



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

Cid Oliveira de Queiroz

**EXPRESSÃO DA PROTEÍNA E2 RECOMBINANTE DO VÍRUS CHIKUNGUNYA
EM CÉLULAS EUCARIOTAS PARA UTILIZAÇÃO EM PLATAFORMAS
DIAGNÓSTICAS**

Belo Horizonte

Maio de 2023

Cid Oliveira de Queiroz

**EXPRESSÃO DA PROTEÍNA E2 RECOMBINANTE DO VÍRUS CHIKUNGUNYA
EM CÉLULAS EUCARIOTAS PARA UTILIZAÇÃO EM PLATAFORMAS
DIAGNÓSTICAS**

Dissertação de Mestrado apresentada 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

Coorientação: Flávia Fonseca Bagno, Karine Lima Lourenço, Caroline Furtado Junqueira e Santuza Maria Ribeiro Teixeira

Belo Horizonte

Maio de 2023

043

Queiroz, Cid Oliveira de.

Expressão da proteína E2 recombinante do vírus Chikungunya em células eucariotas para utilização em plataformas diagnósticas [manuscrito] / Cid Oliveira de Queiroz. – 2023.

133 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientação: Prof. Flávio Guimarães da Fonseca. Coorientação: Flávia Fonseca Bagno, Karine Lima Lourenço, Caroline Furtado Junqueira e Santuza Maria Ribeiro Teixeira.

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

1. Microbiologia. 2. Vírus Chikungunya. 3. Diagnóstico. I. Fonseca, Flávio Guimarães da. II. Bagno, Flávia Fonseca. III. Lourenço, Karine Lima. IV. Junqueira, Caroline Furtado. V. Teixeira, Santuza Maria Ribeiro. VI. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. VII. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE: **CID OLIVEIRA DE QUEIROZ**

Nº REGISTRO: 2021661479

Às 09:00 horas do dia 25 de maio de 2023, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Maria Marta Figueiredo (Universidade do Estado de Minas Gerais), Eduardo Henrique Salviano Bezerra (Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais) e o Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca (Orientador), para julgar o trabalho final "EXPRESSÃO DA PROTEÍNA E2 RECOMBINANTE DO VÍRUS CHIKUNGUNYA EM CÉLULAS EUCARIOTAS PARA UTILIZAÇÃO EM PLATAFORMAS DIAGNÓSTICAS", do aluno Cid Oliveira de Queiroz, requisito final para a obtenção do Grau de MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca - orientador, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. O candidato foi considerado APROVADO. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. O candidato tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 25 de maio de 2023

Membros da banca:

Profa. Dra. Maria Marta Figueiredo
Dr. Eduardo Henrique Salviano Bezerra

De acordo:

Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca
(Orientador)

Profa. Dra. Daniele da Glória de Souza
(Coordenadora do Programa de Pós-graduação
em Microbiologia)



Documento assinado eletronicamente por **Maria Marta Figueiredo, Usuária Externa**, em 25/05/2023, às 17:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flavio Guimaraes da Fonseca, Professor do Magistério Superior**, em 26/05/2023, às 08:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniele da Gloria de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 01/06/2023, às 15:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Henrique Salviano Bezerra, Usuário Externo**, em 06/06/2023, às 08:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2289461** e o código CRC **DB33F910**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu orientador, Prof. Flávio Guimarães da Fonseca, pela oportunidade de desenvolver esse trabalho e por todos os aprendizados nessa jornada. Tenho profunda admiração por você como profissional, sobretudo pelo seu esforço constante para que seu trabalho retorne à sociedade através da informação e de produtos relevantes à saúde pública.

Às minhas coorientadoras, minha gratidão. Profa. Santuza Teixeira, seu olhar acadêmico transforma a todos com quem trabalha, sua orientação foi diferencial na minha formação. Dra. Caroline Junqueira, suas sugestões e críticas foram essenciais para a realização deste projeto. Dra. Karine Lourenço, não há palavras para descrever o suporte acadêmico e contribuição na minha vida pessoal por todos esses anos de orientação. Dra. Flávia Bagno, obrigado por toda paciência e disponibilidade, foi uma honra seguir sua linha de pesquisa do mestrado e doutorado.

Agradeço à banca examinadora, Profa. Maria Marta Figueiredo, Dr. Eduardo Henrique Salviano Bezerra e Profa. Lara Carvalho Godoi pela disponibilidade e por contribuírem para este trabalho.

Agradeço a equipe do CT-Vacinas, pelo acolhimento e companheirismo. Vocês são profissionais exemplares e pessoas maravilhosas. Foi gratificante participar da equipe de um centro de pesquisa de extrema relevância para a saúde nacional.

Julinha, sou grato por todos os momentos compartilhados e ensinamentos. Sua parceria acadêmica e pessoal foi essencial à execução deste trabalho. Sarinha, Ana Flávia, Mateus, Tânia e demais amigos, a companhia de vocês tornou os dias mais alegres e memoráveis, que nossos laços perdurem além dos caminhos profissionais.

Agradeço aos membros do LVBA (Laboratório de Virologia Básica e Aplicada) por toda formação ao longo dos anos. Profa. Edel Stancioli, você é um exemplo de pesquisadora. Dri e Samille, obrigado por todas as conversas e conselhos, vocês são especiais.

Laura, infelizmente não fizemos o mestrado no mesmo laboratório, mas não deixaram de ser especiais todos os momentos virtuais e físicos que vivemos nesse período. Torço muito pelo seu sucesso.

Agradeço aos meus pais, Cid e Yolanda, e ao meu irmão, Leandro. Sou extremamente sortudo de ter vocês na minha vida. Obrigado pelo amor incondicional, por proporcionarem todas as formas possíveis de apoio e pelo encorajamento constante. Dedico a vocês cada conquista minha. E mãe, sou extremamente grato pela correção desta dissertação e tantos trabalhos durante a graduação.

Ao meu namorado, Túlio, por toda a paciência e carinho do mundo. Seu incentivo e apoio em todas etapas da minha jornada são, para mim, inestimáveis. Sua parceria e acolhimento me permitem superar qualquer desafio.

Agradeço à minha família, por todo o amor e incentivo em todas as etapas da minha vida, principalmente na infância. Em especial aos meus avós maternos Leivina e Edmundo. E a minha avó paterna Maria Hilda, *in memoriam*, onde quer que esteja sei que está olhando por mim. A todos os meus irmãos, primos e tios, eterna gratidão por todos os momentos inesquecíveis e toda contribuição para minha formação enquanto pessoa.

Aos meus amigos, por todos os bons tempos que passamos juntos. Não se faz nada sozinho, receber o apoio de vocês e poder compartilhar as dificuldades da vida me trouxeram leveza em minha caminhada. Em especial ao meu trio, Pedro e Nathalia, que acompanharam de perto cada etapa.

Obrigado a todos pela torcida e incentivo. Sou eternamente grato a vocês!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Rede Vírus/Ministério da Ciência, Tecnologia e Informação (MCTI).

RESUMO

O *Chikungunya virus* (CHIKV- família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus*) é um arbovírus, causador da febre Chikungunya, cujos sintomas incluem febre, artralgia, mialgia e dor de cabeça. Cerca de 40% dos pacientes desenvolvem um quadro crônico de artralgia por meses ou anos, resultando em perdas sociais e econômicas em regiões endêmicas. A sintomatologia e perfil epidemiológico do CHIKV pode ser semelhante à de outras arboviroses, como Zika e Dengue, dificultando o diagnóstico clínico no Brasil, onde há co-circulação de arboviroses. Diante do atual cenário, testes de diagnósticos nacionais, baratos, de aplicação simples e com alto desempenho são cruciais ao controle e tratamento do CHIKV. O presente trabalho objetivou a produção da proteína E2 do CHIKV em sistemas eucariotos e avaliação da sua antigenicidade, com prospecção de desenvolver testes sorológicos, ELISA e IFL. A glicoproteína de envelope E2 está associada a adsorção do vírus, sendo um dos principais alvos da resposta humoral. O gene E2 foi construído para expressão em sistemas eucariotos, a fim de conferir modificações pós-traducionais associadas a antigenicidade e imunogenicidade. CHIKV-E2 foi expressa de forma transiente em células HEK293T e EXPI293. Para expressão estável, o sistema lentiviral foi utilizado para transdução das linhagens HEK293T, EXPI293 e CHO²³⁵³. Após otimizações da expressão estável, as taxas de expressão transiente continuaram superiores. Apesar do tamanho esperado de 40 kDa, CHIKV-E2 foi expressa apresentando cerca de 46 kDa. A divergência entre o tamanho esperado e o identificado pode estar relacionada às MPTs. A proteína CHIKV-E2 expressa em EXPI293 foi purificada e avaliada em ELISA contra soros de pacientes positivos para CHIKV. O ensaio preliminar em ELISA utilizando a proteína recombinante como fase sólida indicou 98,2% de sensibilidade e 100% especificidade para IgG, assim como 77% de sensibilidade e 100% especificidade para IgM.

Palavras-chave: *Chikungunya virus*; diagnóstico; expressão; eucarioto.

ABSTRACT

The *Chikungunya virus* (CHIKV - family *Togaviridae*, genus *Alphavirus*) is an arbovirus that causes Chikungunya fever, whose symptoms include fever, arthralgia, myalgia, and headache. About 40% of patients develop a chronic arthralgia for months or years, resulting in a significant social and economic impact in endemic regions. The symptomatology and epidemiological profile of CHIKV may be similar to other arboviruses, such as Zika and Dengue, therefore, clinical diagnosis in Brazil becomes more challenging, where there is co-circulation of arboviruses. In the current scenario, national, cheap, easy-to-apply, and high-performance diagnostic tests are crucial for the control and treatment of CHIKV. This study aimed at producing the E2 protein of CHIKV in eukaryotic systems and evaluate its antigenicity, with the prospect of developing serological tests, ELISA, and IFL. The E2 envelope glycoprotein is associated with virus adsorption, being one of the main targets of the humoral response. The E2 gene was constructed for expression in eukaryotic systems to confer antigenicity and immunogenicity-associated post-translational modifications. Transient expression of CHIKV-E2 was observed in HEK293T and EXPI293 cells. The lentiviral system was used for stable expression in HEK293T, EXPI293, and CHO²³⁵³ cell lines. After optimizing stable expression, transient expression rates remained higher. Despite the expected size of 40 kDa, CHIKV-E2 was expressed at around 46 kDa. The divergence between the expected and identified size may be related to MPTs. The CHIKV-E2 protein expressed in EXPI293 was purified and evaluated in ELISA against sera from CHIKV-positive patients. The preliminary ELISA assay indicated 98.2% sensitivity and 100% specificity for IgG, as well as 77% sensitivity and 100% specificity for IgM. The preliminary ELISA assay using recombinant protein as the solid phase indicated 98.2% sensitivity and 100% specificity for IgG, as well as 77% sensitivity and 100% specificity for IgM.

Keywords: *Chikungunya virus*; diagnosis; expression; eukaryote.

UNIDADES DE MEDIDAS

| | |
|--------------------------|---|
| % | Porcentagem |
| °C | Graus Celsius |
| Da, kDa | Dalton, Quilodalton |
| g | Aceleração da gravidade |
| g, mg, µg, ng | Gramas, miligramas, microgramas, nanogramas. |
| h, min, s | Horas, minutos, segundos |
| L, mL, µL | mililitro, microlitro |
| m, cm, mm, µm, nm | Metro, centímetro, milímetro, nanômetro, micrômetro |
| M, mM | Molar, milimolar |
| pb, kb | Pares de base, quilobases |
| psi | Pressão (do inglês <i>pound force per square inch</i>) |
| rpm | Rotações por minuto |
| V | Volts |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|-----------|
| Figura 1- Histórico de distribuição das linhagens CHIKV nas últimas décadas. | 25 |
| Figura 2 - Dinâmica da resposta imune diante da infecção por CHIKV. | 30 |
| Figura 3 - Estrutura do RNA genômico de CHIKV e sua expressão. | 32 |
| Figura 4 - Representação esquemática da partícula viral de CHIKV. | 33 |
| Figura 5 - Representação esquemática do ciclo de replicação do CHIKV. | 35 |
| <i>Figura 6 - Esquema da estrutura do dímero E1-E2 de CHIKV.</i> | <i>37</i> |
| <i>Figura 7 - Mapa do vetor pLVX-puro.</i> | <i>55</i> |
| <i>Figura 8 - Mapa do vetor pCMV.VSV-g.</i> | <i>56</i> |
| Figura 9 - Mapa do vetor psPAX2. | 57 |
| Figura 10 - Gráficos das predições de regiões transmembranas (A e C) e hidrofóbicas (B) do gene E2. | 66 |
| Figura 11 - Análise dos sítios putativos de glicosilação no gene E2. | 67 |
| Figura 12 - Construção do gene CHIKV-E2 recombinante para expressão em células de mamífero. | 69 |
| Figura 13- . Estrutura tridimensional da proteína CHIKV-E2 predita pelo software Phyre2. | 70 |
| Figura 14- Mapa do plasmídeo pcDNA 3.1 + CHIKV-E2 contendo a sequência do gene CHIKV-E2. | 71 |
| Figura 15- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de digestão do vetor pcDNA 3.1 + CHIKV-E2. | 72 |
| Figura 16 - Gel SDS-PAGE (A) e Western Blot (B) do sobrenadante e extrato de células HEK293T transfectadas com pcDNA 3.1 + CHIKV-E2. | 74 |
| Figura 17 - Eletroforese em gel SDS-PAGE (A) e Western Blot (B) do sobrenadante de células HEK293T transfectadas com pcDNA 3.1 + CHIKV-E2. | 76 |
| Figura 18- Eletroforese em gel SDS-PAGE (A) e Western Blot (B) do sobrenadante de células EXPI293 transfectada com pcDNA 3.1 + CHIKV-E2. | 77 |
| <i>Figura 19 - Mapa do vetor pLVX-puro-CHIKV-E2.</i> | <i>78</i> |
| Figura 20 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de digestão da construção pLVX-puro + CHIKV-E2. | 79 |
| Figura 21 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR gerados a partir do DNA de células EXPI293 e HEK293T transduzidas com lentivírus pLVX-E2. | 80 |
| <i>Figura 22 - Eletroforese em gel SDS-PAGE (A) e Western Blot (B) do sobrenadante de células HEK293T transduzidas com lentivírus pLVX-E2.</i> | <i>81</i> |
| Figura 23 - Eletroforese em gel SDS-PAGE (A) e Western Blot (B) do sobrenadante de células HEK293T transduzidas com lentivírus pLVX-E2. | 82 |
| Figura 24 - Eletroforese em gel SDS-PAGE (A) e Western Blot (B) do sobrenadante de células HEK293T transduzidas com lentivírus pLVX-E2. | 84 |
| Figura 25- Eletroforese em gel SDS-PAGE (A) e Western Blot (B) do sobrenadante de células EXPI293 transduzidas com lentivírus pLVX-E2. | 85 |
| Figura 26 - Eletroforese em gel SDS-PAGE (A) e Western Blot (B) do sobrenadante de células EXPI293 transduzidas com lentivírus pLVX-E2 concentrado. | 86 |
| Figura 27 - Eletroforese em gel SDS-PAGE (A) e Western Blot (B) do sobrenadante de células EXPI293 transduzidas duas vezes com lentivírus pLVX-E2 concentrado. | 88 |
| Figura 28 - Eletroforese em gel SDS-PAGE (A) e Western Blot (B) do sobrenadante de células EXPI293 transduzidas com lentivírus pLVX-E2 produzido em EXPI293. | 89 |

| | |
|--|-----|
| Figura 29 - Eletroforese em gel SDS-PAGE (A) e Western Blot (B) do sobrenadante de células CHO transduzidas com lentivírus pLVX-E2 produzido em EXPI293. | 92 |
| Figura 30 - Eletroforese em gel SDS-PAGE da purificação sobrenadante de células EXPI293 transfectadas com pcDNA 3.1 + CHIKV-E2. | 94 |
| Figura 31 - Eletroforese em gel SDS-PAGE do purificado do sobrenadante de células EXPI293 transfectadas com pcDNA 3.1 + CHIKV-E2. | 95 |
| Figura 32 - Eletroforese em gel SDS-PAGE (A) e Western Blot (B) do sobrenadante de células EXPI293 T2.4. | 96 |
| Figura 33 - Eletroforese em gel SDS-PAGE da purificação do sobrenadante da cultura EXPI293 T2.4. | 98 |
| Figura 34 - Categorização por ELISA de soros de pacientes infectados com CHIKV. | 100 |
| Figura 35 - Avaliação da sensibilidade e especificidade do ELISA IgG para CHIKV-E2 expressa em EXPI293. | 101 |
| Figura 36 - Avaliação da sensibilidade e especificidade do ELISA IgM para CHIKV-E2 expressa em EXPI293. | 102 |
| Figura 37- Eletroforese em gel SDS-PAGE (A) e Western Blot (B) do sobrenadante de células EXPI293 transduzidas com lentivírus pLVX-E2 produzido em EXPI293. | 128 |
| Figura 38 - Eletroforese em gel SDS-PAGE (A) e Western Blot (B) do sobrenadante de células CHO transduzidas com lentivírus pLVX-E2 produzido em EXPI293. | 130 |
| Figura 39 - Avaliação da sensibilidade e especificidade do ELISA IgM para E2 expressa em E. coli. | 131 |
| Figura 40 - Avaliação da sensibilidade e especificidade do ELISA IgG para E2 expressa em E. coli. | 131 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Tabela 1 - Testes rápidos comerciais para detecção de imunoglobulinas anti-CHIKV. | 39 |
| Tabela 2 - Sensibilidade e especificidade da proteína E2 expressa em procaríoto e eucarioto. | 46 |
| Tabela 3 - Relação entre AUC e potencial de discriminação | 63 |
| Tabela 4 - Classificação de amostras em relação ao índice | 64 |
| Tabela 5 - Referência para a classificação dos resultados pelo teste de ELISA. | 65 |
| Tabela 6 - Comprimento da sequência nucleotídica do gene CHIKV-E2, tamanho da proteína a ser traduzida e suas propriedades físico-químicas | 70 |
| Tabela 7 - Propriedades do ELISA IgM/IgG de CHIKV-E2 expressa em EXPI293. | 103 |
| Tabela 8 - Índices individuais dos soros avaliados em ensaios de ELISA. | 104 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------------|--|
| aa | Aminoácido(s) |
| AC | Acurácia |
| Ae. | Gênero de mosquito <i>Aedes</i> |
| Arg | Arginina |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| Asp | Aspartato |
| AUC | Área sob a curva, do inglês <i>Area Under the Curve</i> |
| AVAs | Anos de vida ajustados por incapacidade |
| C | Proteína estrutural do capsídeo viral |
| CDC | <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> (Estados Unidos) |
| CHIKV | <i>Chikungunya virus</i> |
| CHO | Células de ovário de hamster chinês, do inglês Chinese Hamster Ovary |
| CMV | Citomegalovírus |
| CPV | vesícula citopática, do inglês <i>Cytopathic Vesicle</i> |
| CRISPR | <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i> |
| DENV | <i>Dengue virus</i> |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>) |
| E | Especificidade |
| ECSA | Linhagem Leste-Centro-Sul Africano, do inglês <i>East Central South African</i> |
| ELISA | Ensaio de imunoabsorção enzimática, (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>) |

| | |
|------------------|--|
| et al | Do latim, <i>et alii</i> , que significa, e outros |
| E. coli | <i>Escherichia coli</i> |
| E1/E2 | Proteína do envelope 1/ Proteína do envelope 2 (do CHIKV) |
| HEK | Células de rim de embrião humano, do inglês <i>Human embryonic kidney 293 cells</i> |
| His | Histidina |
| HIV | vírus da imunodeficiência humana, do inglês <i>human immunodeficiency virus</i> |
| IFL | Imunocromatografia de Fluxo Lateral |
| IOL | Linhagem Oceano Índico, do inglês <i>Ocean Indian Lineage</i> |
| IgG/ IgM | Imunoglobulinas G e M |
| MAC-ELISA | Ensaio imunoenzimático de captura de IgM (IgM <i>antibody capture</i> ELISA) |
| MPTs | Modificações pós-traducionais |
| nsP | Proteínas não estruturais de alfavírus |
| ORF | Fase aberta de leitura, do inglês <i>Open Reading Frame</i> |
| PCR | Reação em cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) |
| pE2 | Proteína precursora de E2 |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| POC | Ponto de atendimento, do inglês <i>point-of-care</i> |
| poli-A | Cauda poliadenilada |
| PRNT | Teste de Neutralização por Redução de Placa, do inglês <i>Plaque Reduction Neutralization Test</i> |
| RT-PCR | Reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa |
| RE | Retículo endoplasmático |
| RNA | Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic Acid</i>) |

| | |
|-----------------|--|
| RT-PCR | Reação em cadeia da Polimerase em Tempo Real, do inglês <i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i> |
| SDS-PAGE | Eletroforese em gel de Dodecilsulfato de Sódio e Poliacrilamida |
| SUS | Sistema Único de Saúde |
| SV40 | Simian vacuolating virus 40 |
| UFMG | Universidade Federal de Minas Gerais |
| UTR | Região não traduzida, do inglês <i>Untranslated Region</i> |
| VPN | Valor preditivo negativo |
| VPP | Valor preditivo positivo |
| VSV-G | Proteína G do vírus vesicular da estomatite, do inglês <i>Vesicular stomatitis virus G</i> |
| WNV | Vírus do Nilo Ocidental (<i>West Nile virus</i>) |
| YFV | Vírus da Febre amarela (<i>Yellow fever virus</i>) |
| ZIKV | <i>Zika vírus</i> |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 REVISÃO DA LITERATURA | 18 |
| 1.1 Arboviroses | 18 |
| 1.2 História das arboviroses | 20 |
| 1.3 Família <i>Togaviridae</i> | 22 |
| 1.4 Histórico do CHIKV | 22 |
| 1.5 Epidemiologia atual | 24 |
| 1.6 Epidemiologia do CHIKV no Brasil | 25 |
| 1.7 Febre Chikungunya..... | 27 |
| 1.8 Resposta humoral | 30 |
| 1.9 Partícula viral e Ciclo replicativo..... | 31 |
| 1.9.1 Genoma | 31 |
| 1.9.2 Morfologia | 32 |
| 1.9.3 Ciclo de Multiplicação..... | 33 |
| 1.9.4 Glicoproteína E2..... | 36 |
| 1.10 Diagnósticos sorológicos comerciais | 37 |
| 1.11 Vigilância epidemiológica de arboviroses no Brasil | 40 |
| 1.12 Sistemas de expressão | 41 |
| 1.12.1 Sistema de expressão procarioto | 41 |
| 1.12.2 Sistema de expressão eucarioto | 42 |
| 1.12.3 Glicosilação | 44 |
| 1.12.4 Lentivírus | 44 |
| 1.12.5 ELISA de E2 | 46 |
| 2 JUSTIFICATIVA | 47 |
| 3 OBJETIVOS | 48 |
| 3.1 Objetivo geral..... | 48 |
| 3.2 Objetivos específicos | 48 |
| 4 METODOLOGIA | 49 |
| 4.1 Construção do gene CHIKV-E2..... | 49 |
| 4.1.1 Análise do gene | 49 |
| 4.1.2 Construção do gene..... | 49 |
| 4.2 Clonagem e confirmação da correta construção do plasmídeo | 50 |
| 4.2.1 Transformação..... | 50 |
| 4.2.2 Digestão enzimática..... | 51 |
| 4.2.3 Eletroforese em gel de agarose..... | 51 |

| | |
|---|----|
| 4.3 Cultivo celular | 51 |
| 4.3.1 HEK293T | 51 |
| 4.3.2 EXPI293..... | 52 |
| 4.3.3 CHO..... | 52 |
| 4.4 Expressão transiente do gene CHIKV-E2 em sistema eucarioto | 53 |
| 4.4.1 Transfecção em HEK293T | 53 |
| 4.4.2 Transfecção em EXPI293..... | 53 |
| 4.5 Expressão estável do gene CHIKV-E2 em sistema eucarioto | 54 |
| 4.5.1 Construção do plasmídeo pLVX –puro + CHIKV-E2 | 54 |
| 4.5.2 Produção lentiviral em HEK293T..... | 58 |
| 4.5.3 Produção lentiviral em EXPI293 | 58 |
| 4.5.4 Concentração de lentivírus – Ultracentrifugação e filtro Amicon..... | 58 |
| 4.5.5 Transdução | 59 |
| 4.6 PCR | 60 |
| 4.7 Análise da expressão..... | 60 |
| 4.7.1 SDS-PAGE | 60 |
| 4.7.2 Western Blot | 61 |
| 4.8 Cromatografia de afinidade..... | 62 |
| 4.9 ELISA | 62 |
| 4.10 Análises dos resultados de ELISA..... | 63 |
| 5 RESULTADOS | 65 |
| 5.1 Predição de regiões transmembranas e hidrofóbicas na glicoproteína E2..... | 65 |
| 5.2 Predição de sítios putativos de glicosilação no gene E2 | 67 |
| 5.3 Construção do gene CHIKV-E2..... | 67 |
| 5.3.1 Construção do gene CHIKV-E2 | 68 |
| 5.3.2 Propriedades físico-química do gene CHIKV-E2..... | 70 |
| 5.3.3 Síntese do gene CHIKV-E2 no vetor pcDNA 3.1 (+) | 70 |
| 5.4 Clonagem do pcDNA 3.1 + CHIKV-E2 e confirmação de identidade por restrição enzimática | 72 |
| 5.5 Expressão transiente do gene CHIKV-E2..... | 73 |
| 5.5.1 Expressão transiente do gene CHIKV-E2 em HEK293T | 73 |
| 5.5.2 Expressão transiente do gene CHIKV-E2 em EXPI293..... | 76 |
| 5.6 Construção, clonagem e confirmação do pLVX-puro-CHIKV-E2 | 77 |
| 5.7 Expressão estável do gene CHIKV-E2..... | 79 |
| 5.7.1 Confirmação por PCR da integração do gene CHIKV-E2..... | 79 |
| 5.7.2 Expressão estável do gene CHIKV-E2 em HEK293T | 81 |
| 5.7.3 Expressão estável do gene CHIKV-E2 em EXPI293..... | 84 |
| 5.8 Otimização da expressão estável do gene CHIKV-E2 em EXPI293..... | 85 |

| | |
|---|-----|
| 5.8.1 Comparação da expressão do gene CHIKV-E2 por células transduzidas com sobrenadante lentiviral não concentrado e concentrado | 86 |
| 5.8.2 Comparação da expressão do gene CHIKV-E2 por células transduzidas uma e duas vezes..... | 87 |
| 5.8.3 Comparação da expressão do gene CHIKV-E2 por células transduzidas com sobrenadante lentiviral produzido em EXPI..... | 88 |
| 5.9 Purificação da proteína CHIKV-E2 | 92 |
| 5.10 ELISA com a proteína CHIKV-E2 purificada | 98 |
| 6 DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS..... | 106 |
| 7 CONCLUSÃO..... | 111 |
| 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 112 |
| APÊNDICE 1 – Soluções e tampões..... | 124 |
| ANEXO 1 - Identidade do par dos iniciadores MSC senso e anti-senso | 127 |
| ANEXO 2 - Western Blot anti-E2 do sobrenadante de EXPI293 T1.9 e CHO T1.3..... | 128 |
| ANEXO 3 - Resultados de ELISA pra E2 expressa em <i>E. coli</i> 2023 | 131 |
| ANEXO 4 – Relação da produção científica | 132 |
| ANEXO 5 – Carta emitida pela Fundação Ezequiel Dias-FUNED a respeito do uso de amostras humanas no projeto..... | 133 |

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Arboviroses

Em 1942, o termo *arthropod-borne viroses* (em português, vírus transmitidos por artrópodes) foi implementado para categorizar vírus que infectam animais, transmitidos por artrópodes e causadores de encefalite. Contudo, uma derivação de “*arthropod-borne viroses*” foi cunhada em 1963, o termo arbovírus. A partir de então, como uma classificação ecológica, arboviroses se designa ao grupo não taxonômico de vírus que apresentam um ciclo complexo de transmissão envolvendo hospedeiros vertebrados e artrópodes hematófagos (WHO, 1967).

A manutenção natural dos arbovírus ocorre essencialmente através da transmissão biológica artrópode-vertebrado-artrópode. Na transmissão biológica, o vetor artrópode infectado transmite o arbovírus para um hospedeiro vertebrado susceptível durante o processo de hematofagia. No vertebrado, a multiplicação do vírus resulta no desenvolvimento de viremia, e por fim, o repasto sanguíneo em vertebrados apresentando viremia resulta na infecção de artrópodes hematófagos susceptíveis (ARTSOB; LINDSAY; DREBOT, 2016). A transmissão vertical em artrópodes também é relevante à manutenção de determinadas arboviroses (WHO, 1985). Já a transmissão mecânica, que envolve o contato com o aparelho bucal contaminado do hospedeiro artrópode sem a replicação do vírus no organismo (KENNEY; BRAULT, 2014), e a transmissão humano-humano, através de fluidos (HUANG; HIGGS; VANLANDINGHAM, 2019), são descritas para arbovírus, porém com menor impacto na transmissão.

O ciclo das arboviroses pode envolver um ou mais hospedeiros vertebrados. Os hospedeiros acometidos incluem mamíferos, aves, anfíbios e répteis. No ciclo natural, os hospedeiros infectados progridem para viremia, necessária à manutenção das arboviroses, sem apresentar sintomas associados ou apenas manifestando sintomas brandos. O desenvolvimento clínico de sintomas e a letalidade estão mais associadas à infecção de hospedeiros acidentais. Hospedeiros acidentais não são comuns ao ciclo natural das arboviroses e podem atuar tanto como hospedeiros terminais quanto hospedeiros competentes a desenvolver viremia e propagar a arbovirose. Para a maioria das arboviroses o homem atua como um hospedeiro

acidental terminal, contudo, para arboviroses como *Chikungunya virus* (CHIKV), *Yellow fever virus* (YFV), *Dengue virus* (DENV) e *Zika virus* (ZIKV) a manutenção urbana do ciclo na ausência de outros vertebrados é marcante na epidemiologia (GOULD et al., 2017; KENNEY; BRAULT, 2014).

Artrópodes como mosquitos, carrapatos, moscas e flebotomíneos são vetores comuns de arboviroses, e entre eles, os mosquitos são os artrópodes que apresentam maior importância para a saúde pública mundial (KENNEY; BRAULT, 2014). As espécies de mosquito *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* destacam-se como vetores das arboviroses pela ampla distribuição geográfica atual e competência para transmissão de diversos arbovírus (KAMAL et al., 2018).

Oriundo da África subsaariana, atualmente, o *Ae. aegypti* ocupa nichos urbanos se alimentando preferencialmente de sangue humano, sendo o principal vetor da YFV, DENV, CHIKV E ZIKV (GOULD et al., 2017; KAMAL et al., 2018). Enquanto *Ae. albopictus*, inicialmente endêmico em florestas no sudeste da Ásia, também está presente em regiões tropicais e subtropicais, porém apresenta maior aptidão a climas temperados que o *Ae. Aegypti*. Localizado principalmente em regiões rurais e periurbanas, o *Ae. albopictus* se alimenta igualmente de diversos vertebrados, o que diminui seu potencial na transmissão de arboviroses entre humanos. Apesar disso, *Ae. albopictus* pode atuar como vetor secundário ou exclusivo para arboviroses como CHIKV, DENV e ZIKV (PAUPY et al., 2009).

Apesar das origens divergentes, as múltiplas introduções dessas espécies em novos locais se deram principalmente pelas navegações negreiras e comerciais dos últimos séculos. Atualmente, a incidência de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* se estende a todos os continentes, exceto Antártico, sendo sobrepostas em diversas regiões. As alterações dos padrões climáticos, decorrentes do aquecimento global e modificações ambientais pelo homem, influenciam a demografia de *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*, prevendo-se que a distribuição desses artrópodes se amplie nas próximas décadas (KAMAL et al., 2018; PAUPY et al., 2009).

Os arbovírus são filogeneticamente polifiléticos, indicando origens plurais para o padrão de transmissão artrópode-vertebrado-artrópode. As classificações não taxonômicas dentro do grupo utilizam a sintomatologia e antigenicidade como critérios de categorização. Atualmente, são descritas mais de 500 arboviroses, porém apenas

uma parcela delas causa patologias em humanos. Os arbovírus patogênicos se concentram nas famílias *Togaviridae* (gênero *Alphavirus*), *Flaviviridae* (gênero *Flavivirus*) e *Bunyaviridae* (*Bunyavirus*, *Orthobunyavirus*, *Nairovirus* e *Phlebovirus*). A sintomatologia das arboviroses que afetam humanos varia de acordo com o vírus e até mesmo a linhagem. São comuns quadros assintomáticos e brandos com o desenvolvimento de febre, dores de cabeça e musculares, artralgia e/ou irritação de pele. Casos graves são menos frequentes e exibem progressão de sintomas leves para graves como meningite, febre hemorrágica ou poliartralgia (CAPUTO et al., 2018).

1.2 História das arboviroses

As arboviroses afetam humanos há séculos. Inicialmente, os arbovírus eram restritos a regiões silvestres, porém, a domesticação dos mosquitos, em especial *Ae. aegypti*, seguida da sua introdução em novas regiões permitiu o surgimento e manutenção do ciclo de diversas arboviroses em novas regiões, inclusive urbanas e periurbanas. Nos últimos séculos, algumas arboviroses como *Japanese encephalitis virus* (JEV) e *Saint Louis encephalitis virus* (SLEV), emergiram localmente. Enquanto cinco arboviroses, *West Nile virus* (WNV), *Dengue virus* (DENV), *Zika virus* (ZIKV), *Chikungunya virus* (CHIKV) e *Yellow fever virus* (YFV), emergiram nos dois hemisférios (GOULD et al., 2017). Os últimos quatro vírus destacam-se por serem capazes de sustentar um ciclo urbano humano-mosquito-humano (WEAVER, 2018).

Alterações nos padrões de transmissão das arboviroses que propiciam a emergência estão relacionados a uma série de fatores, como mutações pontuais no genoma viral, introdução a novas regiões, a distribuição e densidade populacional dos hospedeiros e vetores (HUANG; HIGGS; VANLANDINGHAM, 2019; WILDER-SMITH et al., 2017).

Em relação à presença do vetor, cerca de metade da população mundial habita áreas de risco para arboviroses (KAMAL et al., 2018), apenas para DENV são estimadas 390 milhões de infecções por ano (WHO, 2021). Apesar da baixa letalidade ser uma característica comum à maioria das arboviroses, a circulação dos arbovírus

causam graves impactos à saúde pública de diversos países devido à morbidade associadas e podem afetar a qualidade de vida dos infectados (GIRARD et al., 2020).

Apesar do impacto global, a previsão de novas epidemias de arboviroses e o controle das já existentes ainda são falhos, principalmente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Para mitigar a emergência dos arbovírus se faz necessário aprofundar os conhecimentos neste grupo ecológico, além da promoção de ações para o controle vetorial, vigilância epidemiológica desenvolvimento e utilização de testes moleculares e sorológicos eficazes, assim como fármacos e vacinas (WEAVER, 2018; WILDER-SMITH et al., 2017).

O Brasil apresenta diversos fatores que favorecem a circulação de arboviroses. Trata-se de um país continental dentro da região tropical e subtropical, com altos índices pluviométricos, regiões florestais e regiões com alta densidade demográfica, apresentando ampla distribuição de *Ae. aegypti* e *Ae. Albopictus*. Além de fatores socioeconômicos que favorecem a multiplicação dos vetores e a precariedade da vigilância epidemiológica (MAGALHAES et al., 2020). Nesse contexto, o Brasil é um dos países com maior incidência de DENV no mundo (WHO, 2021) e atualmente, as arboviroses causadoras de doenças que circulam no país incluem DENV, YFV, CHIKV, ZIKV, *Mayaro virus*, *Oropouche virus*, *WNV* e *SLEV* (DONALISIO; FREITAS; ZUBEN, 2017).

No Brasil, o CHIKV causou diversos surtos sazonais por todo o país desde a sua entrada em 2014 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020a). No geral, a sintomatologia de CHIKV é semelhante à dos outros arbovírus, contudo destaca-se por causar sintomas relacionados à artralgia, que podem se estender por anos. O estado crônico da febre chikungunya impacta na qualidade de vida e produtividade dos pacientes acometidos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Estimativas conservadoras, mensuraram que os gastos públicos com o manejo das arboviroses DENV, CHIKV e ZIKV foram de 2,3 bilhões de reais para 2016 (TEICH; ARINELLI; FAHAM, 2017). Dentro desse gasto público, avaliando apenas os anos de vida ajustados por incapacidade (AVAls) causadas pelas arboviroses, o CHIKV foi responsável pela perda de quase 124 milhões (29%) dos 431 milhões de reais perdido para essa categoria (TEICH; ARINELLI; FAHAM, 2017). Apesar desse impacto em AVAls, os casos de CHIKV representaram apenas 13,7% dos casos totais de arboviroses registrados em 2016, alcançando 271.824 notificações para a doença.

1.3 Família *Togaviridae*

O CHIKV pertence à família *Togaviridae*, composta unicamente pelo gênero *Alphavirus*. Anteriormente a família *Togaviridae* também englobava os gêneros *Flavivirus* e *Rubivirus*. Os alfavírus são compostos por um genoma RNA fita simples positivo, interno ao nucleocapsídeo, envoltos por um envelope de origem celular embebido de glicoproteínas virais. Apresentando 32 espécies, o gênero *Alphavirus* é constituído principalmente por arbovírus, dos quais muitos são identificados como patógenos humanos e animais (ICTV, 2018).

Presentes em todos os continentes (LA LINN et al., 2001), os vírus da família *Togaviridae* são agrupados em oito complexos antigênicos (ICTV, 2018). Para a maioria dos alfavírus que infectam humanos, este é o hospedeiro terminal, podendo desenvolver sintomatologia relacionada à febre, erupções cutâneas, artrite e encefalite. Espécies como CHIKV, MAYV, *Sindbis virus* (SINV) e *Ross River virus* (RRV) são conhecidos por causar artralgia em humanos. Enquanto *Venezuelan equine encephalitis virus* (VEEV), *Eastern equine encephalitis virus* (EEEV), *Western equine encephalitis virus* (WEEV) são alfavírus capazes de infectar humanos e animais, causando encefalite (GRIFFIN, 2013; POWERS et al., 2001).

Integrando o complexo antigênico Semliki Forest, CHIKV é extremamente próximo a espécie *O'nyong nyong virus*, apesar da diferença vetorial, uma vez que *O'nyong nyong virus* é transmitido por mosquitos do gênero *Anopheles* (POWERS et al., 2001).

1.4 Histórico do CHIKV

O CHIKV é, provavelmente, originário de florestas da África Subsaariana. Onde desde a década de 1950, partículas virais de CHIKV e anticorpos específicos são encontrados em primatas não humanos no ambiente silvestre, assim como outros mamíferos. Apesar de não ser plenamente elucidado, o ciclo silvestre de CHIKV em regiões florestais da África parece ser bem estabelecido, envolvendo mosquitos do gênero *Aedes*, e atuando como focos potenciais para a emergência de CHIKV (CHEN et al., 2016; ZELLER; BORTEL; SUDRE, 2016).

O nome Chikungunya deriva de “kungunyala”, verbo da língua maconde que significa “contorcer” e “dobrar”, e incita a sintomatologia dos pacientes acometidos pela febre Chikungunya. A língua maconde é falada pelos habitantes do sudeste da Tanzânia e norte de Moçambique, leste da África (LUMSDEN, 1955; ROBINSON, 1957). Onde, em surtos relacionados entre 1952 e 1953, o CHIKV foi isolado pela primeira vez no soro de pacientes acometidos por artralgia (MASON; HADDOW, 1957; ROSS, 1956). Apesar da data de isolamento, Carey (1971), sugere que diversos registros de epidemias de “dengue” de até 250 anos se assemelham a sintomatologia de CHIKV, indicando que CHIKV pode ter sido o agente causador de surtos esporádicos na Índia e sudeste da Ásia, além de outras possíveis epidemias por todo o globo (CAREY DONALD. E., 1971; HALSTEAD, 2015). A linhagem isolada primeiramente na África foi nomeada como Leste-Centro-Sul Africano (ECSA - *East Central South African*) e continuou a circular no continente, causando epidemias por diversos países africanos entre o período de seu isolamento até 1980 (ZELLER; BORTEL; SUDRE, 2016).

Na Ásia, o CHIKV foi isolado pela primeira vez em 1958, em Bangkok, Tailândia, onde estava relacionado ao mosquito *Ae. aegypti* em um surto urbano. Nos anos seguintes o CHIKV circulou por diversos países asiáticos causando grandes surtos, como uma epidemia em Chennai, na Índia, que acometeu mais de 400.000 indivíduos em 1964 (ZELLER; BORTEL; SUDRE, 2016). Contudo, a detecção de anticorpos específicos para CHIKV em soros coletados já em 1954 e a baixa taxa de infecção de pessoas maiores de 50 anos apresentando soroconversão no surto de 1964, indicam que CHIKV circulava na Ásia antes de seu isolamento. Estudos filogenéticos indicam que o genótipo causador de surtos entre 1958 e 1973, denominado Asiático (*Asian*), teria divergido da linhagem ECSA enzoótica antes de 1956 (WEAVER; FORRESTER, 2015). Mais recente, o isolamento do CHIKV e identificação de anticorpos anti-CHIKV em animais silvestres na Ásia indicam a possibilidade do estabelecimento enzoótico do arbovírus no continente (APANDI et al., 2009).

Após a grande circulação na África e Ásia, respectivamente até 1980 e 1973, CHIKV causou epidemias esporádicas restritas a esses continentes. No século XXI, impulsionado pelas viagens aéreas, altas densidades populacionais e extensa distribuição global dos vetores, o CHIKV foi introduzido intensamente em novas

regiões por todo o globo (WHO, 2020). Em 2004, a linhagem mais recente de CHIKV, o genótipo Oceano Índico (IOL - *Ocean Indian Lineage*), derivada da linhagem ECSA, começava a circular em regiões do Quênia após 22 anos do primeiro registro local do ECSA. A febre Chikungunya atingiu quase meio milhão de pessoas e a soroprevalência chegou a 70% em regiões pequenas como a ilha Lamu, Quênia. Rapidamente a nova linhagem migrou para regiões próximas e ilhas do Oceano Índico, onde causou epidemias nos anos seguintes (WAHID et al., 2017).

Uma das regiões afetadas pelo genótipo IOL foi a Ilha Reunião, território francês com 750.000 habitantes no Oceano Índico, a qual apresentou altas taxas de infecção, acometendo 35% da população. Contudo, o mais surpreendente nessa epidemia foi a ausência do principal vetor, *Ae. aegypti*, naquela ilha (ZELLER; BORTEL; SUDRE, 2016). Diferente dos registros anteriores para CHIKV, os altos índices de infecção detectados na ilha se sustentaram pela transmissão exclusiva por *Ae. albopictus*, que até então apresentava papel secundário na epidemiologia. Estudos subsequentes relacionaram a alta taxa de transmissão de CHIKV por *Ae. albopictus* a mutações na glicoproteína de envelope, E1 (WEAVER; FORRESTER, 2015).

As epidemias urbanas de CHIKV são caracterizadas por um súbito aumento no número de casos. A taxa de infectados numa população susceptível durante um surto pode variar de 35% a 70% em poucas semanas (WAHID et al., 2017; ZELLER; BORTEL; SUDRE, 2016). E após surtos explosivos regionais, CHIKV tende a desaparecer ou circular em baixos níveis nos anos seguintes devido ao desenvolvimento de imunidade pela população (GRIFFIN, 2013).

1.5 Epidemiologia atual

A partir de 2005, o genótipo IOL foi disseminado para o sul e sudeste asiático, continuando a circular pela África e Ásia até a atualidade. Em 2007, casos autóctones de CHIKV foram relatados na Europa pela primeira vez. A ausência de *Ae. aegypti* em regiões temperadas, como a Europa, dificulta a transmissão local de arboviroses como DENV e YFV, e anteriormente do CHIKV. Porém, mutações na linhagem IOL e ECSA permitiram que CHIKV pudesse estabelecer ciclos urbanos em regiões temperadas

envolvendo *Ae. albopictus* e infectar centenas de pessoas. Os primeiros surtos foram relatados na Itália, e o sul da Europa continuou a apresentar casos autóctones esporádicos até 2015. Desde 2011, a Oceania também começava a enfrentar a circulação de CHIKV (ZELLER; BORTEL; SUDRE, 2016).

Apesar de apresentar vetores capazes de transmitir o vírus, regiões com alta densidade populacional, clima adequado, população susceptível e arboviroses bem estabelecidas, o continente Americano foi o último a apresentar casos autóctones de CHIKV. A introdução do vírus às Américas na era moderna se deu pela linhagem asiática na Ilha de São Martinho, Caribe, no final de 2013 (WEAVER, 2014). Em pouco tempo, centenas de casos foram descritos e o CHIKV havia se alastrado para países da América Central, do Norte e do Sul. Desde a sua introdução até Janeiro de 2015 foram relatados mais de um milhão de casos suspeitos para febre Chikungunya e cerca de 25000 casos confirmados, em 42 países e territórios nas Américas (HALSTEAD, 2015; PAHO/WHO, 2021).

