Med Trop* 49(5):537-543.2016.
- Buckley A, Gould EA. Detection of virus-specific antigen in the nuclei or nucleoli of cells infected with Zika or Langat virus. *J Gen Virol*, 69,1913–1920.1998.

- Burt, F. J., Rolph, M. S., Rulli, N. E., Mahalingam, S., & Heise, M. T. Chikungunya: A re-emerging virus. *The Lancet*. 379(9816), 662–671. 2012.
- Calisher CH, Karabatsos N, Dalrymple JM, et al. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J Gen Virol*. 70,37–43.1989.
- Calisher, C.H. & Karabatsos, N. - Arbovirus serogroups: definition and geographic distribution. In: MONATH, T.P., ed. *The Arboviruses: epidemiology and ecology*. Boca Ratón, CRC Press, 1, 19-57. 1988.
- Calvet, G., Aguiar, R. S., Melo, A. S. O., Sampaio, S. A., de Filippis, I., Fabri, A., Araujo, E. S. M. , De Sequeira, P. C. , De Mendonça, M. C. L. , De Oliveira, L. , Tschoeke, D. A. , Schrago, C. G , Thompson, F. L , Brasil, P., Dos Santos, F. B. , Nogueira, R. M. R. , Tanuri, A. , de Filippis, A. M. B. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: A case study. *The Lancet Infectious Diseases*, 653–660. 2016.
- Campos R. M., Cirne-Santos, C., Meira G. L., Santos, L. L. R. Prolonged detection of Zika virus RNA in urine samples during the ongoing Zika virus epidemic in Brazil. *J Clin Virol*, 77:69–70. 2016
- Carteaux, G., Maquart, M., Bedet, A., Contou, D., Brugières, P., Fourati, S., Zika virus associated with meningoencephalitis. *N. Engl. J. Med.* 374, 1595–1596. 2016.
- Castro, R. Fiocruz obtém registro para teste que detecta infecção por zika, dengue e Chikungunya. 2016. Disponível em: **Erro! A referência de hiperlink não é válida..** Acesso em 30/01/2018.
- CDC. Areas with Risk of Zika. 2018. <https://wwwnc.cdc.gov/travel/files/zika-areas-of-risk.pdf>. Acesso em 10/01/2018
- CDC. Chikungunya Virus Home Symptoms, Diagnosis, & Treatment <https://www.cdc.gov/chikungunya/symptoms/>. Atualizado em 03/08/2015. Acesso em 23/08/16.

- CDC. Chikungunya Virus. Diagnostic Testing. Atualizado em 08/08/2017. <https://www.cdc.gov/chikungunya/hc/diagnostic.html>. Acesso em 20/01/2018.
- CDC-a. Chikungunya Virus. <http://www.cdc.gov/chikungunya/>. Acesso em 20/03/2016.
- CDC-b, Division of Vector-Borne Diseases Subject: Revised diagnostic testing for Zika, chikungunya, and dengue viruses in US Public Health Laboratories. 2016.
- Cecilia, D., Kakade, M., Alagarasu, K., Patil, J., Salunke, A., Parashar, D., Shah, P. S. Development of a multiplex real-time RTPCR assay for simultaneous detection of dengue and chikungunya viruses. *Arch Virol*, 160: 323–327. 2015.
- Chan, J. F. W., Choi, G. K. Y., Yip, C. C. Y., Cheng, V. C. C., & Yuen, K. Y. Zika fever and congenital Zika syndrome: An unexpected emerging arboviral disease. *Journal of Infection*, 72(5), 507–524. 2016.
- Chang, C., Ortiz, K., Ansari, A., & Gershwin, M. E. The Zika outbreak of the 21st century. *Journal of Autoimmunity*, 68, 1–13. 2016.
- Chen YC, Wang SY, King CC. Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of virus entry via a CD14- dependent mechanism. *J Virol* 73, 2650–2657. 1999.
- Cho, B., Jeon, B.-Y., Kim, J., Noh, J., Kim, J., Park, M., & Park, S. Expression and Evaluation of Chikungunya Virus E1 and E2 Envelope Proteins for Serodiagnosis of Chikungunya Virus Infection. *Yonsei Medical Journal*, 49(5), 828–835. 2008.
- Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP. Predicting the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels. *PLoS ONE* 7(10): e46688. 2012.
- Colt, S., Garcia-Casal, M. N., Peña-Rosas, J. P., Finkelstein, J. L., Rayco-Solon, P., Weise-Prinzo, Z. C. Transmission of Zika virus through breast milk and other breastfeeding-related bodily fluids: A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis* 11 (4): e0005528. 2017.

- Cugola, F. R., Fernandes, I. R., Russo, F. B., Freitas, B. C., Dias, J. L. M., Guimarães, K. P., ... Beltrão-Braga, P. C. B. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature*, 534(7606), 267–271. 2016.
- Da Fonseca, F. G., Ladeira, L. O., Versiani, A. F., & De Jesus, A. C. Nanobastões de ouro funcionalizados, uso e kit para imunodiagnóstico de dengue. Google Patents. 2017.
- Dai, L., Song, J., Lu, X., Deng, Y.-Q., Musyoki, A. M., Cheng, H., Gao, G. F. Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. *Cell Host & Microbe*, 19(5), 696–704. 2016.
- Davidson A, Slavinski S, Komoto K, Rakeman J, Weiss D. Suspected Female-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus - New York City, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.*; 65(28):716-7. 2016.
- Dawes, B. E., Smalley, C. A., Tiner, B. L., Beasley, D. W., Milligan, G. N., Reece, L. M., Barrett, A. D. Research and development of Zika virus vaccines. *Npj Vaccines*.1, 16007. 2016.
- Deckard DT, Chung WM, Brooks JT, Smith JC, Woldai S, Hennessey M, et al. Male-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus--Texas. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.*; 65(14):372-4. 2016.
- Dick G. W., Kitchen S. F., Haddow, A. J., Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 46, 509–520. 1952.
- Domingo, C., Yactayo, S., Agbenu, E., Demanou, M., Schulz, A. R., Daskalow, K., & Niedrig, M. Detection of yellow fever 17D genome in urine. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(2), 760–762. 2011.
- D'Ortenzio E, Matheron S, Yazdanpanah Y, de Lamballerie X, Hubert B, Piorkowski G, et al. Evidence of Sexual Transmission of Zika Virus. *N Engl J Med.*; 374(22):2195-8. 2016.

