

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA E BIOTECNOLOGIA EM
SAÚDE

Tallyta Tâmara da Silva Monteiro

Domínio B da Proteína E2 do Vírus Chikungunya: Aplicabilidade no diagnóstico e
produção de anticorpos

RECIFE

2020

Tallyta Tâmara da Silva Monteiro

Domínio B da proteína E2 do Vírus Chikungunya: Aplicabilidade no diagnóstico e produção de anticorpos

Dissertação apresentada ao Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Dr. Rafael Dhalia

Co-orientador: Dr. Christian Robson de Souza Reis

RECIFE

2020

**Catálogo na fonte: Biblioteca Luciana Borges Abrantes dos Santos
Instituto Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz**

- M772d Monteiro, Tallyta Tâmara da Silva.
Domínio D da proteína E2 do vírus chikungunya:
aplicabilidade no diagnóstico e produção de anticorpos /
Tallyta Tâmara da Silva Monteiro. — Recife: [s.n.],
2020.
93 p. : il., graf., tab. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) - Instituto Aggeu Magalhães,
Programa de Pós-Graduação em Biociências e
Biotecnologia em Saúde, Recife, 2020.
Orientador: Rafael Dhalia; coorientador: Christian
Robson de Souza Reis.
1. Vírus Chikungunya - imunologia. 2. Formação de
Anticorpos. 3. Proteínas do Envelope Viral . 4.
Anticorpos Antivirais. 5. Alphavirus - imunologia. 6.
Proteínas Recombinantes. 7. Proteínas Virais -
imunologia. 8. Vacinas Virais - imunologia. 9. Proteínas
virais - imunologia. I. Dhalia, Rafael II. Reis, Christian
Robson de Souza III. Título.

TALLYTA TÂMARA DA SILVA MONTEIRO

**DOMÍNIO B DA PROTEÍNA E2 DO VÍRUS CHIKUNGUNYA:
APLICABILIDADE NO DIAGNÓSTICO E PRODUÇÃO DE ANTICORPOS**

Trabalho apresentado ao Curso de Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

Dr. Rafael Dhalia (Orientador)

Instituto Aggeu Magalhães /Fiocruz

Dra. Clarice Neuenschwander Lins de Morais Fonseca

Instituto Aggeu Magalhães /Fiocruz

Dr. Antônio Roberto Lucena

Departamento de Genética/ UFPE

*Aos meus pais,
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por sempre cuidar de mim, pois sei que se não fosse o cuidado dele, eu não estaria aqui.

Agradeço à mainha e a painho por todo esforço, amor e apoio incondicional. Eu também não teria chegado até aqui sem tamanha dedicação deles.

Em especial aos meus orientadores, Rafael Dhalia e Christian Reis, pela oportunidade disponibilizada a mim e pelos conhecimentos transmitidos. Agradeço principalmente por me incentivarem e não me permitirem “cair” quando fraquejei. Recebi deles um apoio enorme que foi fundamental para a conclusão deste trabalho.

Agradeço grandemente às minhas companheiras de grupo, Irassandra e Suelen, e aos amigos do laboratório, Bruno, Fernando, Heloísa, Thaíse, Elisa, Thaís, Peu, entre outros, pela troca de conhecimentos, opiniões, conselhos e ensinamentos para a vida, além do fato de terem tornado o dia-a-dia de trabalho mais leve.

A todos do grupo ‘Notificação preferida’, Lílian, Drica, Camila, Wagner, Allana, Neuman, Mayara e Moezio pelo acolhimento no momento em que mais precisei.

Agradeço também a Julia, Stephanny, Yallen, Gustavo, Rafaella, Renata, do Departamento de Microbiologia pela parceria e por terem me apoiado e me dado forças sempre.

Aos meus colegas de trabalho, Suzana, Nair, Lane, Naínne, Roberta, Reginaldo e aos demais, por cada troca de plantão e por terem “segurado a barra” para mim todas as vezes que precisei.

À toda minha família e amigos, Francielly, Duda, Carlos, Leonardo, Cinthya, que foram tão importantes no processo e por estarem comigo nos melhores e piores momentos deste ciclo que está se fechando.

Ao CNPq, Facepe e à Fiocruz.

Por fim, a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente neste trabalho e/ou nesta etapa da minha formação.