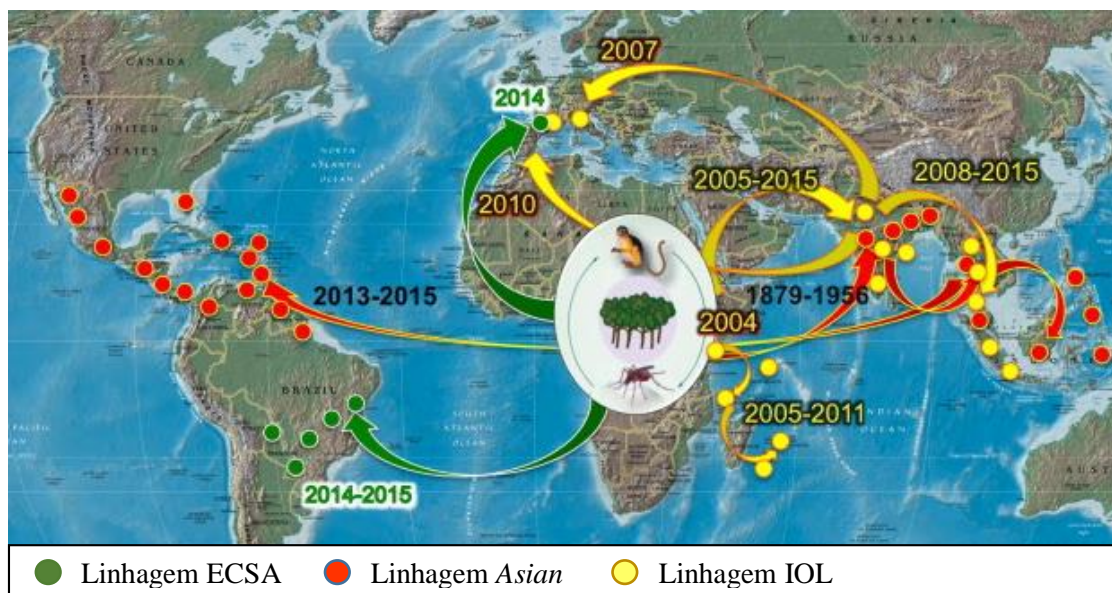


Figura 1- Histórico de distribuição das linhagens CHIKV nas últimas décadas. As setas indicam os eventos de exportação do arbovírus. Em verde, a linhagem ECSA, em vermelho, a linhagem Asian, e em amarelo, a linhagem IOL. Adaptado de Weaver & Forrester (2015).

1.6 Epidemiologia do CHIKV no Brasil

No Brasil, os primeiros relatos de transmissão autóctone de CHIKV ocorreram no Amapá e na Bahia, em Setembro de 2014 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020a).

Apesar da proximidade temporal dos casos iniciais, estudos filogenéticos apontaram introduções de origens divergentes e anteriores aos primeiros relatos. O genótipo ECSA foi isolado de três pacientes sem histórico de viagem em Feira de Santana, Bahia, enquanto o genótipo asiático foi isolado de dois pacientes com histórico de viagem para o Caribe e um paciente residente de Oiapoque, Amapá. A filogenia dos isolados ECSA indicaram que este genótipo foi introduzido uma vez, supostamente advindo da Angola. Já a filogenia dos isolados da linhagem asiática sugeriu múltiplas introduções provenientes do Caribe e América do Sul (NUNES et al., 2015).

O CHIKV permaneceu presente em território brasileiro causando epidemias por diversos estados nos anos seguintes. Assim como para DENV e ZIKV, a notificação de casos suspeitos de infecção por CHIKV é compulsória no Sistema Único de Saúde (SUS). Já no ano de introdução, 2014, foram 4577 casos autóctones suspeitos de febre Chikungunya atingindo cinco estados (SILVA et al., 2018). A Bahia e o Amapá, estados onde foram identificados os primeiros casos nacionais, apresentaram maior incidência. Em 2015, foram 38.499 notificações de casos autóctones e 16 óbitos em decorrência da infecção viral no total 12 de federações brasileiras. O Nordeste apresentou a maior incidência, no qual o estado da Bahia sozinho apresentou 75% dos casos. 10 estados registraram casos importados de febre Chikungunya para 2015. De acordo com monitoramento epidemiológico, 2016 foi o ano com maior incidência, sendo 277.882 casos prováveis de febre Chikungunya por todo o país e 239 óbitos. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018, 2020b, 2021a).

Em 2017, foram notificados 247.692 casos e 192 mortes, concentrados no Nordeste. 118.765 casos suspeitos e 45 óbitos foram registrados em 2018, ano no qual o Sudeste, pela primeira vez, apresentou maior incidência, detendo 60,4% das notificações. O Rio de Janeiro apresentou o maior número absoluto e o Mato Grosso a maior taxa em relação ao número de habitantes. Em 2019, Rio de Janeiro e Rio Grande do Norte concentraram 75,6% das 178.500 notificações daquele ano, e 101 óbitos foram confirmados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020b, 2021a). Em 2020, o Nordeste volta a ser a região mais incidente para CHIKV, seguida do Sudeste, sendo 99.804 casos prováveis, 30 óbitos confirmados e 23 em investigação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021b, 2021a).

O Ministério da Saúde registrou 174.517 casos prováveis para o ano de 2022, número 78,9% maior do que o registro em 2021 (Ministério da Saúde, 2023). Nos

últimos anos, a região Nordeste foi a mais afetada pela febre Chikungunya, sobretudo o estado do Ceará, responsável por 30% das notificações de 2022 no Brasil.

Sintomas inespecíficos, como febre e dor no corpo, são compartilhados por infecções causadas por arbovírus e pela COVID-19 (JAIN et al., 2021). No contexto de coexistência dessas doenças no Brasil, pacientes podem ter sido erroneamente diagnosticados, devido a urgência da pandemia e a carência de testes. Além de possíveis diagnósticos imprecisos, o colapso do sistema de saúde brasileiro pode ter acarretado a subnotificação de CHIKV para os anos de 2020 e 2021. Uma vez que anos de 2020 e 2021 apresentaram uma notificação menor de casos em relação aos anos anteriores e anos seguintes (SILVA; MAGALHÃES; PENA, 2021)

Em 2023, foram registrados 83.942 casos, um aumento de 35% em relação ao mesmo período do ano anterior, além de 19 mortes. O Sudeste apresenta a maior incidência até o momento (O GLOBO, 2023). Até Abril de 2023, foram registrados 844 casos prováveis em Belo Horizonte, contrastando com as 11 notificações até Abril de 2022 (ITATIAIA, 2023). Para todos os anos, os picos de incidência estiveram concentrados entre a semana epidemiológica 5 e 25, semelhante ao padrão de outras arboviroses, devido ao calor e pluviosidade desse período (SILVA; MAGALHÃES; PENA, 2021).

O Brasil apresenta potencial para o estabelecimento de um ciclo silvestre de CHIKV, uma vez que dispõe de vetores e hospedeiros susceptíveis em florestas. A vigilância do CHIKV nas florestas brasileiras é essencial para o controle epidemiológico dessa arbovirose, uma vez que assim como o YFV, a circulação silvestre desse arbovírus pode ser responsável pela manutenção do vírus no país (FIGUEIREDO, 2019; WEAVER; FORRESTER, 2015).

1.7 Febre Chikungunya

No ciclo urbano, a transmissão do CHIKV ocorre através da inoculação viral na pele durante a picada de fêmeas infectadas do gênero *Aedes*. Inicialmente, partículas de CHIKV replicam-se em fibroblastos dérmicos, macrófagos e células endoteliais no local de inoculação. A progênie viral é transportada para órgão linfoides secundários, onde, após a infecção, partículas são liberadas para o sistema

circulatório e atingem os sistemas musculoesquelético, sistema linfático e sistema nervoso (GOH et al., 2013; ZAID et al., 2018). O CHIKV é transmitido principalmente pela via vetorial, porém, em baixas taxas, também é descrita a transmissão entre humanos por sangue contaminado, transmissão vertical e intraparto (CDC, 2018a).

Cerca de 70% dos indivíduos infectados pelo CHIKV apresentam sintomatologia, no geral, leve a moderada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Casos graves (aproximadamente 0,3%) de febre Chikungunya não são frequentes, e a taxa de letalidade para a doença é estimada em 1 morte a cada 1000 casos, sendo maior para maiores de 60 anos, menores de 1 ano de idade e indivíduos com comorbidades (GRIFFIN, 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017, 2020b).

Nos seres humanos, o tempo de incubação normalmente é de 3 a 7 dias, podendo variar de 1 a 12 dias (CDC, 2018a). A sintomatologia se inicia subitamente com uma febre aguda, associada a poliartralgia bilateral e simétrica. Também são frequentes a ocorrência de mialgia, cefaléia, artrite, fadiga e erupções cutâneas, com duração média de sete dias. Outros sintomas da fase aguda incluem náuseas, dor retro-ocular, calafrios, conjuntivite sem secreção, faringite, diarreia, dor abdominal e neurite. Alteração laboratoriais como linfopenia, trombocitopenia, creatinina elevada e transaminases hepáticas elevadas podem ser identificadas (CDC, 2018a; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; WHO, 2020).

Casos graves são raros e podem envolver o desenvolvimento de nefrite, hepatite, meningoencefalite, trombocitopenia ou encefalopatia. Para alguns pacientes, a forma clínica grave da febre Chikungunya está relacionada ao agravamento de doenças cardiovasculares, respiratórias, renais e autoimunes pré-existentes (DA CUNHA; TRINTA, 2017; GRIFFIN, 2013).

Os sintomas da fase aguda se limitam a duas semanas após o início dos sintomas. Contudo, a febre Chikungunya pode evoluir para um quadro de fase subaguda, estendendo do final da fase aguda a três meses, e até mesmo a um quadro crônico, com duração de meses a anos. A fase subaguda é caracterizada, principalmente, pela continuidade ou piora da artralgia e artrite, podendo ocorrer erupções cutâneas, cansaço e sintomas depressivos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Sintomas não específicos como mudanças na cor da pele e alopecia também são descritos na fase subaguda (DA CUNHA; TRINTA, 2017).

A fase crônica da febre Chikungunya, é caracterizada pela persistência e surgimento de novas complicações após 3 meses, relacionadas à artralgia, mialgia, e em menor frequência, neuropatia. Sintomas comuns a essa forma clínica incluem dores musculoesqueléticas, fadiga, artrite reumática, depressão e distúrbios de sono, acometendo com maior frequência mulheres acima dos 45 anos, idosos e pessoas com comorbidades (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; PAIXÃO et al., 2018). No decorrer da fase subaguda e crônica os processos inflamatórios exacerbados podem resultar na degeneração e calcificação das articulações acometidas (DA CUNHA; TRINTA, 2017). Estima-se que a fase crônica atinja mais de 40% dos pacientes (GRIFFIN, 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Apesar da importância clínica da doença e atual emergência do patógeno, ainda não existem antivirais e vacinas licenciados para tratamento da infecção por CHIKV (CDC, 2018b; WHO, 2020; ZAID et al., 2018). Na fase aguda, o tratamento consiste principalmente em reduzir a dor e controlar a febre do paciente. Anti-inflamatórios não esteróides e analgésicos são utilizados na fase subaguda, com intuito de aliviar as dores e limitar processos inflamatórios e suas consequências. Para manifestação clínica crônica o tratamento está relacionado diretamente às manifestações clínicas identificadas, com base na localização e na presença ou ausência de inflamação, degeneração e lesões musculoesqueléticas. Após o diagnóstico da complicação desencadeada pela febre Chikungunya, o tratamento tradicional para as doenças desenvolvidas é aplicado (ZAID et al., 2018).

As manifestações da febre Chikungunya, principalmente a fase crônica, estão relacionadas à diminuição na qualidade de vida do paciente, uma vez que dores debilitantes e distúrbios neurológicos podem persistir de meses até cerca de três anos (PAIXÃO et al., 2018). Puntasecca e colaboradores (2021) estimaram que entre 2010 a 2019 CHIKV causou a perda de 106 mil AVAIs (os anos de vida ajustados por incapacidade) anualmente pelo mundo, sendo 94,995 AVAIs apenas nas Américas. Considerando que a introdução de CHIKV nas Américas aconteceu em 2013, a avaliação do impacto global no período de 2014 a 2019 aumenta os AVAIs para 158 mil nas Américas. A complicação da febre chikungunya que maior contribuiu para os AVAIs foi o desenvolvimento da forma clínica crônica.

1.8 Resposta humoral

O tempo de viremia na infecção por CHIKV pode variar de dois a dez dias, período no qual o vírus pode ser detectado por RT-PCR e o paciente pode apresentar sintomatologia. Antes do fim do período virêmico, a produção do anticorpo IgM é iniciada, atingindo picos entre a quarta e sexta semanas, e decaindo para níveis indetectáveis entre o segundo e terceiro mês. A detecção de anticorpos IgG é feita a partir do décimo dia de apresentação dos sintomas, e as quantidades de IgG no soro podem elevar quatro vezes da fase aguda ao período convalescente. A permeância de IgG anti-CHIKV no paciente infectado pode se estender por anos, e assim proteger de possíveis reinfecções. Esse padrão de resposta humoral é conivente com o perfil epidemiológico de CHIKV (CHUA et al., 2017; KAM et al., 2009, 2012).

IgM apresenta caráter neutralizante, de tal forma que sua detecção, juntamente com altos níveis de IFN- γ , estão relacionados a diminuição da viremia entre o quarto e sexto dias de sintomas. Até o décimo dia de sintomatologia, IgM é o protagonista da resposta humoral, contudo, a partir desse período a resposta por IgG é predominante (CHUA et al., 2017).

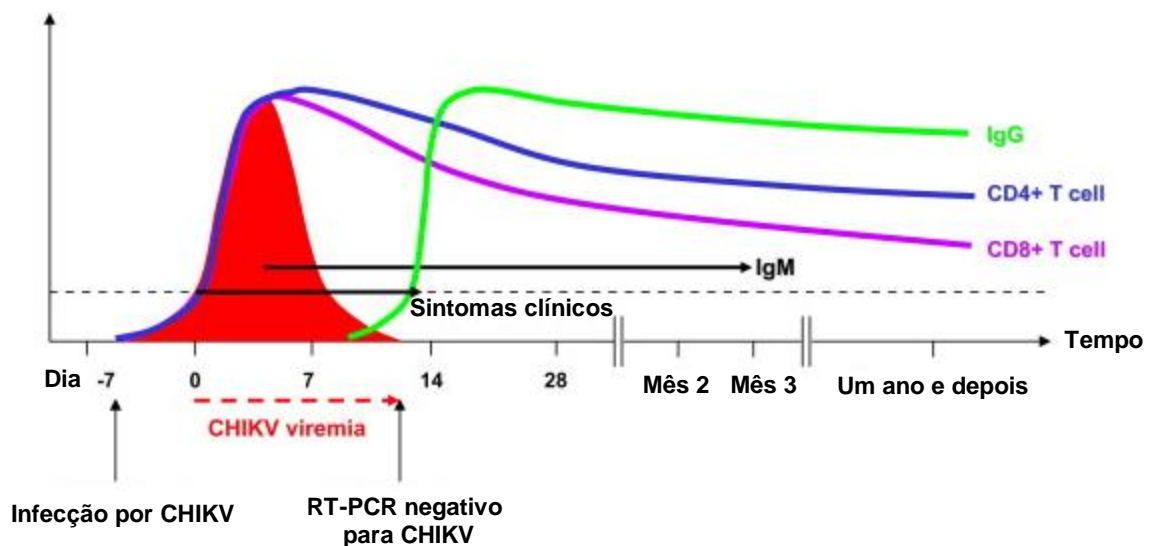


Figura 2 - Dinâmica da resposta imune diante da infecção por CHIKV. Em vermelho, a viremia. As setas pretas, de cima para baixo, indicam o tempo de detecção de IgM e a duração dos sintomas clínicos. Em verde, azul e roxo, respectivamente, níveis de IgG, células CD4+ e CD8+. Adaptado de Kam (2009).

1.9 Partícula viral e Ciclo replicativo

A partícula viral do CHIKV é composta por um genoma linear RNA fita simples polaridade positiva, envolto por um capsídeo constituído por uma única proteína. Externo ao nucleocapsídeo, a partícula apresenta uma bicamada lipídica de origem hospedeira, onde três proteínas virais de envelopes são ancoradas (SOLIGNAT et al., 2009).

1.9.1 Genoma

O RNA genômico do CHIKV apresenta 11805 nucleotídeos de comprimento, além de uma estrutura *cap* 5', um sítio poli (A) e a cauda poli (A) na extremidade 3'. O genoma é organizado em duas fases abertas de leitura (ORF), separadas por uma região de junção não codificante (J) e flanqueadas pelas regiões não traduzidas 5' e 3' (UTR). A estrutura genômica segue o seguinte padrão: 5' *cap*-nsP1-nsP2-nsP3-nsP4-(junção)-C-E3-E2-6k-E1-poly(A)-3' (KHAN et al., 2002).

A fase de leitura 5' representa dois terços do genoma e codifica as proteínas não estruturais (nsPs), nsPs 1-4, respectivamente. As nsPs são traduzidas do RNA genômico em uma poliproteína, que é então clivada pela porção protease da nsP2. A poliproteína P123 é encontrada em maiores níveis em relação a P1234, uma vez que há um códon de parada entre nsP3 e nsP4 e a tradução de P1234 é o resultado de um erro na leitura (ICTV, 2018).

A sequência codificadora das proteínas estruturais está localizada na ORF 3'. Assim como para as nsPs, as proteínas estruturais de capsídeo, C, e envelope, E1-3 e 6k, são traduzidos em uma poliproteína. Contudo, diferente das nsPs, as proteínas estruturais são traduzidas do RNA subgenômico 26S, que engloba a sequência não codificadora J até a extremidade 3'. A sequência não codificadora de junção compreende 68 nucleotídeos, apresentando na fita negativa um promotor interno e o códon de iniciação para a transcrição do RNA subgenômico 26S, além de codificar um peptídeo sinal (SOLIGNAT et al., 2009).

A porção UTR 5' apresenta uma extremidade *cap* e compreende 76 nucleotídeos, os quais formam duas estruturas em alça. A primeira estrutura em alça

mimetiza a metilação do *cap*, auxiliando na evasão da resposta imune. A segunda atua como um elemento de replicação do RNA viral nos hospedeiros humanos e vertebrados. Cinco estruturas em alça são presentes na região codificadora de nsP1 também atuam na replicação viral, porém de forma dependente ao hospedeiro (KENDALL et al., 2019).

O comprimento e composição da UTR 3' é variável entre diferentes linhagens de CHIKV e alfavírus (FILOMATORI et al., 2019). A UTR 3' apresenta uma cauda poli (a) e seu comprimento pode variar entre 500 a 900 nucleotídeos. A presença de sequências denominadas repetições diretas na região UTR 3' estão relacionadas a regulação da síntese viral e variabilidade genética (FILOMATORI et al., 2019).

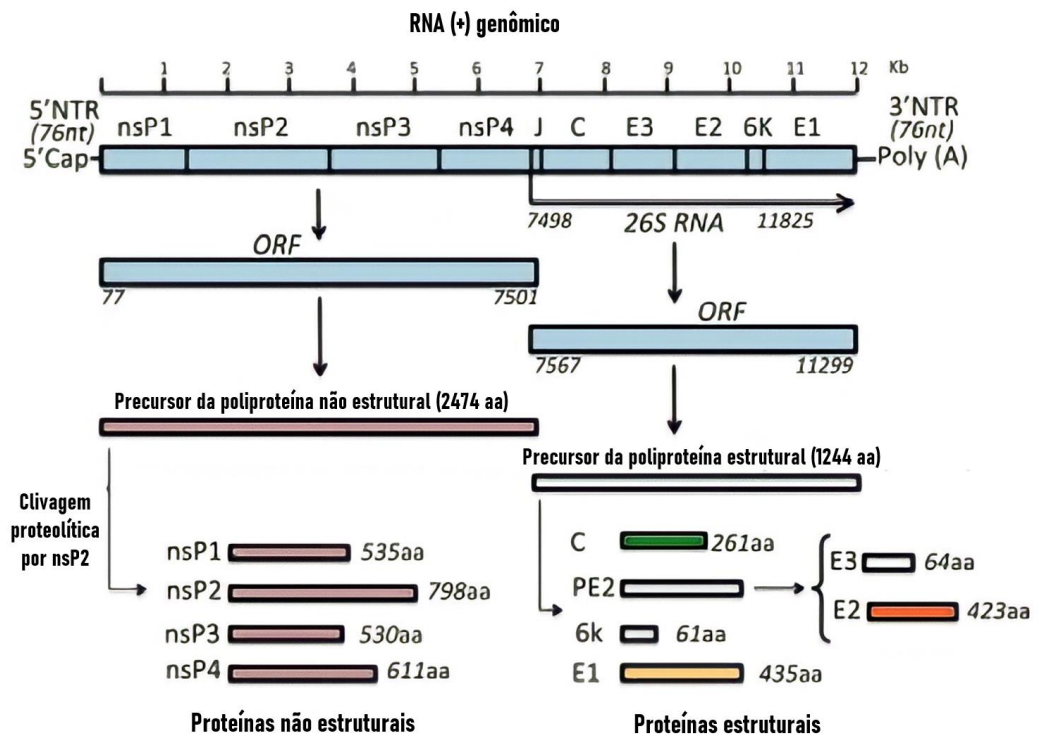


Figura 3 - Estrutura do RNA genômico de CHIKV e sua expressão. As proteínas C, E1 e E1 estão representadas respectivamente pelas cores verde, amarelo e laranja. As mesmas cores são utilizadas na figura 4 para designar as proteínas citadas. Adaptado de Thiberville e colaboradores (2020).

1.9.2 Morfologia

O virion do CHIKV apresenta simetria icosaédrica, com cerca de 70nm de diâmetro e triangulação igual a 4. O capsídeo é formado por 240 cópias da proteína

C, as quais interagem entre si e com o domínio transmembrana de E2 através da porção C-terminal e interagem com genoma na porção N-terminal. Envolto ao capsídeo, o envelope viral contém 80 hetero-trímeros das glicoproteínas E1-E2 que atravessam a membrana e se projetam como espículas (GRIFFIN, 2013; ICTV, 2018).

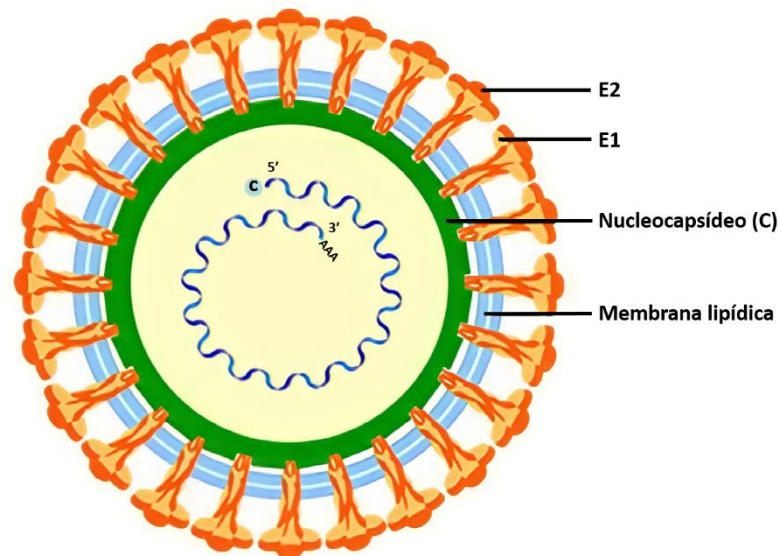


Figura 4 - Representação esquemática da partícula viral de CHIKV. As proteínas C, E1 e E2 estão representadas respectivamente pelas cores verde, amarelo e laranja, conforme a Figura 3. A membrana lipídica é representada na cor azul. A letra “C” representa a estrutura cap na extremidade 5’, enquanto “AAA” representa polianelidação. Adaptado de Metz (2011).

1.9.3 Ciclo de Multiplicação

O primeiro contato com a célula ocorre por interações entre o ligante viral E2 e estruturas de superfície celulares, porém ainda não é totalmente elucidado o processo de adsorção e penetração do CHIKV. Alguns possíveis fatores de ligação celulares descritos incluem glicosaminoglicanos, a imunoglobulina de células T e domínio da mucina 1 (TIM-1) e o receptor de lectina tipo-C DC-SIGN. Ligações redundantes às estruturas celulares aumentam a afinidade da interação célula-vírus e permite a ligação a possíveis receptores virais, TIM-1 e proteínas proibitina (PHB) (SCHNIERLE, 2019).

Interações entre E2, os receptores virais e possíveis correceptores desencadeiam a entrada viral no citoplasma, principalmente, através da via endocítica dependente de clatrina. Outros mecanismos de disseminação e entrada ainda não

elucidados incluem a transmissão célula a célula e a entrada na célula por vias de macropinocitose (PORTA et al., 2016; SCHNIERLE, 2019). Uma vez no compartimento endossomal, a redução do pH altera a conformação das glicoproteínas de envelope. As proteínas E1 e E2 dissociam-se e E1 forma homotrímeros, expondo o domínio de fusão presente em E1, anteriormente coberto por E2 na espícula do vírion. Na nova conformação o peptídeo de fusão presente em E1 é inserido na membrana endossomal promovendo a fusão com o envelope viral, e consequentemente liberando o nucleocapsídeo do CHIKV no citoplasma (GRIFFIN, 2013).

O genoma infeccioso no citoplasma, semelhante a um RNAm hospedeiro, interage com ribossomos e permite a tradução da poliproteína não estrutural. As nsPs desempenham diversas funções relacionadas à replicação e modificações do genoma, entre elas, destaca-se a atuação de nsP1 na formação do *cap*, a ação proteolítica e de helicase pela nsP2, a relação de nsP3 na síntese de fitas senso negativa e nsP4 como a RNA polimerase dependente de RNA (GRIFFIN, 2013; ICTV, 2018).

As nsPs formam um complexo de replicação que regula a síntese de fitas genômicas, fitas polaridade negativa e o RNA subgenômico 26S. O processo de síntese das fitas negativas a partir do genoma se inicia pela ação de P123, nsP4, moléculas hospedeiras e interação com elementos de replicação genômicos. Inicialmente, a replicação ocorre em compartimentos esféricos na membrana plasmática, que podem derivar estruturas citoplasmáticas de replicação conhecidas como vacúolos citopáticos (CPV-I) (SILVA; DERMODY, 2017). O aumento dos níveis de nsPs resultam na clivagem da poliproteína por nsP2, resultando na mudança conformacional no complexo de replicação, que leva a síntese das fitas positivas a partir das negativas (GRIFFIN, 2013).

O aumento nos níveis do RNA subgenômico é seguido da tradução do mesmo. A proteína C é a primeira porção da poliproteína a ser traduzida, e ela própria se cliva. A montante de C, a porção pE2, precursora da proteína E2 e E3, apresenta uma sequência de translocação para o retículo endoplasmático (RE). A tradução da poliproteína segue com a síntese transmembrana de pE2, 6k e E1 no RE. As proteínas de envelope sofrem modificações pós-traducionais no RE e no complexo de Golgi, envolvendo glicosilação, ação de proteases, mudanças conformacionais por

chaperonas e formação de pontes de dissulfeto (GRIFFIN, 2013). A clivagem de 6K e a formação dos dímeros pE2-E1, seguida da conformação hetero-trímeros, ocorre no RE, enquanto clivagem de E3 é realizada por furinas durante o deslocamento entre complexo de Golgi e a membrana plasmática. No Golgi, os dímeros são glicosilados, sofrem mudanças conformacionais e são translocados para a membrana (VOSS et al., 2010). Diferente de CPV-I, vacúolos citopáticos tardios (CPV-II) podem ser formados após a expressão dos genes estruturais e auxiliar na montagem viral. Os CPV-II são originados do Golgi, apresentando em seu interior as glicoproteínas virais e externamente nucleocapsídeos ancorados (SOONSAWAD et al., 2010).

O empacotamento viral se dá pela interação dos genomas virais sintetizados com o capsídeo, formando o nucleocapsídeo de forma independente. A montagem viral segue com a interação entre a proteína C do nucleocapsídeo e a glicoproteína E2 dos hetero-trímeros E1-E2 de envelope presentes na membrana plasmática. Tal interação predispõe o brotamento de partículas maduras (GRIFFIN, 2013).

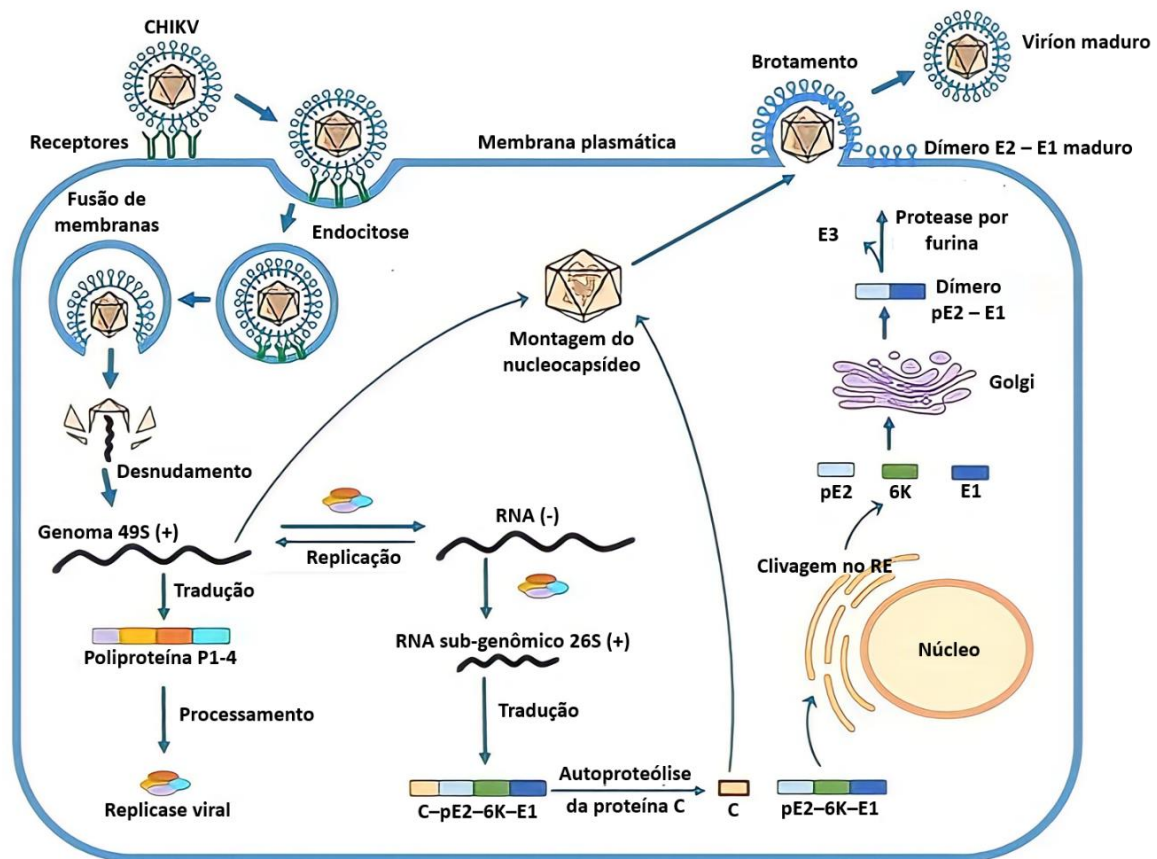


Figura 5 - Representação esquemática do ciclo de replicação do CHIKV. Adaptado de Abdelnabi (2020).

1.9.4 Glicoproteína E2

No CHIKV, a glicoproteína E2 é a principal proteína responsável pelas interações com fatores de ligação e receptores celulares (SOLIGNAT et al., 2009). E2 é uma proteína transmembrana do tipo I, composta de 423 aminoácidos dispostos em 3 domínios. Na extremidade amino, o domínio A representa a parte central de E2 e é responsável pela ligação a receptores. Em seguida, o domínio B está na região distal ao envelope, protegendo a alça de fusão da proteína E1 presente no sulco entre os domínios A e B. O domínio C está inserido no envelope viral, e assim como o A, está conectado a B por uma longa fita β (PORTA et al., 2016; VOSS et al., 2010).

Quanto a estrutura de E2, são previstos dois sítios de N-glicosilação em asparagina, situados na posição 263 e 273, respectivamente, na fita longa β que conecta os domínios B e C e no domínio C (GOH et al., 2013; VOSS et al., 2010). A redução do peso molecular de E2 após o tratamento com enzimas que clivam glicanos confirmam a glicosilação (BAGNO et al., 2020; GOH et al., 2013). Um N-glicano na posição 262 da proteína E2 de *Mayaro virus*, conservado em CHIKV, é sugerido como um elemento envolvido na estabilização da espícula viral e na infectividade da partícula (RIBEIRO-FILHO et al., 2021).

Outros componentes estruturais incluem a formação de 6 pontes dissulfeto nos domínios A, B e na fita β que interferem na estrutura secundária e na estabilidade de E2 (VOSS et al., 2010). Alterações nas pontes dissulfeto mostraram interferir no reconhecimento de IgG anti-E2 (GOH et al., 2013). Outras características de E2 incluem uma “ponte de sal estabilizadora” entre Asp 60 e do Arg 68 no domínio A, (VOSS et al., 2010) e na extremidade C terminal, três possíveis resíduos de cisteína para palmitoilação (SOLIGNAT et al., 2009).

No envelope viral, a proteína E2 recobre porções da proteína E1 e está mais exposta ao meio externo. Tal disposição, juntamente com relevância na ligação e adsorção viral, tornam a glicoproteína E2 alvo para anticorpos neutralizantes, uma vez que podem interferir na ligação de E2 a receptores e impedir exposição do alça de fusão (PORTA et al., 2016).

Ensaio utilizando dois anticorpos neutralizantes isolados de células B ativadas de pacientes infectados por CHIKV demonstraram, por crio-microscopia

eletrônica, a ligação dos anticorpos aos domínios A e B da glicoproteína E2 (PORTA et al., 2016). Um estudo sorológico com 30 pacientes mostrou a alta frequência de anticorpos IgG específicos para os primeiros 10 aa de E2 (KAM et al., 2012). Uma experimentação vacinal, em camundongos, utilizando a glicoproteína E2 recombinante produzida em sistema procaríoto foi capaz de proteger os camundongos contra infecção pelo CHIKV (KUMAR; SUDEEP; ARANKALLE, 2012). Outro ensaio mostrou a capacidade de neutralização de partículas de CHIKV por cinco imunoglobulinas anti-E2 geradas em camundongos após a inoculação do vírus inativado (GOH et al., 2013).

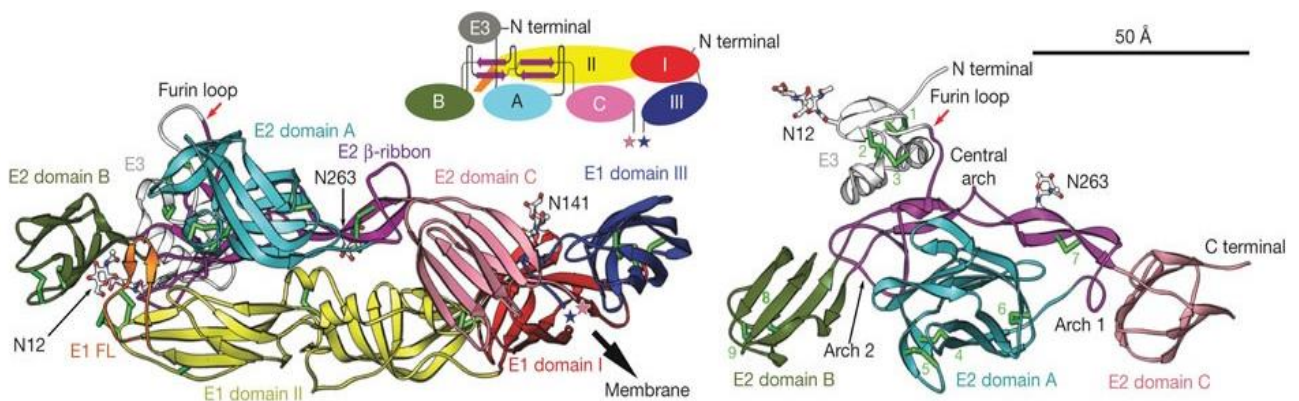


Figura 6 - Esquema da estrutura do dímero E1-E2 de CHIKV. A esquerda, é ilustrado o dímero E1-E2 presente no envelope do CHIKV. A direita, é ilustrado a estrutura da proteína E2. Os domínios A, B e C de E2 são representados, respectivamente, nas cores azul, verde e rosa. O arco central composto por fitas β é representado em roxo. Estruturas brancas, nos pontos N263 e N12, reproduzem glicosilações. Conectores verdes, acompanhados dos números 1 a 9, também na cor verde, indicam a formação de pontes dissulfeto. Adaptado de Voss e colaboradores (2010).

1.10 Diagnósticos sorológicos comerciais

No Sistema Único de Saúde, o diagnóstico de CHIKV é clínico, sendo confirmado por testes laboratoriais sorológicos e moleculares ou teste rápido. As diferenças sintomatológicas entre as arboviroses circulantes no Brasil, CHIKV, DENV e ZIKV, podem ser bem sutis ou até imperceptíveis, tornando o diagnóstico clínico um desafio (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020a). Os diagnósticos sorológicos e moleculares são cruciais para o manejo das arboviroses, em destaque os que detectam anticorpos, devido a curta janela de viremia (FISCHER et al., 2021).

Seguindo o perfil virêmico, os diagnósticos de detecção do RNA e o isolamento de CHIKV são utilizados do primeiro ao oitavo dia de sintomas, principalmente nos

primeiros cinco dias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Testes sorológicos visando a detecção de IgM são destinados a pacientes entre 5 dias a 2 meses da apresentação dos sintomas. A presença de IgM indica contato recente com o arbovírus (BARTHOLOMEUSZ; LOCARNINI, 2012; KAM et al., 2012). Os níveis de anticorpos IgG anti-CHIKV são alvos para testes sorológicos a partir do décimo dia da manifestação clínica, podendo ser detectados também a longo prazo, uma vez que IgG pode permanecer por anos no soro de pacientes. A distinção entre infecção prévia e recente com base em teste sorológicos que pesquisam IgG se dá pela verificação do aumento de anticorpos anti-CHIKV entre testagens pareadas, comum aos primeiros meses após infecção (E. ÁLVAREZ-ARGÜELLES et al., 2019; KAM et al., 2012).

Os testes moleculares laboratoriais para CHIKV, que detectam o RNA viral, incluem RT-PCR (*Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction*) e o qRT-PCR (*Real Time RT-PCR*) e são considerados padrão-ouro. O isolamento viral e teste de neutralização por redução de placa (PRNT, do inglês *Plaque Reduction Neutralization Test*) são extremamente específicos, contudo os resultados são demorados e exigem infraestrutura laboratorial adequada (DA CUNHA; TRINTA, 2017; MENDOZA et al., 2019). O PRNT pode ser utilizado como padrão-ouro na avaliação do desempenho de métodos sorológicos (JOHNSON et al., 2016).

Quanto aos testes sorológicos para o diagnóstico de CHIKV, os ELISAs de captura de anticorpos IgM (MAC-ELISA) e IgG e os teste rápidos para IgM são os mais utilizados (FISCHER et al., 2021). Os testes rápidos normalmente utilizam a tecnologia de imunocromatografia de fluxo lateral (IFL) e são uma importante ferramenta de *point-of-care* (POC - em português, ponto de atendimento). Os testes POC propiciam o diagnóstico em regiões isoladas ou com poucos recursos, uma vez que dispensam equipamentos laboratoriais e profissionais treinados, além de serem baratos, rápidos e seguros (DA CUNHA; TRINTA, 2017). Uma limitação no uso de testes rápidos é o menor desempenho quanto a sensibilidade na detecção de anticorpos em relação ao ELISA (DA CUNHA; TRINTA, 2017; FISCHER et al., 2021).

Diversos ELISAs indiretos IgM/IgG para CHIKV foram desenvolvidos na última década, tanto modelos *in house* quanto disponíveis comercialmente. Quanto ao desempenho, CDC (2016) avaliou sete kits comerciais para MAC-ELISA, sendo que os kits das empresas CHIKjj, Inbios, Euroimmun, e Abcam foram indicados para

utilização (JOHNSON et al., 2016). A metanálise realizada por *Andrew* e colaboradores (2022) indicou maior variabilidade de sensibilidade do que da especificidade para testes IgM IFL e ELISA, comerciais e *in house*. Os testes rápidos para detecção de IgM apresentaram 42,4% de sensibilidade, enquanto os baseados em ELISA, 93,4%.

Dois testes rápidos para detecção de IgM também foram avaliados pelo CDC. O teste *On-site CHIK IgM Combo Rapid test* do empresa CTK Biotech apresentou sensibilidade de 13% no ensaios, enquanto o IFL *SD BIOLINE Chikungunya IgM* da SD Diagnostics não foi capaz de reconhecer nenhuma amostra positiva para IgM anti-CHIKV (JOHNSON et al., 2016). Ambos os testes foram avaliados por outros grupos de pesquisas, apresentando desempenho abaixo do que consta na descrição do produto (PRAT et al., 2014). Outros testes rápidos baseados em IFL estão disponíveis comercialmente, contudo ainda não há avaliações externas e as avaliações internas são limitadas (ECO DIAGNOSTICA, 2021; LEE et al., 2020; WAMA DIAGNÓSTICA, 2021).

Tabela 1 - Testes rápidos comerciais para detecção de imunoglobulinas anti-CHIKV.

| Tipo | Empresa | Nome do teste | Sensibilidade | Especificidade |
|-----------------|---|---|---|-----------------------|
| IFL | CTK Biotech (EUA/China) | On-site CHIK IgM Combo Rapid test | 13% (3/23) ^a , 20% ^b | 93% ^b |
| | SD Diagnostics (Coreia do Sul) | SD BIOLINE Chikungunya IgM | 0% (0/24) ^a , 30% ^b | 73% ^b |
| | Boditech Med Inc., Chuncheon, Korea | ichroma Chikungunya virus (CHIKV) IgG/IgM | IgM - 94,7 - 100,0%* | IgM - 97,5 - 99,4%* |
| | | | IgG - 92,4 - 100,0%* | IgG - 98,3 - 100,0%* |
| | ECO Diagnóstica (BR) | ChikV IgG/IgM ECO Teste | IgM - 99,9%* | IgM - 97,7%* |
| | | | IgG - 99,9%* | IgG - 99,6%* |
| | WAMA Diagnóstica (BR) | Imuno-Rápido CHIKUNGUNYA IgG/IgM | IgM - 100,0%* | IgM - 99,3%* |
| | | | IgG - 100,0%* | IgG - 97,9%* |
| | Bio-Manguinhos (Nacional) | TR DPP® CHIKUNGUNYA IGM/IGG | IgM - 91,7- 97,4%* | IgM - 99-100%* |
| | | | IgG - 92,5- 100%* | IgG - 99,5- 100%* |
| Bahiafarma (BR) | Teste Rápido Chikungunya IgM Bahiafarma | IgM - 94%* | IgM - 95%* | |

| | | | | |
|--|----------------------------------|----------------------------|--------|--------|
| | Hangzhou Biotest Biotech (China) | MedTeste Chikungunya ML-02 | 99.9%* | 99.9%* |
|--|----------------------------------|----------------------------|--------|--------|

IFL: imunocromatografia de fluxo lateral.

^a Resultados obtidos pelo CDC (JOHNSON et al., 2016) para CHIKV-IgM. ^b Resultados obtidos por Prat e colaboradores (2014). *Valores informados pelo fabricante.

O desempenho de testes sorológicos para arboviroses pode variar por diversos fatores, entre eles, a fase temporal da coleta da amostra analisada, a presença ou ausência endêmica do patógeno na região pesquisada e pela reatividade cruzada com outros arbovírus circulantes. Na metanálise realizada por *Fischer e colaboradores (2021)*, MAC-ELISAs para CHIKV apresentaram menor sensibilidade em regiões endêmicas para o arbovírus. Enquanto o teste IgM ELISA para CHIKV da Euroimmun apresentou reação cruzada com amostras brasileiras positivas para dengue (LIMA et al., 2021).

A maioria das empresas fabricantes dos testes comerciais sorológicos para CHIKV mantêm segredo a respeito da composição dos antígenos utilizados. Algumas citam na descrição do produto que o teste dispõem de uma “combinação de antígenos” do CHIKV. Portanto, não se sabe quais antígenos foram usados para formulação dos testes e nem em quais plataformas foram produzidos. Atualmente, o Brasil apresenta apenas um teste rápido de detecção nacional, o TR DPP® CHIKUNGUNYA IGM/IGG (Bio-Manguinhos).

1.11 Vigilância epidemiológica de arboviroses no Brasil

Atualmente, os quatro sorotipos de DENV circulam no Brasil em ciclos urbanos efetivos, envolvendo principalmente por *Ae. aegypti* como vetor. DENV é arbovirose com maior taxa de infecção anual no Brasil e no mundo, e até a atualidade as ações de controle não foram suficientes para mitigar as conhecidas epidemias sazonais de dengue por todo o país (WHO, 2021; ZANOTTO; LEITE, 2018).

Contemporaneamente ao CHIKV, o ZIKV foi introduzido em território brasileiro e foi responsável por diversas epidemias ao longo do país, concentrando-se no Nordeste. Apesar de um menor número de casos em relação ao CHIKV, as por ZIKV foram os alarmantes devido aos casos de microcefalia em recém-nascidos,

desencadeados pela transmissão vertical em gestantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020b).