- Dos Santos, T., Rodriguez, A., Almiron, M., Zika virus and the GuillainBarré syndrome - case series from seven countries. *N Engl J Med*, 375:1598–601. 2016.
- Dosztányi, Z., Csizmok, V., Tompa, P., Simo, I. IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. *Bioinformatics* 21(16), 3433-4. 2005.
- Doytchinova, I. A., Flower, D. R. VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC Bioinformatics*. 8 (4). 2007.
- Dudley, D. M., Aliota, M. T., Mohr, E. L., Weiler, A. M., Lehrer-Brey, G., Weisgrau, K. L., et al. A rhesus macaque model of Asian-lineage Zika virus infection. *Nat. Commun.* 28, 1–9. 2016.
- Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, Pretrick M, Marfel M, Holzbauer S, Dubray C, Guillaumot L, Griggs A, Bel M, Lambert AJ, Laven J, Kosoy O, Panella A, Biggerstaff BJ, Fischer M, Hayes EB. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med*, 360,2536 –2543. 2009.
- Economopoulou A, Dominguez M, Helynck B, Sissoko D, Wichmann O, et al. Atypical chikungunya virus infections: clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005–2006 outbreak on Reunion. *Epidemiol. Infect.* 137:534–41. 2009.
- Economopoulou, A., Dominguez, M., Helynck, B., Sissoko, D., Wichmann, O., Quenel, P., Germonneau, P., Quatresous, I. Atypical Chikungunya virus infections: clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005-2006 outbreak on Réunion. *Epidemiology and Infection* 137(4),534-41. 2009.
- Enfissi A, Codrington J, Roosblad J, Kazanji M, Rousset D. Zika virus genome from the Americas. *The Lancet*. 387(10015), 227 – 228. 2016.

- Faria, N. R., Azevedo, R. do S. da S., Kraemer, M. U. G., Souza, R., Cunha, M. S., Hill, S. C., Vasconcelos, P. F. C. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science*. 352(6283), 345-349. 2016.
- Fernandez-Garcia M. D., Mazzon, M., Jacobs, M., & Amara, A. Review Pathogenesis of Flavivirus Infections: Using and Abusing the Host Cell. *Cell Host and Microbe*, 5(4), 318–328. 2009.
- Fiocruz, 2016. Aedes e dengue: vetor e doença. Dengue vírus e Vetor. <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/aedesvetoredoenca.html>. Acesso em 20/03/2016.
- Foy, B. D., Kobylinski, K. C., Foy, J. L. C., Blitvich, B. J., da Rosa, A. T., Haddow, A. D., Tesh, R. B. Probable Non-Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. *Emerging Infectious Diseases*, 17(5), 880–882. 2011.
- Garcez PP, Correia Loiola E, Madeiro da Costa R, Higa LM, Trindade P, Delvecchio R, et al. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science*. 352,816-818. 2016.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., Bairoch, A. *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server*; (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press. 571-607. 2005
- Gerardin P, Barau G, Michault A, Bintner M, et al. Multidisciplinary prospective study of mother-to-child chikungunya virus infections on the Island of La Reunion. *PLoS Med.*;5(3):413–23. 2008.
- Gérardin P, Barau, G., Michault, A., Bintner, M., Randrianaivo, H., Choker, G., Robillard, P. Y. Multidisciplinary prospective study of mother-to-child chikungunya virus infections on the island of La Réunion. *PloS Medicine* 5(3),60. 2008.
- Gerardin P, Sampéris S, Ramful D, Boumahni B, et al. Neurocognitive outcome of children exposed to perinatal mother-to-child chikungunya virus infection: the

- CHIMERE cohort study on Reunion island. *PLoS Negl Trop Dis.* 8(7):1–14. 2014.
- Gerardin, P., Barau, G., Michault, A., Bintner, M., Randrianaivo, H., Choker, G., ... Robillard, P. Y. Multidisciplinary prospective study of mother-to-child chikungunya virus infections on the island of La Reunion. *PLoS Medicine*, 5(3), 0413–0423. 2008.
- Gibbons, D.L.; Ahn, A.; Liao, M.; Hammar, L.; Cheng, R.H.; Kielian, M. Multistep Regulation of Membrane Insertion of the Fusion Peptide of Semliki ForestVirus. *J. Virol.* 78, 3312–3318. 2004.
- Gladwyn-ng, I., Cordón-barris, L., Alfano, C., Creppe, C., Couderc, T., Morelli, G., Nguyen, L. Stress-induced unfolded protein response contributes to Zika virus – associated microcephaly. *Nature Neuroscience*, 21(1), 63–71. 2018.
- Goh, L. Y. H., Hobson-Peters, J., Prow, N. A., Baker, K., Piyasena, T. B. H., Taylor, C. T., Hall, R. A. The chikungunya virus capsid protein contains linear B cell epitopes in the N- and C-terminal regions that are dependent on an intact C-terminus for antibody recognition. *Viruses*, 7(6), 2943–2964. 2015.
- Goo, L., Demaso, C. R., Pelc, R. S., Kuhn, R. J., Pierson, T. C., Ledgerwood, J. E., & Graham, B. S. The Zika virus envelope protein glycan loop regulates virion antigenicity. *Virology*, 515, 191–202. 2018.
- Gould EA, Higgs S. Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 103,109 –121. 2009.
- Gratz, N. G. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *Med Vet Entomol*, 18,215-227. 2004.
- Griffin, D. E. Alphaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. 5th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 1023-67. 2007.
- Gubler DJ. Dengue, urbanization and globalization: the unholy trinity of the 21st century. *Trop Med Health*, 39,3–11. 2011.