Minha mais sincera gratidão!

*“Se não puder voar, corra. Se não puder correr, ande.
Se não puder andar, rasteje, mas continue em frente.”*

Martin Luther King

RESUMO

MONTEIRO, Tallyta Tâmara da Silva. Domínio B da proteína E2 do vírus Chikungunya: aplicabilidade no diagnóstico e produção de anticorpos. 2020. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2020.

As arboviroses são um grande desafio para a Saúde Pública mundial. O Brasil é considerado alvo de epidemias de arbovírus, devido ao clima tropical e as precárias condições de saneamento que favorecem a proliferação dos vetores. Entre as arboviroses, a Febre Chikungunya (CHIKF) causada pelo Vírus Chikungunya (CHIKV) é transmitida por insetos do gênero *Aedes* e tem como principais sintomas: febre, dor de cabeça e artralgia. O CHIKV consiste em um nucleocapsídeo e um RNA fita simples que codifica as proteínas virais. Dentre elas a glicoproteína E2, que compõe o envelope, constitui um importante alvo diagnóstico. Esta proteína pode ser dividida em três domínios A, B e C, dos quais o B (DBE2/CHIKV) é considerado um importante determinante imunogênico. Devido à dificuldade do diagnóstico sorológico da CHIKF, por apresentar reações cruzadas com outros arbovírus, neste trabalho propomos a produção de anticorpos policlonais (contra DBE2/CHIKV) para utilizá-los como ferramenta na validação de uma vacina de DNA contra a Chikungunya, assim como avaliar a aplicabilidade desta subunidade proteica no diagnóstico preciso desta virose. A região codificante da subunidade DBE2 foi subclonada em plasmídeos de expressão, para sua produção em sistema procarioto sob a forma de proteínas de fusão com caudas de histidina (His/DBE2). As proteínas obtidas foram utilizadas na imunização de coelhos, para a obtenção de soros hiperimunes contra as mesmas. Os anticorpos policlonais anti-His/DBE2 foram avaliados quanto a sua capacidade de reconhecimento domínio B da proteína E2 do CHIKV. Os anticorpos foram capazes de reconhecer a subunidade recombinante DBE2 tanto em ensaios de ELISA como de *western blot*, assim como capazes de detectar a expressão da vacina de DNA contra CHIKV. O antígeno His/DBE2 foi em seguida avaliado quanto a sua possível aplicabilidade como antígeno diagnóstico para Chikungunya, através de ensaios de ELISA indireto utilizando amostras sorológicas humanas. Embora a subunidade His/DBE2 tenha apresentado capacidade diagnóstica para a detecção de anticorpos contra CHIKV por ELISA, ainda se faz necessário validar este ensaio.

Palavras-chave: Vírus Chikungunya; proteína do envelope viral; proteína E2; domínio B; formação de anticorpos; diagnóstico.

ABSTRACT

MONTEIRO, Tallyta Tâmara da Silva. Domain B of Chikungunya virus E2 protein: applicability in the diagnosis and production of the virus. 2020. Dissertation (Academic Master's Degree in Biosciences and Biotechnology in Health) - Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2020.

Arboviruses are a major challenge for public health worldwide. Brazil is considered the target of arbovirus epidemics, due to the tropical climate and the precarious sanitation conditions that favor the proliferation of vectors. Among arboviruses, Chikungunya Fever (CHIKF) caused by the Chikungunya Virus (CHIKV) is transmitted by insects of the genus *Aedes* and has as main symptoms: fever, headache and arthralgia. CHIKV consists of a nucleocapsid and a single stranded RNA that encodes viral proteins. Among them, the E2 glycoprotein, which makes up the envelope, constitutes an important diagnostic target. This protein can be divided into three domains A, B and C, of which B (DBE2/CHIKV) is considered an important immunogenic determinant. Due to the difficulty of serological diagnosis of CHIKF, for presenting cross reactions with other arboviruses, in this work we propose the production of polyclonal antibodies (against DBE2/CHIKV) to use them as a tool in the validation of a DNA vaccine against Chikungunya, as well as evaluate the applicability of this protein subunit in the accurate diagnosis of this virus. The coding region of the DBE2 subunit was subcloned into expression plasmids, for its production in a prokaryotic system in the form of fusion proteins with histidine tails (His/DBE2). The proteins obtained were used to immunize rabbits, to obtain hyperimmune sera against them. Polyclonal anti-His/DBE2 antibodies were assessed for their ability to recognize the B domain of the CHIKV E2 protein. The antibodies were able to recognize the recombinant DBE2 subunit in both ELISA and western blot assays, as well as capable of detecting the expression of the CHIKV DNA vaccine. The His/DBE2 antigen was then evaluated for its possible applicability as a diagnostic antigen for Chikungunya, through indirect ELISA assays using human serological samples. Although the His/DBE2 subunit has shown diagnostic capacity for the detection of antibodies against CHIKV by ELISA, it is still necessary to validate this assay.