A co-circulação de DENV, CHIKV e ZIKV, já era prevista, uma vez que as três arboviroses apresentam ciclos de transmissão semelhantes. Pouco tempo após a introdução de CHIKV e ZIKV, logo em 2015, já era relatada epidemias concomitantes das três arboviroses e até mesmo co-infecções (CARDOSO et al., 2015; SARDI et al., 2016; SILVA et al., 2019). Um dos agravamentos da co-circulação é a dificuldade em diferenciar clinicamente cada infecção quanto a sintomatologia, além de sobrecarregar os sistema público de saúde (CARDOSO et al., 2015; SILVA et al., 2019).

1.12 Sistemas de expressão

Acerca da expressão de antígenos, a escolha de um sistema apropriado aos objetivos da expressão é crucial. Os sistemas disponíveis para expressão de proteínas recombinantes são diversos e a individualidade de cada modelo de expressão impacta em características físicas e biológicas do produto final, assim como nos custos e condições de cultura (TRIPATHI; SHRIVASTAVA, 2019).

1.12.1 Sistema de expressão procarioto

Os sistemas procarióticos, no geral, apresentam baixo custo e altas taxas de produção, com capacidade de expressão em um curto período e passíveis de escalonamento. O sistema de expressão procarioto mais utilizado é a bactéria *E. coli*, entre outros motivos pelo extenso conhecimento na genética e metabolismo deste organismo (DEMAIN; VAISHNAV, 2009).

Atualmente, uma série de modificações pós-traducionais (MPTs) em proteínas são descritas para bactérias, desde modificações simples, como metilação, até alterações mais complexas, como a adição de glicanos. Apesar de apresentarem MPTs, a frequência destas é muito inferior e divergente em relação àquelas que ocorrem em eucarioto (MACEK et al., 2019). As diferenças ou até ausência das MPTs,

juntamente com altas taxas de expressão do gene alvo, resultam em altas frequências de expressão das proteínas eucariotas na forma insolúvel, além da formação de agregados e corpos de inclusão (BRONDYK, 2009).

1.12.2 Sistema de expressão eucarioto

As plataformas de expressão eucarióticas são comumente mais caras e lentas em relação às procarióticas, porém, esses sistemas permitem MPTs similares às que ocorrem naturalmente em proteínas de mamíferos (DEMAIN; VAISHNAV, 2009). As alterações incluem o dobramento proteico por chaperonas, glicosilações, formações de ponte de sulfato e tráfego intracelular. Em última instância as MPTs vão interferir na estrutura, antigenicidade, atividade biológica, taxa de solubilidade, entre outras características da proteína expressada. Tais atributos são requeridos quando a estrutura e funções biológicas originais das proteínas são vitais à finalidade da produção (TRIPATHI; SHRIVASTAVA, 2019).

Para a expressão de proteínas cujas MPTs necessitam ser semelhantes às que ocorrem na expressão humana, a escolha de sistemas de expressão baseados em células de mamíferos é mais usual. Industrialmente, a célula de mamífero mais utilizada para a síntese de proteínas terapêuticas é a CHO, sendo também empregadas células não humanas como BHK, sp2/0 e NS0, e as células humanas HEK293, HT-1080 e PER.C6 (GOH; NG, 2018; LALONDE; DUROCHER, 2017).

A linhagem CHO é oriunda de hamsters laboratoriais derivados de um longo processo geracional de endogamia, o qual resultou em mutações, como a redução no número de cromossomos. Em 1957, foram isoladas e plaqueadas células do ovário de hamster chinês, espontaneamente imortalizadas, apresentando altas taxas de crescimento e resiliência em cultura. Nas décadas seguintes, as células CHO começaram a ser amplamente utilizadas por vários grupos de pesquisa e na indústria (JAYAPAL et al., 2007), devido a características excepcionais como a capacidade de serem cultivadas em suspensão, em meio sem soro, atingindo altas taxas de crescimento, além da susceptibilidade a inserção de DNA exógeno e modificações genéticas (POULAIN et al., 2017). Na última década, o sequenciamento do genoma (XU et al., 2011), juntamente com análises do transcriptoma e proteoma de CHO

elucidaram diversos campos das vias de transcrição e tradução, permitindo rápidos avanços na engenharia genética (LALONDE; DUROCHER, 2017).

A primeira linhagem de células HEK293 foi estabelecida em 1977, através da transformação por adenovírus de células embrionárias de rim humano (GRAHAM et al., 1977). Durante os anos, aplicações de engenharia genética resultaram na criação de novas sublinhagens de HEK. Entre elas, algumas contêm elementos virais de SV40 virus ou Epstein–Barr virus, que implicam diretamente na retenção episomal do plasmídeo e no aumento de expressão do mesmo (GEISSE; VOEDISCH, 2012). No geral, as células HEK apresentam altas taxas de transfecção, e culturas transientes podem ser estabelecidas em uma a duas semanas. Tais características são responsáveis pela extensiva utilização de HEK para expressão transiente em laboratórios (BACKLIWAL et al., 2008; VINK et al., 2014) .

Os sistemas de expressão HEK e CHO compartilham diversas vantagens. Ambas são plataformas bem estabelecidas e comercializadas, com linhagens capazes de crescer em suspensão e passíveis de escalonamento para o nível industrial. Além de serem capazes de expressar proteínas alvos apresentando MPTs semelhantes às humanas, em altos níveis, sem a adição de soro (HUNTER et al., 2019; POULAIN et al., 2019; VINK et al., 2014). Contudo, divergências incluem maiores taxas de transfecção e expressão transiente para HEK (HUNTER et al., 2019), enquanto CHO exibe baixa taxa de transfecção, requerendo grandes quantidades de plasmídeos para a expressão transiente (POULAIN et al., 2017). Por outro lado, CHO exibe alta produção proteica em culturas estáveis e é extensamente utilizada na indústria (STEGER et al., 2016). O estabelecimento de células estáveis de CHO pode variar entre 4 a 8 meses, porém alternativas para assegurar altas taxas de produção a curto tempo incluem a utilização de populações heterogêneas (POULAIN et al., 2017).

Os sistemas de expressão HEK e CHO apresentam similaridades nas MPTs pela proximidade filogenética, porém o perfil de MPTs nas duas plataformas não é idêntico. Quanto à glicosilação, de maneira geral, o sistema HEK exibe padrões mais semelhantes àqueles que ocorrem no organismo humano. Na linhagem CHO, diferente da expressão natural em humanos, as células são incapazes de realizar as glicosilações: α -2,6-sialização, α -1,3/4-fucolização e β -1,4-N-acetilglicosamina. Outra diferença é capacidade de adição de ácido N-glicolilneuramínico e galactose- α 1,3-

galactose pela maquinaria de CHO, que são ausentes na glicosilação humana. Em relação a CHO, HEK ainda apresenta um desempenho superior na sulfatação de tirosina e γ -carboxilação de ácido glutâmico, porém menores taxas de sialização (GOH; NG, 2018; LALONDE; DUROCHER, 2017).

Os diferentes padrões de glicosilação não implicam na categorização de um sistema como ideal, a melhor plataforma é dependente da proteína e sua utilização (STEGER et al., 2016).

1.12.3 Glicosilação

As MPTs nos organismos eucariotos são diversas e desempenham funções variadas, relacionadas à estrutura e atividade biológica da proteína. MPTs incluem glicosilação, carboxilação, metilação, adição de lipídeos, formação de ligações dissulfeto e processamentos proteolíticos. Dentre os MPTs, a glicosilação é a mais frequente e mais complexa. A adição de glicanos pode desempenhar diferentes e importantes papéis na proteína alvo, como auxiliar o correto dobramento, alterar o tráfego na célula, modificar o perfil de antigenicidade, a atividade biológica e estabilidade (WALSH, 2010).

Como visto anteriormente por nosso grupo de pesquisa, a expressão da proteína E2 de CHIKV nos sistemas *E. coli* e HEK resultou em diferentes padrões de glicosilação. Avaliado em ELISA, a expressão no sistema HEK apresentou taxas superiores de sensibilidade e especificidade na captura de anticorpos específicos em soros positivos para CHIKV, principalmente para IgM (BAGNO et al., 2020).

1.12.4 Lentivírus

Em relação à expressão transiente, a expressão estável é prioritariamente utilizada para produções em larga escala de proteínas recombinantes em células de mamíferos, devido a altas quantidades de plasmídeo necessárias à transfecção e à necessidade de reprodutibilidade. Por outro lado, a obtenção de clones expressando

altas quantidades de proteína recombinante de forma estável é um desafio. (BÜSSOW, 2015).

O sistema lentiviral, a técnica de CRISPR e a transfecção seguida de um *screening* seletivo são os principais métodos de integração do gene exógeno ao genoma de células de mamíferos. A seleção de clones contendo o gene integrado gera culturas que podem ser manipuladas de diversas maneiras, mantendo a capacidade de expressão (BÜSSOW, 2015; SHEARER; SAUNDERS, 2015).

Atualmente, além da produção de proteínas recombinantes e iRNA (SHEARER; SAUNDERS, 2015), o sistema lentiviral também é utilizado para terapias gênicas experimentais no tratamento de distúrbios genéticos e câncer (MILONE; O'DOHERTY, 2018), e também para a geração de animais transgênicos. No presente trabalho a plataforma lentiviral foi eleita para expressão estável em células de mamíferos.

O sistema lentiviral de transdução consiste na utilização de um vetor lentiviral não replicativo, normalmente originado do HIV-1, para integração de um transgene a células de mamíferos. O vetor lentiviral é sintetizado a partir da cotransfecção de 3 plasmídeos contendo: genes estruturais da partícula viral, a sequência do transgene e genes essenciais à montagem da partícula e integração do transgene ao genoma hospedeiro (TANDON et al., 2018).

Os plasmídeos lentivirais são categorizados em plasmídeos de transferência, envelope e montagem. O plasmídeo de transferência inclui o transgene e o gene de resistência a serem integrados. O plasmídeo de montagem é composto pelas sequências das proteínas estruturais *gag* e *pol*. E o de envelope codifica a sequência de proteína VSV-G (*Vesicular stomatitis virus G glycoprotein* – em português, Glicoproteína G do vírus da estomatite vesicular), que se liga a receptores conservados em diversos tecidos e espécies de mamíferos. Os plasmídeos lentivirais de terceira geração são modificados geneticamente a fim de obter-se maior expressão dos genes através da troca de promotores do HIV-1 por promotores com alta eficiência, como o promotor CMV (ADDGENE, 2023).

1.12.5 ELISA de E2

Nosso grupo expressou a proteína E2 de CHIKV em sistema procarioto, *E. coli*, e comparou com a proteína E2 produzida em eucarioto, HEK293T, cedida pelo professor Dr. Arturo Reyes-Sandoval (Jenner Institut, Universidade de Oxford, Reino Unido). Em paralelo, o kit de ELISA IgM/IgG da Euroimmun também foi utilizado a fim de comparação (BAGNO et al., 2019, 2020). O kit comercial é baseado em proteínas recombinantes, cujas identidades e origens não são esclarecidas.

A proteína E2 expressa em *E. coli* apresentou peso molecular conforme o predito em bioinformática. O peso molecular de E2 expressa transientemente em HEK293T foi superior ao esperado. Após o tratamento com glicosilase, E2 expressa em HEK293T apresentou peso molecular inferior ao não tratado (BAGNO et al., 2020).

O kit comercial e proteínas produzidas em *E. coli* e HEK293T tiveram sua antigenicidade comparada em ELISA. Ambas apresentaram desempenho semelhante para a detecção de anticorpos anti-CHIKV do tipo IgG, entretanto, o kit comercial e E2 expressa em eucarioto apresentaram melhores taxas de sensibilidade e especificidade quanto a detecção de IgM (tabela 2) (BAGNO et al., 2020).

Tabela 2 - Sensibilidade e especificidade da proteína E2 expressa em procarioto e eucarioto

| Elisa indireto | BL21 (<i>E. coli</i>) | HEK293T |
|-----------------------|--|--|
| IgG | 200 ng de antígeno / poço Diluição do soro: 1/100 | 200 ng de antígeno / poço Diluição do soro: 1/100 |
| Sensibilidade | 97% | 99% |
| Especificidade | 96% | 97% |
| IgM | 3200 ng de antígeno / poço Diluição do soro: 1/25 | 200 ng de antígeno / poço Diluição do soro: 1/25 |
| Sensibilidade | 81% | 85% |
| Especificidade | 71% | 98% |

2 JUSTIFICATIVA

Em pouco tempo após sua introdução, o CHIKV foi disseminado para todas as regiões do Brasil. O cenário brasileiro, favorável a emergência de arboviroses, permitiu surtos explosivos de CHIKV, concomitante a outras arboviroses. Apesar da baixa letalidade geral associada à febre Chikungunya, os mais de um milhão de casos registrados pelo Ministério da Saúde desde 2014 resultaram em centenas de mortes e um estrondoso prejuízo em AVAIs (anos de vida ajustados por incapacidade), principalmente devido a cronificação da patologia.

A co-circulação de DENV, ZIKV e SARS-Cov-2, juntamente com limitações nos diagnósticos sorológicos e moleculares, atendimentos clínicos e vigilância epidemiológica no SUS para CHIKV culminam para subnotificação de casos e medidas efetoras insuficientes para o controle e tratamento dessa arbovirose no país. Para CHIKV, até o momento, não existem vacinas e medicações validadas para a comercialização e as políticas de controle dos vetores nas últimas décadas foram ineficazes. O cenário atual do Brasil resulta na ocorrência de óbitos e sequelas evitáveis em um imaginário de manejo clínico e vigilância epidemiológica adequados.

A presença de outras arboviroses ou outros agentes infecciosos causadores de patologias com sintomas semelhantes ao da febre Chikungunya torna o diagnóstico clínico um desafio. Os diagnósticos para CHIKV podem ser realizados em diferentes fases clínicas da febre Chikungunya. O curto período de viremia após apresentação dos sintomas limitam a janela de tempo para o diagnóstico precoce por isolamento viral e, sobretudo, RT-PCR. A infecção por CHIKV sucede na rápida produção de anticorpos, principalmente contra E2, a proteína de envelope mais imunogênica. Testes sorológicos visando a detecção de anticorpos anti-E2, como o ELISA e IFL, permitem o diagnóstico ainda num tempo hábil para o tratamento da febre Chikungunya, além de permitir a vigilância epidemiológica do patógeno.

Métodos de diagnósticos de RT-PCR e ELISA são disponíveis comercialmente e podem apresentar ótimos desempenhos, contudo necessitam de estrutura laboratorial e mão de obra especializada. Testes do tipo *point of care* (POC), como IFL, são extremamente rápidos e de fácil manipulação, dispensando infraestrutura adequada. Contudo, apesar dos IFLs comerciais apresentarem alta

especificidade, eles são pouco sensíveis. Nesse panorama, a expressão de antígenos de CHIKV com a prospecção de uso em testes sorológicos é necessária ao momento atual, especialmente para o uso em IFL.

Plataformas de expressão eucariotas dispõem de maquinaria pós-traducional semelhante à de humanos. Apesar do custo mais elevado em relação a sistemas procariotas, a expressão da proteína alvo em células eucariotas confere maior similaridade, quanto a composição e estrutura, a expressão natural. A expressão da proteína antigênica E2 de CHIKV em sistemas eucariotas pode conferir maior performance em testes sorológicos indiretos, uma vez que conserva características pós-traducionais semelhantes às que ocorreriam no ciclo natural de CHIKV.

Uma vez que a proteína E2 expressa em procarioto não apresentou resultados suficientes para utilização na detecção de IgM em ELISA (BAGNO et al., 2020), a expressão da glicoproteína E2 de CHIKV em plataforma eucariota pode superar o desempenho do antígeno produzido em procarioto. Possibilitando a utilização de E2 expressa em eucarioto em testes de diagnósticos visando anticorpos IgM, sobretudo em testes *point-of-care* (POC).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Expressar a proteína constituinte do envelope, E2, de *Chikungunya virus* em plataformas eucariotas e avaliar seu potencial como ferramenta diagnóstica.

3.2 Objetivos específicos

- a) Construir, a partir de análises *in silico*, plasmídeos contendo o gene codificador da proteína E2 de CHIKV para os sistemas de expressão HEK293 e CHO.
- b) Expressar a proteína E2 de CHIKV nas plataformas de expressão HEK293 e CHO.
- 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 Construção do gene CHIKV-E2

4.1.1 Análise do gene

A sequência consenso do gene CHIKV-E2 foi construída por (Bagno et al. (2019) baseada em amostras brasileiras e do genótipo asiático depositadas no *GenBank*. No presente trabalho, a sequência foi avaliada quanto à presença de regiões transmembranas através dos softwares *ProtScale - Transmembrane tendency* (Expasy - <https://web.expasy.org/protscale/>) e *TMHMM 2.0* (DTU - <https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) e quanto a regiões hidrofóbicas pela ferramenta *ProtScale - Hphob. / Kyte & Doolittle* (Expasy - <https://web.expasy.org/protscale/>). A predição dos softwares baseia-se nas propriedades de cada aminoácido que compõem a proteína, pontuando numa escala de probabilidade da característica predita.

A presença de N-glicosilações e O-glicosilações foi investigada através dos programas *NetNGlyc - 1.0* (DTU - <https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetNGlyc-1.0/>) e *NetOGlyc - 4.0* (DTU - <https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetOGlyc-4.0/>). As N-glicosilações são conservadas e são preditas nas sequências Asn-Xaa-Ser/Thr, enquanto as O-glicosilações não apresentam um padrão tão simples. Atualmente, a predição de O-glicosilações ainda é limitada, podendo diferir das predições *in silico*. A ferramenta *NetOGlyc - 4.0* baseia-se em um banco de O-glicoproteoma para pontuar potenciais sequências glicosiladas, no qual as sequências pontuadas com mais de 0,5 são identificadas como positivas para essa modificação pós-traducional.

4.1.2 Construção do gene

No intuito de obter-se uma proteína solúvel, purificável e fosse secretada em plataformas eucariotas, a sequência do gene E2 foi construída com suporte nas análises das regiões transmembranas/hidrofóbicas, predições de glicosilações e com base na literatura.

O gene construído foi intitulado “CHIKV-E2”. O peso molecular, ponto isoelétrico (pI) e tamanho da sequência foram calculados pela ferramenta *Compute pI/Mw* (Expasy - https://web.expasy.org/compute_pi/). A sequência peptídica foi obtida pelo *Translate tool* (Expasy - <https://web.expasy.org/translate/>) e a estrutura tridimensional foi construída pelo software *Phyre2* (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>).

O gene CHIKV-E2 foi sintetizado pela *GenScript* no vetor pcDNA 3.1 (+) entre os sítios de restrição BamHI e XbaI. O plasmídeo pcDNA 3.1 (+) (Figura 14) é apropriado para expressão transiente constitutiva em células de mamífero, sendo composto por um promotor CMV.

4.2 Clonagem e confirmação da correta construção do plasmídeo

4.2.1 Transformação

Para a transformação bacteriana, 100µl de XL1-blue quimiocompetente foram descongelados em gelo e incubados com 10ng de DNA plasmidial por 30min em gelo. No caso de transformação com produto de ligação, foram utilizados 10µl da reação. As bactérias incubadas com DNA foram submetidas a um choque térmico a 42°C por 45s e recuperadas por 2min no gelo, em seguida as bactérias transformadas foram semeadas em placas de Petri contendo LB ágar* com 100µg/ml de ampicilina incubadas *overnight* a 37°C.

Foram selecionados clones crescidos individualmente na placa de Petri para inóculo no volume de 10ml de meio LB* com ampicilina, que foram incubados por 18h a 37°C em incubadora com agitação orbital (ThermoFisher) sob rotação de 200 RPM. Posteriormente, as colônias inoculadas foram submetidas à extração plasmidial pelo kit *QIAprep Spin Miniprep* (QIAGEN) ou *NucleoSpin Plasmid* (Macherey-Nagel). Os plasmídeos obtidos foram quantificados e confirmados por digestão enzimática (tópico 4.2.2) seguida da avaliação em gel de agarose (tópico 4.2.3). Uma vez confirmada a identidade, o plasmídeo era identificado e armazenado a – 20°C.

* As composições das soluções e tampões estão presentes no apêndice 1.

4.2.2 Digestão enzimática

As restrições enzimáticas foram utilizadas para confirmação e construção de plasmídeos, seguindo as indicações do fabricante da enzima. Para a confirmação de identidade, a reação era composta de 2 µl de BSA (diluído 1:10), 2 µl de Buffer, 1 µl de cada enzima, 1 µg de DNA e qsp. de 20 µl H₂O Milli-Q, incubados por 2h a 37°C. Em ensaios de digestão total, com intuito de purificar os fragmentos, a reação era composta por 2 µl de BSA (diluído 1:10), 2 µl de Buffer, 1 µl de cada enzima, 1 µg de DNA e qsp. de 20 µl H₂O Milli-Q, sendo o tempo de incubação *overnight* a 37°C. As reações foram realizadas em tubos de 0,2ml de polipropileno e avaliadas por eletroforese em gel de agarose.

4.2.3 Eletroforese em gel de agarose.

Para análise e separação de ácidos nucleicos, amostras de DNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,7-1% diluído em TAE. As amostras eram adicionadas de *DNA loading Dye* (ThermoFisher) e submetidas à eletroforese a 100V por 40min. O gel foi corado com *SyberSafe* (Invitrogen) e fotodocumentado no *ChemiDoc™ Touch* (BIO-RAD).

4.3 Cultivo celular

A expressão do gene CHIKV-E2 foi realizada em células eucariotas das linhagens HEK293T, EXPI293 e CHO²³⁵³. As manutenções das células foram realizadas em cabines de biossegurança (VECO), com repiques sucessivos a cada 3 a 4 dias de cultivo. Seguem nos próximos tópicos condições específicas de cultivo para cada linhagem.

4.3.1 HEK293T

A linhagem HEK293T foi cultivada de forma aderente durante os experimentos. O cultivo se deu em estufas incubadoras de CO₂ *Elite II* (REVCO) com condições controladas de crescimento, sendo 5% a concentração de CO₂ e a temperatura mantida 37°C. O meio DMEM (Sigma) suplementado com 10% soro fetal

bovino (SFB) (ThermoFisher) e 1% pen/Strep (Sigma) foi utilizado para o cultivo. Entretanto, a avaliação da expressão do gene CHIKV-E2 em células HEK293T foi feita em meio *Opti-MEM* (ThermoFisher), uma vez que o meio DMEM 10% SFB apresenta diversas proteínas que interferem na avaliação da expressão heteróloga por SDS-PAGE e Western-Blot.

As células HEK293T foram cultivadas em garrafas T25 e T75 de acordo com o experimento. Para o repique, o sobrenadante era descartado, as células lavadas com PBS e incubadas em tripsina (Sigma) por 5min. As células suspensas na tripsina eram adicionadas de DMEM 10% SFB para neutralização da tripsina e centrifugadas a 1200 rpm por 5min. O *pellet* de célula gerado era ressuspendido em meio fresco para contagem, subsequente, uma quantidade de células era repicada de acordo com ensaios a serem feitos.

4.3.2 EXPI293

Células EXPI293 (ThermoFisher) são células eucariotas derivadas de HEK293T modificadas para maior expressão de proteínas recombinantes, entre outros motivos pela capacidade de crescimento em alta densidade. Para tal, a linhagem foi cultivada em suspensão a 37°C, em 8% de atmosfera de CO₂, 80% de umidade, na rotação de 90rpm em incubadora com agitador orbital Minitron (INFORS HT). Células EXPI293 foram cultivadas em Erlenmeyers (ThermoFisher) de 125ml a 1L, comportando cerca de um quarto do seu volume com meio de crescimento. A linhagem EXPI293 dobra a cada 24h e foi repicada a cada 3 ou 4 dias com 3-5x10⁵ células/ml sem centrifugação, atingindo a concentração de até 5x10⁶ células/ml no repique rotineiro e até a densidade de 2x10⁷ no cultivo para expressão. O cultivo de EXPI293 é realizado em *EXPI293™ Expression Medium* (ThermoFisher), meio quimicamente definido, adicionado de GlutaMAX (ThermoFisher), livre de soro e proteínas. Não são necessárias suplementações adicionais.

4.3.3 CHO

A linhagem CHO, derivada de células epiteliais de ovário de hamster chinês, é extensamente utilizada na produção de biológicos terapêuticos. As culturas de CHO podem ser cultivadas em aderência ou suspensão, e nesse trabalho foram cultivadas em suspensão a 37°C, 8% de atmosfera de CO₂ e 80% de umidade, na rotação de

90 rpm em incubadora com agitador orbital Minitron (INFORS HT). Assim como EXPI293, células CHO²³⁵³ foram cultivadas em Erlenmeyers (ThermoFisher) de 125ml a 1L, comportando cerca de um quarto do seu volume com meio de crescimento. O *BalanCD CHO Growth A Medium* (FUJIFILM) foi utilizado para a manutenção de CHO²³⁵³, e é um meio livre de componentes animais, desenhado para melhorar as taxas de expressão de anticorpos e proteínas recombinantes.

4.4 Expressão transiente do gene CHIKV-E2 em sistema eucarioto

4.4.1 Transfecção em HEK293T

A linhagem HEK293T foi transfectada com o reagente *Lipofectamine*[™] 3000 (ThermoFisher) para expressão transiente do gene CHIKV-E2, seguindo o protocolo do fabricante. Anteriormente à transfecção, células em placa de 6 poços, T25 ou T75 foram cultivadas a fim de obter-se confluência próxima a 70% no dia do ensaio. Para expressão do gene CHIKV-E2, após atingir a confluência requerida, o meio era trocado por *Opti-MEM* (ThermoFisher), apesar da *Lipofectamine*[™] 3000 (ThermoFisher) ser passível de uso em meio DMEM suplementado com 10% SFB. Para a transfecção em garrafa M, 30 µL de *Lipofectamine*[™] 3000 foram diluídos em 500 µL de *Opti-MEM* (ThermoFisher), em um tubo de 2ml, enquanto 40ng de plasmídeo eram diluídos em 1ml de *Opti-MEM* (ThermoFisher), seguido da adição de 40 µL p3000. Após a incubação individual das diluições por 5min, a solução contendo o DNA foi diluída na solução com *Lipofectamine*[™] 3000, e então, incubadas por 15min. Em seguida, o complexo era adicionado, delicadamente, à cultura de células. Para obtenção da proteína expressa, o meio era coletado de 24h a 72h após a transfecção, centrifugado a 2000 rpm e armazenado a -20°C para posterior avaliação por SDS-PAGE e Western Blot. Os volumes de reagentes e plasmídeos eram alterados proporcionalmente à quantidade de células a serem transfectadas.

4.4.2 Transfecção em EXPI293

A transfecção de células EXPI293 foi realizada com o kit *EXPI293 Expression System* (ThermoFisher), seguindo as orientações do fabricante. Para expressão, a linhagem foi cultivada a fim de obter-se a densidade de 3×10^6 /ml células em pelo

menos 50% de meio fresco e apresentando viabilidade acima de 95%. O protocolo a seguir refere-se à transfecção com *ExpiFectamine™ 293 Reagent* (ThermoFisher) em 30ml de cultura no Erlenmeyer T125. As quantidades utilizadas dos reagentes e plasmídeos foram proporcionalmente adequadas de acordo com o volume a ser transfectado. Para a transfecção, 25µg de plasmídeos eram diluídos em 1,5ml de *Opti-MEM* (ThermoFisher) e, separadamente, 80µl de *ExpiFectamine™ 293 Reagent* (ThermoFisher) eram diluídos em 1,4ml de *Opti-MEM* (ThermoFisher). Após incubação de 5min, a solução com *ExpiFectamine™ 293 Reagent* (ThermoFisher) era adicionada àquela contendo o plasmídeo diluído e incubadas por 15min. Ao final da incubação, o complexo de *ExpiFectamine™ 293 Reagent* (ThermoFisher) e DNA era, cuidadosamente, transferido para 25ml de EXPI293 cultura preparado previamente. Seguidas 18 a 22h da transfecção, a cultura era adicionada de 150µl de *ExpiFectamine™ 293 Transfection Enhancer 1* e de 1,5ml do *ExpiFectamine™ 293 Transfection Enhancer 2*. Para obtenção da proteína expressa, o meio era coletado 5 dias após a transfecção, centrifugado a 2000 rpm e armazenados a -20°C para posterior avaliação por SDS-PAGE e Western Blot.

4.5 Expressão estável do gene CHIKV-E2 em sistema eucarioto

4.5.1 Construção do plasmídeo pLVX –puro + CHIKV-E2

Para a síntese de partículas lentivirais é necessária a cotransfecção dos três plasmídeos lentivirais: pLVX-puro, p.CMV.VSV-g e psPAX2 (Figura 7, 8 e 9). Para a expressão de proteínas de interesse, o gene selecionado deve ser inserido no plasmídeo de transferência, pLVX-puro, para sua integração no genoma hospedeiro por lentivírus. Para tal, o gene CHIKV-E2 foi inserido no vetor pLVX-puro, cuja construção foi nomeada como pLVX-puro-CHIKV-E2.

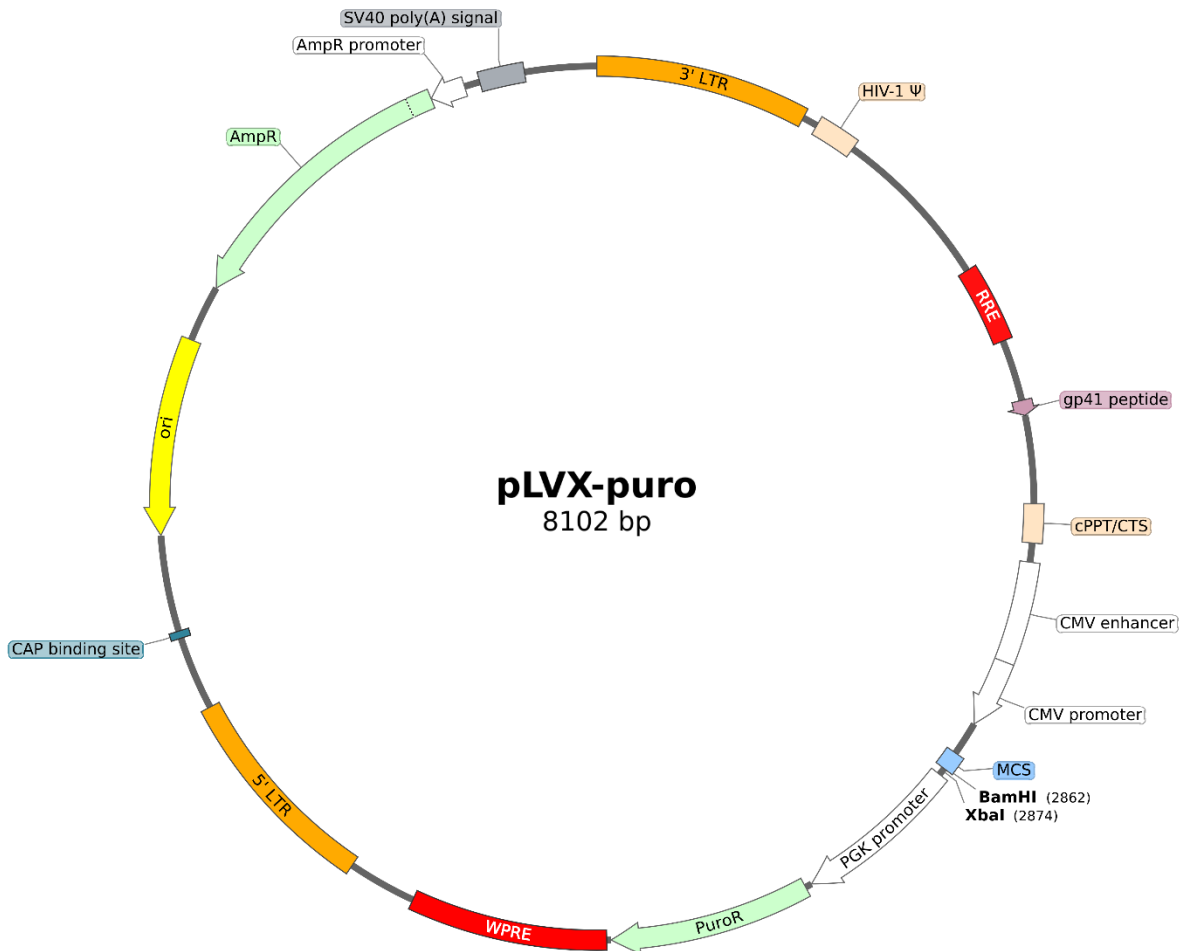


Figura 7 - Mapa do vetor pLVX-puro. Em branco, a sequência do promotor CMV está a montante do multiple cloning site (MCS - em português, sítio de clonagem múltipla), enquanto o promotor PGK (Phosphoglycerate kinase) está a montante do gene de resistência a puromicina (PuroR) e o promotor de ampicilina (AmpR promoter) está localizado a montante do gene de resistência à ampicilina (AmpR). Em vermelho, WPRE e RRE são elementos que atuam na regulação transcricional e da expressão, respectivamente. A sequência cPPT é o sítio de reconhecimento para transcrição reversa e HIV-1 Ψ é o sítio alvo para empacotamento do nucleocapsídeo, ambos representados em bege. LTRs, em laranja, flanqueiam a sequência a ser transduzida, sendo 5' LTR envolvida na transcrição. O sinal de poliadenilação de SV40 (SV40 poly(A) signal) está à jusante do 3' LTR. LTR: Long terminal repeats; RRE: Rev Response Element; cPPT: Central polypurine tract; MCS: multiple cloning site; WPRE: Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element; Ori: origem de replicação. Adaptado: Snapgene (Dotmatics).

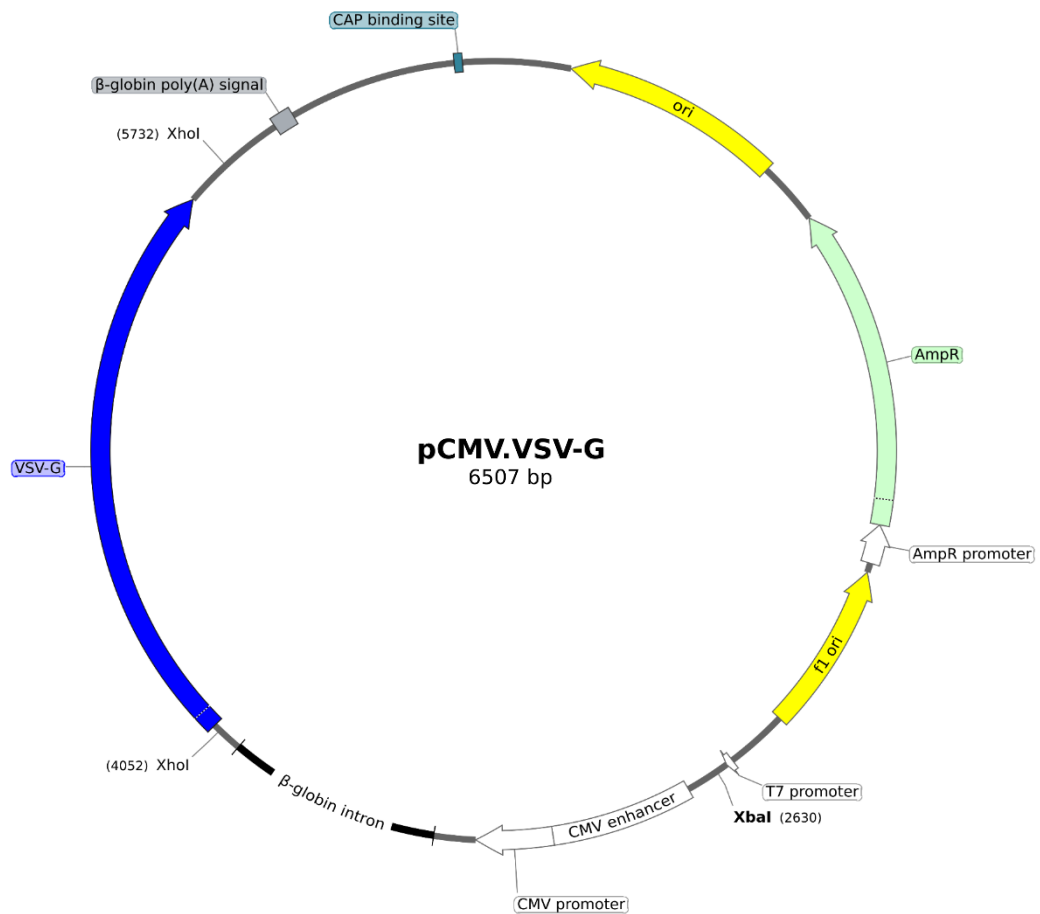


Figura 8 - Mapa do vetor pCMV.VSV-g. Em branco, a sequência do promotor CMV e T7 está a montante do gene da proteína de envelope VSV-G (Vesicular stomatitis virus G) e o promotor de ampicilina (AmpR promoter) está localizado a montante do gene de resistência a ampicilina (AmpR). O sinal de poliadenilação de β -globina (β -globin poly(A) signal), em cinza, está a jusante do gene VSV-G. Ori: origem de replicação. Adaptado: Snapgene (Dotmatics)

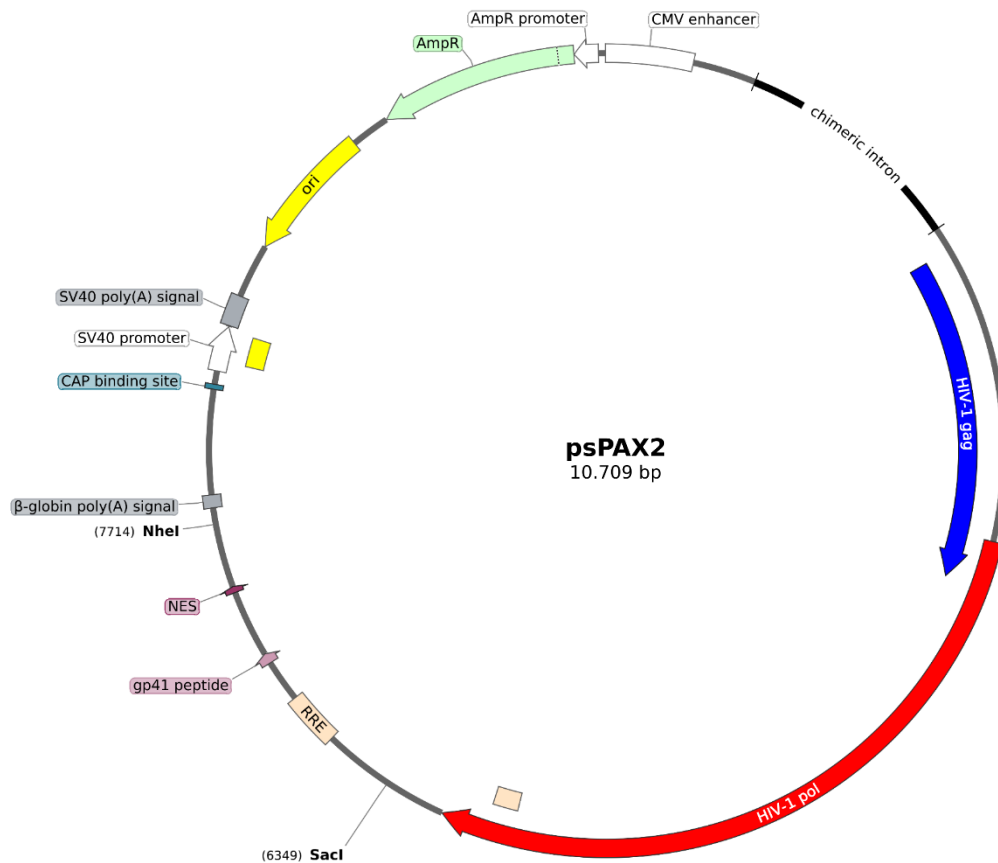


Figura 9 - Mapa do vetor psPAX2. Em branco, a sequência do promotor CMV está a montante dos genes estruturais gag e pol do HIV-1. O promotor de ampicilina (AmpR promoter) está localizado a montante do gene de resistência a ampicilina (AmpR), em verde. RRE é um elemento que atua na regulação de expressão. O peptídeo Gp41 compõe a porção transmembrana da proteína de envelope, NES é um sinal de exportação nuclear, e a jusante há o sinal de poliadenilação de β - globulina. RRE: Rev Response Element; NES: Nuclear Export Signal; Ori: origem de replicação. Adaptado: Snapgene (Dotmatics).

O plasmídeo pLVX-puro-CHIKV-E2 foi construído a partir da ligação do inserto e *template* oriundos, respectivamente, da restrição do pcDNA 3.1 + CHIKV-E2 e pLVX-puro pelo par de enzimas BamHI e XbaI. Os produtos de digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose. O fragmento de 1191 pb proveniente da digestão do pcDNA 3.1 + CHIKV-E2 e o de 8102 pb gerado da digestão de pLVX-puro foram, cuidadosamente, excisados do gel de agarose, pesados e submetidos à purificação pelo kit *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel).

Os fragmentos purificados foram quantificados e submetidos à ligação com *T4 DNA Ligase* (Promega) na razão 3:1 de inserto para vetor, incubados *overnight* a 15°C. O volume total de ligação, 10 μ l, foi utilizado para transformar XL1-Blue. As

colônias crescidas no meio de seleção foram inoculadas e submetidas à extração plasmidial. Os plasmídeos obtidos foram confirmados por digestão e avaliados por eletroforese em gel de agarose.

4.5.2 Produção lentiviral em HEK293T

Para produção de lentivírus em células HEK293T, a cultura em garrafa T75 foi transfectada com os três plasmídeos lentivirais, pLVX-puro CHIKV-E2, p.CMV.VSV-g e psPAX2, na razão 1:2:2, num total de 25 µg de DNA. A transfecção seguiu o protocolo descrito no tópico 4.4.1, porém após 24h o meio era trocado por DMEM 2,5% SFB, havendo a coleta total do sobrenadante contendo lentivírus nos tempos de 48h e 72h. O SFB foi mantido em baixa concentração, pois apesar de interferir na adsorção viral, é um importante fator estimulador do metabolismo celular. Todos os sobrenadantes contendo lentivírus foram centrifugados a 1500 rpm e filtrados com filtros 0,45 µm (KASVI) para remoção de células e debris celulares. Os sobrenadantes lentivirais eram prontamente utilizados para transdução ou armazenados a -80°C.

4.5.3 Produção lentiviral em EXPI293

A produção de lentivírus carreando o gene E2 em células EXPI293 seguiu o mesmo protocolo de transfecção descrito no tópico 4.4.2, alterando os tempos de coleta. Na transfecção foi utilizada a razão 1:1:1 dos plasmídeos lentivirais, num total de 25 µg de DNA. Passadas 24h após adição dos *Enhancer*, os 30ml de meio foram coletados, centrifugados e o *pellet* de células ressuspenso em *EXPI293™ Expression Medium* (ThermoFisher) novo, seguido da segunda coleta no tempo de 48 h. Todos os sobrenadantes contendo lentivírus foram centrifugados a 1500 rpm e filtrados a 0,45 µm para remoção de células e debris celulares.

4.5.4 Concentração de lentivírus – Ultracentrifugação e filtro Amicon

Objetivando uma maior eficiência de transdução, o sobrenadante passou a ser concentrado por ultracentrifugação ou filtração em coluna Amicon. Na ultracentrifugação, o sobrenadante lentiviral foi centrifugado a 30.000 x g na temperatura de 4°C na ultracentrífuga *Sorvall Wx Ultra Series* (ThermoFisher). O

precipitado, invisível a olho nu, proveniente de 10ml de sobrenadante lentiviral, foi ressuspenso em 2ml de *EXPI293™ Expression Medium* (ThermoFisher) e filtrado. Para concentração em coluna Amicon de 50 kDa, 10ml de sobrenadante foi centrifugado a 5000 x g por no mínimo 10min. O volume que não atravessou o filtro foi utilizado para lavar a membrana e completado para 2ml, a fim de obter-se as partículas virais retidas, e em seguida coletados.

4.5.5 Transdução

Em células HEK293T, a adsorção do vírus era realizada em garrafas T25. Inicialmente, o sobrenadante das células era descartado, as células tripsinizadas e centrifugadas. As células eram quantificadas e 1×10^7 células eram ressuspenso em 2-3ml de sobrenadante lentiviral suplementado com 4µg/ml de polybrene (Merck). Quando o lentivírus produzido estava armazenado a -80°C , o descongelamento e manuseamento do sobrenadante lentiviral era feito em gelo para preservação das partículas virais. Após 1h de adsorção em baixa agitação o volume era completado para 5 ml. O polybrene (Merck) é um polímero catiônico que neutraliza as cargas na superfície viral e celular para aumentar a eficiência de adsorção. A seleção de células transduzidas era feita com puromicina (ThermoFisher) nos repiques seguintes a transdução. A viabilidade celular era avaliada por *Trypan Blue* (ThermoFisher) em contador automático *Countess II FL* (ThermoFisher).

Para EXPI293 e CHO²³⁵³, 5×10^6 células eram centrifugadas e ressuspenso em sobrenadante lentiviral. A adsorção era feita sob agitação de 300 rpm por 1 h, adicionado de 4µg/ml de polybrene. O volume de sobrenadante para adsorção era entre 2-3ml, sendo que o sobrenadante poderia ou não ser previamente submetido à ultracentrifugação ou filtração em Amicon para concentração das partículas virais. Após a adsorção, o volume era completado para 5ml e transferido para garrafa T25, permanecendo sob agitação de 60 rpm, a 37°C e 5% CO_2 . Após 24h de crescimento em garrafa T25, o volume total era transferido para Erlenmeyer de 125ml, e a cultura completada com meio para 25ml e suplementada 2µg/ml do agente de seleção puromicina (ThermoFisher). A viabilidade celular era avaliada em cada etapa através do *Trypan Blue* (ThermoFisher). As culturas foram repicadas somente após a recuperação da viabilidade, e o sobrenadante só era analisado após no mínimo dois repiques com a droga de seleção.