- Gubler DJ. Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. *Emerg Infect Dis*, 4,442– 450. 1988.
- Gubler DJ. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch Med Res*. 33,330–342. 2002.
- Hassing RJ, Leparco-Goffart I, Blank SN, Thevarayan S, Tolou H, van Doornum G, van Genderen PJ. Imported Mayaro virus infection in the Netherlands. *J Infect*, 61(4):343-5. 2010.
- Hayes, E. B. Zika virus outside Africa. *Emerging Infectious Diseases*, 15(9), 1347–1350. 2009.
- Hennessey, M. Fischer, M. Staples, J. E. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 65, 55–58. 2016.
- Hilgard P, Stockert R. Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes. *Hepatology*, 32,1069–1077. 2000.
- Hills SL, Russell K, Hennessey M, et al. Transmission of Zika Virus Through Sexual Contact with Travelers to Areas of Ongoing Transmission — Continental United States, *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 65,215–216. 2016.
- Hinckley AF, O’Leary DR, Hayes EB. Transmission of West Nile virus through human breast milk seems to be rare. *Pediatrics*. 119, e666–71. 2007.
- Hong, E.M.; Perera, R.; Kuhn, R.J. Alphavirus capsid protein helix I controls a checkpoint in nucleocapsid core assembly. *J. Virol.* 80, 8848–8855. 2006.
- Huang, C., J, Lin, H., Yang, X. Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 39,383-99. 2012.
- Huang, Y. S., Ayers, V. B. , Lyons, A. C., Unlu, I., Alto, B. W. , Cohnstaedt, L. W., Higgs, S., Vanlandingham, D. L. *Culex* Species Mosquitoes and Zika Virus. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2016.

- Inoue, H. Nojima, H. Okayama, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. 96 (1), 23-28. 1990.
- IOC/Fiocruz. Fiocruz anuncia inovação no diagnóstico simultâneo de zika, dengue e Chikungunya. 2016. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/pt-br/content/fiocruz-anuncia-inovacao-no-diagnostico-simultaneo-de-zika-dengue-e-chikungunya>. Acesso em 30/01/2018.
- Irini, A. Doytchinova and Darren R Flower. VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC Bioinformatics*. 8(4). 2007.
- Jean-Baptiste, E., von Oettingen, J., Larco, P., Raphael, F, Larco, N. C., Cauvin, M. M. Chikungunya virus infection and diabetes mellitus: a double negative impact. *Am J Trop Med Hyg*, 95:1345–50. 2016.
- Jespersen, M. C., Peters, B., Nielsen, M., Marcatili, P. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Res (Web Server issue)*. 2017
- Jespersen, M. C., Peters, B., Nielsen, M., Marcatili, P. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Res (Web Server issue)*. 2017.
- Jin, J., Liss, N. M., Chen, D. H., Liao, M., Fox, J. M., Shimak, R. M., ... Simmons, G. Neutralizing Monoclonal Antibodies Block Chikungunya Virus Entry and Release by Targeting an Epitope Critical to Viral Pathogenesis. *Cell Reports*, 13(11), 2553–2564. 2015.
- Jindadamrongwech S, Thepparit C, Smith DR. Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. *Arch Virol* 149,915–927. 2004.
- Johansson, M. A., Powers, A. M., Pesik, N., Cohen, N. J., Staples, J. E. Nowcasting the spread of chikungunya virus in the Americas. *PLoS One*. 9(8):e104915. 2014.

- Johnson, B. W., Russell, B. J., Goodman, C. H. Laboratory Diagnosis of Chikungunya Virus Infections and Commercial Sources for Diagnostic Assays. *J Infect Dis*, 214: S471–S474. 2016.
- Joseph, A. Y., Babu, V. S., Dev, S. S., Gopalakrishnapai, J., Harish, M., et al. Rapid detection and characterization of chikungunya virus by RT-PCR in febrile patients from Kerala, India. *Indian J Exp Biol*, 46: 573–578. 17. 2008.
- Keasey, S. L., Pugh, C. L., Jensen, S. M. R. , Smith, J. L. , Hontz, R. D., Durbin, A. P., Dudley, D. M., O'Connor, D. H., Ulrich, R. G. Antibody responses to Zika virus infections in environments of flavivirus endemicity. *Clin Vaccine Immunol.*, 24(4), 1–16. 2017.
- Kenney JL, Brault AC. The role of environmental, virological and vector interactions in dictating biological transmission of arthropod borne viruses by mosquitoes. *Adv Virus Res*. 89,39–83. 2014.
- Khan, A. H., Morita, K., Parquet, C., Hasebe, F., Mathenge, E. G. M., & Igarashi, A. Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site, *Journal of General Virology*, 83, 3075-3084. 2002.
- Kostyuchenko, V. A., Lim, E. X. Y., Zhang, S., Fibriansah, G., Ng, T.-S., Ooi, J. S. G., Lok, S.-M. Structure of the thermally stable Zika virus. *Nature, advance online publication*. 2016.
- Kuno, G., Chang, G. J., Tsuchiya, K. R., Karabatsos, N. & Cropp, C. B. Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *J. Virol.* 72, 73–83. 1998.
- Lanciotti, R. S., Kosoy, O. L., Laven, J. J., Velez, J. O., Lambert, A. J., Johnson, A. J., Duffy, M. R. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerging Infectious Diseases*, 14(8), 1232–1239. 2008.