Keywords: Chikungunya virus; viral envelope protein; protein E2; B domain; antibody formation; diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Distribuição geográfica das epidemias de CHIKV e dos seus vetores.....	21
Figura 2-	Número de casos prováveis e incidência de CHIKF até SE 5 de 2020.....	23
Figura 3-	Ciclo de transmissão do CHIKV através de vetores.....	25
Figura 4-	Estrutura do CHIKV.....	27
Figura 5-	Genoma do CHIKV, codificação e clivagem de suas proteínas.....	28
Figura 6-	Viremia e resposta imunológica da infecção pelo CHIKV.....	30
Figura 7-	Representação esquemática do i-ELISA e do MAC-ELISA.....	33
Figura 8-	Domínios da proteína E2.....	35
Figura 9-	Interação do DBE2/CHIKV com anticorpo.....	36
Figura 10-	Estrutura do DBE2/CHIKV e seus epítomos.....	36
Figura 11-	Fluxograma dos procedimentos metodológicos.....	42
Figura 12-	Mapas de restrição dos vetores pRSETA e pET21d.....	44
Figura 13-	Análise dos tamanhos dos fragmentos de DNA.....	53
Figura 14-	Digestão para confirmação da ligação do gene DBE2 nos respectivos vetores de expressão.....	54
Figura 15-	Prova de digestão do DBE2 no vetor pRSETA (pRSETA/DBE2).....	55
Figura 16-	Prova de digestão do DBE2 no vetor pET21d (pET21d/DBE2).....	55
Figura 17-	Alinhamento das sequências de DNA.....	56
Figura 18-	BLASTx do sequenciamento.....	57
Figura 19-	Teste de expressão das proteínas DBE2 recombinantes.....	58
Figura 20-	Purificação da proteína fusionada à cauda de histidina (His/DBE2).....	59
Figura 21-	Identificação da His/DBE2 através dos soros anti-His/DBE2.....	60
Figura 22-	Limite de detecção dos soros anti-His/DBE2 por <i>western blot</i>	61
Figura 23-	Curso da infecção por CHIKV através de <i>western blot</i>	62
Figura 24-	Limite de detecção por <i>western blot</i> dos anticorpos anti-His/DBE2 purificados.....	62
Figura 25-	Detecção da expressão dos vetores vacinais.....	63
Figura 26-	Limite de detecção dos soros reativos à His/DBE2 através de ELISA.....	64
Figura 27-	Curva ROC estabelecida para o ELISA com a His/DBE2.....	66
Figura 28-	Reatividade da His/DBE2 com soros humanos no ELISA indireto.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Sensibilidade e especificidade do ELISA indireto com a proteína His/DBE2 como antígeno.....	66
------------------	---	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1-	Proteínas em estudo no projeto de vacina de DNA contra o CHIKV.....	50
Quadro 2-	Diluições e etapas dos anticorpos nos ensaios de <i>western blot</i>	51
Quadro 3-	Variações do ensaio de ELISA avaliadas no processo de padronização.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVAI s	Anos de Vida Ajustados por Incapacidade
AUC	<i>Area Under the Curve</i> (Área Abaixo da Curva)
BIOMAT	<i>Biomaterial Modelling</i> (Modelagem de biomaterial)
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> (Ferramenta básica de alinhamento local)
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumina Sérica Bovina)
Cél	Célula
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CHIKF	<i>Chikungunya Fever</i> (Febre Chikungunya)
CHIKV	<i>Chikungunya Virus</i> (Vírus Chikungunya)
CO₂	Dióxido de carbono
DBE2	Domínio B da proteína E2
DENV	<i>Dengue Virus</i> (Vírus da Dengue)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (Meio de Eagle modificado por Dulbecco)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática)
EUA	Estados Unidos da América
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
MEM	Meio Essencial Mínimo
mM	Milimolar
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i> (Multiplicidade de Infecção)
Neg	Negativo
NPT	Núcleo de Plataformas Tecnológicas
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
IgG	Imunoglobulina G
IPTG	Isopropil-β-D-tio-galactosídeo
kDa	Quilo Dalton
LB	Luria Bertani