4.6 PCR

A fim de confirmar a transdução, as células transduzidas foram submetidas ao kit *QIAamp DNA Blood Mini (Qiagen)* para extração do DNA total. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro *NanoDrop (ThermoFisher)* e 60ng de cada amostra foram submetidas à PCR. A amplificação foi direcionada ao MCS (*multiple cloning site* – em português, sítio múltiplo de clonagem) através de iniciadores senso e anti-senso específicos para a região do sítio múltiplo de clonagem no plasmídeo pLVX-puro (anexo 1). No ensaio de PCR foram utilizados 0,25 µl da enzima *Taq polimerase*, 5 µl de buffer, 2 µl de DNTP, 1 µl de cada iniciador e 1 qsp. de H₂O Milli-Q. A reação sem o DNA foi realizada em comparação. A reação de PCR ocorreu em termociclador seguindo a ciclagem: desnaturação inicial a 95°C por 5min; 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1min seguida da fase de anelamento a 55°C por 30s, e por fim, o alongamento a 72°C por 2min; alongamento final 72°C por 10min.

4.7 Análise da expressão

O sobrenadante das células eucariotas transfectadas e transduzidas com o gene CHIKV-E2 foram analisados por SDS-PAGE e Western Blot. Devido à baixa concentração da proteína expressa, em alguns ensaios o sobrenadante foi concentrado com filtro Amicon (Merck) e/ou purificado com *bead* de *Ni-NTA Agarose (QIAGEN)*. Para concentração, 12ml de sobrenadante foram concentrados em colunas Amicon de 10 ou 30 kDa centrifugados a 5000 x g por no mínimo 10min. O volume que não atravessou o filtro foi utilizado para lavar a membrana, a fim de obter-se as proteínas retidas, e então coletado. Para purificação, 500µl de sobrenadante foram incubados 50µl de *bead* por 2h sob agitação, em seguida centrifugados a 1200 rpm, seguido do descarte do sobrenadante e ressuspensão das *beads* em tampão de amostra.

4.7.1 SDS-PAGE

A expressão da proteína CHIKV-E2 em plataforma eucariota foi avaliada por separação eletroforética em gel de poliacrilamida. O gel de SDS-PAGE consiste em

duas fases, o gel de empilhamento, no qual as amostras são alinhadas, e abaixo, o gel de separação ou resolução, onde as proteínas são separadas de acordo com o peso molecular durante a eletroforese. O gel de resolução foi preparado para uma concentração final de 12,5% de acrilamida, Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, 0,5% de APS, 0,1% de SDS e 0,05% de TEMED. O gel de empilhamento consistiu em 4% de acrilamida, Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, 0,5% de APS, 0,1% de SDS e 0,2% TEMED. As amostras analisadas foram preparadas com tampão de amostra* e incubadas por 10min a 96°C. As amostras eram aplicadas no gel imerso em tampão de corrida* nas cubas (Biorad) e submetidos à corrente de 150V por cerca de 1h30min. Os géis foram corados com *Instant Comassie* (Abcam) por 30min ou *Comassie Brilliant Blue** por 20min, e para o último corante, descorados com solução descorante*. O padrão de peso molecular *Precision Plus Protein Dual Color Standards* (Biorad) ou *PageRuler™* (Thermo Scientific) foi aplicado ao gel a fim de comparação com as amostras.

* As composições das soluções e tampões estão presentes no apêndice 1.

4.7.2 Western Blot

A técnica de Western Blot foi utilizada para identificar a presença de CHIKV-E2 em amostras de células eucariotas, assim como para avaliar a antigenicidade da proteína. Inicialmente as amostras foram submetidas à eletroforese em SDS-PAGE, e ao final da corrida as proteínas do gel de poli(acrilamida) foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose *Amersham™* (Cytiva), sob eletroforese a 350 mA por 2h em cuba preenchida com tampão de transferência*. Para confirmação da transferência, a membrana de nitrocelulose foi corada com *Ponceu* e em seguida lavada com TBS-T*. Posteriormente, a membrana foi incubada em solução de bloqueio*, por 1h ou *overnight*. Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo *Anti-6x His Tag* (Sigma) diluído 1:500 a 1:2000 ou anti-E2 (IgG total purificado de coelho imunizados com E2 produzida em procaríoto, por Bagno et al. (2020)) diluído 1:250 a 1:1000 por 1h, e respectivamente, incubadas com *Anti-Mouse IgG* (Sigma) na diluição 1:2000 a 1:10000 ou *Anti-Rabbit IgG* (Sigma) na diluição 1:100.00 a 1:150.000, por 1h. Os anticorpos secundários, *Anti-Mouse* e *Anti-Rabbit*, são conjugados com peroxidase. Ao final de cada incubação, a membrana foi lavada 3x com solução TBS-T durante 10min. A revelação da membrana foi feita com luminol,

utilizando o kit *Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (Cytiva), e a quimioluminescência gerada foi documentada no *ChemiDoc™ Touch* (BIO-RAD).

* As composições das soluções e tampões estão presentes no apêndice 1.

4.8 Cromatografia de afinidade

A construção do gene CHIKV-E2 foi adicionada de uma cauda de histidina (6x His) na porção C-terminal para purificação da proteína por afinidade. Portanto, após a confirmação da expressão de CHIKV-E2 por Western Blot, alguns sobrenadantes foram selecionados para purificação por cromatografia de afinidade a histidina pela coluna *HisTrap excel* (GE Healthcare Life Sciences), no aparelho *ÄKTA prime plus* (GE Healthcare Life Sciences).

Previamente a purificação, o sobrenadante foi clarificado por centrifugação a 2000 rpm e filtrado a 0,45 µm. A coluna foi lavada com água para remoção do etanol 20% de armazenamento, ambientada com solução de ligação*, e em sequência, a aplicação do sobrenadante. Após a passagem do sobrenadante, a coluna foi lavada com tampão de lavagem para remoção de ligações inespecíficas e em seguida submetida ao tampão de eluição*. Diferentes estratégias de eluição foram testadas a fim de obter-se frações da proteína sem contaminantes. A quantificação do purificado foi realizada utilizando o kit *Randox Up*, seguindo as recomendações do fabricante.

* As composições das soluções e tampões estão presentes no apêndice 1.

4.9 ELISA

Com intuito de avaliar a antigenicidade de CHIKV-E2, foram realizados ensaios de ELISA indireto. Para tal, placas de poliestireno foram sensibilizadas por 18h a 4°C com 100µL da solução do antígeno diluído em tampão carbonato (pH 9,6)*. Para avaliação de IgM foram utilizados 800ng por poço para sensibilização, enquanto para IgG foram utilizados 200ng por poço. A solução de sensibilização foi descartada e os poços foram bloqueados por 2h a 25°C, utilizando-se 250µL da solução de bloqueio. Após o descarte do bloqueio, em cada poço foram adicionados 100µL de soro diluído em diluente de amostra, incubados a 37°C por 60min. As diluições do

soro utilizadas foram 1:25, para avaliação de IgM, e 1:100, para análise de IgG. Em seguida, as placas foram lavadas cinco vezes e adicionou-se 100µL do anticorpo secundário (*Anti-Human IgG*, Sigma A0170, ou *Anti-Human IgM*, Sigma A0420, ambos conjugados à enzima peroxidase) previamente diluído em estabilizante (Moss, Ref. HRPD1000) (1:60.000 para detecção de IgG e 1:40.000 para IgM), sendo incubados a 37°C por 30min. As placas foram lavadas cinco vezes e incubadas com 100µL de TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina) (Scienco, Ref. One Step) por poço, ao abrigo de luz, por 20min. A reação foi interrompida com 100µL de solução de parada e absorbância medida em espectrofotômetro *Multiskan GO* (Thermo Fisher Scientific) a uma densidade óptica (O.D.) de 450nm.

* As composições das soluções e tampões estão presentes no apêndice 1.

4.10 Análises dos resultados de ELISA

Os gráficos e dados estatísticos foram gerados pelo programa *GraphPad Prism 8* (Dotmatics), que fornece a análise por curva ROC. A curva ROC relaciona antagonicamente o sinal dado pelos verdadeiros positivos (sensibilidade), do ruído do teste e dado pelos falsos positivos (1-especificidade), para assim, distinguir os indivíduos como infectados e não infectados. A partir da curva ROC é possível analisar a Área sob a Curva (AUC). A AUC representa o desempenho geral do teste, pois leva em consideração todos os valores de sensibilidade e especificidade de cada ponto de corte, da seguinte forma (DAVID W. HOSMER JR.; STANLEY LEMESHOW; RODNEY X. STURDIVANT, 2013)

Tabela 3 - Relação entre AUC e potencial de discriminação

| | Potencial de discriminação |
|----------------------|----------------------------|
| $0,5 \leq AUC < 0,7$ | Sem discriminação |
| $0,7 \leq AUC < 0,8$ | Discriminação aceitável |
| $0,8 \leq AUC < 0,9$ | Discriminação muito boa |
| $AUC \geq 0,9$ | Discriminação excelente |

Um valor de *cut-off* foi calculado pela média de soros verdadeiramente negativos acrescidos de três vezes o valor do desvio padrão (3DP) (KIM et al., 2019), e confirmado pela Curva ROC. A partir do *cut-off* determinou-se um índice (I) de classificação dos resultados, baseado na absorbância (Abs) de cada amostra (Abs 450 nm), dividida pelo valor do *cut-off*, de acordo com a equação:

$$I = \frac{Abs_{450nm}}{cut - off}$$

Tabela 4 - Classificação de amostras em relação ao índice

| Índice | Classificação da amostra |
|---------------|---------------------------------|
| I < 0.8 | Negativa - amostra não reagente |
| 0.8 ≤ I < 1.1 | Indeterminada |
| I ≥ 1.1 | Positiva - amostra reagente |

O desempenho das proteínas recombinantes foi avaliado pela razão entre a média das absorbâncias encontradas para as amostras positivas dividida pela média das absorbâncias das amostras negativas. Os resultados foram comparados às categorizações prévias, determinando-se os parâmetros de sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia (AC), como mostrado na Tabela 5.

Tabela 5 - Referência para a classificação dos resultados pelo teste 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 |
| <p>Especificidade: $E = \frac{D}{(B+D)}$</p> <p>Sensibilidade: $S = \frac{A}{(A+C)}$</p> <p>Valor Preditivo Positivo: $VPP = \frac{A}{(A+B)}$</p> <p>Valor Preditivo Negativo: $VPN = \frac{D}{(C+D)}$</p> <p>Acurácia: $AC = \frac{(A+D)}{(A+B+C+D)}$</p> | | | |

Amostras classificadas como indeterminadas ($0,8 \leq I < 1,1$) não foram utilizadas para os cálculos de E, S, VPN VPP, AC.

5 RESULTADOS

5.1 Predição de regiões transmembranas e hidrofóbicas na glicoproteína E2

A sequência consenso do gene E2 de CHIKV foi obtida por Bagno et al. (2019) a partir de amostras brasileiras e do genótipo asiático. O gene intitulado CHIKV-E2 foi analisado, no presente trabalho, em sua estrutura quanto ao potencial transmembrana e hidrofóbico, com base nos resíduos peptídicos que compõem a proteína a ser traduzida.

Os softwares *Transmembrane tendency* (ProtScale) e *TMHMM* (DTU) indicaram, respectivamente, um potencial transmembrana a partir dos aminoácidos 356 e 365 (Figura 10 – A e C). O potencial hidrofóbico foi avaliado através do software *Hphob. / Kyte & Doolittle* (ProtScale), determinando que uma possível sequência hidrofóbica do gene E2 está presente a partir do aminoácido 367 (Figura 10 - B). As três ferramentas de análise indicam a região entre os aminoácidos 390-405 como uma região de baixa tendência transmembrana e hidrofóbica.

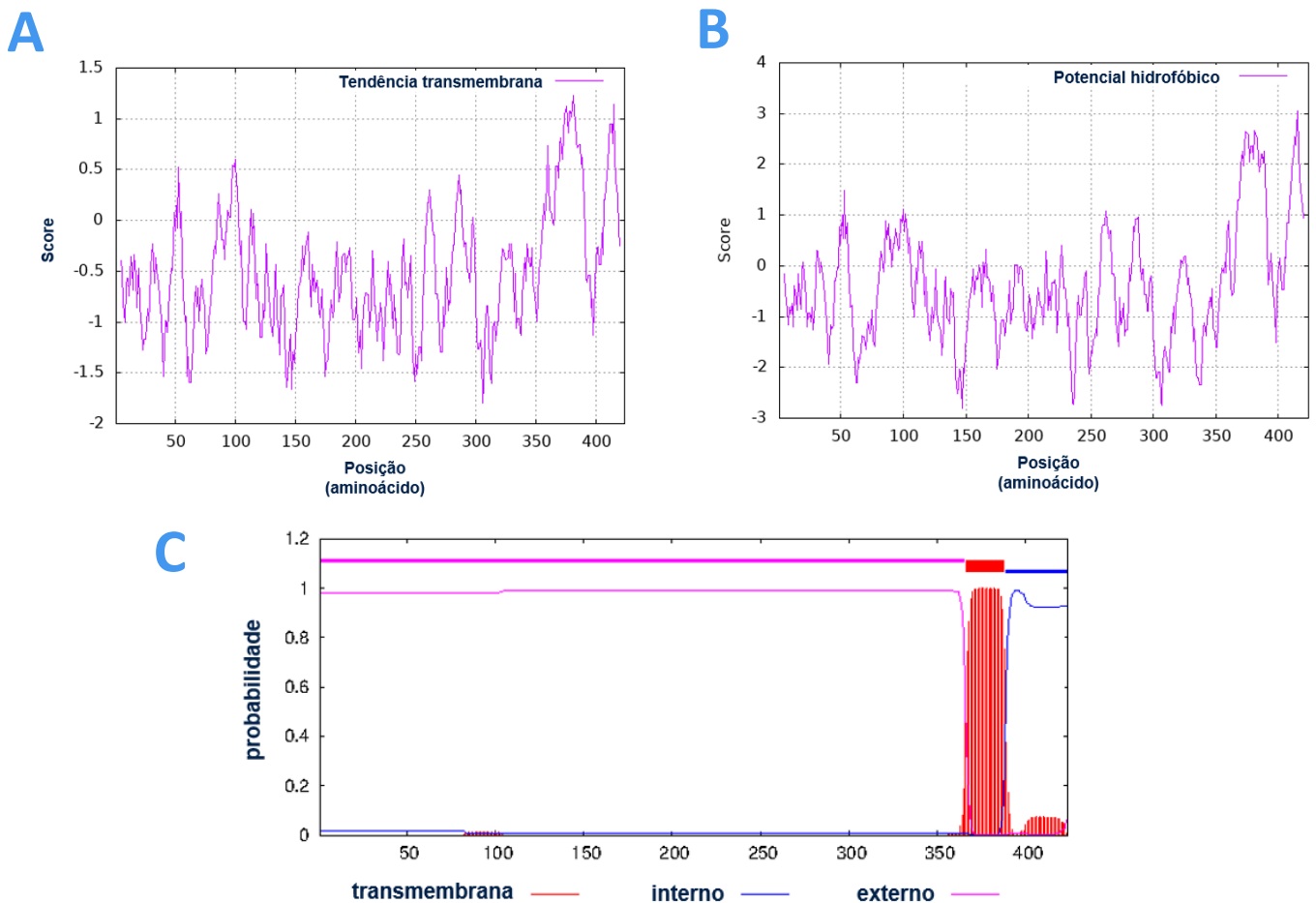


Figura 10 - Gráficos das predições de regiões transmembranas (A e C) e hidrofóbicas (B) do gene E2 gerados, respectivamente, pelos softwares *Transmembrane tendency* (ProtScale), *TMHMM* (DTU) e *Hphob. / Kyte & Doolittle* (ProtScale). Os gráficos A e B classificam o potencial transmembrana/hidrofóbico das sequências por score. O painel C marca em rosa sequências preditas como externas, as sequências transmembranas em vermelho e em azul a região proteica interna em relação a probabilidade de cada predição no eixo y.

5.2 Predição de sítios putativos de glicosilação no gene E2

O gene da glicoproteína E2 foi rastreado quanto à presença de O-glicosilações e N-glicosilações através dos programas *NetNGlyc - 1.0* e *NetOGlyc - 4.0* (DTU). Três sítios putativos de N-glicosilações foram preditos nas posições 263, 273 e 345 pela ferramenta *NetNGlyc - 1.0* (Figura 11 - A). Os N-glicanos preditos estão descritos na literatura (GOH et al., 2013; VOSS et al., 2010). A predição no software *NetOGlyc - 4.0* indicou 5 sítios putativos de O-glicosilação, sendo eles os aminoácidos na posição 144, 155, 156, 160 e 161 (Figura 11 - B). Os padrões de O-glicosilações ainda não são totalmente elucidados, dificultando a predição dos mesmos.

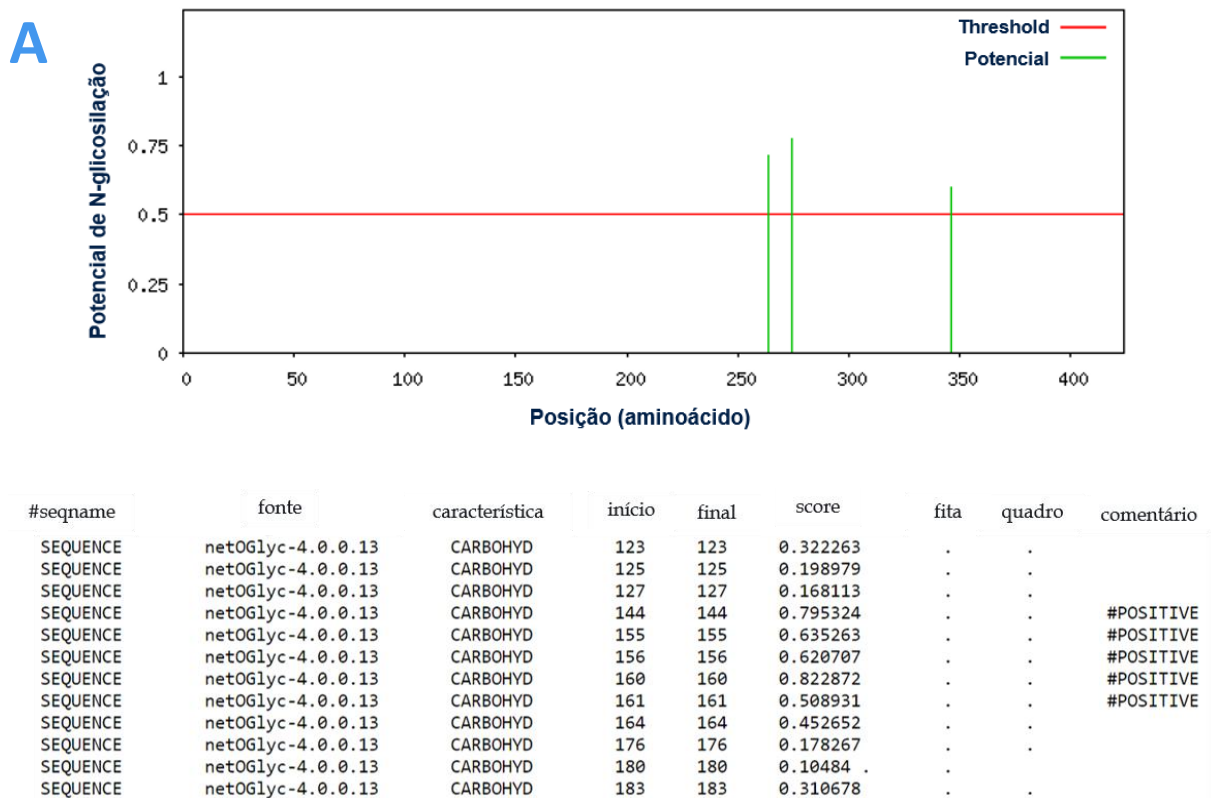


Figura 11 - Análise dos sítios putativos de glicosilação no gene E2. O gráfico (A) representa as N-glicosilações preditas no programa *NetNGlyc - 1.0* (DTU). Em verde, estão denotados sítios com potencial de glicosilação, em relação à sua probabilidade em y. A lista (B) exibe os sítios putativos de O-glicosilação gerados pelo software *NetOGlyc - 4.0* (DTU). Sequências com score maior que 0,5 foram registrados com "POSITIVE" para glicosilação.

5.3 Construção do gene CHIKV-E2

Com base nas predições de regiões transmembranas e nos sítios putativos de glicosilação, a construção do gene CHIKV-E2 contemplou até o aminoácido na posição 352 da sequência consenso. Para manipulação do gene e sua expressão em plataforma eucariotas foram acrescentadas as alterações descritas nos tópicos seguintes.

5.3.1 Construção do gene CHIKV-E2

A porção do gene E2 identificada como transmembrana foi retirada e os pontos preditos de N-glicosilação e O-glicosilação mantidos. A montante da sequência do gene E2 foram adicionados a sequência Kozak e o peptídeo sinal tPA-*Tissue plasminogen activator* (em português, ativador de plasminogênio tecidual) para, respectivamente, interação ribossomal do mRNA e secreção proteica (WANG et al., 2011). A sequência codificadora da cauda de histidina (6x HIS) foi adicionada a jusante da sequência de E2, em função da purificação por afinidade, e ao final da construção do gene foi adicionado um stop códon. Os sítios de restrição das enzimas BamHI e XbaI foram inseridos flanqueando o gene construído, respectivamente, a montante e a jusante. A construção final do gene está representada em nucleotídeos (Figura 12 - A), aminoácidos (Figura 12 - B) e esquema ilustrativo (Figura 12 - C) nas figuras seguintes.

5.3.2 Propriedades físico-química do gene CHIKV-E2

A ferramenta *Compute pI/Mw* (Expasy) calculou o peso molecular e ponto isoelétrico (pI) da proteína expressa pelo gene CHIKV-E2 baseando-se na composição peptídica da proteína traduzida, sem o peptídeo sinal (tabela 3). E a estrutura tridimensional da proteína CHIKV-E2 foi construída no software Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>) através de homologia por banco de dados (Figura 13).

Tabela 6 - Comprimento da sequência nucleotídica do gene CHIKV-E2, tamanho da proteína a ser traduzida e suas propriedades físico-químicas

| Gene/proteína | Tamanho da sequência | Número de aminoácidos | Peso molecular (kDa) sem MPTs | Ponto isoelétrico (pI) |
|-----------------|----------------------|-----------------------|-------------------------------|------------------------|
| CHIKV-E2 | 1071 | 357 | 40,3 | 8,21 |

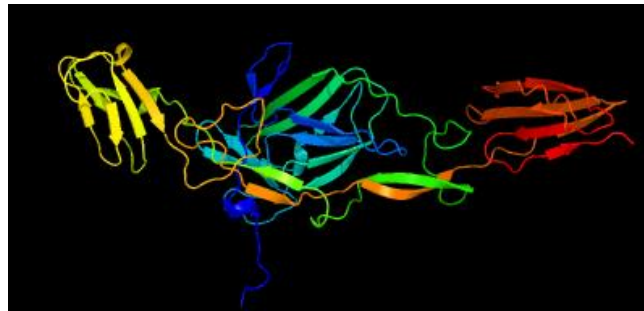


Figura 13- Estrutura tridimensional da proteína CHIKV-E2 predita pelo software Phyre2. Coloração baseada na sequência do arco-íris, iniciando pela porção N terminal até a extremidade C terminal.

5.3.3 Síntese do gene CHIKV-E2 no vetor pcDNA 3.1 (+)

A construção final foi fabricada comercialmente pela *GenScript Biotech*. O gene CHIKV-E2 foi incorporado no vetor pcDNA 3.1 (+), plasmídeo de 6540 pb que inclui um promotor CMV a jusante do gene e sinal de poliadenilação bGH a montante, além das sequências para os genes de resistência a ampicilina, canamicina e neomicina. O plasmídeo pcDNA 3.1 (+) contendo o gene CHIKV-E2 será referido como pcDNA 3.1 + CHIKV-E2 (Figura 14). Não houve otimização de códons do gene CHIKV-E2,

uma vez que, naturalmente, o CHIKV expressa a proteína E2 em humanos. Não foi adicionado sinal de poliadenilação em virtude da possível interferência na montagem do lentivírus. A presença de um sinal interno de poliadenilação pode gerar a terminação prematura do RNA a ser incorporado na partícula viral (HAGER et al., 2008).

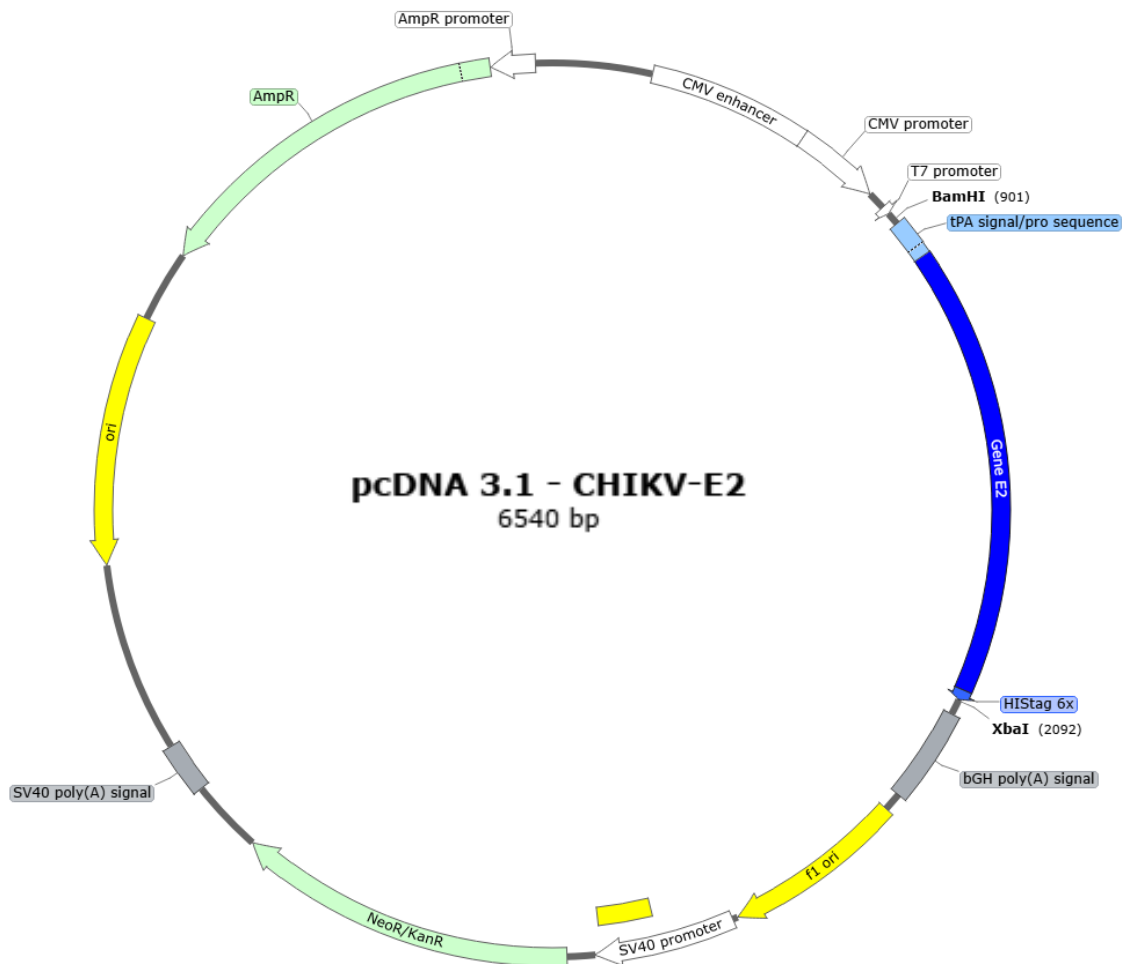


Figura 14- Mapa do plasmídeo pcDNA 3.1 + CHIKV-E2 contendo a sequência do gene CHIKV-E2. Em azul, a construção do gene E2, contendo o peptídeo sinal tPA e a cauda de histidina (HIStag), flanqueados pelos sítios de restrição das enzimas BamHI e XbaI. Em branco, a sequência do promotor CMV e T7 estão a montante do gene E2, enquanto o promotor SV40 está a montante do gene de resistência a neomicina e canamicina (NeoR/KanR) e o promotor de ampicilina (AmpR promoter) está localizado a montante do gene de resistência a ampicilina (AmpR). Em cinza, o sinal de poliadenilação bGH (bGH poly(A)signal) localiza-se a montante do gene CHIKV-E2 e o sinal de poliadenilação de SV40 (SV40 poly(A)signal) está a jusante do gene NeoR/KanR. Ori: origem de replicação. Adaptado: Snapgene.

5.4 Clonagem do pcDNA 3.1 + CHIKV-E2 e confirmação de identidade por restrição enzimática

Após o recebimento do plasmídeo, bactérias XL1-blue quimiocompetentes foram transformadas e plaqueadas em placa de Petri preenchida com LB ágar seletivo. Houve o crescimento de cerca de 40 colônias resistentes a ampicilina, dessas, duas colônias crescidas espacialmente isoladas das demais foram selecionadas para inoculo, e após 18h submetidas à mini-prep para obtenção dos plasmídeos. Os produtos de mini-prep foram quantificados e armazenados a -20°C.

Com o propósito de confirmar a identidade do pcDNA 3.1 + CHIKV-E2, uma amostra dos plasmídeos obtidos na mini-prep dos clones 1 (C1) e 2 (C2) foram digeridos pelo par de enzimas BamHI e XbaI, que flanqueiam o gene CHIKV-E2, gerando fragmentos esperados de 5349 pb e 1191 pb. A sequência de pcDNA 3.1 (+) apresenta sítio de restrição para NdeI e o gene CHIKV-E2 para XhoI, a clivagem do pcDNA 3.1 + CHIKV-E2 por essas enzimas originam fragmentos de 5031 pb e 1509 pb. Os fragmentos observados por eletroforese em gel de agarose dos produtos de digestão apresentaram peso molecular semelhante ao esperado (Figura 15).

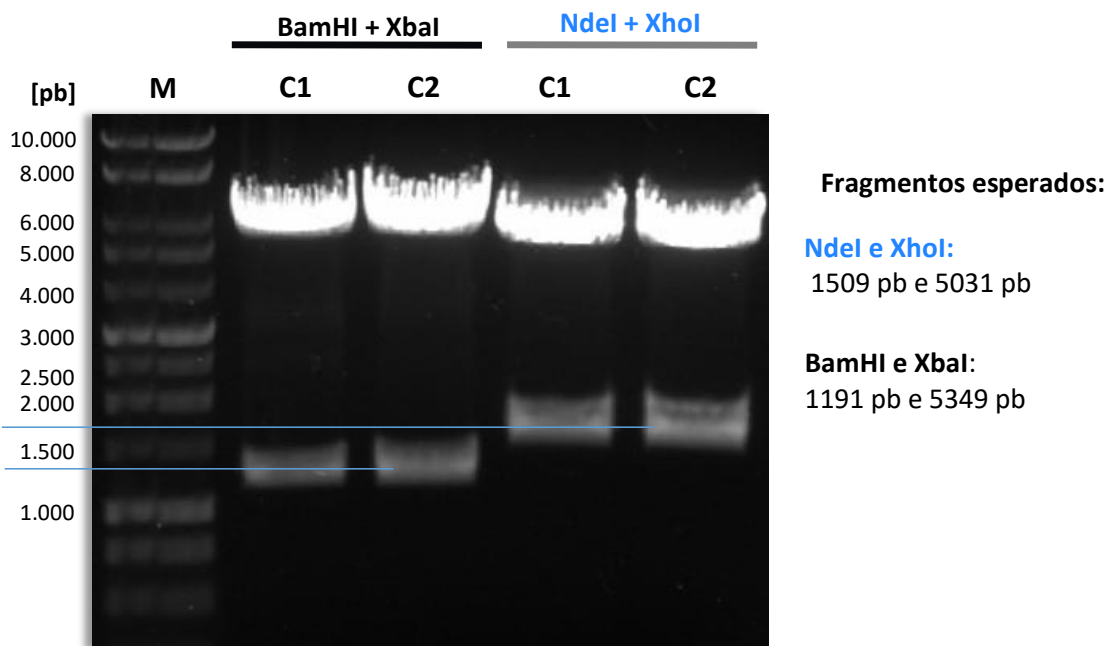


Figura 15- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de digestão do vetor pcDNA 3.1 + CHIKV-E2. Confirmação da identidade a partir da restrição enzimática dos plasmídeos obtidos por mini-prep de dois clones de DH5α transformados com pcDNA 3.1+ CHIKV-E2 (C1 e C2), seguido da eletroforese dos produtos da digestão em gel de agarose 0,7% corado com SYBR Safe (Invitrogen). A clivagem de pcDNA 3.1 + CHIKV-E2 pelo par de enzimas BamHI e XbaI geram fragmentos de 1191 pb e 5349 pb, enquanto a digestão pelo par NdeI e XhoI geram fragmentos de 1509 pb e 5031 pb. M: 1kb DNA Ladder (Promega).

5.5 Expressão transiente do gene CHIKV-E2

Com intuito de avaliar a expressão do gene E2, o plasmídeo pcDNA 3.1 + CHIKV-E2 foi utilizado para transfectar células HEK293T e células EXPI293. Inicialmente, o sobrenadante e extrato de células HEK293T crescidas em meio DMEM 10% SFB foram avaliados por WB. Contudo, o meio DMEM 10% SFB apresenta diversas bandas em SDS-PAGE e múltiplas ligações inespecíficas em Western Blot quando utilizado o anticorpo Anti-HIStag. Como solução, após a transfecção, a cultura era mantida em meio *Opti-MEM* (ThermoFisher) por 24h a 48h. A fórmula do meio *Opti-MEM* (ThermoFisher) conta com menor suplementação de soro, permitindo uma melhor avaliação por ensaios de SDS-PAGE e Western Blot das proteínas recombinantes expressas no sobrenadante. A avaliação do extrato de células HEK293T WT por Western Blot também apresentou abundantes ligações inespecíficas.

5.5.1 Expressão transiente do gene CHIKV-E2 em HEK293T

O sobrenadante e o extrato de células HEK293T WT e transfectadas com pcDNA 3.1 + CHIKV-E2 utilizando *Lipofectamine™ 3000*, foram coletados submetidos à eletroforese em gel SDS-PAGE e Western Blot (Figura 16 – A e B). O extrato de células foi obtido a partir da extração de proteínas totais por *RIPA* (ROCHE). Para marcação da proteína E2 em Western Blot das mesmas amostras avaliadas no gel SDS-PAGE foram utilizados o anticorpo primário Anti-E2 (IgG total purificado de coelho imunizados com E2 produzida em procarioto, por Bagno et al. (2020)) e *Anti-IgG Rabbit* como secundário (Sigma, Ref. A0545). Em SDS-PAGE não foi possível distinguir a expressão da proteína CHIKV-E2, e no Western Blot não houve marcação de nenhuma proteína nas amostras provenientes das células, apenas a amostra controle foi marcada.

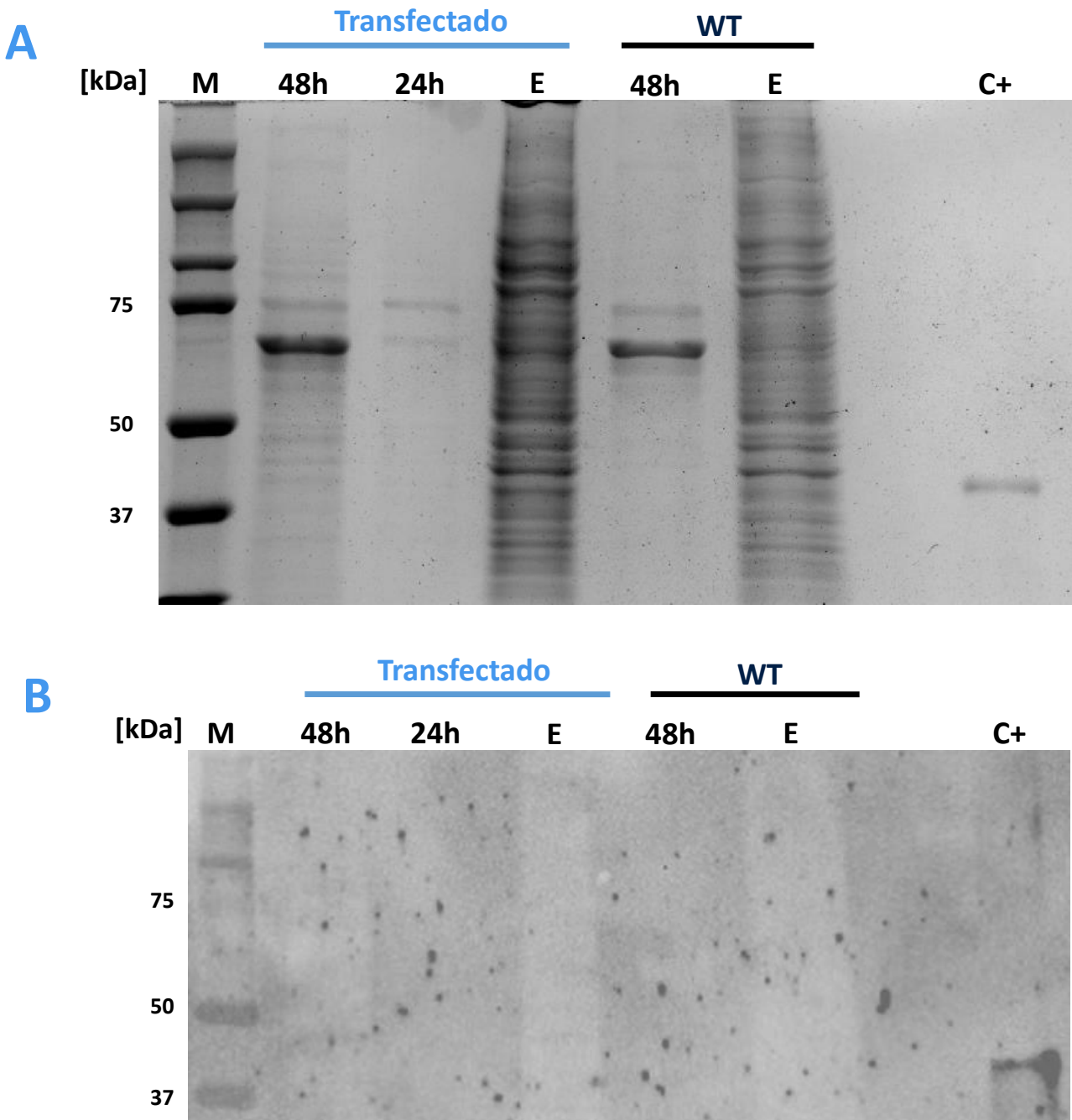


Figura 16 - Gel SDS-PAGE (A) e Western Blot (B) do sobrenadante e extrato de células HEK293T transfectadas com pcDNA 3.1 + CHIKV-E2. O sobrenadante (24 e 48 horas) e extrato de células HEK293T WT e transfectadas com pcDNA 3.1 + CHIKV-E2, mantidas em OptiMEM (ThermoFisher), foram submetidos a eletroforese em gel SDS-PAGE 12,5% corado com Coomassie Brilliant Blue e avaliados em Western Blot. Para marcação da proteína por Western Blot das mesmas amostras analisados no gel SDS-PAGE foi utilizado o anticorpo primário Anti-E2 (IgG total purificado de coelhos imunizados com E2 produzida em procaríoto) e o Anti-IgG rabbit como anticorpo secundário. A membrana de nitrocelulose foi revelada com o kit Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Cytiva). M: marcador Precision Plus Protein Dual Color Standards (Biorad); 24h: sobrenadante de células HEK293T coletado 24 horas após a transfecção; 48h: sobrenadante coletado 48 horas após a transfecção; E: extrato total de células; WT: wild type; C+: E2 produzido em procaríoto.

Um novo ensaio repetindo o protocolo anterior foi realizado. Desta vez avaliando apenas o sobrenadante, purificando-o com *beads Ni-NTA Agarose* (QIAGEN), e aumentando as concentrações de anticorpos primários e secundários. As modificações permitiram a detecção por Western Blot da proteína E2 no sobrenadante purificado de células HEK293T transfectadas com pcDNA 3.1 + CHIKV-E2. A proteína CHIKV-E2 expressa em células HEK293T apresenta peso molecular de aproximadamente 46 kDa.

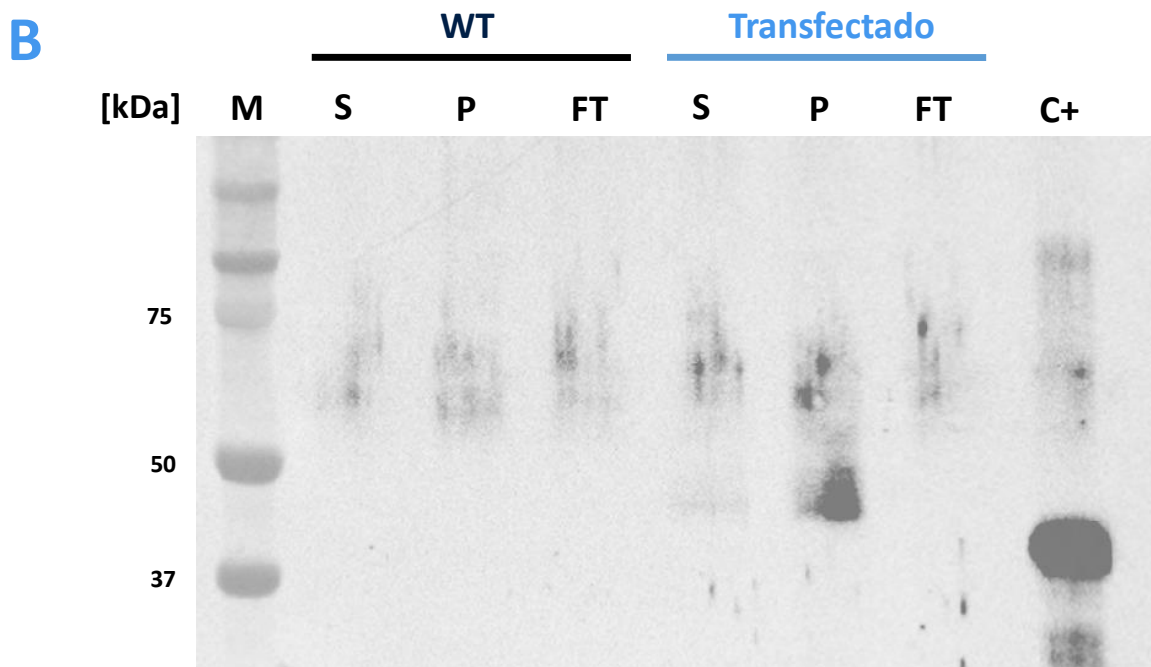
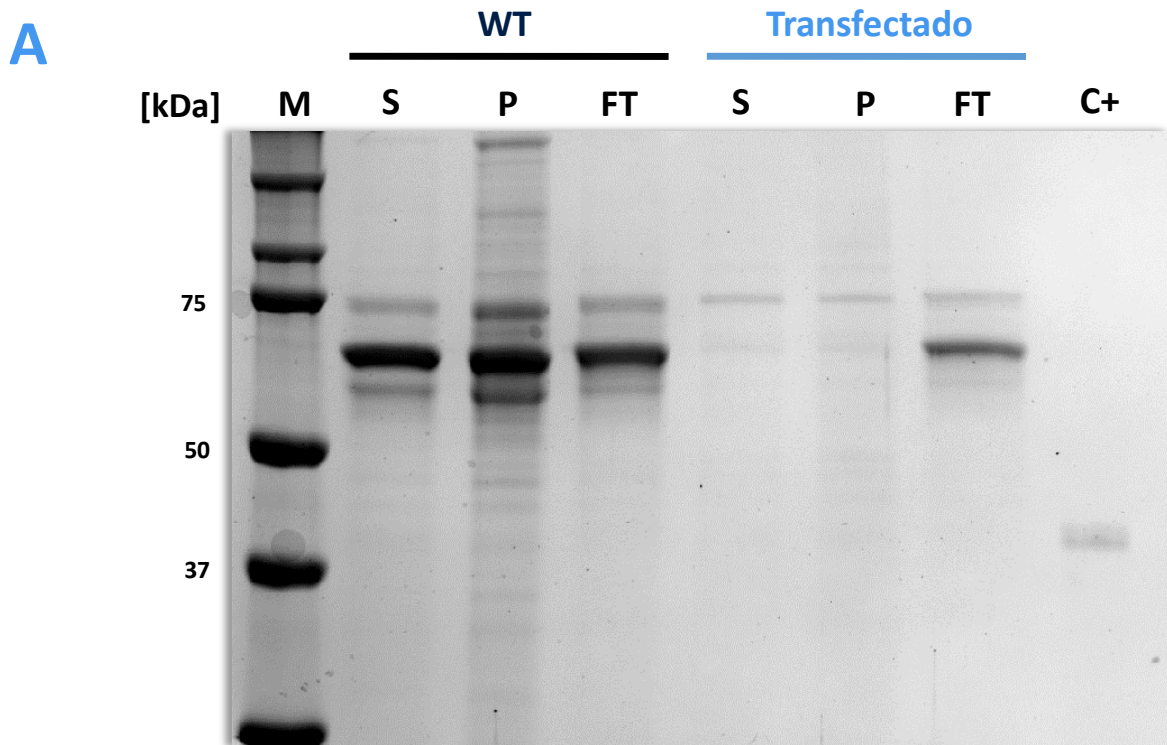


Figura 17 - Eletroforese em gel SDS-PAGE (A) e Western Blot (B) do sobrenadante de células HEK293T transfectadas com pcDNA 3.1 + CHIKV-E2. O sobrenadante (S) de células HEK293T WT e transfectadas com pcDNA 3.1 + CHIKV-E2, mantidas em Opti-MEM (ThermoFisher), foi purificado com bead de Agarose (P) (Agarose Ni-NTA, QIAGEN) e submetido a eletroforese em gel SDS-PAGE 12,5% corado com Coomassie Brilliant Blue. As amostras do SDS-PAGE também foram avaliadas por Western Blot utilizando o anticorpo primário Anti-E2 (IgG total purificado de coelho imunizados com E2 produzida em procaríoto) e anti-IgG rabbit como secundário. A membrana de nitrocelulose foi revelada com o kit Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Cytiva). M: marcador Precision Plus Protein Dual Color Standards (Biorad); S: sobrenadante; P: sobrenadante purificado com bead de agarose; FT: Flow-through da purificação; WT: wild type; C+: E2 produzido em procaríoto.