- Lanciotti, R. S., Kosoy, O. L., Laven, J. J., Velez, J. O., Lambert, A. J., Johnson, A. J., ... Duffy, M. R. (2008). Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia. *Emerging Infectious Diseases*, 14(8), 1232–1239. 2007.
- Laurent, P., Le Roux, K., Grivard, P., Bertil, G., Naze, F., et al. Development of a sensitive real-time reverse transcriptase PCR assay with an internal control to detect and quantify chikungunya virus. *Clin Chem*, 53: 1408–1414. 18. 2007.
- Lebrun G, Chadda K, Reboux AH, Martinet O, Gauzere BA. Guillain-Barre syndrome after Chikungunya infection. *Emerg. Infect. Dis.* 15:495–96 37. 2009.
- Leis, A. A., Stokic, D. S. Neuromuscular Manifestations of West Nile Virus Infection. *Front Neurol.* 3,1-10. 271. 2012.
- Letunic, I., & Bork, P. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Research*, 44(Web Server issue), W242–W245. 2016.
- Li, L.; Jose, J.; Xiang, Y.; Kuhn, R.J.; Rossmann, M.G. Structural Changes of Envelope Proteins during Alphavirus Fusion. *Nature*. 468, 705–708. 2010.
- Lindenbach, B.D., Thiel, H.J., and Rice, C.M. Flaviviridae: the viruses and their replication. In *Fields Virology*, Fifth Edition, D.M. Knipe and P.M. Howley, eds. (Philadelphia, PA: Lippincott, Williams, and Wilkins), pp. 1101–1152. 2007.
- Lisa, F. P. Immunopathology of Chikungunya Virus Infection: Lessons Learned from Patients and Animal Models. *Annu. Rev. Virol.*, 4:413-427. 2017.
- Lorenz, I. C., Allison, S. L., Heinz, F. X. & Helenius, A. Folding and dimerization of tick-borne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum. *J. Virol.* 76, 5480–5491. 2002.

- Lorenz, I. C., Kartenbeck, J., Mezzacasa, A., Allison, S. L., Heinz, F. X., & Helenius, A. Intracellular assembly and secretion of recombinant subviral particles from tick-borne encephalitis virus. *Journal of Virology*, 77(7), 4370–4382. 2003.
- Lorenz, I.C., Kartenbeck, J., Mezzacasa, A., Allison, S.L., Heinz, F.X., and Helenius, A. Intracellular assembly and secretion of recombinant subviral particles from tick-borne encephalitis virus. *J. Virol.* 77, 4370–4382. 2003.
- Lovell, S. C., Davis, I. W., Arendall, W. B., de Bakker, P. I. W., Word, J. M., Prisant, M. G., Richardson, J. S. and Richardson, D. C. Structure validation by Calpha geometry: C α geometry: ϕ, ψ and C β deviation. *Proteins: Structure, Function & Genetics*. 50: 437-450. 2002.
- Lozach PY, Burleigh L, Staropoli I, Navarro-Sanchez E, Harriague J, Virelizier JL, Rey FA, Despres P, Renzana-Seisdedos F, Amara A. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN)-mediated enhancement of dengue virus infection is independent of DC-SIGN internalization signals. *J Biol Chem* 280,23698–23708. 2005.
- MacNamara, F. N. Zika virus: A report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 48, 139–145. 1954.
- Malkinson M, Banet C, Weisman Y, Pokamunski S, King R, Drouet MT, Deubel V. Introduction of West Nile virus in the Middle East by migrating white storks. *Emerg Infect Dis*, 8,392–397. 2002.
- Marcondes CB, Ximenes M de FF de M. Zika virus in Brazil and the danger of infestation by *Aedes (Stegomyia)* mosquitoes. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015.
- Martí-Carvajal, A., Ramon-Pardo, P., Javelle, E., Simon, F., Aldighieri, S., Horvath, H. Interventions for treating patients with chikungunya virus infection-related

rheumatic and musculoskeletal disorders: A systematic review. *PLoS ONE*, 12(6): e0179028. 2017.

Martines RB, Bhatnagar J, Keating MK, Silva-Flannery L, Muehlenbachs A, Gary J, Goldsmith C, Hale G, Ritter J, Rollin D, Shieh WJ, Luz KG, Ramos AM, Davi HP, Kleber de Oliveria W, Lanciotti R, Lambert A, Zaki S. 2016. Hoorn, E. J., Walsh, S. B., McCormick, J. A., Fürstenberg, A., Yang, C.-L., Roeschel, T., Ellison, D. H. Zika virus: management of infection and risk Shazaad. *Bmj*, 17(10), 1304–9. 2011.

Martins, H. A. D. L., Bernardino, S. N., Ribas, K. H., Santos, C. C., Antunes, T., & Ribas, V. R. Outbreak of Neuro-Chikungunya in Northeastern Brazil. *Journal of Neuroinfectious Diseases*, 7(2), 2–4. 2016.

Meaney-Delman, D., Oduyebo, T., Polen, K. N., *et al.*; Prolonged detection of Zika virus RNA in pregnant women. *Obstet Gynecol*, 128:724–30. 2016.

Melo, A. S. D. O., Aguiar, R. S., Amorim, M. M. R., Arruda, M. B., Melo, F. D. O, Ribeiro, S.T.C., Batista, A. G. M., Ferreira, T., dos Santos, M. P., Sampaio, V. V., Moura, S. R. M. , Rabello, L. P., Gonzaga, C. E., Malinger, G., Ximenes, R., de Oliveira-Szejnfeld, P. S., Tovar-Moll, F., Chimelli, L., Silveira, P. P., Delvechio, R., Higa, L., Campanati, L., Nogueira, R. M. R. , Filippis, A. M. B., Szejnfeld, J., Voloch, C. M. , Ferreira, O. C., Brindeiro, R. M., Tanuri, A. Congenital Zika Virus Infection Beyond Neonatal Microcephaly. *JAMA Neurol.*; 73(12):1407–1416. 2016.

Melo, A. S. O., Malinger, G., Ximenes, R., Szejnfeld, P. O., Sampaio, S. A., de Filippis A. M. B. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound Obstet Gynecol*. 47:6–7. 2016.