OD	Densidade Ótica
Pb	Pares de base
PBS	<i>Phosphate Bufferid Saline</i> (Tampão fosfato salino)
Pen-Strep	Penicilina-Streptomicina
PFU	<i>Plaque Forming Unit</i> (Unidade Formadora de Placa)
Pos	Positivo
PRNT	Teste de Neutralização por Redução de Placa
PVDF	Fluoreto de Polivinilideno
RNA	Ácido ribonucleico
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i> (Característica Operacional do Receptor)
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> (Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase)
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> (Eletroforese em gel de poliacrilamida - Dodecil Sulfato de Sódio)
SE	Semana Epidemiológica
ssRNA	<i>single strand RNA</i> (RNA fita simples)
TBS	Tampão Tris Salino
UF	Unidade da Federação
ZIKV	<i>Zika Virus</i> (Vírus Zika)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL	20
2.1 HISTÓRICO.....	20
2.2 EPIDEMIOLOGIA.....	21
2.3 IMPACTO ECONÔMICO.....	23
2.4 TRANSMISSÃO E VETOR.....	24
2.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E TRATAMENTO.....	25
2.6 ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO DO GENOMA DO CHIKV.....	26
2.7 CONTROLE E PREVENÇÃO.....	28
2.8 DIAGNÓSTICO.....	29
2.8.1 Viroológico	31
2.8.2 Sorológico	32
2.9 A GLICOPROTEÍNA E2.....	34
2.9.1 O domínio B	35
3 JUSTIFICATIVA	38
4 OBJETIVOS	39
4.1 OBJETIVO GERAL.....	39
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
5 PERGUNTAS CONDUTORAS	40
6 HIPÓTESES	41
7 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	42
7.1 TRANSFORMAÇÃO E DIGESTÃO DO GENE DBE2.....	42
7.2 SUBCLONAGEM DO GENE DO DBE2 EM VETORES DE EXPRESSÃO...	43
7.3 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	45
7.4 PURIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	46
7.5 PRODUÇÃO DE SOROS HIPERIMUNES ANTI-HIS/DBE2.....	47
7.6 PURIFICAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DO ANTI-HIS/DBE2.....	47
7.7 CURSO DA INFECÇÃO POR CHIKV EM CÉLULAS VERO.....	48
7.7.1 Obtenção do extrato celular	49
7.8 ENSAIOS DE <i>WESTERN-BLOT</i>	49
7.9 ENSAIOS DE ELISA INDIRETO.....	51

7.10 DETECÇÃO DE ANTI-DBE2 EM SOROS HUMANOS.....	52
7.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
7.12 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	52
8 RESULTADOS	53
8.1 SUBCLONAGEM DO GENE DO DBE2 EM VETORES DE EXPRESSÃO...	53
8.2 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	57
8.3 PURIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA HIS/DBE2.....	58
8.4 IDENTIFICAÇÃO DA HIS/DBE2 E LIMITE DE DETECÇÃO DOS SOROS ANTI-HIS/DBE2 POSITIVOS.....	59
8.5 CURSO DA INFECÇÃO POR CHIKV.....	61
8.6 LIMITE DE DETECÇÃO POR WESTERN BLOT DOS ANTICORPOS ANTI-HIS/DBE2 PURIFICADOS.....	62
8.7 DETECÇÃO DO DBE2 EM VARIADAS CONDIÇÕES.....	63
8.8 LIMITE DE DETECÇÃO POR ELISA DOS SOROS REATIVOS À DBE2....	64
8.9 DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-DBE2 CIRCULANTES EM SOROS HUMANOS	64
9 DISCUSSÃO	68
10 CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS	73

1 INTRODUÇÃO

As arboviroses são viroses causadas por arbovírus, que por sua vez, são transmitidos por artrópodes hematófagos. Esse tipo de virose têm importância médico-veterinária pois promovem surtos em humanos e animais, provocando altas taxas de morbidade e mortalidade e, conseqüentemente, grandes prejuízos econômicos e pecuários (MARKLEWITZ; JUNGLEN, 2019; OLUWAYELU; ADEBIYI; TOMORI, 2018). Atualmente, são registrados 537 diferentes arbovírus no Catálogo Internacional de Arbovírus do CDC (*Center for Disease Control and prevention* – Centro de Controle e Prevenção de Doenças) (CDC, 2019).