5.5.2 Expressão transiente do gene CHIKV-E2 em EXPI293

Células EXPI293 foram transfectadas com *ExpiFectamine™ 293 Reagent* (ThermoFisher) em meio *EXPI293™ Expression Medium* (ThermoFisher) e o sobrenadante foi coletado 4 dias após a transfecção. Comparativamente com amostras de EXPI293 WT, o sobrenadante de EXPI293 transfectada foi avaliado em SDS-PAGE e Western-Blot (Figura 18 – A e B). A linhagem EXPI293 cresce em suspensão no meio *EXPI293™ Expression Medium* (ThermoFisher), meio livre de soro e proteínas. No entanto, as células EXPI293 expressam naturalmente uma proteína na altura próxima à da proteína CHIKV-E2, dificultando a distinção da expressão por SDS-PAGE (Figura 18 - A). Por Western Blot é possível identificar de forma clara a expressão da proteína CHIKV-E2 (Figura 18 - B).

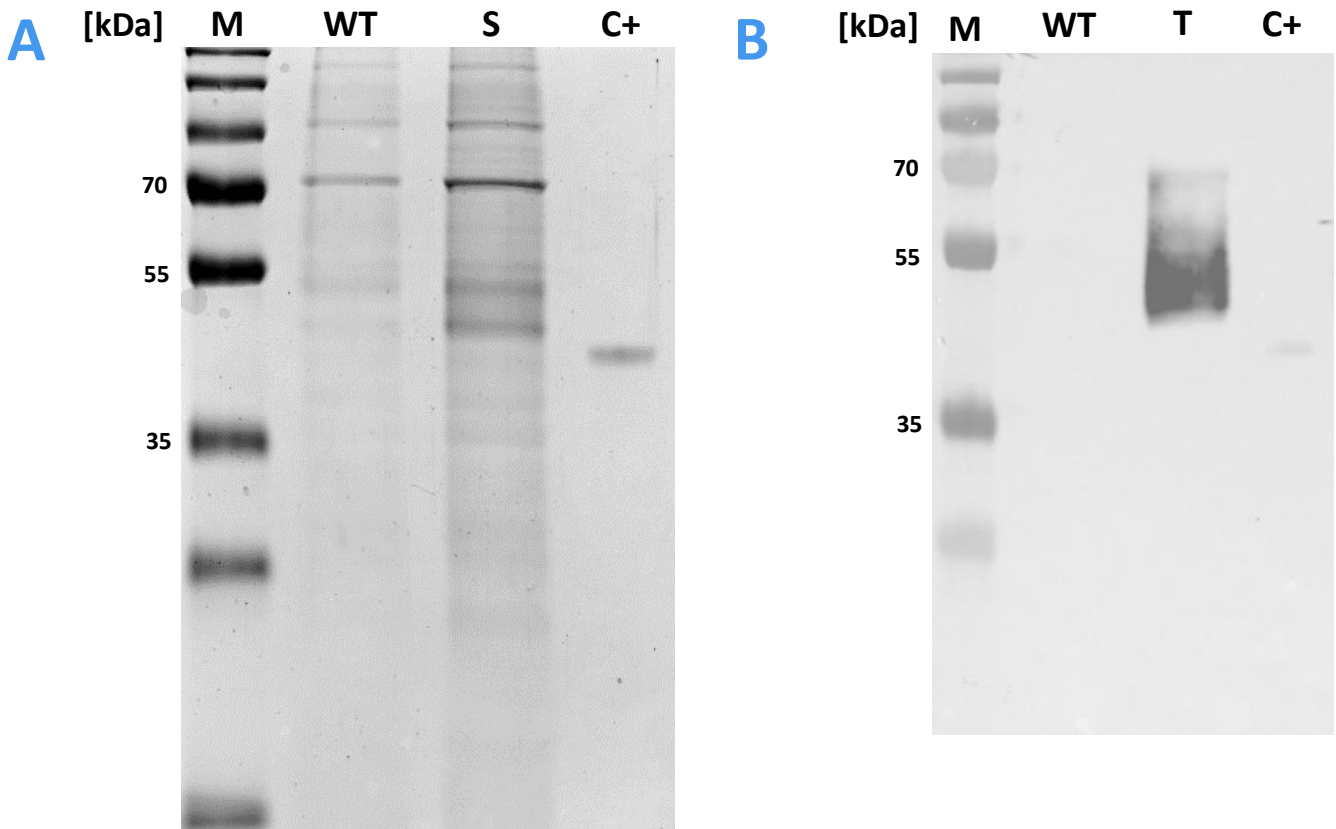


Figura 18- Eletroforese em gel SDS-PAGE (A) e Western Blot (B) do sobrenadante de células EXPI293 transfectada com pcDNA 3.1 + CHIKV-E2. O sobrenadante (S) de células EXPI293 WT e transfectadas com pcDNA 3.1 + CHIKV-E2, utilizando expifectamina, foram submetidos à eletroforese em gel SDS-PAGE 12,5% corado com InstantBlue® Coomassie (ABCAM) e avaliados em Western Blot. Para marcação da proteína por Western Blot das mesmas amostras avaliadas no gel SDS-PAGE foram utilizados o anticorpo primário Anti-HisTag (Sigma) e Anti-IgG mouse (Sigma) como secundário, revelado com o kit Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Cytiva). M: PageRuler™ (Thermo Scientific); WT: wild type; S: sobrenadante; C+: E2 produzido em procaríoto.

5.6 Construção, clonagem e confirmação do pLVX-puro-CHIKV-E2

Com intuito de expressar de forma estável o gene CHIKV-E2 em células eucariotas, o veículo lentiviral carreando o gene E2 foi construído para transdução de HEK293T, EXPI293 e CHO²³⁵³. Uma vez que é necessário a adição do gene exógeno ao plasmídeo de transferência lentiviral, o plasmídeo pLVX-puro-CHIKV-E2 (Figura 19) foi construído através do *template* de pLVX-puro e do gene E2 como inserto, proveniente do vetor pcDNA 3.1 + CHIKV-E2.

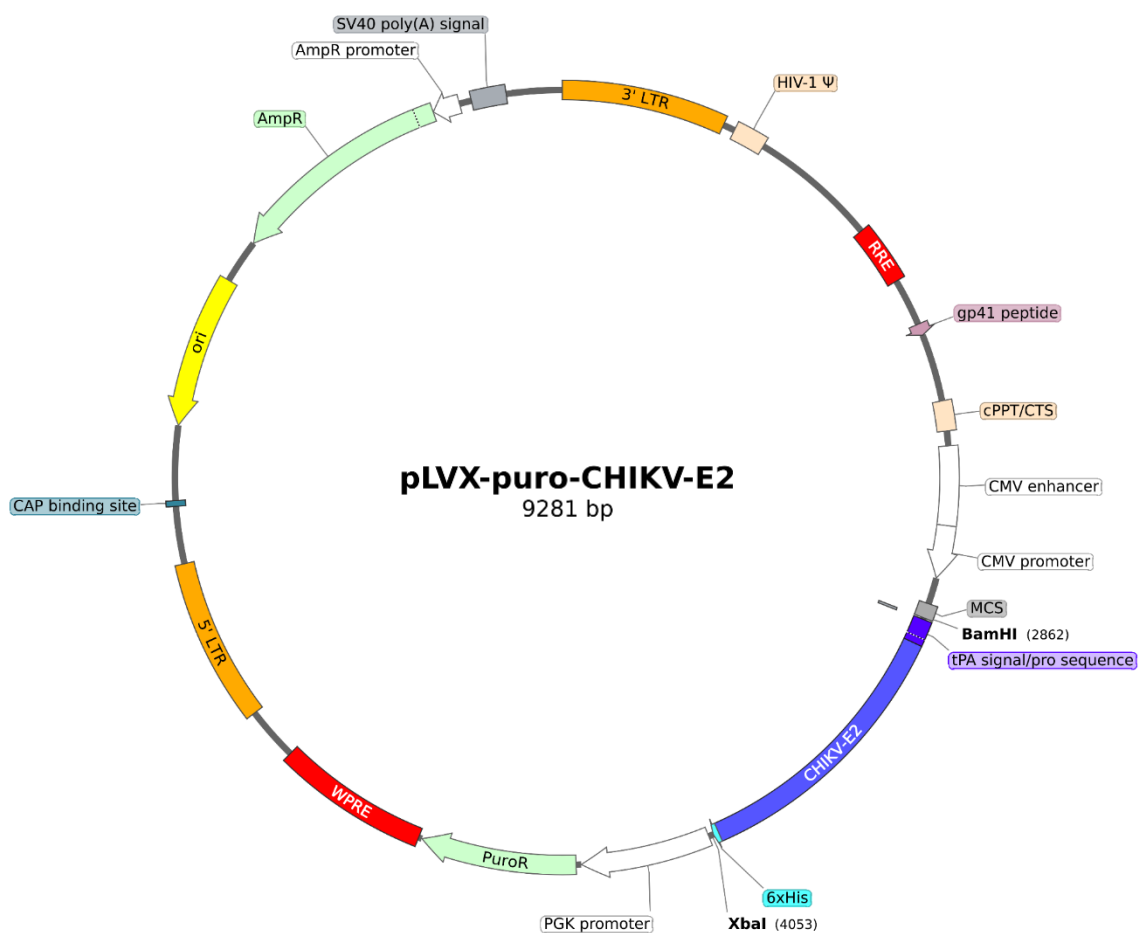


Figura 19 - Mapa do vetor pLVX-puro-CHIKV-E2. Em azul, a construção do gene E2, contendo o peptídeo sinal tPA e a cauda de histidina (HIStag), flanqueados pelos sítios de restrição das enzimas BamHI e XbaI. Em branco, a sequência do promotor CMV está a montante do múltiplo clonagem site (MCS - em português, sítio de clonagem múltipla), enquanto o promotor PGK (Phosphoglycerate kinase) está a montante do gene de resistência à puromicina (PuroR) e o promotor de ampicilina (AmpR promoter) está localizado a montante do gene de resistência a ampicilina (AmpR). Em vermelho, WPRE e RRE são elementos que atuam na regulação transcricional e da expressão, respectivamente. A sequência cPPT é o sítio de reconhecimento para transcrição reversa e HIV-1 Ψ é o sítio alvo para empacotamento do nucleocapsídeo, ambos representados em “nude?”. LTRs, em laranja, flanqueiam a sequência a ser transduzida, sendo 5' LTR envolvida na transcrição. O sinal de poliadenilação de SV40 (SV40 poly(A) signal) está a jusante do 3' LTR. LTR: Long terminal repeats; RRE: Rev Response Element; cPPT: Central polypurine tract; MCS: multiple cloning site; WPRE: Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element; Ori: origem de replicação. Adaptado: Snapgene (Dotmatics).

Para construção do pLVX-puro-CHIKV-E2, bactérias XL1-blue carregando os plasmídeos pLVX-puro e pcDNA 3.1 + CHIKV-E2 foram inoculadas em meio LB seletivo e submetidas à mini-prep após 18h de crescimento. Os plasmídeos obtidos foram quantificados e confirmados por digestão, e em seguida, os vetores pLVX-puro e pcDNA 3.1 + CHIKV-E2 foram digeridos pelo par de enzimas BamHI e XbaI para obtenção, respectivamente, do *template* e inserto. Os produtos de digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, e o fragmento de 8102 pb proveniente da clivagem de pLVX-puro e o fragmento de 1191 pb gerado pela digestão de pcDNA 3.1 + CHIKV-E2 foram, separadamente, excisados e purificados do gel através do kit *NucleoSpin* (Macherey-Nagel). Os fragmentos purificados de inserto e *template* foram submetidos à ligação e o produto da reação foi utilizado para transformar DH5 α . Observou-se o crescimento de 20 colônias em meio LB ágar seletivo, e dentre as colônias, duas foram coletadas, inoculadas e após 18h submetidas à mini-prep. Os plasmídeos obtidos foram clivados com o par de enzimas BamHI e XbaI e o produto de digestão analisado em eletroforese em gel de agarose (Figura 20). Os fragmentos gerados correspondem ao perfil de digestão do plasmídeo pLVX-puro-CHIKV-E2.

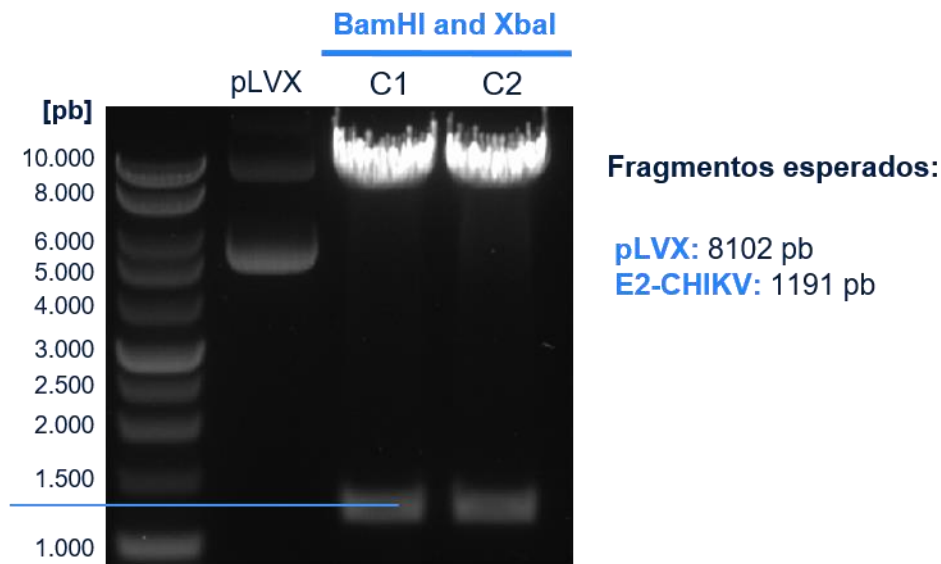


Figura 20 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de digestão da construção pLVX-puro + CHIKV-E2. Confirmação da identidade por restrição enzimática dos plasmídeos obtidos de dois Clones de DH5α transformados com a construção pLVX-puro CHIKV-E2 (C1 e C2), seguido da eletroforese em gel de agarose 0,7% corado com SYBR Safe (Invitrogen) dos produtos da digestão. A clivagem de pLVX-puro CHIKV-E2 pelo par de enzimas BamHI e XbaI geram fragmentos de 8102 pb e 1191 pb. Marcador (pb): 1kb DNA Ladder (Promega).

5.7 Expressão estável do gene CHIKV-E2

No intuito de obter-se a expressão estável do gene CHIKV-E2 em células eucariotas foi eleita a plataforma lentiviral para integração gênica. A produção de partículas lentivirais se deu pela co-transfecção de células HE293T ou EXPI293 com os três plasmídeos lentivirais: pCMV.VSV-g, pLVX-puro-CHIKV-E2 e psPAX2. Nos protocolos iniciais foram utilizados 2ml de sobrenadante lentiviral para transduzir 5×10^6 células HE293T WT e EXPI293 WT, e após a recuperação, as culturas eram selecionadas com $2 \mu\text{g/ml}$ de puomicina. A transdução descrita de células EXPI293 ou HEK293T originou as culturas EXPI293 T1.1 e HEK293T T1.1 avaliadas a seguir.

5.7.1 Confirmação por PCR da integração do gene CHIKV-E2

Para confirmar a integração do gene E2, 4×10^6 células de EXPI293 T1.1 e HEK293T T1.1 foram submetidas à extração de DNA através do kit *QIAamp DNA Blood Mini* (Qiagen). O DNA extraído foi quantificado e congelado. Após 2 meses de

cultivo de HEK293T T1.1, a cultura foi submetida ao mesmo protocolo de extração de DNA e as três amostras foram amplificadas por PCR utilizando o par de primer MCS (*multiple cloning site* – em português, sítio múltiplo de clonagem) (anexo 1). O par de primer MCS flanqueiam o sítio múltiplo de clonagem do plasmídeo pLVX-puro, onde o gene CHIKV-E2 foi adicionado entre os sítios de BamHI e XbaI. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (Figura 21) e apresentaram um fragmento próximo a 1289 pb, que é o esperado para a sequência do sítio múltiplo de clonagem do pLVX-puro contendo o gene CHIKV-E2.

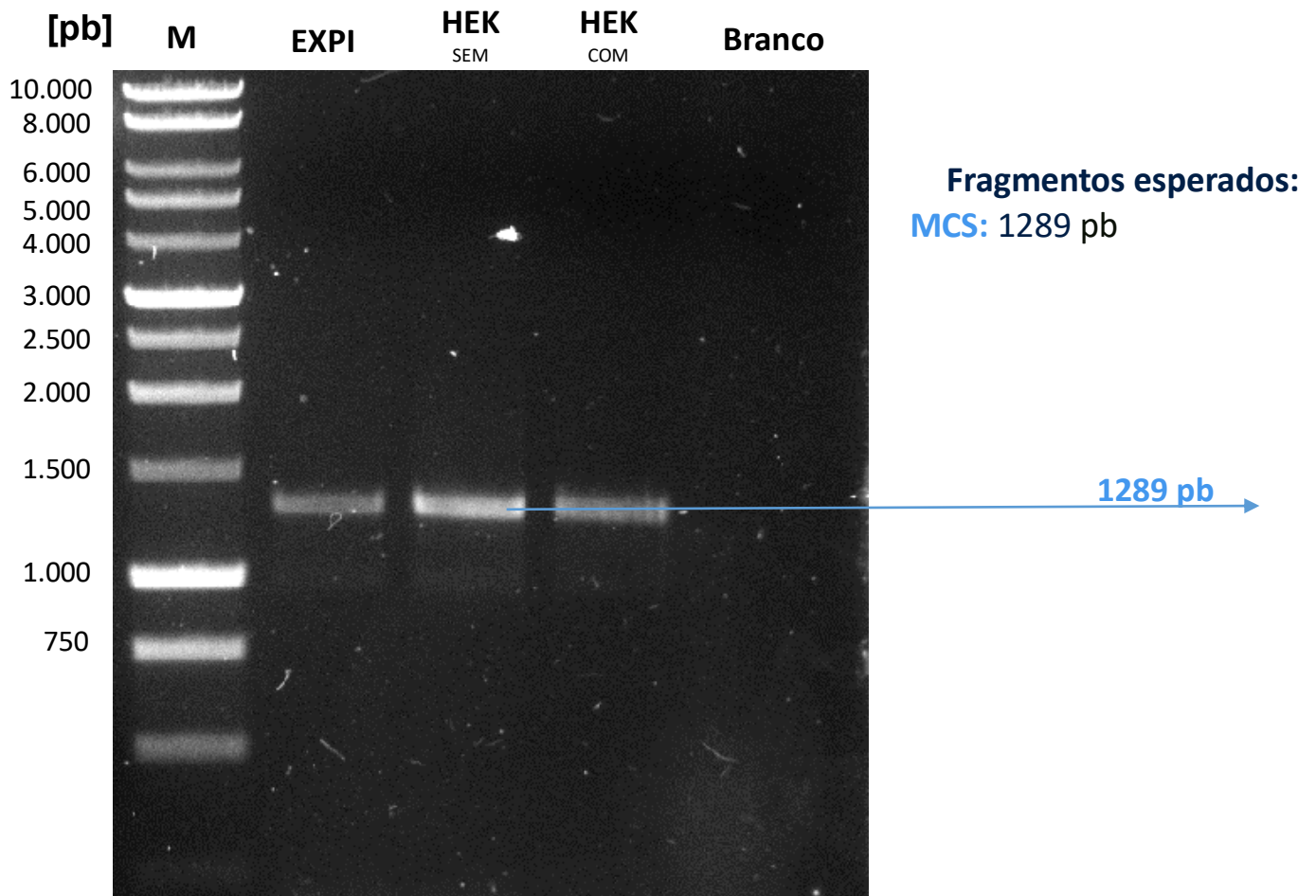


Figura 21 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR gerados a partir do DNA de células EXPI293 e HEK293T transduzidas com lentivírus pLVX-E2. Amplificação do sítio múltiplo de clonagem do plasmídeo pLVX-puro em amostras de DNA das células EXPI293 (EXPI) e HEK293T. O material genético obtido pelo kit QIAamp DNA Blood Mini (Qiagen) foi amplificado pelo par de primers MCS, sendo o fragmento esperado da amplificação de 1289 pb para a sequência contendo o gene E2. Para HEK293T, foi avaliada uma cultura mantida com a droga de seleção (HEK com), puromicina, e outra crescida sem puromicina por dois meses (HEK sem). Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com SYBR Safe (Invitrogen). M: 1kb DNA Ladder (Promega).

5.7.2 Expressão estável do gene CHIKV-E2 em HEK293T

Uma vez confirmada a inserção do gene CHIKV-E2, o sobrenadante e o extrato de HEK293T T1.1 foram coletados para avaliar a expressão da proteína CHIKV-E2, em comparação à cultura HEK293T WT. As culturas de HEK293T transduzidas eram mantidas em meio *Opti-MEM* (ThermoFisher) por 48h antes da coleta do sobrenadante. O sobrenadante e extrato foram analisados por SDS-PAGE e Western Blot específico para cauda de histidina (Figura 22 – A e B). Em outro ensaio, sobrenadante e extrato também foram analisados por SDS-PAGE e Western Blot, desta vez com anticorpos policlonais específicos para proteína E2 (Figura 23 –A e B). Não foi possível identificar a proteína CHIKV-E2 no sobrenadante de HEK293T T1.1 por nenhuma das técnicas.

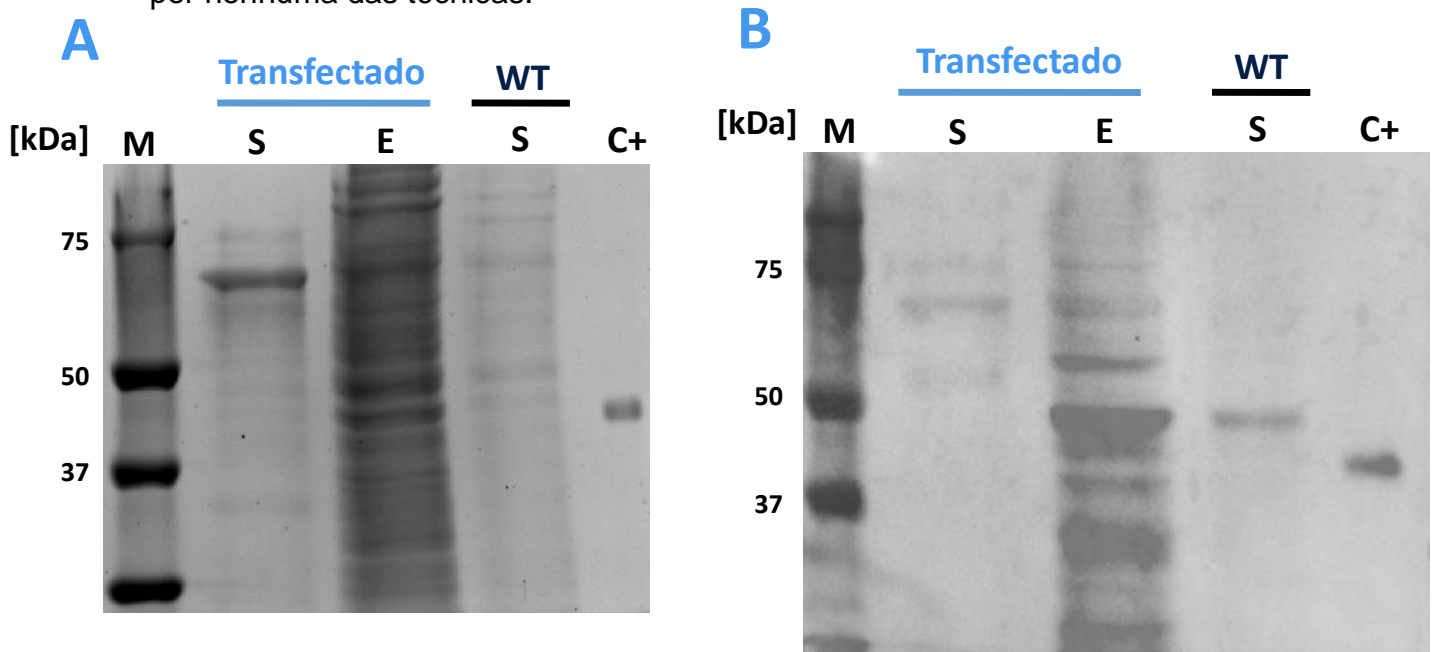


Figura 22 - Eletroforese em gel SDS-PAGE (A) e Western Blot (B) do sobrenadante de células HEK293T transduzidas com lentivírus pLVX-E2. O sobrenadante (S) de células HEK293T WT e transduzidas com o gene E2, pela plataforma lentiviral, foi coletado após 48h de troca de meio DMEM 10% SFB por Opti-MEM (ThermoFisher). Os sobrenadantes e o extrato (E) de HEK293T transduzidas foram avaliados por eletroforese em gel SDS-PAGE 12,5% corado com Coomassie Brilliant Blue e por Western Blot. Para marcação da proteína por Western Blot das mesmas amostras avaliadas no gel SDS-PAGE foram utilizados o anticorpo primário Anti-HisTag (Sigma) e o Anti-IgG mouse (Sigma) como secundário, revelado com o kit Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Cytiva). M: marcador Precision Plus Protein Dual Color Standards (Biorad); S: sobrenadante; E: extrato de células; WT: wild type; C+: E2 produzido em procarioto.

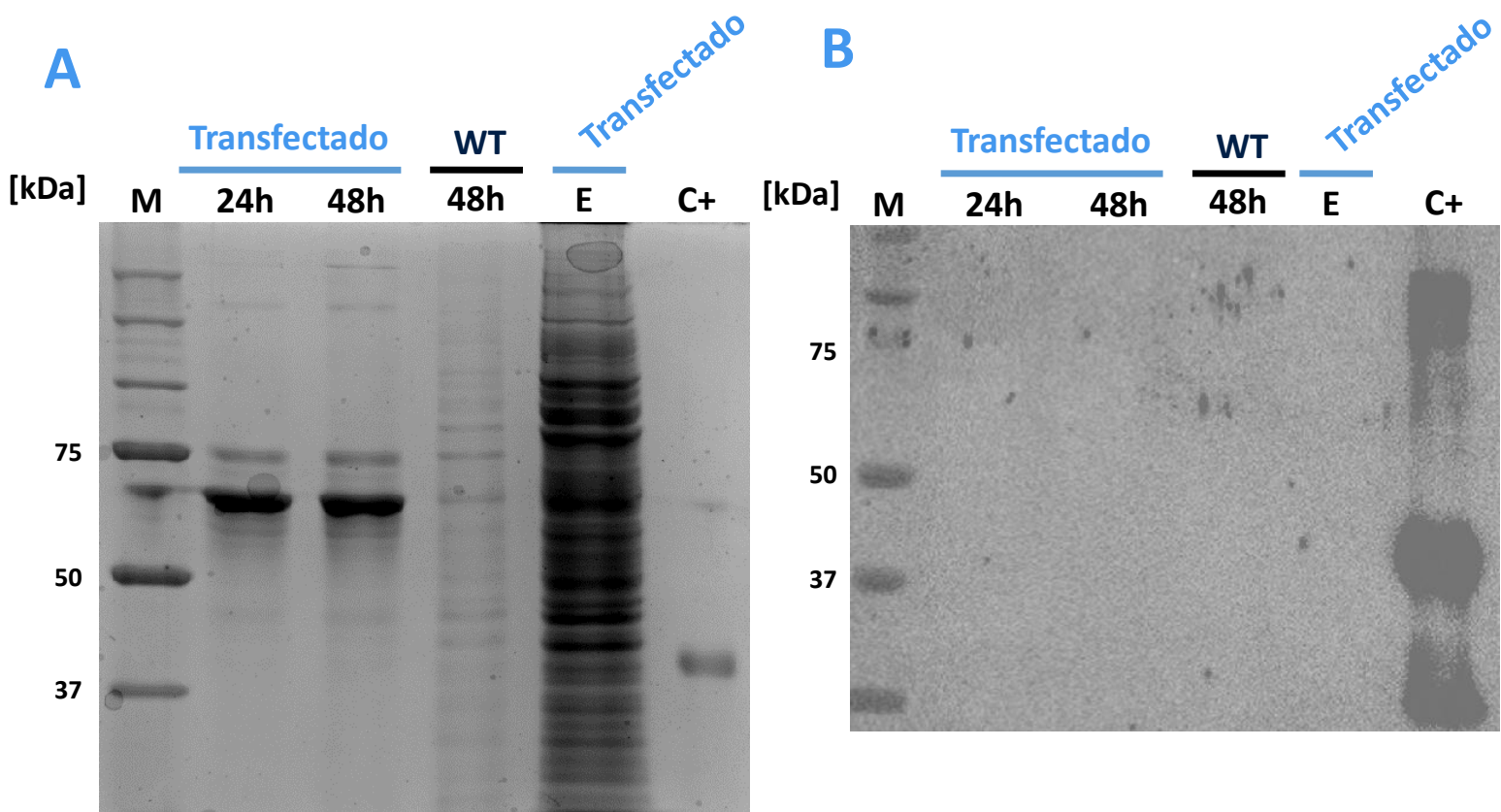


Figura 23 - Eletroforese em gel SDS-PAGE (A) e Western Blot (B) do sobrenadante de células HEK293T transduzidas com lentivírus pLVX-E2. O sobrenadante de células HEK293T WT e transduzidas com o gene E2 pela plataforma lentiviral foram coletados após 48h de troca de meio DMEM 10% SFB por Opti-MEM (ThermoFisher). Os sobrenadantes e o extrato (E) de HEK293T transduzida foram avaliados por eletroforese em gel SDS-PAGE 12,5% corado com Coomassie Blue Brilliant Blue e por Western Blot. Para marcação da proteína por Western Blot das mesmas amostras avaliadas no gel SDS-PAGE foram utilizados o anticorpo primário Anti-E2 (IgG total purificado de coelho imunizados com E2 produzida em procaríoto) e o anticorpo anti-IgG rabbit como secundário, revelado com o kit Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Cytiva). M: marcador Precision Plus Protein Dual Color Standards (Biorad); 24h: sobrenadante de células HEK293T coletado após 24h de troca de meio DMEM 10% SFB para Opti-MEM (ThermoFisher); 48h: sobrenadante coletado 48 horas de cultivo em meio Opti-MEM (ThermoFisher); E: extrato total de células; WT: wild type; C+: E2 produzido em procaríoto.

Para avaliar se a proteína pesquisada não foi identificada devido a sua baixa concentração no sobrenadante, optou-se pela técnica de purificação com *bead* de agarose a fim de obter-se amostras concentradas. Para tal, 1ml de sobrenadante de HEK293T T1.1 foi purificado com *bead* e as amostras foram avaliadas em SDS-PAGE (Figura 24 - A) e Western Blot, para os anticorpos primários Anti-HIS (Figura 24 - B) e Anti-E2 (Figura 24 - C). Novamente, não foram detectadas bandas inequívocas que pudessem ser atribuídas à expressão de E2.

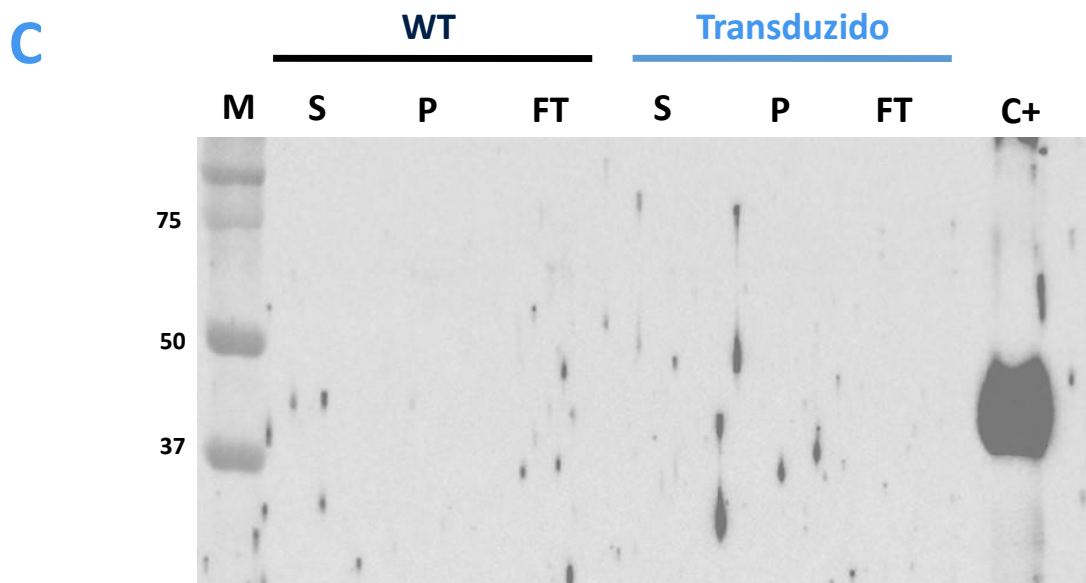
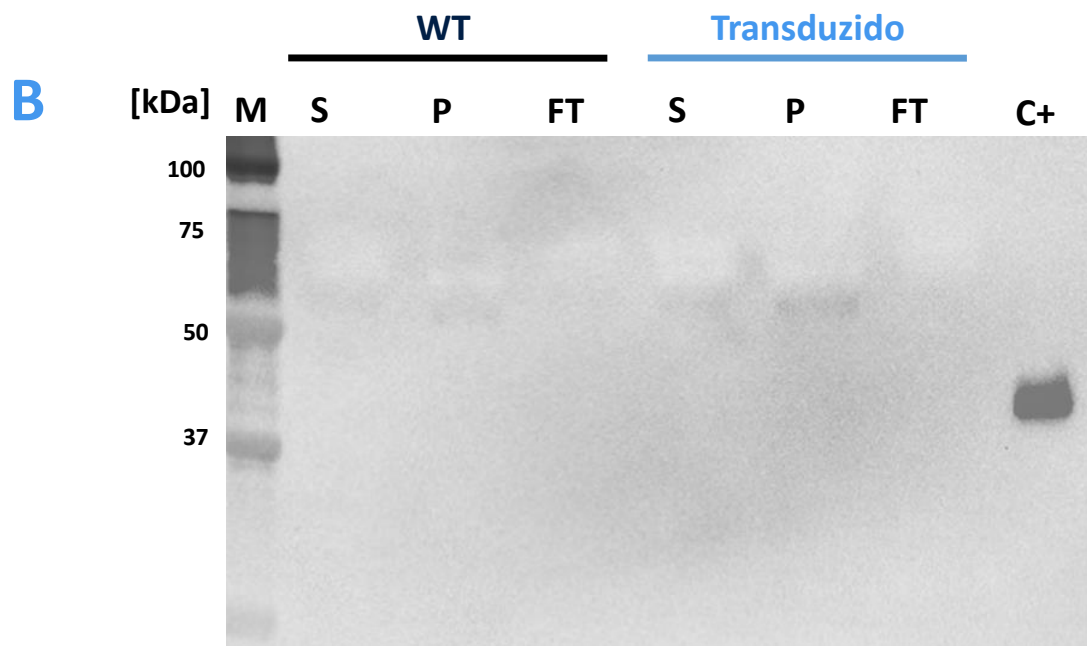
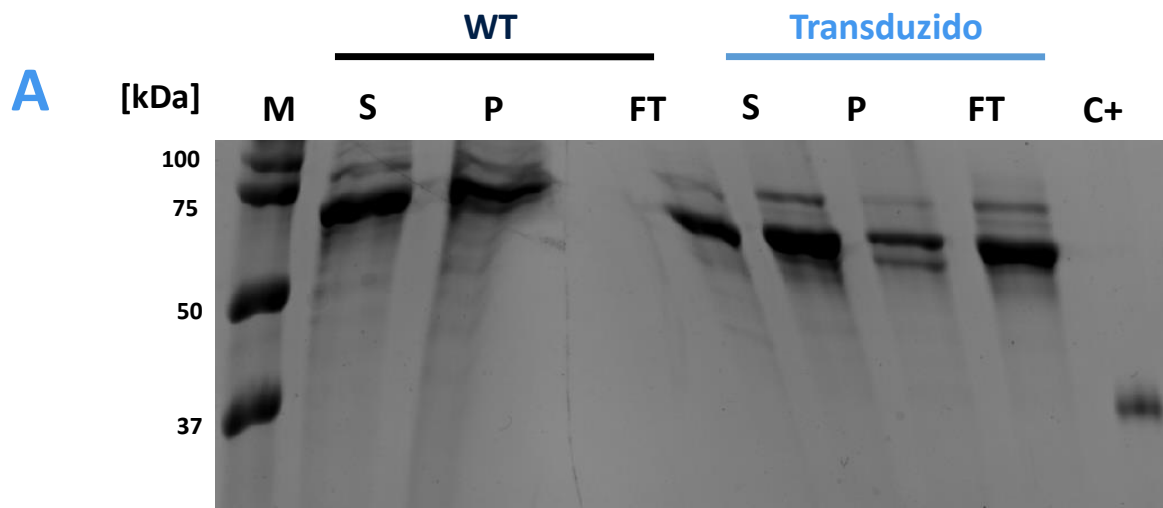
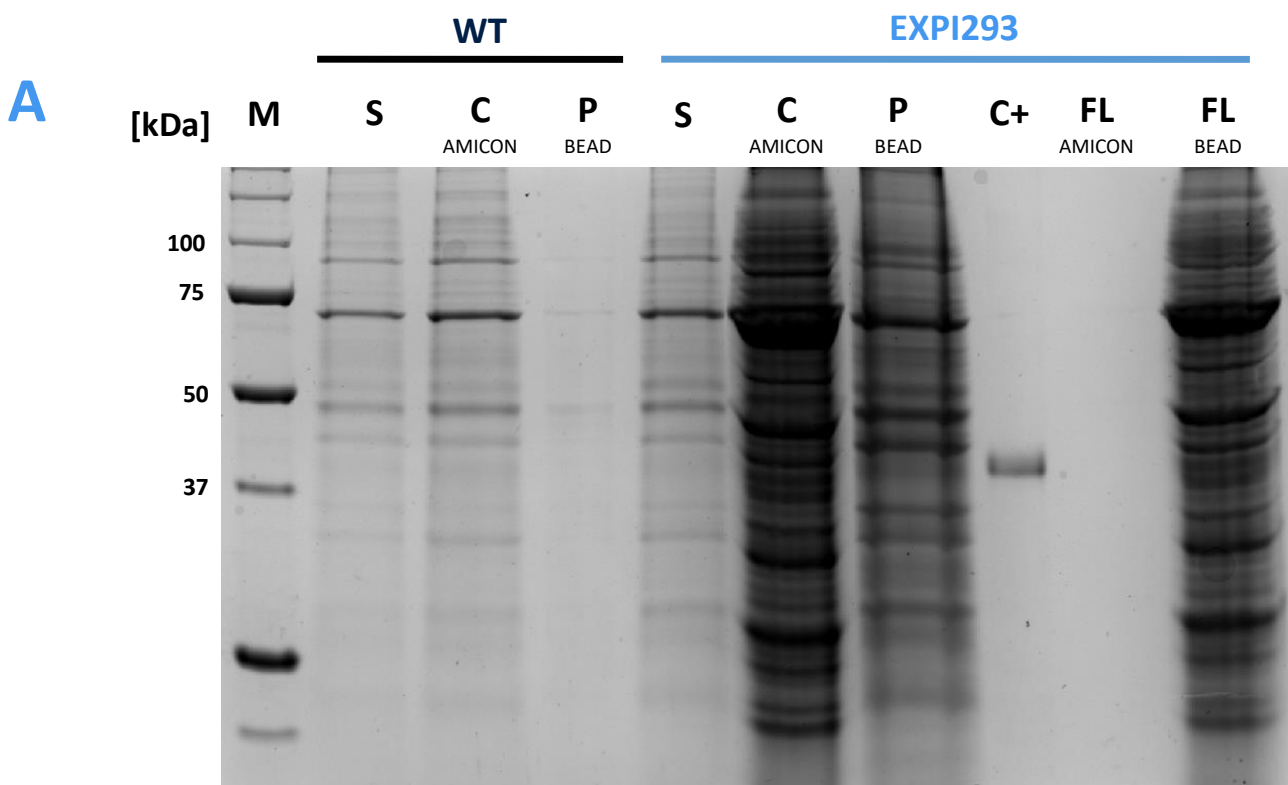


Figura 24 - Eletroforese em gel SDS-PAGE (A) e Western Blot (B) do sobrenadante de células HEK293T transduzidas com lentivírus pLVX-E2. O sobrenadante (S) de células HEK293T WT e transduzidas com o gene E2 pela plataforma lentiviral, mantidas em Opti-MEM (ThermoFisher) por 48h, foi purificado com bead de agarose (P) (Agarose Ni-NTA, QIAGEN) e submetido a eletroforese em gel SDS-PAGE 12,5% corado com Coomassie Brilliant Blue e avaliado por Western Blot. (B) Para marcação da proteína por Western Blot das mesmas amostras avaliadas no gel SDS-PAGE foram utilizados o anticorpo primário Anti-HisTag (Sigma) e o anticorpo Anti-IgG mouse (Sigma) como secundário. (C) Para marcação da proteína por Western Blot das mesmas amostras avaliadas no gel SDS-PAGE foram utilizados o anticorpo primário Anti-E2 (IgG total purificado de coelho imunizados com E2 produzida em procaríoto) e o anticorpo anti-IgG rabbit como secundário. A membrana de nitrocellulose foi revelada com o kit Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Cytiva). M: marcador Precision Plus Protein Dual Color Standards (Biorad); S: sobrenadante; P: sobrenadante purificado com bead de agarose; FT: Flow-through da purificação; WT: wild type; C+: E2 produzido em procaríoto.

5.7.3 Expressão estável do gene CHIKV-E2 em EXPI293

O sobrenadante da cultura EXPI293 T1.1 também foi pesquisado quanto a presença da proteína CHIKV-E2 por SDS-PAGE e Western Blot (Figura 25). Para avaliação, o sobrenadante foi concentrado em filtro *Amicon* (Merck), e o sobrenadante concentrado foi purificado com *bead* de agarose. O sobrenadante de EXPI293 T1.1 e WT apresentaram um padrão de banda semelhantes. A proteína CHIKV-E2 foi detectada em Western Blot por anticorpos específicos para cauda de histidina nas amostras concentrada e purificada do sobrenadante de EXPI293 T1.1.