Mendes, A & Maciel, V. Agência Saúde. Ministério da Saúde. Ministério da Saúde vai distribuir teste rápido de Zika. 2016. Disponível em: <http://combateaedes.saude.gov.br/pt/noticias/856-ministerio-da-saude-vai-distribuir-teste-rapido-de-zika>. Acesso em 25/01/2018.

- Mercado-Curiel RF, Esquinca-Aviles HA, Tovar R, az-Badillo A, Camacho-Nuez M, Munoz ML. The four serotypes of dengue recognize the same putative receptors in *Aedes aegypti* midgut and *Ae. albopictus* cells. *BMC Microbiol* 6,85. 2006.
- Miller JL, de Wet BJ, Martinez-Pomares L, Radcliffe CM, Dwek RA, Rudd PM, Gordon S. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. *PLoS Pathogens*, 4(2),11. 2008.
- Miner JJ, Cao B, Govero J, Smith AM, Fernandez E, Cabrera OH, et al. Zika virus infection during pregnancy in mice causes placental damage and fetal demise. *Cell*. 165, 1081–91. 2016.
- Ministério da Saúde. Portal Brasil. Bebês de mães infectadas pelo zika vírus serão monitorados até os três anos. 2016a. <http://www.brasil.gov.br/saude/2016/11/bebes-de-maes-infectadas-pelo-zika-virus-serao-monitorados-ate-os-tres-anos>. Acesso em 20/01/18.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Nota Informativa: Procedimentos a serem adotados para a vigilância da Febre do vírus Zika no Brasil. 2016b. <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/marco/07/Nota-Informativa-zika.pdf>. Acesso em 30/01/2018.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Atenção Básica 2017. Chikungunya: Manejo Clínico 2ª ed. Versão eletrônica. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/dezembro/25/chikungunya-novo-protocolo.pdf>. Aceso em 14/01/18.
- Mlakar J, Korva M, Tul N, et al. Zika virus associated with microcephaly. *N Engl J Med* 374,951-958. 2016.
- Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., & Harrison, S. C. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*, 427(6972), 313–319. 2004.

- Moreira, J., Peixoto, T. M., Siqueira, A. M., & Lamas, C. C. (2017). Sexually acquired Zika virus: a systematic review. *Clinical Microbiology and Infection*, 23(5), 296–305. 2017.
- Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol.*, 3(1),13-22. 2005.
- Murugan, S. B., & Sathishkumar, R. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, (August), 1–5. 2016.
- Musso D, Nilles EJ, Cao-Lormeau VM. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clin Microbiol Infect.*, 20, O595–O596. 2014.
- Musso, D., & Gubler, D. J. Zika Virus, *Clin Microbiol Rev*, 29,487–524. 2016.
- Nemésio, H., Palomares-Jerez, F., & Villalaín, J. The membrane-active regions of the dengue virus proteins C and e. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1808(10), 2390–2402. 2011.
- Ng, L. C., & Hapuarachchi, H. C. Tracing the path of Chikungunya virus-Evolution and adaptation. *Infection, Genetics and Evolution*, 10(7), 876–885. 2010.
- Nguyen, H. N., Qian, X., Song, H., & Ming, G. Neural stem cells attacked by Zika virus. *Cell Research*. 26,753-754. 2016.
- Novagen. pET System Manual. 11th ed. 2011.
- Novella IS, Presloid JB, Smith SD, Wilke CO.. Specific and nonspecific host adaptation during arboviral experimental evolution. *J Mol Microbiol Biotechnol* 21,71– 81. 2011.
- Nunes MR, Faria NR, de Vasconcelos JM, Golding N, Kraemer MU, de Oliveira LF, Azevedo Rdo S, da Silva DE, da Silva EV, da Silva EP, Carvalho VL, Coelho GE, Cruz AC, Rodrigues SG, Vianez JL, Jr, Nunes BT, Cardoso JF, Tesh RB, Hay SI, Pybus OG, Vasconcelos PF.

- Emergence and potential for spread of chikungunya virus in Brazil. *BMC Med* 13,102. 2015.
- Oehler E, Fournier E, Leparç-Goffart I, Larre P, Cubizolle S, et al. Increase in cases of GuillainBarre syndrome during a chikungunya outbreak, French Polynesia, 2014 to 2015. *Eurosurveillance*, 20:30079. 2015.
- Oehler E, Watrin L, Larre P, Leparç-Goffart I, Lastère S, Valour F, et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013. *Euro Surveill.*;19(9):20720. 2014
- Oehler, E., Watrin, L., Larre, P., Leparç-Goffart, I., Lastere, S., Valour, F., et al. Zika virus infection complicated by Guillain- Barre syndrome a case report, French Polynesia, December 2013. *Euro Surveill.* 19(9),7-9. 2014.
- Oliveira, D. B., Almeida, F. J., Durigon, E. L. , Mendes, E. A, Braconi CT et al. Prolonged Shedding of Zika Virus Associated with Congenital Infection. *N Engl J Med.* Sep 22; 375(12):1202-4. 2016.
- Pan American Health Organization / World Health Organization (PAHO/WHO). Number of Reported Cases of Chikungunya Fever in the Americas, by Country or Territory 2017 (to week noted) Epidemiological Week / EW 51 (Atualizado em 22 December 2017) http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=rdmore&cid=8975&Itemid=40931. Acesso em 16/01/18.
- Pan American Health Organization / World Health Organization. (PAHO/WHO) Epidemiological update: neurological syndrome, congenital anomalies and Zika virus infection. 2016. http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&qid=32879&lang=en. Acesso em 16/01/18.
- Panning, M., Charrel, R. N., Mantke, O. D., Landt, O., Niedrig, M., et al. Coordinated implementation of chikungunya virus reverse transcription-PCR. *Emerg Infect Dis*, 15: 469–471. 2009.