No Brasil, foram isoladas mais de 200 espécies de arbovírus. Destes, cerca de 40 provocam doenças em humanos, como o Vírus Mayaro (MAYV), O Vírus da Febre Amarela (YFV), o Vírus da Encefalite Equina Venezuelana (VEEV), o Vírus Rócio (ROCV), o Vírus da Dengue (DENV), o Vírus Zika (ZIKV), o Vírus Chikungunya (CHIKV), entre outros (FIGUEIREDO, 2007; LIMA-CAMARA, 2016). Por ser um país de clima tropical, o Brasil possui características climáticas e ambientais favoráveis à proliferação dos vetores e à circulação das arboviroses. Além disso, alguns fatores, como o crescimento populacional desordenado nos centros urbanos e a expansão do sistema de transportes, que facilita o fluxo de pessoas, têm contribuído para a dispersão rápida e extensiva dessas viroses (GOULD *et al.*, 2017; MARKLEWITZ; JUNGLEN, 2019). Assim, estas enfermidades são um grande desafio à saúde pública no país sobretudo pelo grande potencial de causar surtos epidêmicos (FIGUEIREDO, 2007).

O Vírus Chikungunya é um *Alphavirus* da Família *Togaviridae* que se destaca por ser o agente etiológico da Febre Chikungunya (CHIKF). Este arbovírus é transmitido por insetos do gênero *Aedes*, sendo o *Ae. aegypti* e o *Ae. albopictus* as espécies envolvidas na transmissão para humanos (GOULD *et al.*, 2017; PAUL; SADANAND, 2018). O CHIKV é formado por um nucleocapsídeo icosaédrico de 70 nm e um RNA fita simples positivo de aproximadamente 12 kb que codifica proteínas não-estruturais (nsP1-4) e estruturais (C, E1, E2, E3 e 6K) (CUNHA; TRINTA, 2017; YAP *et al.*, 2017).

O nome “Chikungunya” provém da palavra de origem Suaíli “*kungunyala*” que significa “ficar contorcido”. Tal nome foi dado devido à postura encurvada característica dos pacientes acometidos pela virose, promovida pelas fortes dores nas articulações. A mialgia e a poliartralgia são sintomas relevantes para o diagnóstico clínico da CHIKF e possuem caráter debilitante e incapacitante (CUNHA; TRINTA, 2017; PAUL; SADANAND, 2018). Assim,

esta virose não é apenas uma adversidade para a saúde pública, como também é uma ameaça para a economia das áreas endêmicas, pois os surtos estão sempre atrelados a impactos econômicos (MAYER; TESH; VASILAKIS, 2017). No Brasil, de acordo com o boletim epidemiológico publicado pelo Ministério da Saúde, em 2019 foram notificados 132.205 casos prováveis da Febre Chikungunya e confirmados 92 óbitos, desestabilizando a saúde pública e gerando custos diretos e indiretos (MS, 2019).

Atualmente, as principais formas de controle do CHIKV são os programas de combate ao vetor, as medidas de proteção pessoal e os programas educacionais. A vacinação é uma ferramenta promissora para a contenção de doenças infecciosas, porém as estratégias vacinais elaboradas para a CHIKV se encontram em fase de testes clínicos ainda (MASCARENHAS *et al.*, 2018). O diagnóstico precoce também é uma forma de controle, uma vez que, quanto mais cedo a doença for diagnosticada, mais cedo serão tomadas as medidas preventivas e será realizado o tratamento (FUMAGALLI *et al.*, 2018). Contudo, há uma grande dificuldade em se fazer o diagnóstico diferencial do CHIKV pois as manifestações clínicas apresentadas por esta febre são semelhantes à sintomatologia de outras enfermidades como a Dengue e a Zika (MS, 2017).