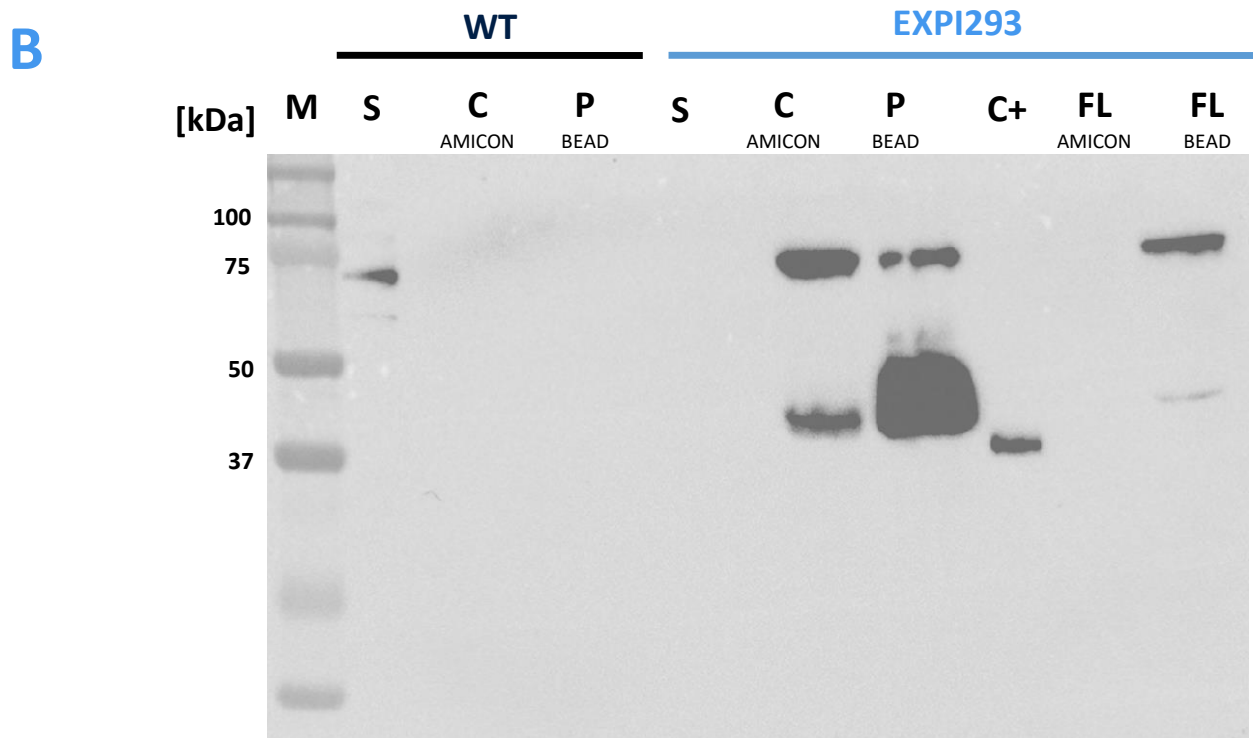


Figura 25- Eletroforese em gel SDS-PAGE (A) e Western Blot (B) do sobrenadante de células EXPI293 transduzidas com lentivírus pLVX-E2. Os sobrenadantes (S) de células EXPI293 WT e transduzidas com o gene E2 pela plataforma lentiviral, foram concentrados na coluna Amicon de 30 kDa, e em seguida, os sobrenadantes concentrados foram purificados com bead de agarose (P) (Agarose Ni-NTA, QIAGEN). As amostras foram submetidas a eletroforese em gel SDS-PAGE 12,5% corado com Coomassie Brilliant Blue e a Western Blot (B). Para marcação da proteína por Western Blot das mesmas amostras avaliadas no gel SDS-PAGE foram utilizados o anticorpo primário Anti-HisTag (Sigma) e o Anti-IgG mouse (Sigma) como secundário, revelado com o kit Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Cytiva). M: marcador Precision Plus Protein Dual Color Standards (Biorad); S: sobrenadante; C: sobrenadante concentrado na Amicon 30 kDa; P: sobrenadante purificado com bead de agarose; FT: Flow-through; WT: wild type; C+: E2 produzido em procaríoto.

5.8 Otimização da expressão estável do gene CHIKV-E2 em EXPI293

A fim de otimizar o processo de expressão, várias alternativas de produção lentiviral e transdução foram testadas. As alterações no protocolo foram verificadas apenas na linhagem EXPI293, uma vez que os resultados de expressão foram melhores em comparação com HEK293T. Os tópicos seguintes descrevem parte dos resultados de otimização.

5.8.1 Comparação da expressão do gene CHIKV-E2 por células transduzidas com sobrenadante lentiviral não concentrado e concentrado

Com intuito de concentrar as partículas virais do sobrenadante lentiviral, os 10ml de sobrenadante coletados 48h após a transfecção de HEK293T foram filtrados e ultracentrifugados a 30.000 x g. O *pellet* foi ressuspendido no volume de 2ml, congelado e posteriormente utilizado para a transdução de células EXPI293, gerando a cultura T1.4. Os sobrenadantes de EXPI293 T1.1 e T1.4 foram concentrados em Amicon 30 kDa e comparados por SDS-PAGE e Western Blot (Figura 26). A cultura transduzida com o sobrenadante lentiviral concentrado, T1.4, apresentou maior expressão em comparação com cultura transduzida com sobrenadante não concentrado, T1.1.

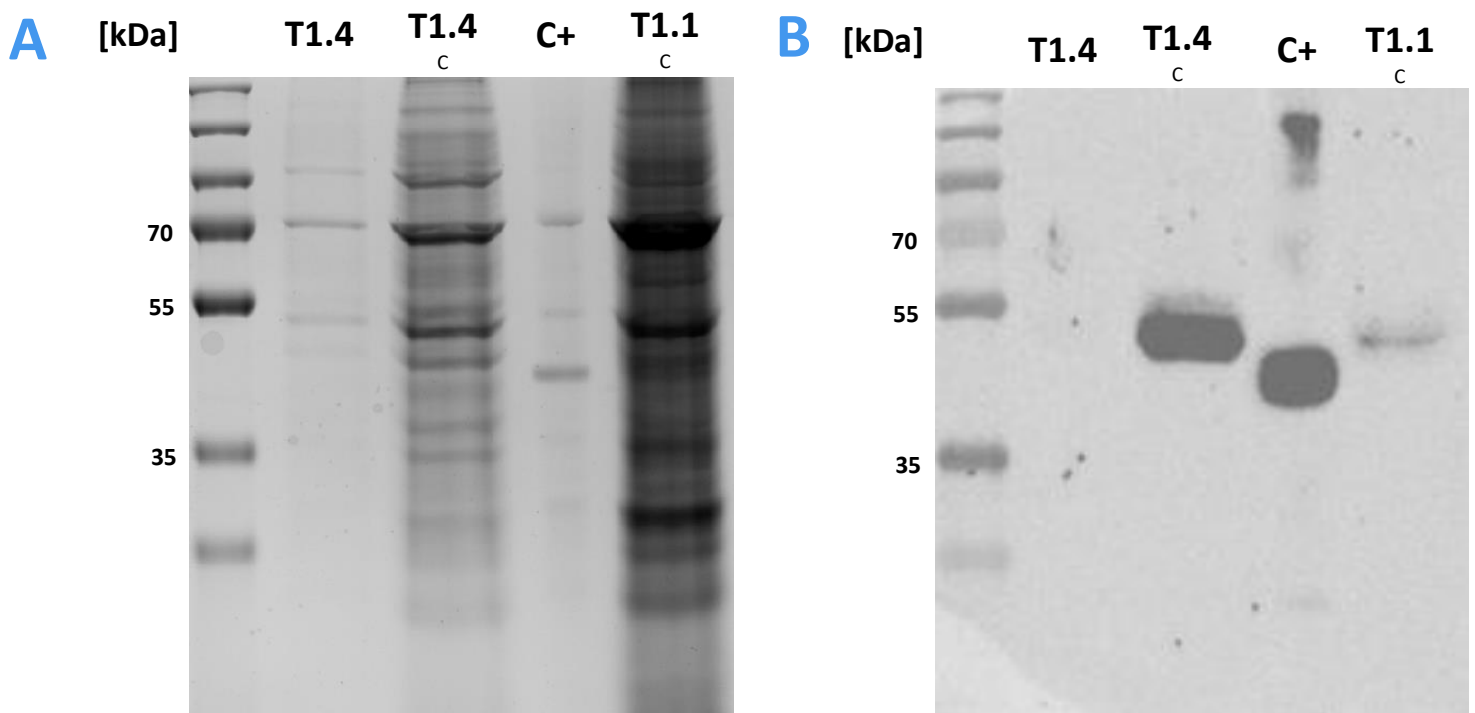
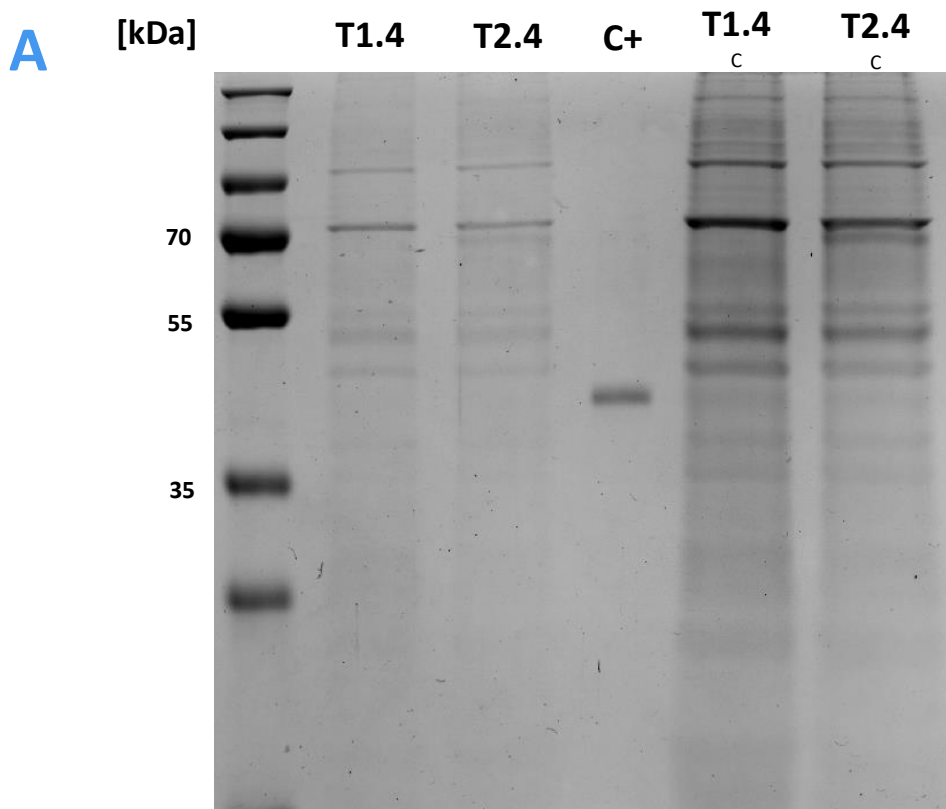


Figura 26 - Eletroforese em gel SDS-PAGE (A) e Western Blot (B) do sobrenadante de células EXPI293 transduzidas com lentivírus pLVX-E2 concentrado. Os sobrenadantes de células EXPI293 transduzidas com o gene E2 pela plataforma lentiviral, foram concentrados na coluna Amicon de 30 kDa. A cultura T1.1 e T1.3 foram transduzidas com sobrenadante lentiviral não concentrado, enquanto a cultura T1.4 foi transduzida com 10 ml sobrenadante ultracentrifugado a 30.000g. As amostras foram submetidas a eletroforese em gel SDS-PAGE 12,5% corado com Coomassie e a Western Blot. Para marcação da proteína por Western Blot das mesmas amostras avaliadas no gel SDS-PAGE foram utilizados o anticorpo Anti-E2 (IgG total purificado de coelho imunizados com E2 produzida em procaríoto) como primário e o anti-IgG rabbit como secundário, revelado com o kit Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Cytiva). M: PageRuler™ (Thermo Scientific); T1.4: EXPI293 transduzida uma vez, quarta cultura a ser transduzida; T1.1: EXPI293 transduzida uma vez, primeira cultura a ser transduzida T1.3: EXPI293 transduzida uma vez, terceira cultura a ser transduzida; C: sobrenadante concentrado na Amicon 30 kDa; C+: E2 produzido em procaríoto.

5.8.2 Comparação da expressão do gene CHIKV-E2 por células transduzidas uma e duas vezes

Outra tentativa de obter-se culturas com maior expressão foi feita através da segunda transdução de culturas já transduzidas. A cultura EXPI293 T1.4 foi transduzida pela segunda vez com 10ml de sobrenadante lentiviral concentrado, originando a cultura EXPI293 T2.4. Os sobrenadantes de EXPI293 T1.4 e T2.4 foram concentrados em filtro Amicon de 10 kDa e comparados por SDS-PAGE e Western Blot (Figura 27). A cultura transduzida duas vezes com o sobrenadante lentiviral concentrado, T2.4, apresentou maior expressão em comparação a cultura transduzida apenas uma vez, T1.4.



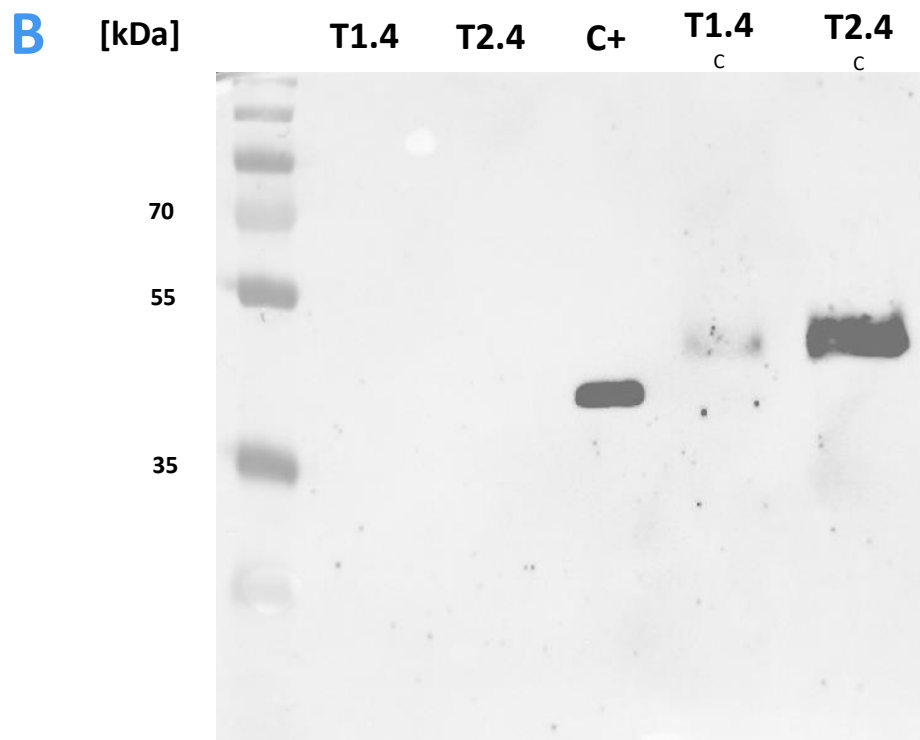


Figura 27 - Eletroforese em gel SDS-PAGE (A) e Western Blot (B) do sobrenadante de células EXPI293 transduzidas duas vezes com lentivírus pLVX-E2 concentrado. Os sobrenadantes de células EXPI293 transduzidas com o gene E2 pela plataforma lentiviral foram concentrados na coluna Amicon de 10 kDa. A cultura T1.4 foi transduzida uma vez com 10 ml sobrenadante ultracentrifugado a 30.000g, enquanto a T2.4 foi obtida pela nova transdução de T1.4 seguindo o mesmo protocolo. As amostras foram submetidas a eletroforese em gel SDS-PAGE 12,5% corado com InstantBlue® Coomassie (ABCAM) e a Western Blot. Para marcação da proteína por Western Blot das mesmas amostras avaliadas no gel SDS-PAGE (A) foram utilizados o anticorpo Anti-HisTag (Sigma) como primário e o Anti-IgG mouse (Sigma) como secundário, revelado com o kit Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Cytiva). M: PageRuler™ (Thermo Scientific); T1.4: EXPI293 transduzida uma vez, quarta cultura a ser transduzida; T2.4: EXPI293 transduzida duas vezes, a partir da cultura T1.4; C: sobrenadante concentrado na Amicon 30 kDa; C+: E2 produzido em procaríoto.

5.8.3 Comparação da expressão do gene CHIKV-E2 por células transduzidas com sobrenadante lentiviral produzido em EXPI

Em relação a HEK293T, a linhagem EXPI293 é capaz de crescer em suspensão alcançando altas densidades em meio livre de soro, obtendo uma melhor performance na expressão de proteínas. Nesse subtópico, foi avaliada a transdução de células eucariotas transduzidas com lentivírus produzidos em células EXPI293. Para tal, células EXPI293 foram transfectadas utilizando *ExpiFectamine*™ 293 Reagent (ThermoFisher) com os 3 plasmídeos lentivirais. O sobrenadante de 30ml foi coletado nos tempos de 24h e 48h após adição dos *enhancer*. O sobrenadante no

tempo de 24h foi ultracentrifugado e fracionado em 3 partes, enquanto o sobrenadante coletado com 48h foi concentrado em porções individuais de 10ml na coluna Amicon 50 kDa. Células EXPI239 e CHO²³⁵³ foram transduzidas com os sobrenadantes concentrados, originando as culturas EXPI293 T1.8 e CHO T1.2 para o sobrenadante lentiviral ultracentrifugado e as culturas EXPI293 T1.9 e CHO T1.3 para o sobrenadante concentrado em Amicon.

A expressão das culturas de EXPI293 T1.8 e T1.9 foi avaliada por SDS-PAGE e Western Blot (Figura 28 – A e B). A expressão de CHIKV-E2 na cultura T1.8 não foi identificada em nenhum dos ensaios, enquanto a cultura T1.9 apresentou, no ensaio de Western Blot, a expressão do gene E2 similar à da cultura T2.4 cultivada por 7 dias.

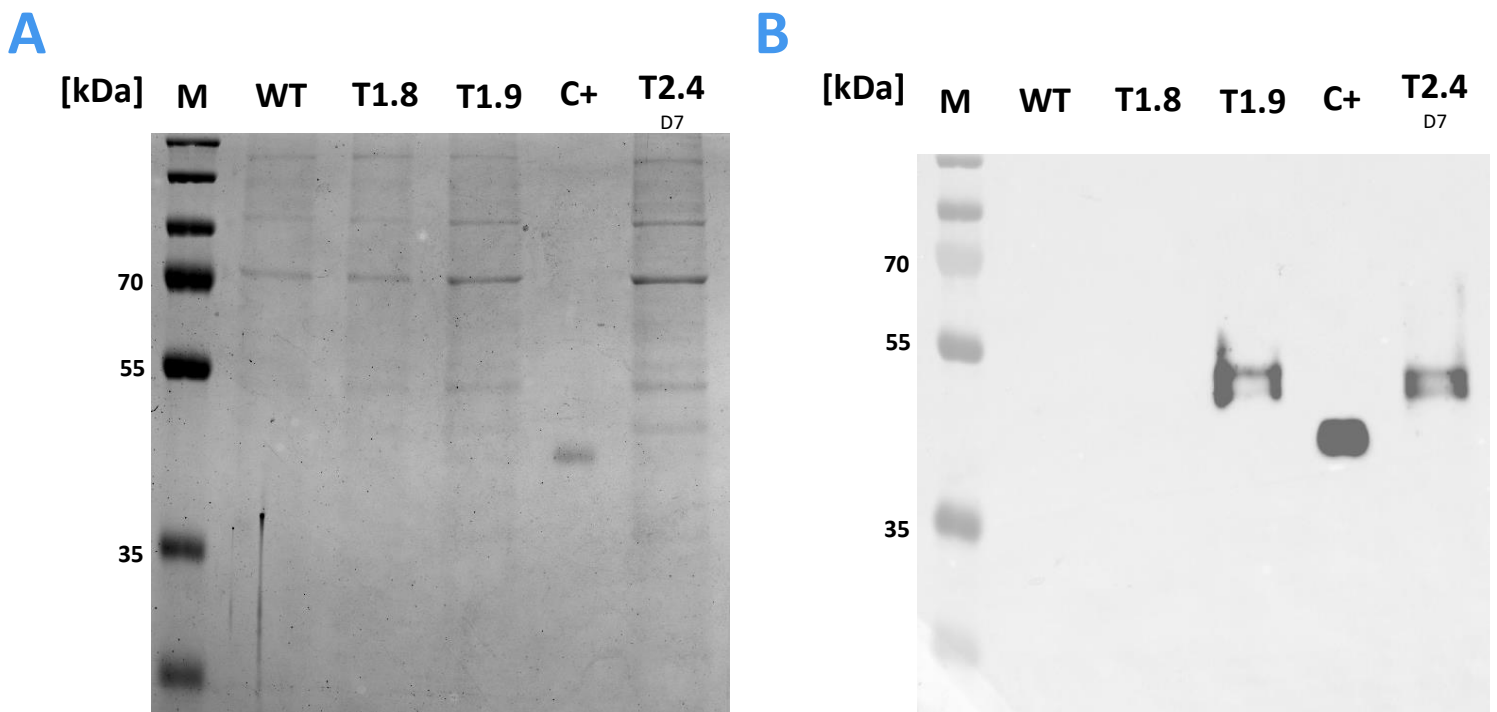
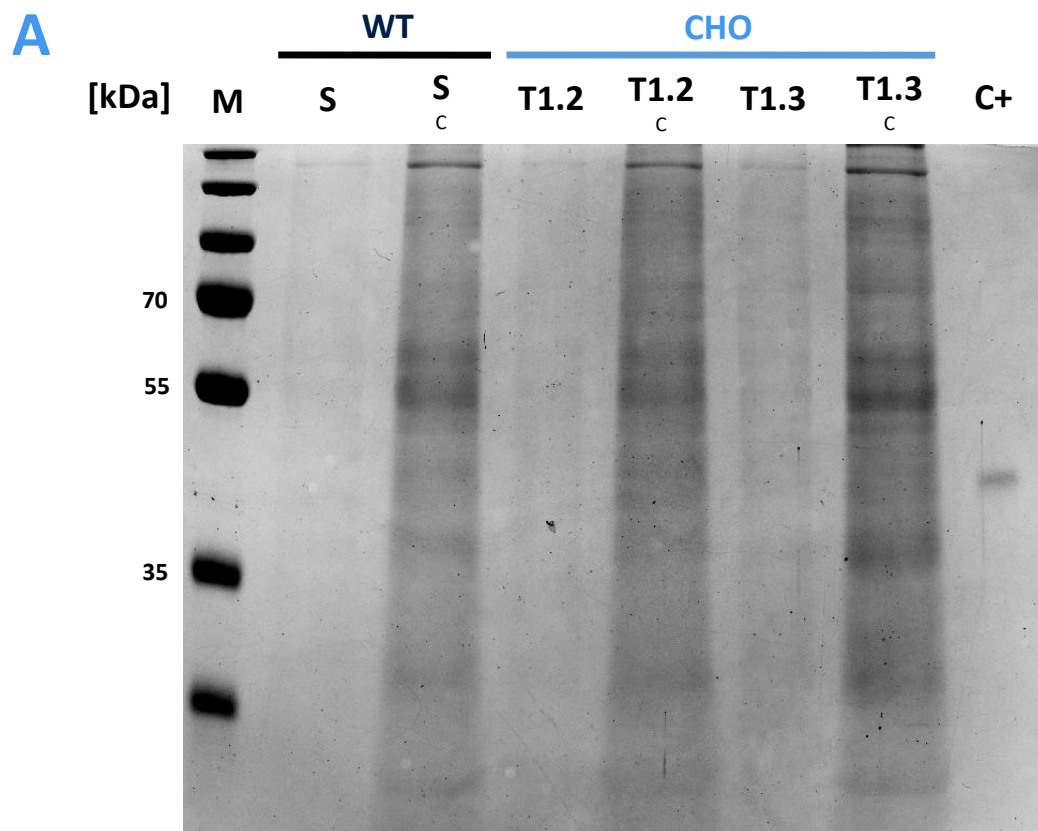


Figura 28 - Eletroforese em gel SDS-PAGE (A) e Western Blot (B) do sobrenadante de células EXPI293 transduzidas com lentivírus pLVX-E2 produzido em EXPI293. A cultura T1.8 foi transduzida uma vez com 10 ml sobrenadante produzido em EXPI293 e ultracentrifugado a 30.000g, enquanto a cultura T1.9 foi obtida pela transdução com 10 ml de sobrenadante produzido em EXPI293 e concentrado em Amicon 50 kDa. O sobrenadante da cultura EXPI293 T2.4, crescida por 7 dias, foi utilizada como controle da expressão de CHIKV-E2 em eucarioto. As amostras foram submetidas a eletroforese em gel SDS-PAGE 12,5% corado com InstantBlue® Coomassie (ABCAM) e a Western Blot. Para marcação da proteína por Western Blot das mesmas amostras avaliadas no gel SDS-PAGE (A) foram utilizados o anticorpo Anti-HisTag (Sigma) como primário e o Anti-IgG mouse (Sigma) como secundário, revelado com o kit Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Cytiva). M: PageRuler™ (Thermo Scientific); WT: wild-type; C+: E2 produzido em procaríoto.

A expressão do gene E2 pelas culturas de CHO²³⁵³ foi avaliada da mesma forma que para EXPI293, através de SDS-PAGE e Western Blot (Figura 29 – A e B) do sobrenadante das culturas transduzidas. As amostras das culturas CHO WT, T1.2 (ultracentrifugação) e T1.3 (Amicon) foram concentradas previamente à análise, na qual apenas a cultura T1.3 apresentou a expressão do gene E2, tanto no sobrenadante sem tratamento quanto no concentrado. A amostra T1.3 concentrada e o controle positivo foram cortados da membrana de nitrocelulose para nova exposição, com intuito de fotografar amostra T1.3 não concentrada sem a interferência das demais bandas marcadas no Western Blot (Figura 29 – C). Na nova exposição, o sobrenadante não concentrado da cultura CHO T1.3 apresentou uma banda robusta na altura de aproximadamente 46 kDa, onde havia apenas uma sombra na Figura 29 -B.



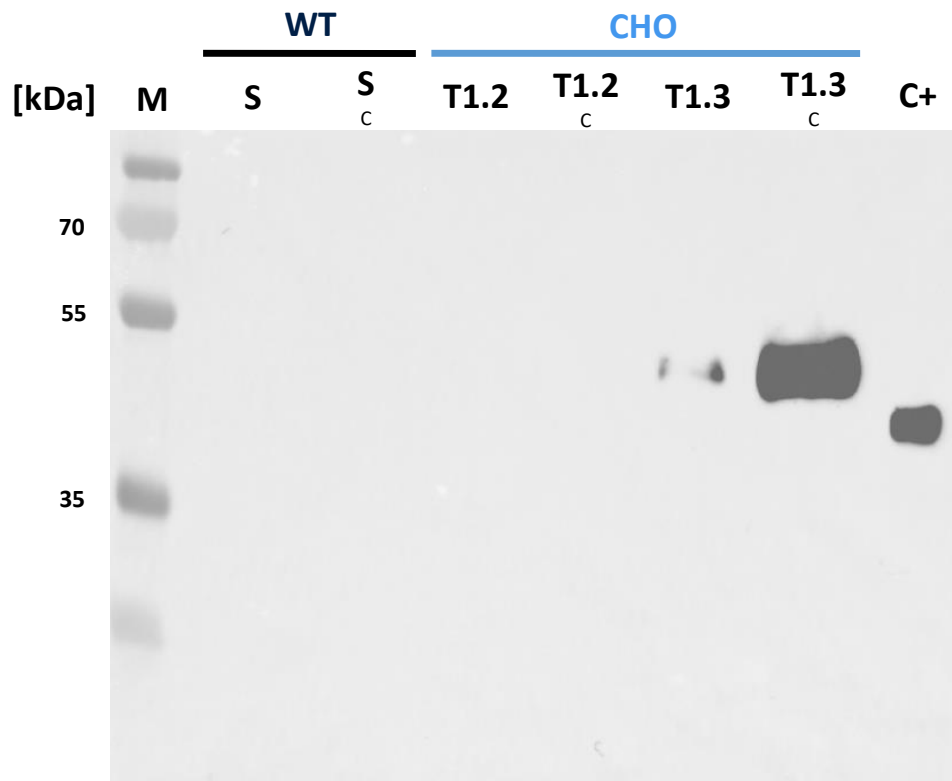
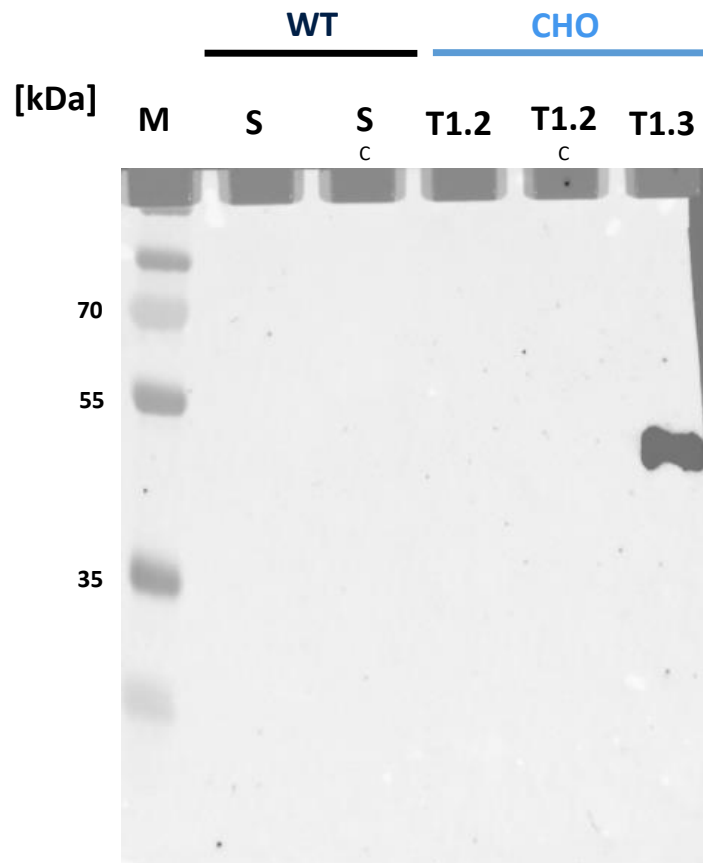
B**C**

Figura 29 - Eletroforese em gel SDS-PAGE (A) e Western Blot (B) do sobrenadante de células CHO transduzidas com lentivírus pLVX-E2 produzido em EXPI293. Os sobrenadantes de células CHO WT e transduzidas com o gene E2 pela plataforma lentiviral foram concentrados na coluna Amicon de 10 kDa para avaliação. A cultura CHO T1.2 foi transduzida uma vez com 10 ml de sobrenadante lentiviral produzido em EXPI293 e ultracentrifugado a 30.000g, enquanto a T1.3 foi obtida pela transdução com 10 ml de sobrenadante lentiviral produzido em EXPI293 e concentrado em Amicon 50 kDa. As amostras foram submetidas a eletroforese em gel SDS-PAGE 12,5% corado com Coomassie Brilliant Blue e avaliadas por Western Blot. Para marcação da proteína por Western Blot, das mesmas amostras avaliadas no gel SDS-PAGE, foram utilizados o anticorpo primário Anti-HisTag (Sigma) e o anticorpo Anti-IgG mouse (Sigma) como secundário, revelado com o kit Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Cytiva). A membrana foi novamente exposta após serem retiradas as canaletas referentes às amostras T1.3 C e C+ (C). M: marcador Precision Plus Protein Dual Color Standards (Biorad); S: sobrenadante; C: concentrado em Amicon 10 kDa; C+: E2 produzido em procarioto.

5.9 Purificação da proteína CHIKV-E2

Após a confirmação da expressão do gene E2 de forma transiente e estável, seguida das alterações de protocolos para otimização, os sobrenadantes de células EXPI293 transfectadas e transduzidas foram submetidos à cromatografia por afinidade a histidina na coluna H1Stag EXCEL (Cytiva) através do aparelho ÄKTA Prime Plus (GE 5 Healthcare Life Sciences).

O sobrenadante de EXPI293 transfectada com pLVX-CHIKV-E2 avaliado no tópico 5.5.2 foi submetido à purificação e as frações foram analisadas em SDS-PAGE. A eluição foi dividida em duas etapas, a primeira utilizando 60mM de imidazol (Figura 30 -A e B) com objetivo de desligar ligações inespecíficas a coluna, enquanto a segunda etapa consistiu num gradiente de 60-500 mM de imidazol (Figura 30 - C) para obtenção da proteína purificada. Algumas frações eluídas com 60 mM de imidazol apresentaram uma sombra na altura esperada da proteína CHIKV-E2, indicando a purificação da proteína em uma baixa concentração. Já as frações obtidas em um gradiente de 60 a 500 mM de imidazol apresentaram, em sua maioria, uma banda única na altura de CHIKV-E2. Na etapa gradiente, cada fração coletada apresentava 1ml de eluato e os 5ml coletados das frações de E10-E14, que apresentaram maior concentração, foram unidos para avaliação.

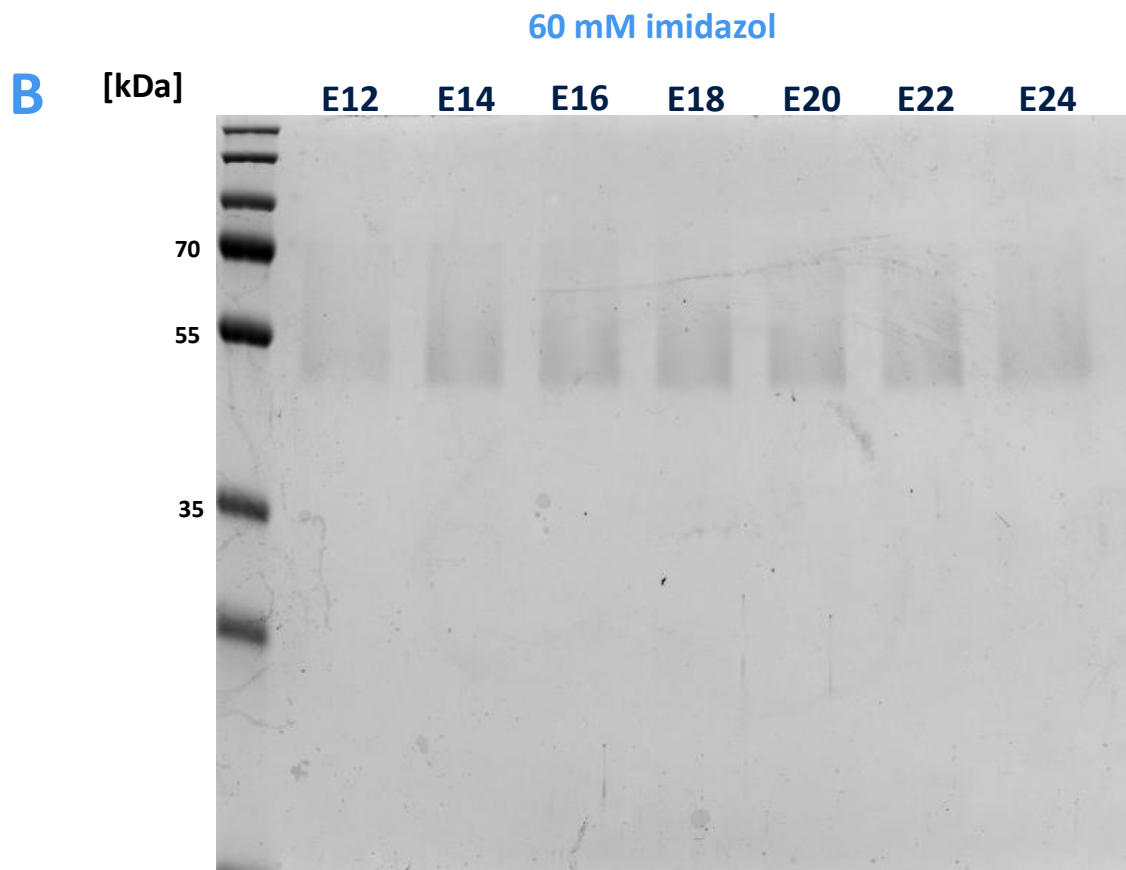
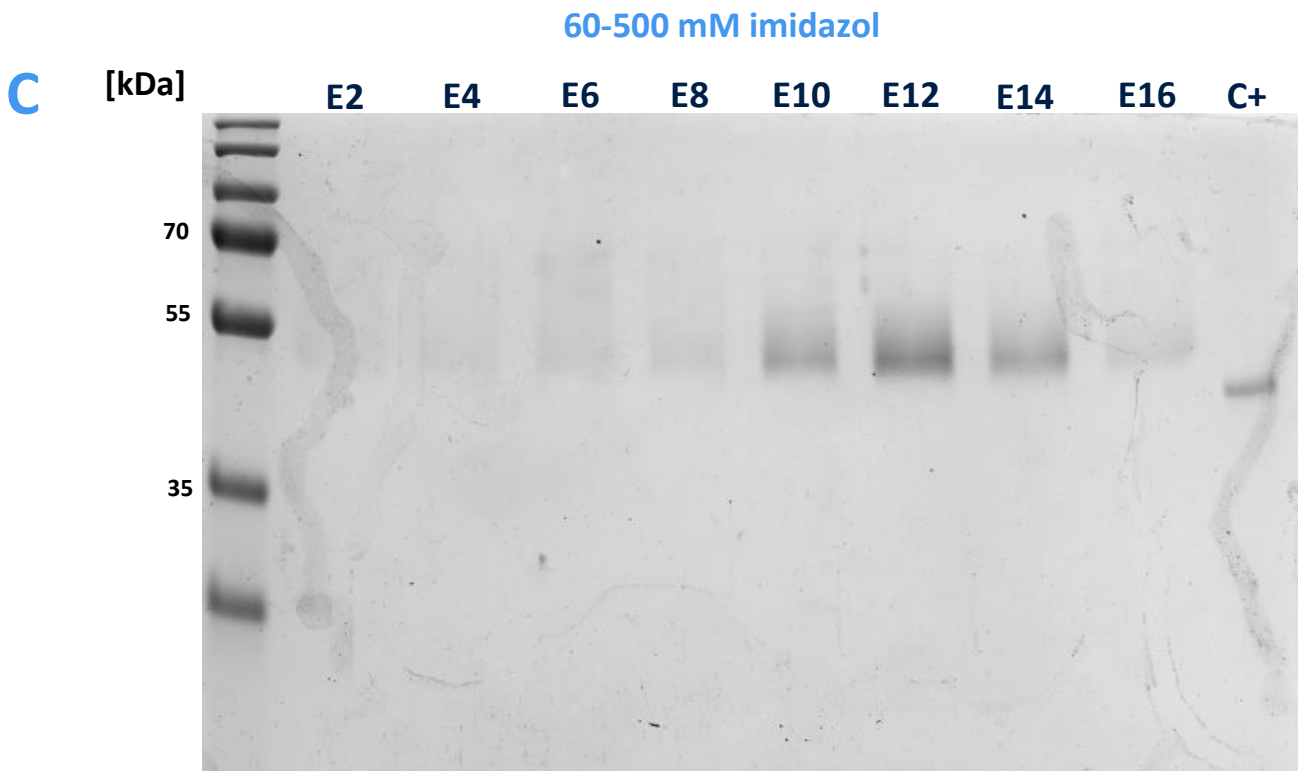


Figura 30 - Eletroforese em gel SDS-PAGE da purificação sobrenadante de células EXP1293 transfectadas com pcDNA 3.1 + CHIKV-E2. A purificação de 25 mL do sobrenadante de EXP1293 transfectada foi realizada no ÄKTA Prime Plus (GE 5 Healthcare Life Sciences) por cromatografia de afinidade a histidina através da coluna H1Strap Excel (Cytiva). As frações obtidas na eluição com 60 mM de imidazol (A e B) e com o gradiente de imidazol de 60-500 mM (C) foram submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE 12,5% corado com Coomassie Brilliant Blue. M: marcador Precision Plus Protein Dual Color Standards (Biorad); WT: wild-type; S: sobrenadante; FT: flow-through; E: eluato; C+: E2 produzido em procarioto.



Para quantificar a concentração da proteína E2 nos 5ml obtidos de E10-E14, uma amostra de 20 μ l foi submetida à eletroforese em SDS-PAGE (Figura 31) em comparação com uma curva de BSA (0,25-2 μ g). A presença do imidazol e a baixa concentração proteica interferiram à quantificação da amostra pelos kits 2-D Quant (Cytiva) e BCA Protein Assay (ThermoFisher). Apenas através do kit Up Randox, foi obtida a concentração de 50 ng/ μ l para a amostra purificada. Após a quantificação da proteína CHIKV-E2 produzida em EXP1293 e purificada, CHIKV-E2 foi avaliada quanto a sua antigenicidade em ELISA.

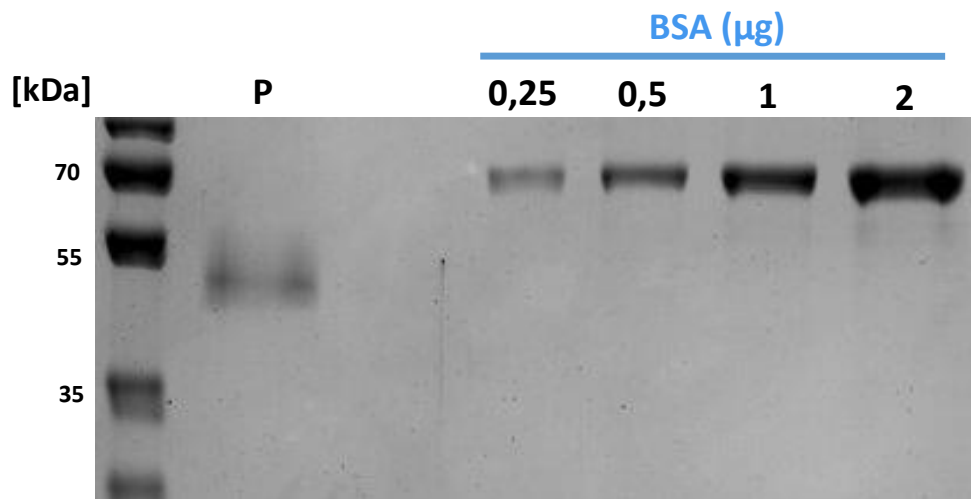


Figura 31 - Eletroforese em gel SDS-PAGE do purificado do sobrenadante de células EXPI293 transfetadas com pcDNA 3.1 + CHIKV-E2. As frações de E10 a E14 da purificação do sobrenadante transiente de EXPI293 (tópico 5.5.2) foram unidas e quantificadas, apresentando 50 ng/μl pelo kit UP Randox. O purificado foi submetido à eletroforese em gel SDS-PAGE 12,5% corado com InstantBlue® Coomassie (ABCAM), em comparação com uma curva de BSA (0,25-2μg). P: sobrenadante transiente purificado.

No intuito de purificar a proteína do sobrenadante de células expressando CHIKV-E2 de forma estável, a cultura T2.4 foi crescida por 7 dias em 250ml de meio e o sobrenadante avaliado por SDS-PAGE e Western Blot (Figura 32). A proteína CHIKV-E2 foi marcada por *Anti-HIStag* em Western Blot na amostra concentrada e não concentrada.