- Panning, M., Grywna, K., van Esbroeck, M., Emmerich, P., Drosten, C. Chikungunya fever in travelers returning to Europe from the Indian Ocean region, 2006. *Emerg Infect Dis*, 14: 416–422. 2008.
- Paz, S., & Semenza, J. C. El Niño and climate change - Contributing factors in the dispersal of Zika virus in the Americas? *The Lancet*, 387(10020), 745. 2016.
- Pettersson, J. H., Eldholm, V., Seligman, S. J., Lundkvist, Å., Falconar, A. K., Gaunt, M. W. Lamballerie, D. How Did Zika Virus Emerge in the Pacific Islands and Latin America? *MBio* 7(5). 2016.
- Pialoux, G., Gaüzère, B. A., Jauréguiberry, S., Strobel, M. Chikungunya, an epidemic arbovirosis. *The Lancet infectious diseases*. 7(5):319–27. 2007.
- Pinto, T. P. C. Expressão e purificação da proteína E3 do vírus chikungunya (CHIKV). 80f. 2013. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) - Universidade Nova de Lisboa. Lisboa, Portugal. 2013.
- Plourde, A. R., & Bloch, E. M. A literature review of Zika virus. *Emerg. Infect. Dis.* 22, 1185–1192. 2016.
- Posen, H.J., Keystone, J.S., Gubbay, J. B., Epidemiology of Zika virus, 1947–2007. *BMJ Global Health*;1:e000087. 2016.
- Powers AM, Brault AC, Tesh RB, Weaver SC. Re-emergence of chikungunya and o'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. *J Gen Virol.* 81,471–9. 2010.
- Powers AM, Brault AC, Tesh RB, Weaver SC. Re-emergence of chikungunya and o'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. *J Gen Virol.* 81, 471–79. 2000.
- Powers, A. M., Brault, A. C., Tesh, R. B., Weaver, S. C. Re-emergence of Chikungunya and O'nyongnyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. *J Gen Virol.*,81(2):471–479. 2000.

- Powers, A. M., Logue, C. H. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. *J Gen Virol.*, 88(9):2363–2377. 2007.
- Queyriaux, B.; Simon, F.; Grandadam, M.; Michel, R.; Tolou, H.; Boutin, J.P. Clinical Burden of Chikungunya Virus Infection. *Lancet Infect. Dis.* 8, 2–3. 2008.
- Rabe, I. B., Staples, J. E., Villanueva, J., Hummel, K. B., Johnson, J. A., Rose, L., ... Powers, A. M. Interim Guidance for Interpretation of Zika Virus Antibody Test Results. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 65 (21). 2016.
- Rather, I. A, Lone. J. B., Bajpai, V. K., Park, Y.H. Zika virus infection during pregnancy and congenital abnormalities. *Front Microbiol*, 8:581. 2017.
- Renault, P., Josseran, L., Pierre, V. Chikungunya-related fatality rates, Mauritius, India, and Reunion Island. *Emerg Infect Dis*, 14. 2008.
- Richard, A.S., Shim, B., Kwon, Y., Zhang, R., Otsuka, Y. AXL-dependent infection of human fetal endothelial cells distinguishes Zika virus from other pathogenic flaviviruses. *PNAS*, 114 (8) 2024-2029. 2017.
- Robinson, M. C. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952–53. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 49,28–32. 1955.
- Rougeron, V., Sam, I.-C., Caron, M., Nkoghe, D., Leroy, E., & Roques, P. Chikungunya, a paradigm of neglected tropical disease that emerged to be a new health global risk. *Journal of Clinical Virology.* 64, 144–52. 2015.
- Roy, A., Kucukural, A., Zhang, Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 5, 725-738. 2010.
- Roy, A., Xu, D., Poisson, J., Zhang, Y. A Protocol for Computer-Based Protein Structure and Function Prediction. *J. Vis. Exp.* 57, e3259. 2011.
- Russell, K., Hills, S. L., Oster, A. M., *et al.* Male-to-female sexual transmission of Zika virus—United States, January–April 2016. *Clin Infect Dis*, 64:211–3. 2017.
- Rust, R. S. Human arboviral encephalitis. *Semin Pediatr Neurol.* 19(3),130-51. 2012.

- Sahdev, S., Khattar, S. K., Saini, K. S. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Mol Cell Biochem*, 307:249–264. 2008.
- Santhosh, S. R., Parida, M. M., Dash, P. K., Pateriya, A., Pattnaik, B., et al. Development and evaluation of SYBR Green I-based one-step real-time RTPCR assay for detection and quantification of Chikungunya virus. *J Clin Virol*, 39: 188–193. 2007.
- Schieffelin, J. S., Costin, J. M., Nicholson, C. O., Orgeron, N. M., Fontaine, K. A., Isern, S., Robinson, J. E. Neutralizing and non-neutralizing monoclonal antibodies against dengue virus E protein derived from a naturally infected patient. *Virology Journal*, 7,28. 2010.
- Schuffenecker, I., Iteman, I., Michault, A., Murri, S., Frangeul, L., et al. Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Med.*, 3 (7):e263. 2006.
- Schwartz, O., & Albert, M. L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. *Nature Reviews. Microbiology*. 8(7), 491–500. 2010.
- Schwartz, O., Albert, M. L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. *Nat Rev Microbiol*, 8: 491–500. 2010.
- Secretaria da Saúde da Bahia (Sesab). Testes rápidos de arboviroses da Bahiafarmas são apresentados na 1ª Feira de Soluções para a Saúde. 2017. <http://www.saude.ba.gov.br/2017/08/01/testes-rapidos-de-arboviroses-da-bahiafarma-sao-apresentados-na-1o-feira-de-solucoes-para-a-saude/>. Acesso em 14/01/18
- Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 27, 2016. Boletim Epidemiológico. <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/agosto/09/2016-026.pdf> Acesso em 28/09/2016.

- Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 51, Boletim Epidemiológico. 49 (1). 2018.
- Shankar, A., Patil, A. A., & Skariyachan, S. Recent Perspectives on Genome, Transmission, Clinical Manifestation, Diagnosis, Therapeutic Strategies, Vaccine Developments, and Challenges of Zika Virus Research *Frontiers in Microbiology*, 8. 2017.
- Shi, W., Zhang, Z., Ling, C., Carr, M. J., Tong, Y., & Gao, G. F. Increasing genetic diversity of Zika virus in the Latin 2016.American outbreak. *Emerging Microbes & Infections*, 5(7), e68. 2016.
- Sikka V, Chattu VK, Popli RK, Galwankar SC, Kelkar D, Sawicki SG, Stawicki SP, Papadimos TJ. The emergence of zika virus as a global health security threat: A review and a consensus statement of the INDUSEM Joint working Group (JWG). *J Global Infect Dis*. 8,3-15. 2016.
- Silva, L. R. C. & Souza, A. M. S. Zika virus: what do we know about the viral structure, mechanisms of transmission, and neurological outcomes? *Rev Soc Bras Med Trop*. 49(3),267-273. 2016.
- Sips GJ, Wilschut J, Smit JM. Neuroinvasive flavivirus infections. *Rev Med Virol*. 22,69-87. 2012.
- Sirohi, D., Chen, Z., Sun, L., Klose, T., Pierson, T. C., Rossmann, M. G., & Kuhn, R. J. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science*. 352(6284), 467–70. 2016.
- Sissoko, D., Malvy, D., Ezzedine, K., Renault, P., Moschetti, F., Ledrans, M., & Pierre, V. Post-epidemic Chikungunya disease on reunion island: Course of rheumatic manifestations and associated factors over a 15-month period. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(3), 1–6. 2009.
- Solignat, M.; Gay, B.; Higgs, S.; Briant, L.; Devaux, C. Replication Cycle of Chikungunya: A Re-Emerging Arbovirus. *Virology*. 393, 183–197. 2009.

- Song, B., Yun, S., Woolley, M., & Lee, Y. Zika virus: History , epidemiology , transmission , and clinical presentation, *Journal of Neuroimmunology*, 308, 50–64. 2017.
- Soonsawad, P., Xing, L., Milla, E., Espinoza, J.M., Kawano, M., Marko, M., Hsieh, C., Furukawa, H., Kawasaki, M., Weerachayanukul, W., *et al.* Structural evidence of glycoprotein assembly in cellular membrane compartments prior to Alphavirus budding. *J. Virol.* 84, 11145–11151. 2010.
- Souza, T. M. A., Azeredo, E. L., Badolato-Corrêa, J., Damasco, P. V., Santos, C., Petitinga-Paiva, F., Nunes, P. C. G., Barbosa, L. S., Cipitelli, M. C., Chouin-Carneiro, T., Faria, N. R. C., Nogueira, R. M. R., de Bruycker-Nogueira, F., dos Santos, F. B. First Report of the East-Central South African Genotype of Chikungunya Virus in Rio de Janeiro, Brazil. *PLOS Currents Outbreaks*, 1. 2017
- Stettler, K., Stettler, K., Beltramello, M., Espinosa, D. A., Graham, V., Cassotta, A., ... Corti, D. Specificity, cross-reactivity and function of antibodies elicited by Zika virus infection, *8505*. 2016.
- Sun, S., Xiang, Y., Akahata, W., Holdaway, H., Pal, P., Zhang, X., Rossmann, M. G. Structural analyses at pseudo atomic resolution of Chikungunya virus and antibodies show mechanisms of neutralization. *eLife*, 2013(2), 1–27. 2013.
- Tandale B.V., Sathe P.S., Arankalle V.A., Wadia R.S., Kulkarni R., Shah S.V., Shah S. K., Sheth J. K., Sudeep A. B., Tripathy A. S., Mishra A. C. Systemic involvements and fatalities during Chikungunya epidemic in India, 2006. *Journal of Clinical Virology* 46(2),145-9. 2009.
- Tauil PL. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. *Cad Saúde Pública*. 18(3),867-871. 2002.
- Teixeira MG, Andrade AM, Costa Mda C, Castro JN, Oliveira FL, Goes CB, Maia M, Santana EB, Nunes BT, Vasconcelos PF. 2015.

- East/Central/South African genotype chikungunya virus, Brazil, 2014. *Emerg Infect Dis J* 21,906–907. 2015.
- Thepparit, C., and D. R. Smith. Serotype-specific entry of dengue virus into liver cells: identification of the 37-kilodalton/67-kilodalton highaffinity laminin receptor as a dengue virus serotype 1 receptor. *J. Virol.* 78,12647–12656. 2004.
- Thon-Hon VG, Denizot M, Li-Pat-Yuen G, Giry C, Jaffar-Bandjee MC, Gasque P. Deciphering the differential response of two human fibroblast cell lines following Chikungunya virus infection. *Virology* 9,213. 2012.
- Torres, J. R, Falleiros-Arlant, L. H. Lourdes, D., Pleitez-Navarrete, J., Castillo, B., Salgado, D. M. Congenital and perinatal complications of chikungunya fever : a Latin American experience. *International Journal of Infectious Diseases* 51, 85–88. 2016.
- Tran, A., & Theel, E. S. The role of serologic testing for Zika virus infection. *Reviews in Medical Microbiology*, 29(1), 1-7. 2018.
- Tripathi, N. K., Priya, R., & Shrivastava, A. Production of recombinant Chikungunya virus envelope 2 protein in Escherichia coli. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(6), 2461–2471. 2014.
- Tsetsarkin KA, Chen R, Yun R, Rossi SL, Plante KS, Guerbois M, Forrester N, Perng GC, Sreekumar E, Leal G, Huang J, Mukhopadhyay S, Weaver SC. Multi-peaked adaptive landscape for chikungunya virus evolution predicts continued fitness optimization in *Aedes albopictus* mosquitoes. *Nat Commun* 5,4084. 2014.
- van den Doel, P., Volz, A., Roose, J. M., Sewbalaksing, V. D., Pijlman, G. P., van Middelkoop, I., ... Martina, B. E. E. Recombinant Modified Vaccinia Virus Ankara Expressing Glycoprotein E2 of Chikungunya Virus Protects AG129 Mice against Lethal Challenge. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(9). 2014.