De maneira geral, o diagnóstico do CHIKV pode ser feito por métodos virológicos (isolamento viral e detecção molecular) ou sorológicos (PRNT e ELISA) (JOHNSON; RUSSELL; GOODMAN, 2016). O isolamento viral consiste na inoculação do soro do paciente infectado em camundongos ou em cultura de células, seguida pela identificação do vírus por imunofluorescência ou por pesquisa de genoma (DASH; MOHANTY; PADHI, 2011). Enquanto a detecção molecular é feita através da transcrição reversa, seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e visa detectar o RNA do vírus na amostra do paciente (GULLETT; NOLTE, 2015). Já os métodos sorológicos baseiam-se na interação antígeno-anticorpo, como o PRNT que se fundamenta na eficiência da neutralização viral pelo soro do indivíduo previamente infectado (AZAMI; MOI; TAKASAKI, 2016), e o ELISA que é uma técnica de detecção de anticorpos anti-CHIKV presentes no soro de pacientes. Porém, no diagnóstico do CHIKV por ELISA, são descritos problemas de reação cruzada com outros *alphavirus*, apresentando falsos-positivos, além de existir limitações devido à baixa sensibilidade dos testes (BURDINO *et al.*, 2016; GAIBANI; LANDINI; SAMBRI, 2016).

A E2 é uma glicoproteína estrutural que faz parte do envelope do CHIKV, dando forma às espículas do vírus, junto com a E1. A proteína E2 é dividida em três domínios: o A,

que fica na parte central da molécula, o B, que se posiciona na região distal, e o C, que se apresenta na porção proximal, ancorando a proteína na membrana viral (WEBER *et al.*, 2017). Estudos identificaram que o domínio B da proteína E2 faz interação com o receptor celular, no processo de endocitose do vírus e, assim, participa da infecção celular. Além disso, foram identificados epítomos que induzem a produção de anticorpos neutralizantes na região deste domínio, tornando-o relevante para a produção de terapias, vacinas e plataformas de diagnóstico (WEGER-LUCARELLI *et al.*, 2015).

Visto o potencial imunogênico do domínio B da proteína E2 do vírus Chikungunya (DBE2/CHIKV), foram realizadas predições e simulações computacionais para avaliar a estabilidade e a conformação dos epítomos deste domínio, de forma isolada do seu contexto natural na proteína E2. O DBE2/CHIKV se manteve estável e apresentou conformação idêntica à observada quando este se encontra integrado aos demais domínios da E2 (dados não publicados). Todos os experimentos *in silico* foram realizados por colaboradores no Departamento de Virologia e Terapia Experimental – Grupo BIOMAT.

Diante dos dados epidemiológicos, é notável que se faz necessário tomar medidas de controle mais efetivas contra o CHIKV, como a elaboração de uma vacina e de uma ferramenta de diagnóstico rápida e confiável. Então, o presente trabalho teve como um dos objetivos produzir anticorpos policlonais contra o DBE2/CHIKV, para dar suporte a um estudo de validação de uma vacina de DNA contra este vírus, baseada na proteína E2. Tal vacina vem sendo desenvolvida no Departamento de Virologia e Terapia Experimental do IAM/FIOCRUZ, como alvo da Tese de Doutorado da colaboradora Irassandra Rooze Pereira Uchôa Cavalcanti de Aquino. Os anticorpos aqui produzidos foram utilizados em ensaios de *western blot* para análise da expressão do antígeno vacinal. Além disso, este trabalho também objetivou avaliar a aplicabilidade do referido domínio no diagnóstico do CHIKV, através de ensaios de ELISA.

2 REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL

O presente tópico apresenta os aspectos teóricos dos temas abordados no decorrer do trabalho: histórico, epidemiologia, impacto econômico, transmissão e vetor, manifestações clínicas e tratamento, estrutura e organização do genoma do CHIKV, controle e prevenção, diagnóstico e glicoproteína E2.