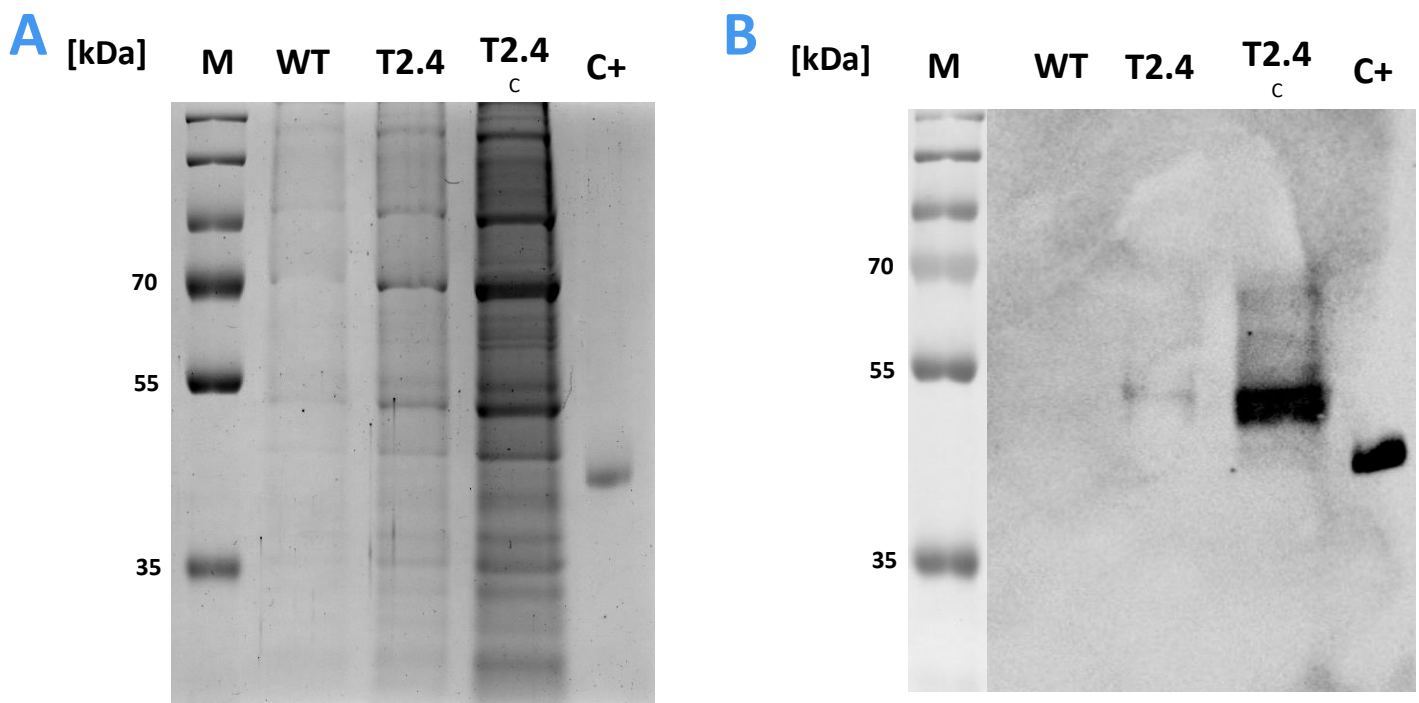
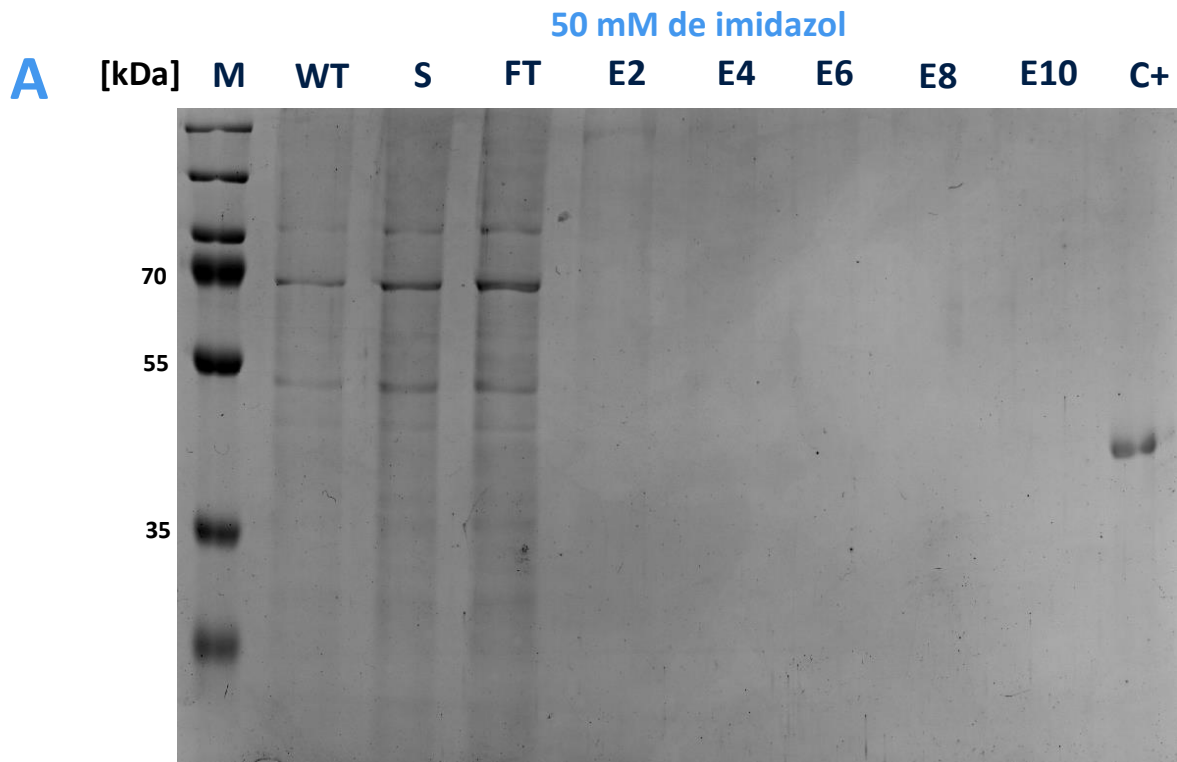
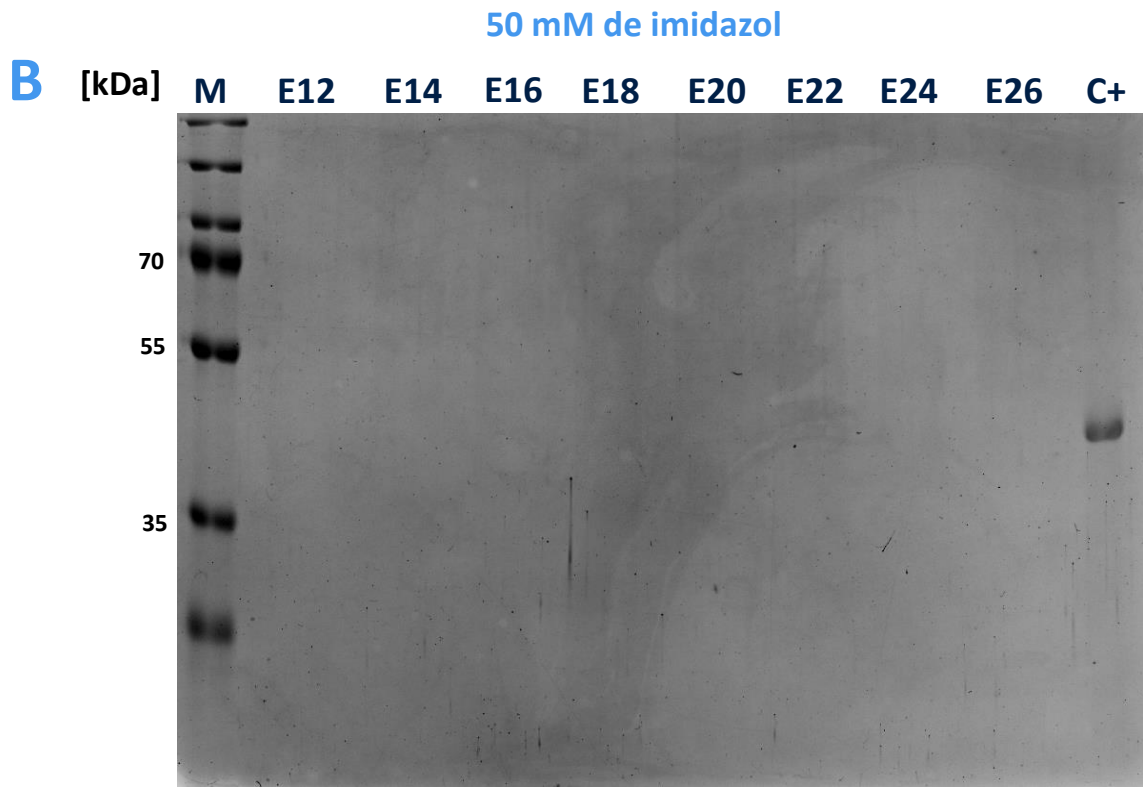


Figura 32 - Eletroforese em gel SDS-PAGE (A) e Western Blot (B) do sobrenadante de células EXPI293 T2.4. A cultura EXPI293 T2.4 foi crescida por 7 dias e o sobrenadante (S) sem tratamento e concentrado foram submetidos a eletroforese em gel SDS-PAGE 12,5% corado com InstantBlue® Coomassie (ABCAM) e avaliados em Western Blot. Para marcação da proteína por Western Blot das mesmas amostras avaliadas no gel SDS-PAGE foram utilizados o anticorpo primário Anti-HisTag (Sigma) e Anti-IgG mouse (Sigma) como secundário, revelado com o kit Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Cytiva). M: PageRuler™ (Thermo Scientific); WT: wild type; S: sobrenadante; C: concentrado C+: E2 produzido em procaríoto.

Após a confirmação da expressão de CHIKV-E2 no sobrenadante da cultura T2.4 crescida por 7 dias, 60ml do sobrenadante foram submetidos à cromatografia por afinidade a histidina na coluna HiStag EXCEL através do aparelho ÄKTA Prime Plus (GE 5 Healthcare Life Sciences). A eluição da amostra foi realizada com as concentrações de 50 mM (Figura 33 – A e B) e 100 mM de imidazol (Figura 33 - C), seguido de gradiente de 100 mM a 500mM de imidazol (Figura 33 - D). Apenas nos eluatos obtidos com 100 mM de imidazol foi possível identificar uma sombra na altura esperada de 46 kDa para a proteína CHIKV-E2 entre as frações E10 e E14.





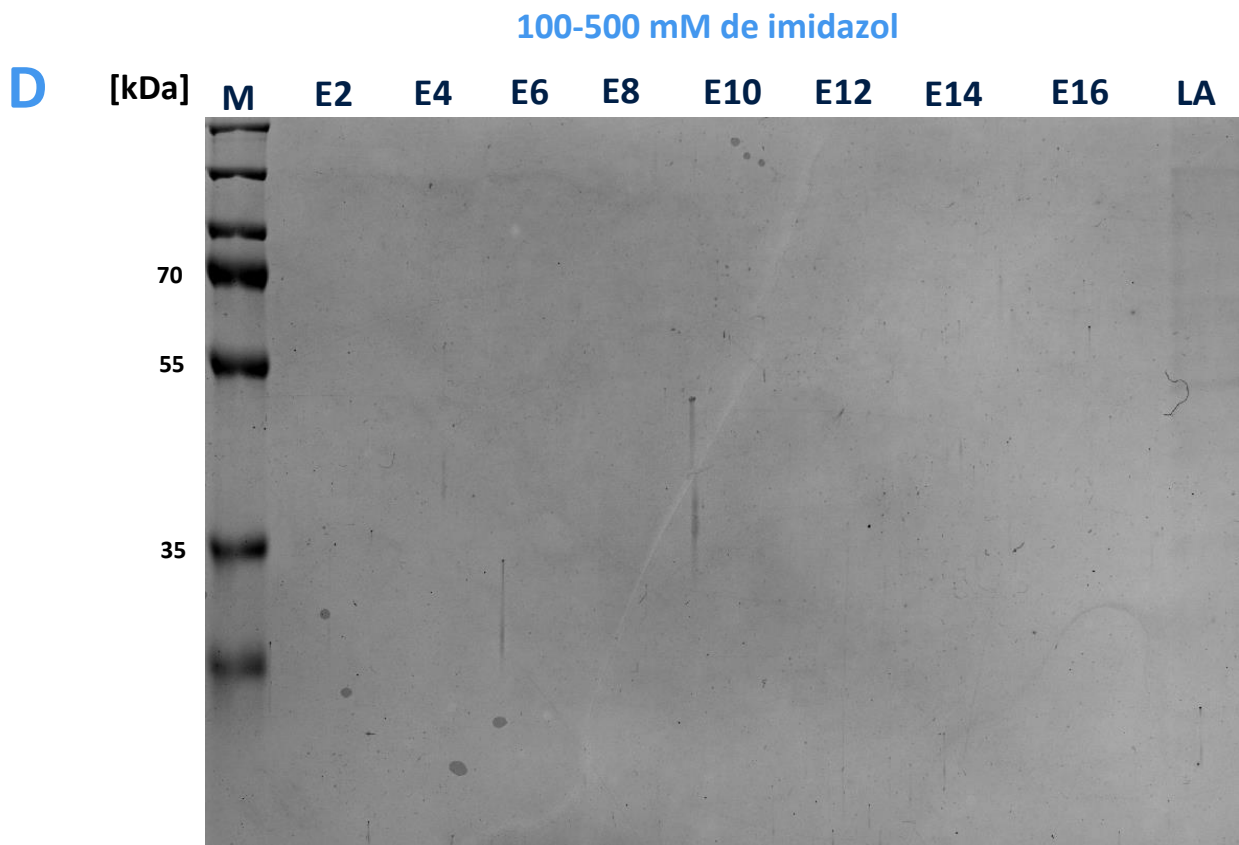


Figura 33 - Eletroforese em gel SDS-PAGE da purificação do sobrenadante da cultura EXPI293 T2.4. A purificação de 60 mL do sobrenadante de EXPI293 T2.4, crescida por 7 dias, foi realizada em ÄKTA Prime Plus (GE 5 Healthcare Life Sciences) através da cromatografia por afinidade a histidina na coluna H1Stag EXCEL (Cytiva). As frações obtidas na eluições com diferentes concentrações de imidazol foram submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE 12,5% corado com Coomassie Brilliant Blue. M: marcador Precision Plus Protein Dual Color Standards (Biorad); WT: wild-type; S: sobrenadante; FT: flow-through; E: eluato; C+: E2 produzido em procarioto.

Em virtude do término do prazo para apresentação da dissertação, a cultura EXPI293 T1.9 e outras culturas que apresentaram desempenho de expressão superior à da cultura T2.4 ainda não foram purificadas e avaliadas, assim como a cultura CHO T1.3.

5.10 ELISA com a proteína CHIKV-E2 purificada

A proteína CHIKV-E2 purificada do sobrenadante de EXPI293 transfectada (tópico 5.5.2) teve sua antigenicidade avaliada em ELISA. Para tal, foram testadas diferentes concentrações da proteína frente a um pool de soros positivos e um de soros negativos. Em seguida, soros individuais de pacientes positivos para CHIKV,

negativos para CHIKV e DENV positivos, foram utilizados tanto para captura de IgG, quanto para de IgM.

Nos ensaios, foram utilizados 57 soros positivos, 30 doados pelo Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco (LACEN/PE) e 27 pela Fundação Ezequiel Dias - FUNED - MG, confirmados através de PCR e/ou diagnósticos clínicos. Os 37 soros negativos foram coletados de colaboradores do CT Vacinas, enquanto os positivos para DENV também foram cedidos pela FUNED. No CT Vacinas, todos os soros negativos e positivos foram categorizados previamente pelos kits IgM/IgG Euroimmun (IgG e IgM, Ref.: EI 293a G, EI 293^a M). Quanto aos soros provenientes da FUNED, 25 foram utilizados na avaliação da antigenicidade da proteína E2 expressa em *E. coli* e em HEK239T (BAGNO et al., 2020).

No presente trabalho, os resultados de ELISA para CHIKV-E2 expressa em EXPI293 foram comparados, quanto a categorização prévia, pelo o kit comercial Euroimmun e por ELISA com as proteínas E2 expressas em *E. coli* e HEK293T. Os ensaios com CHIKV-E2 de EXPI293 foram realizados em paralelo com E2 produzida em *E. coli* (anexo 3), descrito como ELISA *E. coli* 2023. Contudo, as alíquotas da proteína expressa em procaríoto estavam armazenadas por longo período (*E. coli* 2023), o que gerou o comprometimento da atividade, e conseqüentemente o desempenho em ELISA.

No esquema da Figura 34 estão representados os conjuntos de soros categorizados em ELISA pelo kit comercial Euroimmun e pelas proteínas CHIKV-E2 expressa nos sistemas *E. coli*, HEK293T e EXPI293. A categorização, prévia ao trabalho, por E2 de *E. coli* foi identificada como “*E. coli* 2020” (BAGNO et al., 2020) e o ensaio realizado nesse trabalho com a proteína armazenada foi descrita como “*E. coli* 2023”.

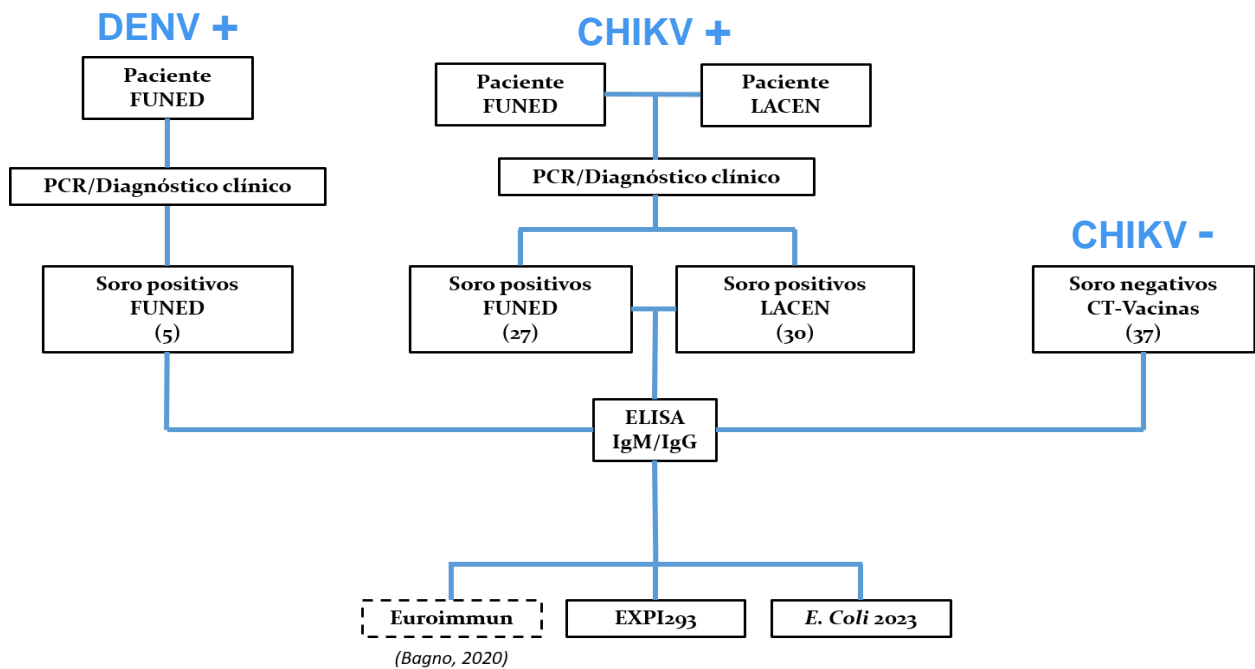


Figura 34 - Categorização por ELISA de soros de pacientes infectados com CHIKV. Categorização por ELISA de soros de pacientes infectados com CHIKV. A antigenicidade da proteína E2 e o desempenho do teste comercial Euroimmun foram avaliados em ELISA a partir de 27 soros positivos da FUNED e 30 do LACEN.

Para captura de IgG foram utilizados 200ng por poço de CHIKV-E2 expressa em EXPI293 e *E.coli*. O ensaio realizado com CHIKV-E2 expressa em EXPI293, para detecção de IgG, alcançou na curva ROC a sensibilidade 98,2% e especificidade de 100% para o ponto de sensibilidade/1-especificidade mais próximo a diagonal esquerda superior, para obtenção da melhor relação entre sensibilidade e especificidade. A AUC da curva ROC foi igual a 0,993, um indicativo de discriminação excelente pelo teste. A razão entre a média das absorvâncias para amostras indicadas como positivas e indicadas como negativas foi de 7,8.

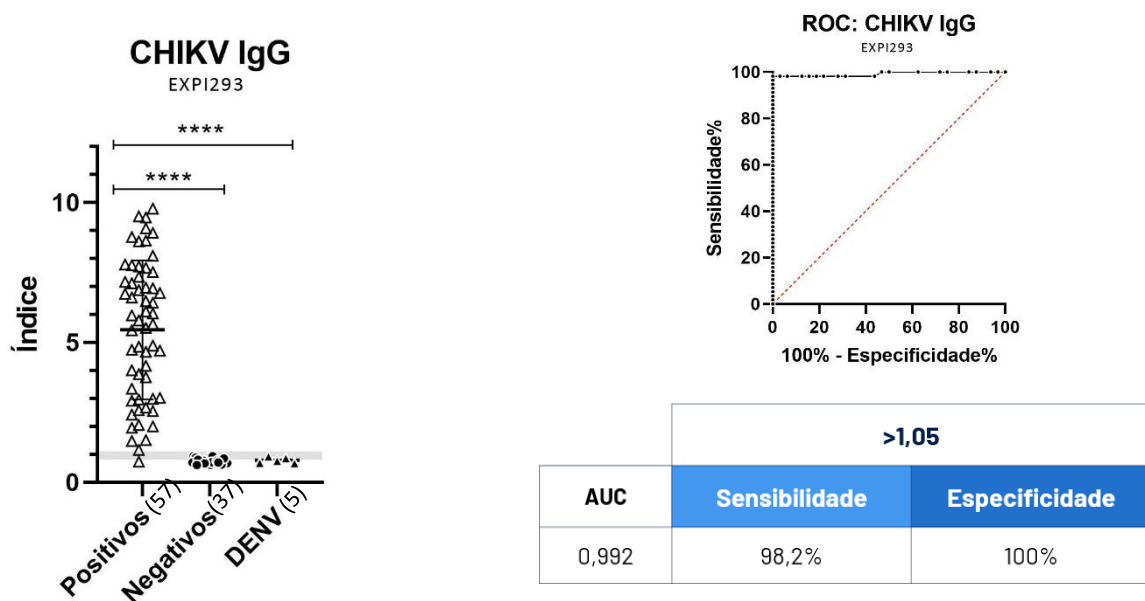


Figura 35 - Avaliação da sensibilidade e especificidade do ELISA IgG para CHIKV-E2 expressa em EXPI293. (A) O índice foi calculado pela razão entre absorvância e a média dos negativos acrescida de 3 DP. A área cinza (índice variando de 0,8-1,1) indica resultados indeterminados. (B) Curva ROC considerando todos os resultados positivos da FUNED e LACEN. (C) A sensibilidade e a especificidade do antígeno foram calculadas de acordo com a curva ROC para os 57 soros positivos para CHIKV, 37 negativos e 5 soros positivos para DENV. Cut-off: 0,099. **** $p > 0,0001$

Para avaliação da captura de IgM foram utilizados 800ng por poço de CHIKV-E2 expressa em EXPI293 e *E.coli*. No ensaio realizado com CHIKV-E2 expressa em EXPI293, para captura IgM, alcançou na curva ROC 77,2% de sensibilidade e 100% de especificidade. Além de AUC da curva ROC igual a 0,943, um indicativo de discriminação excelente. A razão entre a média das absorvâncias para amostras indicadas como positivas e indicadas como negativas foi de 5,9.

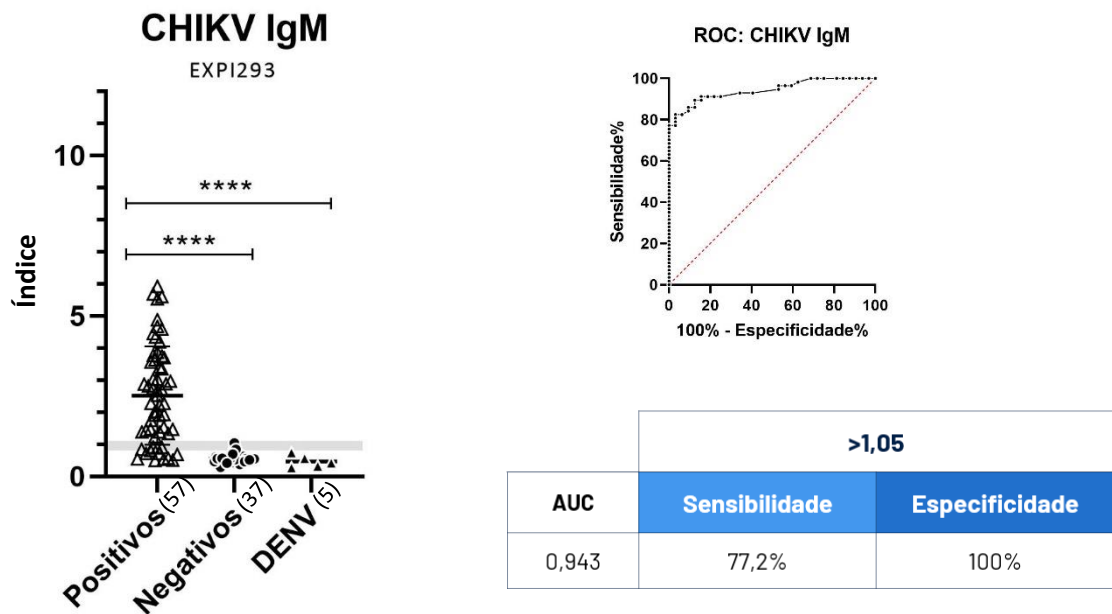


Figura 36 - Avaliação da sensibilidade e especificidade do ELISA IgM para CHIKV-E2 expressa em EXPI293. (A) O índice foi calculado pela razão entre absorvância e a média dos negativos acrescida de 3 DP. A área cinza (índice variando de 0,8-1,1) indica resultados indeterminados. (B) Curva ROC considerando todos os resultados positivos da FUNED e LACEN. (C) A sensibilidade e a especificidade do antígeno foram calculadas de acordo com a curva ROC para os 57 soros positivos para CHIKV, 37 negativos e 5 soros positivos para DENV. Cut-off: 0,233. **** $p > 0,0001$

O *cut-off* do teste foi calculado pela média dos negativos mais 3 DP (desvio-padrão). O valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia (AC), estão sumarizados na tabela 4. Além dos resultados de sensibilidade e especificidade em relação ao índice, sem considerar ao cálculo amostras categorizadas como indeterminadas.

Tabela 7 - Propriedades do ELISA IgM/IgG de CHIKV-E2 expressa em EXPI293

| Elisa indireto | IgM | IgG |
|---------------------------|-------|-------|
| VPP | 100% | 100% |
| VPN | 78% | 96% |
| AC | 90% | 99% |
| Sensibilidade (A/A+C) | 84,6% | 98,2% |
| Especificidade (D/B+D) | 100% | 100% |

A tabela 8 representa os resultados individuais de índice para cada soro positivo nos ensaios de ELISA citados. As amostras com categorizações divergentes entre EXPI293 e comercial/HEK foram destacadas (*). Para IgM, das 55 amostras totais, 6 (10,9%) determinadas como positivas pelo kit comercial foram categorizadas como negativas/indeterminadas por EXPI293, enquanto 1 (1,8%) negativa pelo comercial foi categorizada como positiva por EXPI293. Para IgG, das 55 amostras totais, 2 (3,6%) amostras categorizadas como negativas pelo kit comercial foram categorizadas como positivas por EXPI293. Em relação aos resultados obtidos por HEK293T, dos 25 soros avaliados, 2 (8,0%) soros considerados positivos obtiveram resultados negativos para EXPI293 em relação a captura de IgM. As categorizações no ensaio ELISA IgG foram idênticas para EXPI293 e HEK293T.

O ensaio atual com a alíquota antiga de *E. coli* apresentou categorização semelhante ao ensaio anterior para IgG, contudo com uma razão menor. Entretanto, para análise de IgM, 14 (66,7%) das 21 amostras categorizadas como positivas por *E. coli* 2020 foram identificadas como negativas/indeterminadas no ensaio atual.

Tabela 8 - Índices individuais dos soros avaliados em ensaios de ELISA.

A

Índice IgM

| ID | Euroimmun | | | ID FUNED | Euroimmun | | | HEK293T | E. coli 2023 | |
|---------|-----------|---------|--------------|----------|-----------|---------|---------|---------|--------------|--------------|
| | EXPI293 | EXPI293 | E. coli 2023 | | EXPI293 | EXPI293 | HEK293T | | E. coli 2023 | E. coli 2020 |
| LACEN01 | 8,48 | 3,77 | 1,23 | 4503 | nt | 0,88 | nt | 0,39 | nt | |
| LACEN02 | 8,99 | 3,02 | 1,35 | 4561 | 0,89 | 0,71 | 0,67 | 0,38 | 1,00 | |
| LACEN03 | 6,49 | 3,02 | 0,87 | 4584 | 0,73 | 0,71* | 2,06 | 0,54 | 1,65 | |
| LACEN04 | 9,18 | 2,28 | 0,61 | 4591 | 0,32 | 0,53 | 0,54 | 0,68 | 1,61 | |
| LACEN05 | 4,43 | 1,38 | 1,56 | 4600 | 1,41 | 0,90* | 2,25 | 0,56 | 1,04 | |
| LACEN06 | 0,87 | 1,90* | 0,59 | 4612 | 5,03 | 2,28 | 3,92 | 1,20 | 3,20 | |
| LACEN07 | 10,21 | 1,90 | 0,41 | 4616 | nt | 4,60 | nt | 1,09 | nt | |
| LACEN08 | 5,66 | 3,75 | 2,08 | 4625 | 4,88 | 2,88 | 3,59 | 0,63 | 2,23 | |
| LACEN09 | 6,91 | 2,69 | 0,97 | 4638 | 4,76 | 1,33 | 4,35 | 0,55 | 2,12 | |
| LACEN10 | 7,47 | 3,35 | 0,75 | 4642 | 5,58 | 5,60 | 8,62 | 2,09 | nt | |
| LACEN11 | 6,93 | 4,19 | 2,59 | 4708 | 5,18 | 3,41 | 4,48 | 1,38 | 3,88 | |
| LACEN12 | 9,08 | 2,87 | 0,60 | 4766 | 1,34 | 0,49* | 0,69 | 0,29 | nt | |
| LACEN13 | 3,97 | 1,43 | 1,28 | 4795 | 5,45 | 5,53 | 4,74 | 1,28 | 3,43 | |
| LACEN14 | 8,28 | 4,68 | 0,72 | 4833 | 5,06 | 5,92 | 6,56 | 0,81 | 2,85 | |
| LACEN15 | 6,45 | 5,68 | 1,44 | 4844 | 4,23 | 2,81 | 4,64 | 0,78 | 2,43 | |
| LACEN16 | 3,07 | 1,46 | 0,43 | 4956 | 0,94 | 0,54 | 0,42 | 0,38 | 1,00 | |
| LACEN17 | 4,77 | 1,53 | 0,35 | 4984 | 5,14 | 3,63 | 6,11 | 0,77 | 2,19 | |
| LACEN18 | 5,77 | 2,21 | 1,07 | 4997 | 4,67 | 3,70 | 2,19 | 1,13 | 3,66 | |
| LACEN19 | 7,84 | 3,86 | 0,91 | 5021 | 4,87 | 1,92 | 3,14 | 0,42 | 1,59 | |
| LACEN20 | 7,01 | 4,35 | 1,04 | 5022 | 4,95 | 1,74 | 3,28 | 0,72 | 3,97 | |
| LACEN21 | 5,51 | 1,23 | 0,46 | 5026 | 5,01 | 4,88 | 6,88 | 1,36 | 4,46 | |
| LACEN22 | 7,86 | 2,03 | 0,44 | 5046 | 1,76 | 0,68* | 0,60 | 0,34 | 0,67 | |
| LACEN23 | 1,38 | 0,56* | 0,66 | 5047 | 4,05 | 1,47 | 1,60 | 0,63 | 1,59 | |
| LACEN24 | 3,02 | 3,56 | 1,23 | 5059 | 4,38 | 2,74 | 2,94 | 0,61 | 0,98 | |
| LACEN25 | 9,89 | 2,53 | 2,69 | 5074 | 0,37 | 0,50 | 0,38 | 0,36 | nt | |
| LACEN26 | 1,28 | 0,80* | 0,60 | 5078 | 0,59 | 0,84 | 0,70 | 0,65 | 1,28 | |
| LACEN27 | 8,50 | 1,38 | 0,49 | 5095 | 5,31 | 2,96 | 2,85 | 0,47 | nt | |
| LACEN28 | 9,97 | 0,91* | 0,41 | | | | | | | |
| LACEN29 | 8,71 | 2,67 | 1,19 | | | | | | | |
| LACEN30 | 10,22 | 4,45 | 2,03 | | | | | | | |

B

Índice IgG

| ID | Euroimmun | | | FUNED ID | Euroimmun | | | | |
|---------|-----------|--------------|------|-------------|-----------|---------|--------------|--------------|-------|
| | EXPI293 | E. coli 2023 | | | EXPI293 | HEK293T | E. coli 2023 | E. coli 2020 | |
| LACEN01 | 0,47 | 1,47* | 2,97 | 4503 | nt | 7,66 | nt | 3,86 | Nt |
| LACEN02 | 3,39 | 3,75 | 2,89 | 4561 | 2,57 | 9,46 | 13,40 | 4,01 | 8,97 |
| LACEN03 | 3,28 | 7,16 | 2,32 | 4584 | 2,58 | 9,50 | 13,26 | 4,95 | 11,59 |
| LACEN04 | 0,69 | 1,16* | 1,38 | 4591 | 2,83 | 7,34 | 12,86 | 2,08 | 3,98 |
| LACEN05 | 3,64 | 4,00 | 3,38 | 4600 | 2,66 | 7,75 | 12,63 | 2,83 | 5,58 |
| LACEN06 | 4,29 | 8,91 | 0,72 | 4612 | 2,38 | 2,66 | 3,68 | 0,71 | 0,87 |
| LACEN07 | 0,34 | 0,73 | 0,71 | 4616 | nt | 2,98 | nt | 1,49 | Nt |
| LACEN08 | 3,74 | 6,93 | 1,84 | 4625 | 2,24 | 3,01 | 3,83 | 0,69 | 1,00 |
| LACEN09 | 2,49 | 1,50 | 2,65 | 4638 | 4,45 | 5,43 | 11,13 | 1,64 | 2,48 |
| LACEN10 | 1,89 | 4,84 | 2,92 | 4642 | 4,29 | 7,78 | 1,80 | 1,31 | 1,71 |
| LACEN11 | 1,61 | 2,41 | 1,48 | 4708 | 2,79 | 3,34 | 5,90 | 1,04 | 1,08 |
| LACEN12 | 2,40 | 2,57 | 0,66 | 4766 | 2,67 | 9,07 | 12,91 | 5,21 | 10,84 |
| LACEN13 | 3,16 | 6,86 | 4,05 | 4795 | 3,55 | 6,95 | 8,39 | 4,29 | 6,53 |
| LACEN14 | 3,62 | 7,71 | 0,95 | 4833 | 3,49 | 5,96 | 9,44 | 1,16 | 1,51 |
| LACEN15 | 3,17 | 6,76 | 1,69 | 4844 | 2,83 | 2,04 | 5,06 | 0,71 | 0,59 |
| LACEN16 | 3,88 | 8,09 | 1,19 | 4956 | 2,72 | 6,41 | 9,23 | 2,31 | 4,46 |
| LACEN17 | 4,71 | 8,62 | 0,81 | 4984 | 4,32 | 5,78 | 8,24 | 1,34 | 1,49 |
| LACEN18 | 3,71 | 7,52 | 1,05 | 4997 | 1,42 | 2,55 | 3,22 | 1,00 | 1,68 |
| LACEN19 | 3,55 | 7,11 | 0,95 | 5021 | 2,16 | 1,94 | 2,62 | 1,71 | 1,99 |
| LACEN20 | 2,18 | 2,91 | 1,57 | 5022 | 3,11 | 4,73 | 6,16 | 1,36 | 2,32 |
| LACEN21 | 3,76 | 4,70 | 1,11 | 5026 | 1,78 | 6,47 | 8,67 | 1,17 | 1,36 |
| LACEN22 | 2,87 | 6,73 | 1,97 | 5046 | 2,92 | 9,79 | 12,22 | 4,12 | 7,90 |
| LACEN23 | 4,11 | 4,88 | 0,95 | 5047 | 3,11 | 8,63 | 12,61 | 3,85 | 8,81 |
| LACEN24 | 4,36 | 6,60 | 4,59 | 5059 | 2,24 | 3,86 | 3,52 | 1,10 | 1,58 |
| LACEN25 | 3,64 | 6,03 | 2,61 | 5074 | 2,91 | 8,77 | 11,02 | 3,11 | 10,00 |
| LACEN26 | 4,68 | 2,95 | 1,33 | 5078 | 2,75 | 5,65 | 10,58 | 2,60 | 4,92 |
| LACEN27 | 2,73 | 1,99 | 0,85 | 5095 | 4,80 | 5,51 | 8,22 | 1,11 | 1,36 |
| LACEN28 | 3,16 | 4,16 | 2,02 | | | | | | |
| LACEN29 | 3,23 | 6,10 | 2,06 | | | | | | |
| LACEN30 | 2,83 | 4,66 | 0,62 | | | | | | |

Tabela 8. Índices individuais dos soros avaliados em ensaios de ELISA. A tabela representa, em paralelo, os índices e categorizações obtidos para cada ensaio de ELISA IgM (A) e IgG (B) para o kit comercial e os ensaios com a proteína E2 expressa em *E. coli*, HEK293T e EXPI293. Amostras com índice acima de 1,1 (em vermelho) são consideradas positivas, entre 1,1 e 0,8 como indeterminadas (em branco) e as negativas apresentam índice abaixo de 0,8 (em verde). nt: não testadas.

*Amostras com categorizações positivas divergentes entre EXPI293 e comercial/HEK293T

6 DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS

Nos últimos anos, o Brasil vem enfrentando surtos anuais de CHIKV por todo o território. Houve uma queda nas notificações de casos de febre Chikungunya nos anos de 2020 e 2021, porém a redução pode estar associada a subnotificação em detrimento do colapso do SUS frente à COVID-19. Contudo, os registros de 2022 e 2023 pelo boletim epidemiológico do SUS sugerem uma epidemia em curso de CHIKV.

A febre Chikungunya causa impactos sociais e econômicos exorbitantes por todo o globo, sobretudo pela cronicidade de sintomas como artralgia e mialgia. A sintomatologia na fase aguda se assemelha à de outras arboviroses coendêmicas, como DENV e ZIKV, tornando o diagnóstico clínico um desafio. A falta de diagnósticos, tratamentos específicos e vacinas aprovadas, juntamente com ausência de controle vetorial, agravam as consequências causadas pelo CHIKV.

Atualmente, o comércio dispõe de testes de diagnósticos sorológicos para CHIKV, com mais de 20 produtos aprovados na ANVISA. Contudo, há apenas um teste sorológico nacional aprovado, o Kit TR DPP® CHIKUNGUNYA IgM/IgG - Bio-Manguinhos. Nos últimos anos, regiões do Brasil enfrentaram dificuldades no diagnóstico de arboviroses, sobretudo pela carência de produtos para importação, agravada na pandemia. Esse cenário reforça a necessidade de independência biotecnológica do Brasil, que deve ser promovida e organizada de forma governamental para fomento da pesquisa e produção de insumos e kits nacionais.

Em nosso grupo de pesquisa, Bagno et al. (2020) avaliou o desempenho de proteína E2 de CHIKV expressa em procarioto em comparação E2 expressa em sistema eucarioto, cedida pelo grupo do Professor Arturo Reyes-Sandoval (Instituto Jenner, Universidade de Oxford, Reino Unido). Nos ensaios de ELISA IgG foram alcançados resultados similares para E2 produzida nos dois sistemas. Contudo, para IgM anti-CHIKV, a proteína expressa em sistema eucarioto apresentou resultados superiores (BAGNO et al., 2020). A divergência na análise de IgM pode estar relacionada às MPTs presentes na proteína E2, que são mantidas na expressão em modelo eucarioto.

Já no presente trabalho, a proteína E2 de CHIKV foi expressa, de forma transiente e estável, no sobrenadante de diferentes linhagens eucariotas. CHIKV-E2 apresentou 46 kDa em SDS-PAGE e Western-Blot, apesar do tamanho previsto de 40 kDa para a construção do gene. A discrepância no tamanho pode estar relacionado a MPTs, como glicosilações identificadas por Bagno et al (2020) em E2 expressa em HEK293T. Diferentes protocolos de otimização da expressão estável foram testados, a fim de obter-se maiores taxas de expressão. Além disso, a proteína expressa em EXPI293 de forma transiente foi purificada e teve sua antigenicidade avaliada em ELISA.

A primeira etapa para expressão de um transgene em um sistema eucarioto é a construção do gene, baseada nos objetivos a serem alcançados. A sequência Kozak permitiu o reconhecimento do RNAm por ribossomos e a ausência do sinal de poliadenilação não impediu a expressão de E2 de forma estável, uma vez que o pcDNA 3.1 (+) dispõe de sinal para poliadenilação. A ausência de otimização de códons para as linhagens utilizadas não bloqueou a expressão estável e transiente nas mesmas. A adição do peptídeo sinal tPa permitiu a secreção de CHIKV-E2 por diferentes células de mamífero e a calda de histidina possibilitou a purificação por cromatografia de afinidade.

A transfecção com *Lipofectamine™ 3000* e *ExpiFectamine™ 293 Reagent* (ThermoFisher), assim como a plataforma lentiviral, foram empregadas para a entrega do gene a células eucariotas. As expressões transiente e estável apresentam diferentes vantagens e desvantagens. A expressão transiente pode alcançar altas taxas de expressão em curto prazo, porém se torna inviável para expressão em larga escala. A expressão estável é amplamente utilizada para expressões em larga escala, podendo atingir taxas satisfatórias de expressão. Porém, a integração do gene e a seleção de populações/clones de alta expressão podem ser um desafio.

Em concordância com a literatura, as maiores taxas de expressão foram alcançadas pela expressão transiente. A expressão transiente em EXPI293 foi realizada com *ExpiFectamine™ 293 Reagent* (ThermoFisher), o alto valor desse reagente compromete os custos de produção de forma transiente. No CT Vacinas, um dos objetivos na expressão de proteínas recombinantes é utilizar técnicas passíveis de transferência para a produção em larga escala com melhor custo-benefício. Logo,

atingir melhores taxas de expressão estável foi um dos objetivos, devido às vantagens desse formato de produção.

Com o propósito de aprimorar a expressão estável, diversas condições de produção lentiviral e de transdução foram testadas. Inicialmente, o lentivírus era produzido em células HEK293T e submetidos à transdução, atingindo baixas taxas de expressão. A concentração prévia do sobrenadante lentiviral foi associada ao aumento da produção do gene E2, tal como a transdução consecutiva de culturas melhorou a performance de expressão. Ambas alterações estão relacionadas a maior integração do transgene à célula hospedeira, que possibilitou maior expressão do gene exógeno sem comprometer as taxas de crescimento.

A linhagem EXPI293 (ThermoFisher) apresenta ótimos resultados de desempenho para a expressão de proteínas, devido às suas modificações para crescimento em alta densidade e meio livre de soro. A utilização dessa linhagem para a produção de lentivírus permitiu a obtenção de culturas transduzidas expressando a proteína E2 em taxas superiores àquelas alcançadas pela transdução com lentivírus sintetizados em HEK293T.

Para a expressão do gene CHIKV-E2, a linhagem EXPI293 apresentou desempenho superior ao de HEK293T. Além disso, o crescimento em suspensão e em meio livre de soro possibilita a produção e purificação em larga escala sem a presença excessiva de contaminantes de origem animal. Por essas razões, a linhagem EXPI293 foi eleita para otimizações de expressão. A linhagem CHO²³⁵³ também seria passível dos testes de otimização, uma vez que cresce em suspensão em meio livre de soro, porém problemas com obtenção comercial do meio apropriado limitaram sua utilização neste trabalho.

Uma importante etapa da expressão estável é a seleção de clones ou populações de células apresentando taxas superiores de expressão em relação à cultura total. A transdução lentiviral, e demais métodos de integração estável, atuam de forma aleatória, gerando células com diferentes capacidades de expressão em uma mesma cultura. Todavia, as tentativas de seleção foram falhas. Células individuais de EXPI293 foram obtidas por diluição limitante e *cell sorting*, porém não houve crescimento celular adequado após a realização das técnicas. Perspectivas de seleção incluem a seleção de células única e populações de superexpressão, por

citometria de fluxo. E, para recuperação, a utilização de gentamicina em células cultivadas previamente no poço utilizado para a clonagem, permite a presença de fatores essenciais ao crescimento, sem que haja a contaminação da cultura.

Contudo, as maiores taxas de expressão estável de E2 foram atingidas por culturas de EXPI293 e CHO²³⁵³ transduzidas com lentivírus concentrado, produzido em células EXPI293. Transduções consecutivas, seguindo o mesmo protocolo, podem melhorar a performance dessas culturas, assim como a seleção de clones/pool de alta expressão.

Outros parâmetros a serem avaliados para maiores taxas de expressão incluem a adição de cauda poly(a), que pode estar relacionada às diferenças entre a expressão transiente e estável. A otimização de códons do gene CHIKV para as culturas EXPI293 e CHO²³⁵³ também pode ser testada para melhor performance, tal como a utilização de outras combinações de plasmídeos lentivirais e outros peptídeos sinais para secreção celular.

Uma das limitações do uso de lentivírus, observada ao longo deste trabalho, foi a quantificação. A quantificação é tradicionalmente feita por ELISA, mas também pode ser realizada por PCR em tempo real. Não foi realizada a quantificação de partículas lentivirais nesse trabalho. Outras formas de expressão estável podem ser abordadas, como a seleção de clones com gene integrado após a transfecção.

As taxas alcançadas pela expressão transiente foram suficientes para a purificação em baixa concentração de CHIKV-E2. O sobrenadante de células expressando de forma estável também foram testados, porém a baixa concentração no sobrenadante prejudicou a purificação. Culturas com expressão superior à de EXPI293 T2.4 ainda não tiveram o sobrenadante submetido à purificação.

A proteína CHIKV-E2 expressa em EXPI293 e purificada foi avaliada quanto a sua antigenicidade em ensaios de ELISA indireto IgM/IgG. Os resultados obtidos foram comparados com a performance da proteína E2 expressa em *E.coli* e HEK293T, assim como a do kit comercial, quanto à distinção de soros positivos e negativos para CHIKV.

Em relação ao ensaio de ELISA para detectar IgM, CHIKV-E2 expressa em EXPI293, apresentou sensibilidade de 77,2% e especificidade de 100%, por análise

da curva ROC para a relação entre sensibilidade e especificidade. A curva ROC também indicou a AUC como 0,943, determinando uma discriminação excelente para o teste. CHIKV-E2 de EXPI293 apresentou divergências para algumas amostras categorizadas pelo kit comercial e pela proteína E2 expressa em HEK293T.

O desempenho da proteína CHIKV-E2 expressa em EXPI293 foi similar ao do teste comercial e utilizando E2 expressa HEK293T para captura de IgG. Das amostras avaliadas, dois soros de pacientes que apresentaram febre Chikungunya foram classificados como negativos pelo teste comercial e atestaram como positivos pelo teste com CHIKV-E2 de EXPI293. Para realização do ELISA com CHIKV-E2 de EXPI293, apenas 200ng de proteína por poço foram suficientes para atingir a sensibilidade de 98,2% e especificidade de 100%, através da melhor correlação dos dois parâmetros em curva ROC. A AUC de 0,992 indicou capacidade de discriminação excelente para o teste preliminar.

Em relação aos testes de ELISA para a proteína E2 expressa em procaríoto (*E.coli* 2023), os testes utilizando CHIKV-E2 expressa em EXPI293 apresentaram um melhor desempenho tanto para a detecção de IgM quanto para a de IgG, sobretudo para a detecção de IgM. A melhor performance para avaliação dos títulos de IgM pelo antígeno E2 expresso em plataforma eucariota também foi observada por Bagno et al. (2020) e pode estar relacionada às MPTs, como glicosilações e pontes dissulfeto. Uma vez que glicosilações, pontes dissulfeto e a ação de chaperonas interferem na conformação estrutural da proteína, e que também glicosilações podem ser alvos da resposta humoral, as MPTs podem impactar na antigenicidade das proteínas.