- Van Duijl-Richter, M. K. S., Hoornweg, T. E., Rodenhuis-Zybert, I. A., & Smit, J. M. Early Events in Chikungunya Virus Infection-From Virus CellBinding to Membrane Fusion. *Viruses*, 7(7), 3647–74. 2015.
- Villamil-Gómez W, Alba-Silvera L, Menco-Ramos A, et al. Congenital chikungunya virus infection in Sincelejo, Colombia: a case series. *J Trop Pediatr*. 61(5):386–392. 2015.
- Viralzone. http://viralzone.expasy.org/all_by_species/6756.html. Acesso em 28/09/2016.
- Volk, S. M., Chen, R., Tsetsarkin, K. A., Adams, P., Garcia, T. I., Sall, A. A., Weaver, S. C. Genome-Scale Phylogenetic Analyses of Chikungunya Virus Reveal Independent Emergences of Recent Epidemics and Various Evolutionary Rates. *J Virol.*, 84(13):6497–6504. 2010.
- Vorou, R. Zika virus, vectors, reservoirs, amplifying hosts, and their potential to spread worldwide: what we know and what we should investigate urgently. *International Journal of Infectious Diseases*. 2016.
- Voss, J.E.; Vaney, M.C.; Duquerroy, S.; Vornrhein, C.; Girard-Blanc, C.; Crublet, E.; Thompson, A.; Bricogne, G.; Rey, F.A. Glycoprotein Organization of Chikungunya Virus Particles Revealed by X-ray Crystallography. *Nature*. 468, 709–712. 2010.
- Waggoner, J. J., & Pinsky, B. A. Zika Virus: Diagnostics for an Emerging Pandemic Threat. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(4), 860–7. 2016.
- Waldo, G. S., Standish, B. M., Berendzen, J., & Terwilliger, T. C. Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nat Biotech*. 17(7), 691–695. 1999.
- Wang E, et al. Evolutionary relationships of endemic/ epidemic and sylvatic dengue viruses. *J. Virol*. 74,3227–3234. 2000.

- Wang, L., Valderramos, S. G., Wu, A., Ouyang, S., Li, C., Brasil, P., Cheng, G. From Mosquitos to Humans: Genetic Evolution of Zika Virus. *Cell Host & Microbe*, 19(5), 561–565. 2016.
- WHO, Media centre. Chikungunya, Fact sheet. Atualizado em abril de 2017. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs327/en/>. Acesso em 20/01/18.
- WHO. Arboviruses and human disease. World Health Organ Tech Rep Ser. 1967;369,1-84. <http://www.who.int/iris/handle/10665/40664> Acesso em 15/08/2016.
- WHO. World Health Organ Tech Rep Ser. Arboviruses and human disease. Report of a WHO Scientific Group. 369,1-84. 1967.
- Wiederstein, M & Sippl, M. J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Research*, 35, W407-W410. 2007.
- World Health Organization. Breastfeeding in the context of Zika virus. Interim guidance. 2016. <http://www.who.int/csr/resources/publications/zika/breastfeeding/en/>. Acesso em 12/01/18
- Yang, J., Roy, A., Zhang, Y. Protein-ligand binding site recognition using complementary binding-specific substructure comparison and sequence profile alignment, *Bioinformatics*, 29, 2588-2595. 2013.
- Yathi, K. K., Joseph, J. M., Bhasker, S., Kumar, R., & Chinnamma, M. Recombinant CHIK virus E1 coat protein of 11KDa with antigenic domains for the detection of Chikungunya. *Journal of Immunological Methods*, 372(1-2), 171–176. 2011.
- Yin, J.; Li, G.; Ren, X.; Herrler, G. Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *Journal of Biotechnology*, 127, 335-347. 2007.
- Yu, I.M., Zhang, W., Holdaway, H.A., Li, L., Kostyuchenko, V.A., Chipman, P.R., Kuhn, R.J., Rossmann, M.G., and Chen, J. Structure of the immature

dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science* 319, 1834–1837.2008.

Yun, S.I., Song, B.H., Frank, J.C., Julander, J.G., Polejaeva, I.A., Davies, C.J., White, K.L., Lee, Y.M. Complete genome sequences of three historically important, spatiotemporally distinct, and genetically divergent strains of Zika virus: MR-766, P6-740, and PRVABC-59. *Genome Announc.* 4, e00800–16. 2016.

Zammarchi, L., Tappe, D., Fortuna, C., Remoli, M. E., Gunther, S., Venturi, G., ... Schmidt-Chanasit, J. Zika virus infection in a traveller returning to Europe from Brazil, March 2015. *Euro Surveillance : Bulletin Europ en Sur Les Maladies Transmissibles, European Communicable Disease Bulletin*, 20(23), 2014–2016. 2015.

Zanluca, C., Campos, V., Melo, A. De, Luiza, A., Mosimann, P., Igor, G., Luz, K. (2015). First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil, 110(June), 569–572. 2016.

Zhang. Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9(40). 2008.

Zhu, Z., Chan, J. F.-W., Tee, K.-M., Choi, G. K.-Y., Lau, S. K.-P., Woo, P. C.-Y., ... Yuen, K.-Y. Comparative genomic analysis of pre-epidemic and epidemic Zika virus strains for virological factors potentially associated with the rapidly expanding epidemic. *Emerging Microbes and Infections*, 5(3), e22. 2016.

Zhu, Z., Chan, J. F.-W., Tee, K.-M., Choi, G. K.-Y., Lau, S. K.-P., Woo, P. C.-Y., Yuen, K.-Y. Comparative genomic analysis of pre-epidemic and epidemic Zika virus strains for virological factors potentially associated with the rapidly expanding epidemic. *Emerging Microbes and Infections*, 5(3), e22. 2016.