2.1 HISTÓRICO

A Febre Chikungunya (CHIKF – do inglês, *Chikungunya Fever*) é uma infecção causada pelo Vírus Chikungunya (CHIKV – do inglês, *Chikungunya Virus*). O primeiro relato desta virose se deu há mais de seis décadas durante um surto em 1952 e 1953 na região de Makonde Plateau, na Tanzânia, África Oriental (LUMSDEN, 1955; ROBINSON, 1955). Já o primeiro isolamento viral ocorreu alguns anos depois, num estudo sobre um surto decorrido no distrito de Newala, Tanganyika, também na África Oriental (ROSS, 1956). Em 1958 houve o primeiro caso da virose fora do continente africano, que ocorreu em Bangcoc, na Tailândia, Ásia. Desde então, até 1999, vários outros surtos foram notificados nestes dois continentes já atingidos (RAHMAN *et al.*, 2019; WAHID *et al.*, 2017). O vírus foi relatado na Europa em 2007, na Itália, onde houve um surto iniciado por um turista indiano que apresentou a sintomatologia pouco tempo após sua chegada no país europeu (LIUMBRUNO *et al.*, 2008). Apenas em dezembro de 2013 o CHIKV foi introduzido nas Américas, em Saint Martin, no Caribe, e se dispersou rapidamente pelas três Américas (YACTAYO *et al.*, 2016).

Ao passar por diversos países, o CHIKV foi adquirindo mutações que geraram quatro genótipos nomeados conforme a distribuição geográfica onde foram identificados. São eles: os genótipos da região Central, Sul e Leste da África (do inglês, *East/Central/South African*, ECSA), o da região Ocidental da África (do inglês, *West African*, WAF), o genótipo Asiático (do inglês, *Asian genotype*) e do Oceano Índico (do inglês, *Indian Ocean Lineage*, IOL) (RAHMAN *et al.*, 2019; WAHID *et al.*, 2017). A cepa IOL é derivada da ECSA e contém uma importante mutação adaptativa na proteína E1, convertendo uma alanina em uma valina na posição 226 (A226V), que torna o vírus mais dispersivo (HUANG; HIGGS; VANLANDINGHAM, 2019; TSETSARKIN *et al.*, 2007).

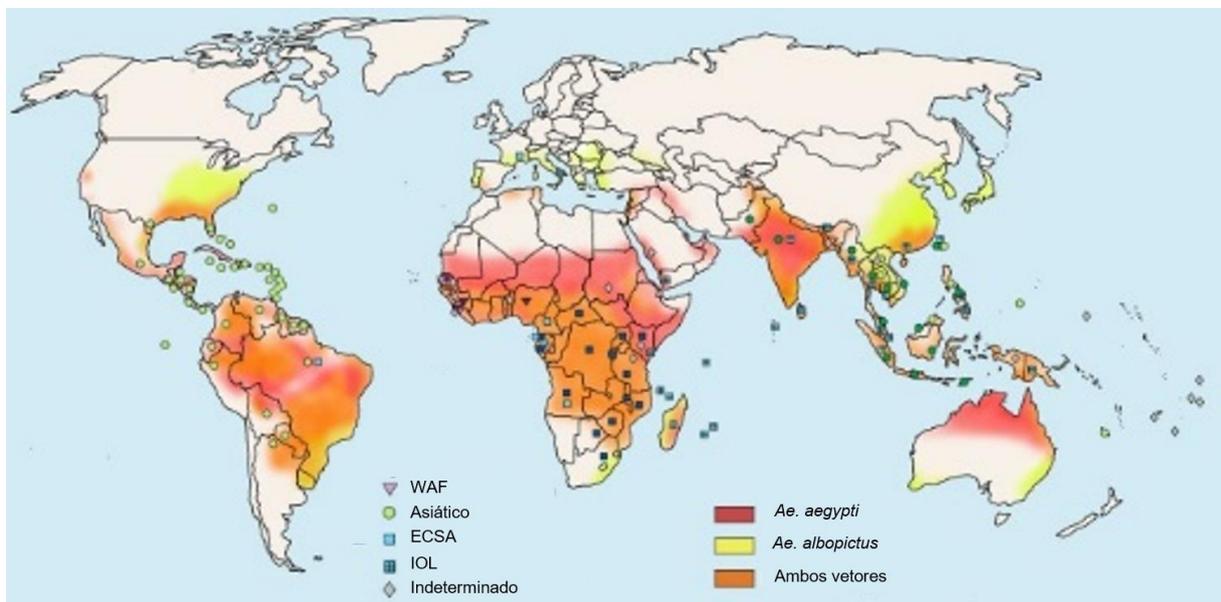
No Brasil, o CHIKV foi introduzido através de casos importados em dois momentos independentes, sendo duas cepas distintas. A linhagem ECSA, foi inserida no país pela cidade de Feira de Santana, na Bahia, em junho de 2014. Já a cepa Asiática, circulante no Caribe e na