Nesse trabalho, os ensaios de ELISA para avaliação da antigenicidade da proteína expressa em procaríoto foram realizados com alíquotas da proteína E2 armazenadas por um longo período, o que resultou em uma menor atividade da proteína em teste de ELISA em comparação as categorizações prévias (BAGNO et al., 2020). A diferença de atividade relacionada ao tempo de armazenamento ressalta a necessidade de novos ensaios para avaliar, comparativamente, em ELISA a antigenicidade da proteína E2 expressa em *E. coli* e EXPI293.

O ensaio preliminar de ELISA utilizando a proteína CHIKV-E2 expressa EXPI293 apresentou uma discriminação excelente pela curva ROC para detecção de IgM e IgG. Esse resultado indica um potencial para a utilização da proteína no

desenvolvimento de testes sorológicos para CHIKV. A antigenicidade de uma proteína é um fator crucial para o desenvolvimento de testes sorológicos, sobretudo para testes POCs que apresentam menor sensibilidade em relação aos testes de ELISA. O desempenho superior do antígeno expresso em eucarioto em relação ao procarioto, principalmente para detecção de IgM, evidência uma melhor antigenicidade na expressão de CHIKV-E2 em sistema eucarioto. Portanto, a expressão de CHIKV-E2 em plataforma eucariota provê perspectivas melhores de sensibilidade e especificidade para o diagnóstico sorológico de infecção recente por CHIKV.

Em razão do tempo, ainda serão avaliadas novas purificações e será realizado a padronização do ELISA utilizando a proteína E2 expressa em sistemas eucariotos. Através de alterações em parâmetros da técnica de ELISA, como diluição do soro e anticorpo secundário, assim como tempos de incubação, possibilitarão uma possível otimização do ensaio em relação à quantidade de proteína utilizada. A proteína CHIKV-E2 expressa em CHO²³⁵³ será purificada e terá sua antigenicidade comparada a proteína expressa em EXPI293.

7 CONCLUSÃO

Ao longo da execução do presente trabalho, foi alcançada a expressão da proteína CHIKV-E2, de forma estável e transiente, em diferentes plataformas eucariotas. Em ELISA, a proteína CHIKV-E2 expressa em EXPI293 discriminação excelente pela curva ROC tanto para captura de IgG, quanto de IgM. Contudo, os ensaios preliminares em ELISA de CHIKV-E2 são um ótimo indicativo do potencial antigênico da proteína para a produção de diagnósticos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELNABI, R.; NEYTS, J.; DELANG, L. Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ' s public news and information . n. January, 2020.

ADDGENE. **Lentiviral Guide**. Disponível em:

<<https://www.addgene.org/guides/lentivirus/>>. Acesso em: 11 maio. 2023.

ANDREW, A. et al. Diagnostic accuracy of serological tests for the diagnosis of Chikungunya virus infection: A systematic review and meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 2, 1 fev. 2022.

APANDI, Y. et al. The first isolation of chikungunya virus from non- human primates in Malaysia. **Journal of General and Molecular Virology**, v. 1, n. 3, p. 35–39, 2009.

ARTSOB, H.; LINDSAY, R.; DREBOT, M. Arboviruses. **International Encyclopedia of Public Health**, v. 1, p. 154–160, 2016.

BACKLIWAL, G. et al. Rational vector design and multi-pathway modulation of HEK 293E cells yield recombinant antibody titers exceeding 1 g/l by transient transfection under serum-free conditions. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 15, 2008.

BAGNO, F. F. et al. Chikungunya E2 protein produced in E. coli and HEK293-T cells—comparison of their performances in ELISA. **Viruses**, v. 12, n. 9, 2020.

BAGNO, F. F. et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant protein antigen for the diagnosis of Chikungunya virus. **Journal of Clinical Virology**, v. 113, p. 27–30, 1 abr. 2019.

BARTHOLOMEUSZ, A.; LOCARNINI, S. Utility of IgM ELISA, TaqMan Real-Time PCR, Reverse Transcription PCR, and RT-LAMP Assay for the Diagnosis of Chikungunya Fever. **Journal of Medical Virology**, v. 84, p. 1771–1778, 2012.

- BRONDYK, W. H. **Chapter 11 Selecting an Appropriate Method for Expressing a Recombinant Protein**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2009. v. 463
- BÜSSOW, K. **Stable mammalian producer cell lines for structural biology. Current Opinion in Structural Biology** Elsevier Ltd, , 1 jun. 2015.
- CAPUTO, A. T. et al. Arboviruses: A Family on the Move. Dengue and Zika: Control and Antiviral Treatment Strategies. In: [s.l: s.n.]. v. 1062p. 265–276.
- CARDOSO, C. W. et al. Outbreak of Exanthematous Illness Associated with Zika, Chikungunya, and Dengue Viruses, Salvador, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 12, p. 2274–2276, 2015.
- CAREY DONALD. E. Chikungunya and dengue: a case of mistaken identity? **Journal of the History of Medicine and Allied Sciences**, v. 26, n. 3, p. 243 – 262, 1971.
- CDC. **Clinical Evaluation & Disease | Chikungunya virus**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/chikungunya/hc/clinicalevaluation.html>>. Acesso em: 20 set. 2021a.
- CDC. **Chikungunya virus: Clinical Evaluation & Disease**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/chikungunya/hc/clinicalevaluation.html>>. Acesso em: 13 ago. 2021b.
- CHEN, R. et al. Comprehensive Genome Scale Phylogenetic Study Provides New Insights on the Global Expansion of Chikungunya Virus. **Journal of Virology**, v. 90, n. 23, p. 10600–10611, 2016.
- CHUA, C. L. et al. The neutralizing role of IgM during early Chikungunya virus infection. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, p. 1–16, 2017.
- DAVID W. HOSMER JR.; STANLEY LEMESHOW; RODNEY X. STURDIVANT. **Applied Logistic Regression**. 3rd Edition ed. [s.l: s.n.].
- DA CUNHA, R. V.; TRINTA, K. S. Chikungunya virus: Clinical aspects and treatment. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 8, p. 523–531, 2017.
- DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 3, p. 297–306, 2009.

- DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A. P. B. VON. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Revista de saude publica**, v. 51, p. 30, 2017.
- DOTIWALA, F. et al. A high yield and cost-efficient expression system of human granzymes in mammalian cells. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2015, n. 100, p. 1–10, 2015.
- E. ÁLVAREZ-ARGÜELLES, M. et al. Diagnosis and Molecular Characterization of Chikungunya Virus Infections. **Current Topics in Neglected Tropical Diseases**, 2019.
- FIGUEIREDO, L. T. M. Human urban arboviruses can infect wild animals and jump to sylvatic maintenance cycles in South America. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. JUL, p. 1–6, 2019.
- FILOMATORI, C. V. et al. RNA recombination at Chikungunya virus 3'UTR as an evolutionary mechanism that provides adaptability. **PLoS Pathogens**, v. 15, n. 4, p. 1–27, 2019.
- FISCHER, C. et al. Challenges towards serologic diagnostics of emerging arboviruses. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 27, n. 9, p. 1221–1229, 2021.
- GEISSE, S.; VOEDISCH, B. Transient expression technologies: Past, present, and future. **Methods in Molecular Biology**, v. 899, p. 203–219, 2012.
- GIRARD, M. et al. Arboviruses: A global public health threat. **Elsevier Public Health Emergency Collection**, n. January, 2020.
- GOH, J. B.; NG, S. K. Impact of host cell line choice on glycan profile. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, n. 6, p. 851–867, 2018.
- GOH, L. Y. H. et al. Neutralizing monoclonal antibodies to the E2 protein of chikungunya virus protects against disease in a mouse model. **Clinical Immunology**, v. 149, n. 3 PB, p. 487–497, 2013.
- GOULD, E. et al. Emerging arboviruses: Why today? **One Health**, v. 4, n. July, p. 1–13, 2017.

- GRAHAM, F. L. et al. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. **Journal of General Virology**, v. 36, n. 1, p. 59–72, 1977.
- GRIFFIN, D. E. Alphaviruses. In: **Fields Virology**. [s.l: s.n.]. p. 651–686.
- GUO, M. et al. Development and evaluation of recombinant E2 protein based IgM capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and double antigen sandwich ELISA for detection of antibodies to Chikungunya virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 12, 1 dez. 2022.
- HALSTEAD, S. B. Reappearance of chikungunya, formerly called Dengue, in the Americas. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 4, p. 557–561, 2015.
- HAGER, S. et al. An internal polyadenylation signal substantially increases expression levels of lentivirus-delivered transgenes but has the potential to reduce viral titer in a promoter-dependent manner. **Human Gene Therapy**, v. 19, n. 8, p. 840–850, 1 ago. 2008.
- HORNBECK, P. Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. **Current Protocols in Immunology**, v. 1, n. 1, p. 2.1.1-2.1.22, 2015.
- HUANG, Y. J. S.; HIGGS, S.; VANLANDINGHAM, D. L. Arbovirus-mosquito vector-host interactions and the impact on transmission and disease pathogenesis of arboviruses. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. JAN, p. 1–14, 2019.
- HUNTER, M. et al. Optimization of Protein Expression in Mammalian Cells. **Current Protocols in Protein Science**, v. 95, n. 1, p. 1–28, 2019.
- ICTV. **ICTV Virus Taxonomy Profile: Togaviridae**. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/togaviridae>. Acesso em: 1 set. 2021.
- ITATIAIA. **Casos de Chikungunya em BH cresceram 7.572% em 2023**. Disponível em: <<https://www.itatiaia.com.br/editorias/cidades/2023/04/30/casos-de-chikungunya-em-bh-cresceram-7572-em-2023-conheca-os-sintomas>>. Acesso em: 11 maio. 2023.

- JAIN, S. et al. **Chikungunya and COVID-19 in Brazil: The danger of an overlapping crises**. *Journal of Medical Virology* John Wiley and Sons Inc, , 1 jul. 2021.
- JAYAPAL, K. P. et al. Recombinant protein therapeutics from CHO Cells - 20 years and counting. *Chemical Engineering Progress*, v. 103, n. 10, p. 40–47, 2007.
- JOHNSON, B. W. et al. Evaluation of commercially available Chikungunya Virus Immunoglobulin M detection assays. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 95, n. 1, p. 182–192, 2016.
- KAM, Y. W. et al. Immuno-biology of Chikungunya and implications for disease intervention. *Microbes and Infection*, v. 11, n. 14–15, p. 1186–1196, 2009.
- KAM, Y. W. et al. Early neutralizing IgG response to Chikungunya virus in infected patients targets a dominant linear epitope on the E2 glycoprotein. *EMBO Molecular Medicine*, v. 4, n. 4, p. 330–343, 2012.
- KAMAL, M. et al. Mapping the global potential distributions of two arboviral vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus* under changing climate. *PLoS ONE*, v. 13, n. 12, p. 1–21, 2018.
- KENDALL, C. et al. Structural and phenotypic analysis of Chikungunya virus RNA replication elements. *Nucleic acids research*, v. 47, n. 17, p. 9296–9312, 2019.
- KENNEY, J. L.; BRAULT, A. C. **The role of environmental, virological and vector interactions in dictating biological transmission of arthropod-borne viruses by mosquitoes**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2014. v. 89
- KHAN, A. H. et al. Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. *Journal of General Virology*, v. 83, n. 12, p. 3075–3084, 2002.
- KIKUTI, M. et al. Evaluation of two commercially available chikungunya virus IgM enzyme-linked immunoassays (ELISA) in a setting of concomitant transmission of chikungunya, dengue and Zika viruses. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 91, p. 38–43, 1 fev. 2020.

- KIM, Y. C. et al. Development of an E2 ELISA methodology to assess chikungunya seroprevalence in patients from an endemic region of Mexico. **Viruses**, v. 11, n. 5, 1 maio 2019.
- KUMAR, M.; SUDEEP, A. B.; ARANKALLE, V. A. Evaluation of recombinant E2 protein-based and whole-virus inactivated candidate vaccines against chikungunya virus. **Vaccine**, v. 30, n. 43, p. 6142–6149, 2012.
- LA LINN, M. et al. Arbovirus of Marine Mammals: a New Alphavirus Isolated from the Elephant Seal Louse, *Lepidophthirus macrorhini*. **Journal of Virology**, v. 75, n. 9, p. 4103–4109, 2001.
- LALONDE, M. E.; DUROCHER, Y. Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells. **Journal of Biotechnology**, v. 251, n. December 2016, p. 128–140, 2017.
- LEE, H. et al. Evaluation of a newly developed rapid automated fluorescent lateral flow immunoassay to detect igg and igm antibodies to chikungunya virus. **Infection and Chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 611–615, 2020.
- LIMA, M. et al. Analysis of a routinely used commercial anti-chikungunya igm elisa reveals cross-reactivities with dengue in brazil: A new challenge for differential diagnosis? **Diagnostics**, v. 11, n. 5, 1 maio 2021.
- LUMSDEN, 1955. an Epidemic of Virus Disease in Southern Province, Tanganika Territory, in 1952-53. **Journal of Geophysical Research Atmospheres**, v. 49, n. 1, p. 28–32, 1955.
- MACEK, B. et al. Protein post-translational modifications in bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 11, p. 651–664, 2019.
- MAGALHAES, T. et al. The Endless Challenges of Arboviral Diseases in Brazil. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 5, n. 2, p. 3–8, 2020.
- MASON, P. J.; HADDOW, A. J. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53; an additional note on Chikungunya virus isolations and serum antibodies. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, n. 3, p. 238–40, 1957.
- MENDOZA, E. J. et al. Combining anti-IgM and IgG immunoassays for

comprehensive chikungunya virus diagnostic testing. **Zoonoses and Public Health**, v. 66, n. 8, p. 909–917, 2019.

METZ, S. W.; PIJLMAN, G. P. Arbovirus vaccines; opportunities for the baculovirus-insect cell expression system. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 107, n. SUPPL., p. S16–S30, 2011.

MILONE, M. C.; O'DOHERTY, U. **Clinical use of lentiviral vectors. Leukemia Nature Publishing Group**, , 1 jul. 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Chikungunya: Manejo Clínico**. [s.l: s.n.]. v. 2ª edição

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim epidemiológico: Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 52 de 2022**. [s.l: s.n.].

Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2023/boletim-epidemiologico-volume-54-no-01/view>>. Acesso em: 11 maio. 2023.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico: Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52**Secretaria de Vigilância em Saúde. [s.l: s.n.].

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Chikungunya**. Disponível em:

<<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/chikungunya>>. Acesso em: 11 nov. 2021a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico: Óbito por arboviroses no Brasil, 2008 a 2019**Secretaria de Vigilância em Saúde. [s.l: s.n.].

Disponível em:

<<https://www.saude.gov.br/images/pdf/2020/August/21/Boletim-epidemiologico-SVS-33.pdf>>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doenças e Agravos de Notificação - SINAN**. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/chikunbr.def>>. Acesso em: 2 nov. 2021a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico: Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos por Aedes (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a**

53Secretaria de Vigilância em Saúde. [s.l.: s.n.]. Disponível em:
<https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/fevereiro/01/boletim_epidemiologico_svs_3.pdf>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico: Monitoramento dos casos de arboviroses pelo mosquito Aedes (dengue, chikungunya urbanas causados por vírus transmitidos e zika), semanas epidemiológicas 1 a 42Boletim Epidemiológico Arboviroses.** [s.l.: s.n.].

NUNES, M. R. T. et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine**, v. 13, n. 1, 2015.

O GLOBO. **Chikungunya: casos crescem 35% no Brasil em 2023.** Disponível em:
<<https://oglobo.globo.com/saude/medicina/noticia/2023/04/chikungunya-casos-crescem-34percent-no-brasil-em-2023-saiba-como-prevenir.ghtml>>.
Acesso em: 11 maio. 2023.

PAHO/WHO. **Reported cases of Chikungunya in the Americas.** Disponível em:
<<https://www3.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/chikv-en.html>>.
Acesso em: 16 nov. 2021.

PAIXÃO, E. S. et al. Chikungunya chronic disease: A systematic review and meta-analysis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 112, n. 7, p. 301–316, 2018.

PAUPY, C. et al. Aedes albopictus, an arbovirus vector: From the darkness to the light. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 14–15, p. 1177–1185, 2009.

PORTA, J. et al. Structural Studies of Chikungunya Virus-Like Particles Complexed with Human Antibodies: Neutralization and Cell-to-Cell Transmission. **Journal of Virology**, v. 90, n. 3, p. 1169–1177, 2016.

POULAIN, A. et al. Rapid protein production from stable CHO cell pools using plasmid vector and the cumate gene-switch. **Journal of Biotechnology**, v. 255, p. 16–27, 10 ago. 2017.

POULAIN, A. et al. Reducing recombinant protein expression during CHO pool selection enhances frequency of high-producing cells. **Journal of Biotechnology**, v. 296, n. October 2018, p. 32–41, 2019.

- POWERS, A. M. et al. Evolutionary Relationships and Systematics of the Alphaviruses. **Journal of Virology**, v. 75, n. 21, p. 10118–10131, 2001.
- PRAT, C. M. et al. Evaluation of commercially available serologic diagnostic tests for chikungunya virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 12, p. 2129–2132, 2014.
- PUNTA SECCA, C. J.; KING, C. H.; LABEAUD, A. D. Measuring the global burden of Chikungunya and Zika viruses: A systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 3, p. 1–18, 2021.
- RIBEIRO-FILHO, H.V., COIMBRA, L.D., CASSAGO, A. *et al.* Cryo-EM structure of the mature and infective Mayaro virus at 4.4 Å resolution reveals features of arthritogenic alphaviruses. **Nat Commun** 12, 3038, 2021.
- ROBINSON, M. C. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952–1953. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, n. 3, p. 28–32, 1957.
- ROSS, B. Y. R. W. The Newala Epidemic. **The Journal of Hygiene**, v. 54, n. 2, p. 177–191, 1956.
- SARDI, S. I. et al. Coinfections of zika and chikungunya viruses in bahia, Brazil, identified by metagenomic next-generation sequencing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 9, p. 2348–2353, 2016.
- SCHNIERLE, B. S. Cellular attachment and entry factors for chikungunya virus. **Viruses**, v. 11, n. 11, p. 1–9, 2019.
- SHEARER, R. F.; SAUNDERS, D. N. **Experimental design for stable genetic manipulation in mammalian cell lines: Lentivirus and alternatives. Genes to Cells** Blackwell Publishing Ltd, , 1 jan. 2015.
- SILVA, N. M. DA et al. Vigilância de chikungunya no Brasil: desafios no contexto da Saúde Pública. **Epidemiologia e serviços de saúde : revista do Sistema Unico de Saude do Brasil**, v. 27, n. 3, p. e2017127, 2018.
- SILVA, S. J. R. DA; MAGALHÃES, J. J. F. DE; PENA, L. Simultaneous Circulation of DENV, CHIKV, ZIKV and SARS-CoV-2 in Brazil: an Inconvenient Truth. **One Health**, v. 12, n. October 2020, p. 2020–2022, 2021.

- SILVA, L. A.; DERMODY, T. S. Chikungunya virus: Epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 3, p. 737–749, 2017.
- SILVA, M. M. O. et al. Concomitant Transmission of Dengue, Chikungunya, and Zika Viruses in Brazil: Clinical and Epidemiological Findings from Surveillance for Acute Febrile Illness. **Clinical Infectious Diseases**, v. 69, n. 8, p. 1353–1359, 2019.
- SOLIGNAT, M. et al. Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus. **Virology**, v. 393, n. 2, p. 183–197, 2009.
- SOONSAWAD, P. et al. Structural Evidence of Glycoprotein Assembly in Cellular Membrane Compartments prior to Alphavirus Budding. **Journal of Virology**, v. 84, n. 21, p. 11145–11151, 2010.
- STEGER, K. et al. Literature Review : CHO versus HEK Cell Glycosylation. **MaxCyte.com**, p. 1–6, 2016.
- TANDON, N. et al. Generation of Stable Expression Mammalian Cell Lines Using Lentivirus. **BIO-PROTOCOL**, v. 8, n. 21, 2018.
- TEICH, V.; ARINELLI, R.; FAHHAM, L. Aedes aegypti e sociedade: o impacto econômico das arboviroses no Brasil. **Jornal Brasileiro de Economia da Saúde**, v. 9, n. 3, p. 267–276, 2017.
- THIBERVILLE, S. et al. Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ' s public news and information . n. January, 2020.
- TRIPATHI, N. K.; SHRIVASTAVA, A. Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, n. December, 2019.
- VINK, T. et al. A simple, robust and highly efficient transient expression system for producing antibodies. **Methods**, v. 65, n. 1, p. 5–10, 2014.
- VOSS, J. E. et al. Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed

- by X-ray crystallography. **Nature**, v. 468, n. 7324, p. 709–712, 2010.
- WAHID, B. et al. Global expansion of chikungunya virus: mapping the 64-year history. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 58, p. 69–76, 2017.
- WALSH, G. Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 17–18, p. 773–780, 2010.
- Wang, JY., Song, WT., Li, Y. *et al.* Improved expression of secretory and trimeric proteins in mammalian cells via the introduction of a new trimer motif and a mutant of the tPA signal sequence. *Appl Microbiol Biotechnol* **91**, 731–740, 2011).
- WEAVER, S. C. Arrival of Chikungunya Virus in the New World: Prospects for Spread and Impact on Public Health. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 6, p. 6–9, 2014.
- WEAVER, S. C. Prediction and prevention of urban arbovirus epidemics: A challenge for the global virology community. **Antiviral Research**, v. 156, n. June, p. 80–84, 2018.
- WEAVER, S. C.; FORRESTER, N. L. Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread. **Antiviral Research**, v. 120, p. 32–39, 2015.
- WHO. **Arboviruses and human disease**. [s.l: s.n.].
- WHO. **Arthropod-borne and rodent-borne viral diseases** World Health Organization - Technical Report Series. [s.l: s.n.].
- WHO. **Chikungunya fact sheet**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya>>. Acesso em: 20 set. 2021.
- WHO. **Dengue and severe dengue**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>>. Acesso em: 2 nov. 2021.
- WILDER-SMITH, A. et al. Epidemic arboviral diseases: priorities for research and public health. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. e101–e106, 2017.

XU, X. et al. The genomic sequence of the Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cell line. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 8, p. 735–741, 2011.

ZAID, A. et al. Chikungunya Arthritis: Implications of Acute and Chronic Inflammation Mechanisms on Disease Management. **Arthritis and Rheumatology**, v. 70, n. 4, p. 484–495, 2018.

ZANOTTO, P. M. DE A.; LEITE, L. C. DE C. The Challenges Imposed by Dengue, Zika, and Chikungunya to Brazil. **Frontiers in immunology**, v. 9, n. August, p. 1964, 2018.

ZELLER, H.; BORTEL, W. VAN; SUDRE, B. Chikungunya : Its History in Africa and Asia and Its Spread to New Regions in 2013 – 2014. v. 214, n. Suppl 5, p. 436–440, 2016.

APÊNDICE 1 – Soluções e tampões

➤ Cultivo em procarioto

Meio de cultivo LB: Triptona 10g/L; Extrato de levedura 5g/L; NaCl 5g/L.

Meio de cultivo LB Ágar: Triptona 10g/L; Extrato de levedura 5g/L; NaCl 5g/L; Ágar 15g/L.

➤ Gel de agarose

TAE (Tris-Acetato-EDTA) 50X: Tris base 242 g/L; Ácido acético glacial (CH₃COOH) 5,7%; EDTA 0,5M (pH 8,0) 10%.

➤ SDS-PAGE

Tampão Tris-HCl 1,5mM - pH 8,8: Tris 182 g/L; SDS 4g/L.

Tampão Tris-HCl 0,5mM - pH6,8: Tris 60 g/L; SDS 4g/L.

Tampão de amostra de proteína 4X: Tris-HCl 200 mM pH 6,8; SDS 10%; Azul de bromofenol 0,05%; Glicerol 20%; β-mercaptoetanol 8%.

Tampão de corrida: Tris 0,25M; Glicina 1,9M; SDS 1%.

Azul de Coomassie: Azul de Coomassie 1g/L; Etanol 50%; Ácido acético 10%.

Solução descorante: Etanol 40%; Ácido acético 10%.

➤ Western Blot

Tampão de transferência: Tris 15,15g/L; Glicina 72g/L; Etanol 20%.

Ponceu: Ponceu 0,1%; Ácido acético 5%.

Solução de lavagem TBS-T - pH 7,5: TBS 1X (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM); Tween-20 0,1%.

Solução de bloqueio: Leite em pó 5% (p/v) em TTBS 1X.

➤ **Cromatografia em Akta**

Tampão de ligação (Tampão A) – pH 7,4: NaH₂PO₄ 50 mM; NaCl 300 mM.

Tampão de lavagem (Tampão A) – pH 7,4: NaH₂PO₄ 50 mM; NaCl 300 mM; Imidazol 30 mM.

Tampão de eluição (Tampão B) – pH 7,4: NaH₂PO₄ 50 mM; NaCl 300 mM; Imidazol 500 mM.

➤ **ELISA**

Etapa 1: Sensibilização – pH 9,6: Carbonato de sódio 15 mM; Bicarbonato de sódio 85 mM.

Etapa 2: Bloqueio – pH 7,4: Sacarose 10 %p/v; Cloreto de sódio 150 mM; Albumina bovina 1%p/v.

Etapa 3: Diluente de Amostra – pH 7,4: Fosfato de sódio dibásico anidro PA 100mM; Fosfato de potássio monobásico anidro 17mM; Cloreto de sódio 150mM; Cloreto de potássio PA28mM; Albumina bovina 1%; Sacarose 2%; D-manitol 1%; Solução BND 50% p/v em DMSO 0,04 %v/v; Tween 800,05% v/v.

Etapa 4: Tampão de lavagem 10X – pH 7,4: Fosfato de sódio dibásico anidro PA100 mM; Fosfato de potássio monobásico anidro 18 mM; Cloreto de sódio 1500 mM; Cloreto de potássio PA 28mM; Proclin0,1 %v/v; Tween 201 %v/v.

Etapa 5: Conjugado: Horseradish Peroxidase Diluent MOSS, IncHRPD; Protein Conjugate FAPON Biotech IncBEEIGGI201- Lote 20160307 (1:5000).

Etapa 6: Substrato: TMB Ultra Sensitive Substrate 2.08 mMol - Código #TMBUS - MOSS, Inc

Etapa 7: Solução de Parada: Ácido sulfúrico 0,5 M

ANEXO 1 - Identidade do par dos iniciadores MSC senso e anti-senso

- Primer MCS - pLVX Forward: **GCGCTACCGGACTCAGAT**
- Primer MCS - pLVX Reverse: **CTCCAGACTGCCTTGGGAAA**

ANEXO 2 - Western Blot anti-E2 do sobrenadante de EXPI293 T1.9 e CHO T1.3

No tópico 5.7.3 foi avaliada a expressão de CHIKV-E2 por EXPI293 e CHO²³⁵³ transduzidas com lentivírus produzido em EXPI293, gerando as culturas EXPI293 T1.9 e CHO T1.3. Em paralelo aos resultados utilizando Anti-HIS, também foram realizados ensaios de Western Blot com o anticorpo Anti-E2. Seguem nas figuras 37 e 38, respectivamente, o Western Blot anti-E2 para o sobrenadante de EXPI293 T1.9 e CHO T1.3.

Na figura 37 (B) o sobrenadante de EXPI293 T1.9 é marcado por Anti-E2, confirmando a identidade da proteína expressa. Contudo, o sobrenadante de T2.4 reconhecido por Anti-His (Figura 28) não teve marcações, o que pode estar relacionado a uma falha experimental.

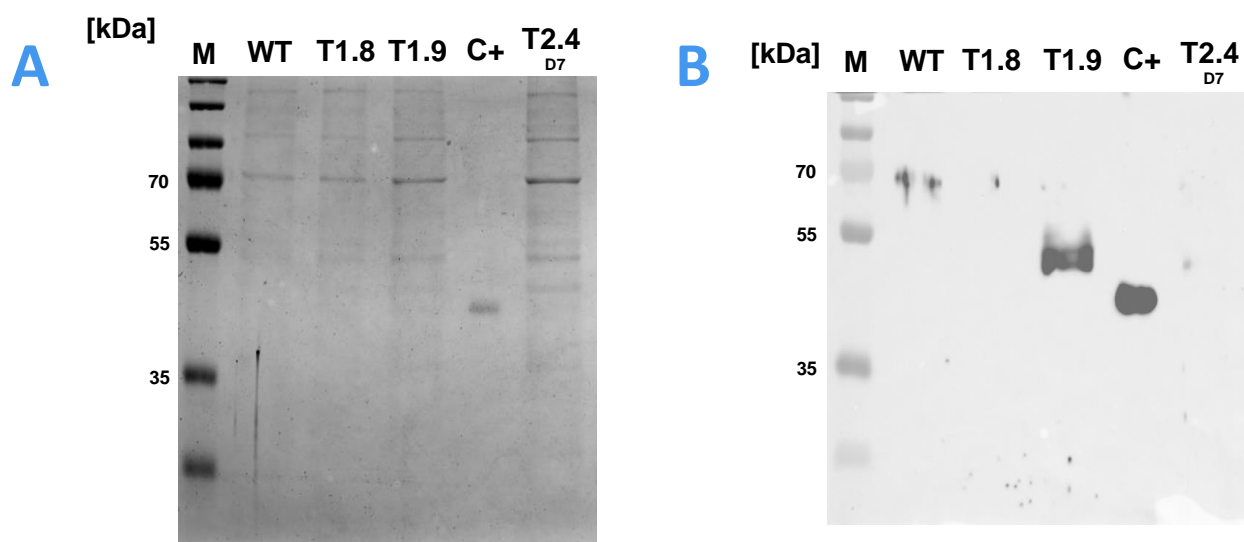
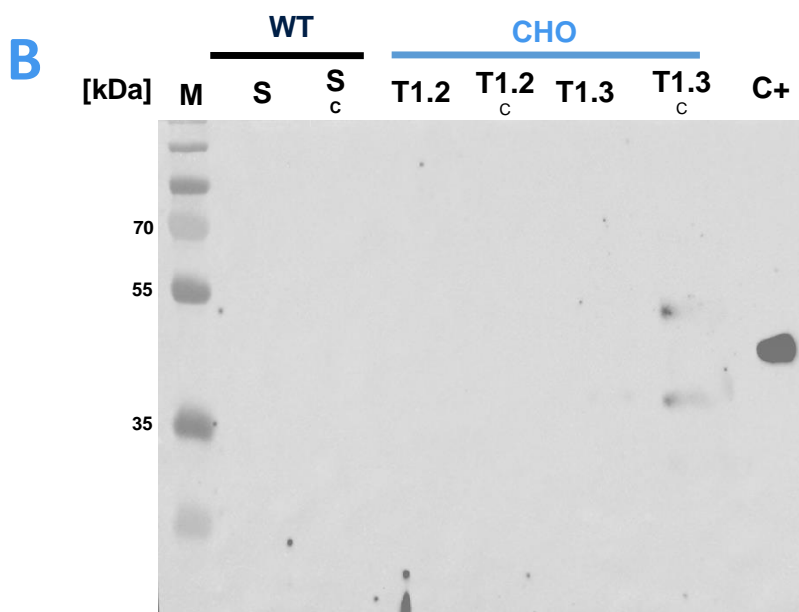
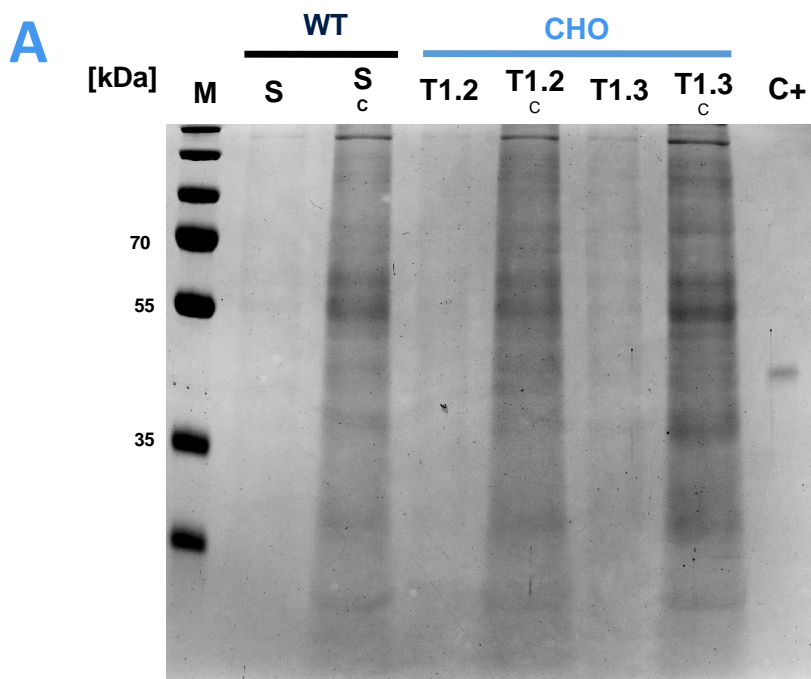


Figura 37- Eletroforese em gel SDS-PAGE (A) e Western Blot (B) do sobrenadante de células EXPI293 transduzidas com lentivírus pLVX-E2 produzido em EXPI293. A cultura T1.8 foi transduzida uma vez com 10 ml sobrenadante produzido em EXPI293 e ultracentrifugado a 30.000g, enquanto a cultura T1.9 foi obtida pela transdução com 10 ml de sobrenadante produzido em EXPI293 e concentrado em Amicon 50 kDa. O sobrenadante da cultura EXPI293 T2.4, crescida por 7 dias, foi utilizada como controle da expressão de CHIKV-E2 em eucarioto. As amostras foram submetidas a eletroforese em gel SDS-PAGE 12,5% corado com InstantBlue® Coomassie (ABCAM) e a Western Blot. Para marcação da proteína por Western Blot das mesmas amostras avaliadas no gel SDS-PAGE (A e Figura 28) foram utilizados o anticorpo Anti-E2 (igG total purificado de coelho imunizados com E2 produzida em procarioto) como primário e o anti-igG rabbit como secundário, revelado com o kit Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Cytiva). M: PageRuler™ (Thermo Scientific); WT: wild-type; C+: E2 produzido em procarioto.

Para o ensaio de Western Blot Anti-E2 do sobrenadante de CHO T1.3 (Figura 38), a intensidade de marcação pelos anticorpos foi muito inferior à observada por Anti-His (Figura 29). Além disso, há uma marcação próxima a 37 kDa. Esses resultados confirmam a identidade da proteína CHIKV-E2 e indicam uma possível degradação que aumentou a afinidade por Anti-E2.



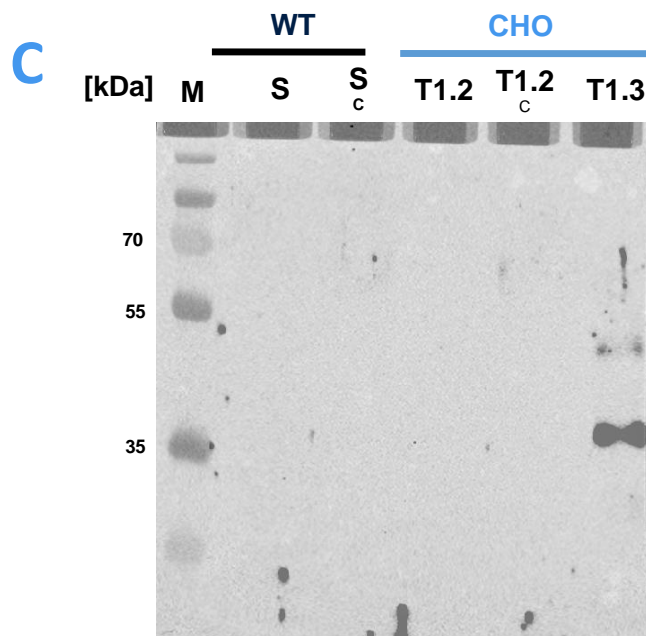


Figura 38 - Eletroforese em gel SDS-PAGE (A) e Western Blot (B) do sobrenadante de células CHO transduzidas com lentivírus pLVX-E2 produzido em EXPI293. Os sobrenadantes de células CHO WT e transduzidas com o gene E2 pela plataforma lentiviral foram concentrados na coluna Amicon de 10 kDa para avaliação. A cultura CHO T1.2 foi transduzida uma vez com 10 ml de sobrenadante lentiviral produzido em EXPI293 e ultracentrifugado a 30.000g, enquanto a T1.3 foi obtida pela transdução com 10 ml de sobrenadante lentiviral produzido em EXPI293 e concentrado em Amicon 50 kDa. As amostras foram submetidas a eletroforese em gel SDS-PAGE 12,5% corado com Coomassie Brilliant Blue e avaliadas por Western Blot. Para marcação da proteína por Western Blot, das mesmas amostras avaliadas no gel SDS-PAGE (A e Figura 29), foram utilizados o anticorpo Anti-E2 (igG total purificado de coelho imunizados com E2 produzida em procarioto) como primário e o anti-igG rabbit como secundário, revelado com o kit Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Cytiva). A membrana foi novamente exposta após serem retiradas as canaletas referentes às amostras T1.3 C e C+ (C). M: marcador Precision Plus Protein Dual Color Standards (Biorad); S: sobrenadante; C: concentrado em Amicon 10 kDa; C+: E2 produzido em procarioto.

ANEXO 3 - Resultados de ELISA pra E2 expressa em *E. coli* 2023

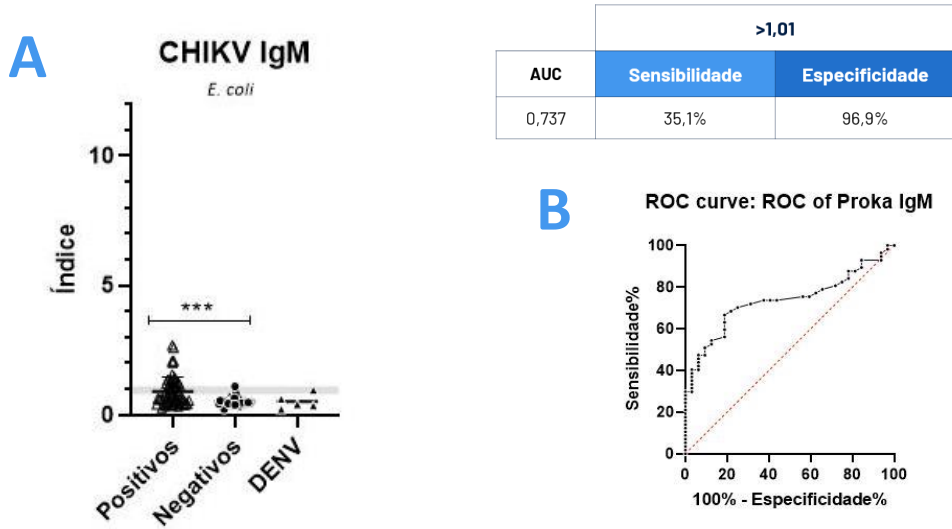


Figura 39 - Avaliação da sensibilidade e especificidade do ELISA IgM para E2 expressa em *E. coli*. (A) O índice foi calculado pela razão entre absorvância e a média dos negativos acrescida de 3 DP. A área cinza (índice variando de 0,8-1,1) indica resultados indeterminados. (B) Curva ROC considerando todos os resultados positivos da FUNED e LACEN. (C) A sensibilidade e a especificidade do antígeno foram calculadas de acordo com a curva ROC. Cut-off: 0,374. *** $p > 0,0002$

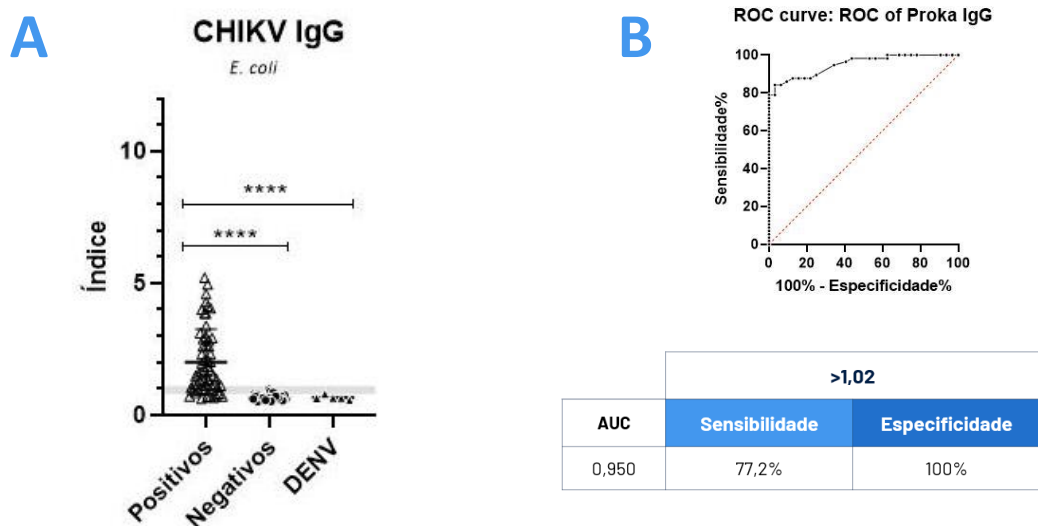


Figura 40 - Avaliação da sensibilidade e especificidade do ELISA IgG para E2 expressa em *E. coli*. (A) O índice foi calculado pela razão entre absorvância e a média dos negativos acrescida de 3 DP. A área cinza (índice variando de 0,8-1,1) indica resultados indeterminados. (B) Curva ROC considerando todos os resultados positivos da FUNED e LACEN. (C) A sensibilidade e a especificidade do antígeno foram calculadas de acordo com a curva ROC. Cut-off: 0,121. **** $p > 0,0001$

ANEXO 4 – Relação da produção científica

❖ Apresentação de Pôster em Congresso

- Expressão da glicoproteína E2 do vírus Chikungunya em células eucariotas para o uso em plataformas de diagnóstico - IX Simpósio de Microbiologia da UFMG – A Microbiologia no Brasil: A ciência de hoje para soluções dos problemas do amanhã, 2022
- Expression of recombinant *Chikungunya virus* E2 protein in eukaryote cells for use in diagnostic - XLVI Congress of the Brazilian Society of Immunology - IMMUNO 2022.
- Expression of recombinant Chikungunya E2 glycoprotein in mammalian cells for use in point-of-care based diagnostics - XXXIII Congresso Brasileiro de Virologia, 2022

❖ Organização de eventos

- **VIII Simpósio de Microbiologia da UFMG – CONECTASIM 2021**, promovido pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais. 2021
- **IX Simpósio de Microbiologia da UFMG –A Microbiologia no Brasil: A ciência de hoje para soluções dos problemas do amanhã**, promovido pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. 2022
- **XXXIII Congresso Brasileiro de Virologia**, promovido pela Sociedade Brasileira de Virologia na cidade de Porto Seguro – BA, 2022.

❖ Cursos de curta duração

- **Treinamento de PCR em Tempo Real (qPCR) para a plataforma QuantStudio™3**, realizado por Thermo Fisher Scientific em 2023. Duração de 7h.
- **Treinamento em Boas Práticas de Conduta Laboratorial**, realizado por Lisiane Gomes - CT Vacinas em 2022. Duração de 11 h.

ANEXO 5 – Carta emitida pela Fundação Ezequiel Dias-FUNED a respeito do uso de amostras humanas no projeto



Participar do fortalecimento do Sistema Único de Saúde,
protegendo e promovendo a saúde

**INSTITUTO OCTÁVIO MAGALHÃES
DIVISÃO DE EPIDEMIOLOGIA E CONTROLE DE DOENÇAS
SERVIÇO DE VIROLOGIA E RIQUETSIOSES**

Eu, Glauco de Carvalho Pereira, chefe do Laboratório de Virologia e Riquetsioses da Fundação Ezequiel Dias – FUNED, autorizo a utilização de amostras de soro humano provenientes desta Instituição no âmbito da realização dos seguintes projetos nos dos quais temos colaboração formalizada nos termos dos respectivos editais e programas:

- 1) PROJETO: "DESENVOLVIMENTO DE TESTES SOROLÓGICOS DIFERENCIAIS PARA ARBOVIROSES BRASILEIRAS BASEADOS NA IDENTIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS CONSERVADOS/ NÃO CONSERVADOS NO PROTEOMA DOS DIFERENTES VÍRUS E NA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES OBTIDAS EM SISTEMAS HETERÓLOGOS DE EXPRESSÃO". MODALIDADE: "EDITAL 007/2017 - PROGRAMA DE PESQUISA PARA O SUS - PPSUS" - PROCESSO N.: CBB- APQ-04295-17. COORDENADOR: PROF. FLAVIO G DA FONSECA
- 2) PROJETO: "DESENVOLVIMENTO DE TESTE SOROLÓGICO DIFERENCIAL PARA DENGUE, CHIKUNGUNYA ZIKA E FEBRE AMARELA - BIOSSENSORES BASEADOS EM NANOBASTÕES DE OURO". MODALIDADE: "EDITAL 001/2017 - DEMANDA UNIVERSAL". PROCESSO N.: CBB - APQ-03081-17. COORDENADOR: PROF. FLAVIO G DA FONSECA

As amostras serão utilizadas pelo Dr. Flávio Guimarães da Fonseca - Professor Associado junto ao Depto. de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, CI número M3467468, Siape no. 1 519 530 - para estudos de vigilância epidemiológica e para a pesquisa e desenvolvimento de novas estratégias de diagnósticos.

Atenciosamente,

Glauco Carvalho Pereira
Chefe do Serviço de Virologia e Riquetsioses
DECD-DIOM-FUNED-LACEN/MG
CRBio-04/nº44962/04-D /MASP: 1159906-3
14 de julho de 2018