América do Sul, atravessou as fronteiras brasileiras pelo estado do Amapá, no Oiapoque, em setembro do mesmo ano (DE SOUZA *et al.*, 2018; NUNES *et al.*, 2015). O vírus teve disseminação rápida, sendo registrados, até outubro de 2014, os primeiros casos autóctones (originários do país), além de uma epidemia na Bahia. Até o ano de 2018 não houve relatos da linhagem IOL no Brasil (DE SOUZA *et al.*, 2018).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

A CHIKF tem a característica de ser uma doença re-emergente, ou seja, a mesma causa epidemias após um período de tempo em declínio infeccioso. O CHIKV tem como principal forma de transmissão o repasto sanguíneo de insetos do gênero *Aedes*, sendo o *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* os vetores responsáveis pela transmissão para humanos. Portanto, tanto o histórico, quanto o risco de surtos, está diretamente relacionado com a presença do vetor na região (Figura 1) (GOULD *et al.*, 2017; NUNES *et al.*, 2015). Durante os surtos, a taxa de ataque desta enfermidade fica entre 35 – 75% na região onde o vírus circula (REYES-SANDOVAL, 2019; CDC, 2018).

Figura 1 – Distribuição geográfica das epidemias de CHIKV e dos seus vetores.



Fonte: Silva; Dermody (2017).

Nota: As formas geométricas coloridas indicam os países onde já houve registro de casos autóctones de CHIKF. Cada forma representa um genótipo diferente. Denominou-se “Indeterminado” o genótipo que ainda não foi identificado. A distribuição geográfica do vírus condiz com as áreas de disposição dos dois principais vetores responsáveis pela transmissão para humanos (SILVA; DERMODY, 2017).

Em 2013 o CHIKV já havia sido introduzido na África, Ásia, Europa, Oceania e nas Américas e, desde então, vem causando surtos que geram grandes impactos sociais e econômicos (SILVA; DERMODY, 2017; YACTAYO *et al.*, 2016). A maior epidemia já registrada ocorreu no Suriname, cuja população possui uma taxa de mais de 90% de soroprevalência (VAN GENDEREN *et al.*, 2016). Nas Américas, este vírus já provocou surtos em 45 países, somando mais de 2 milhões de casos suspeitos (YACTAYO *et al.*, 2016).

Em 2016, após sua chegada ao Brasil em 2014, o CHIKV, juntamente com outros arbovírus (DENV e ZIKV), causou uma grande epidemia na região Nordeste com uma taxa de incidência de 415,7 casos/100 mil habitantes. Os estados mais atingidos foram Rio Grande do Norte, Ceará, Pernambuco, Alagoas e Paraíba, computando mais de 500 casos por 100 mil habitantes cada. Neste mesmo ano, foram confirmados 196 óbitos por CHIKV em todo o país, sendo 181 destes no Nordeste (MS, 2017).

No ano de 2019, foram notificados 132.205 casos prováveis da Febre Chikungunya no Brasil. O Rio de Janeiro e o Rio Grande do Norte foram os estados mais acometidos, com as taxas de incidência de mais de 499 e 390 casos/100 mil habitantes, respectivamente. Juntas, estas UFs contabilizaram mais de 75% dos casos prováveis. Foram confirmados 92 óbitos em todo o país (MS, 2019). Já em 2020, até o mês de janeiro, correspondendo a Semana Epidemiológica (SE) 5, o número de casos prováveis em todo o Brasil era de 3.439. Até então, a região mais afetada foi o Sudeste apresentando 2.127 casos prováveis, ou seja, mais de 61% do total. O que alavancou os números do Sudeste foi o estado do Espírito Santo que retratou 1.096 casos prováveis e uma taxa de incidência de mais de 27 casos/100 mil habitantes (Figura 2). Ainda neste mesmo mês, foi confirmado laboratorialmente 1 óbito no estado do Rio de Janeiro (MS, 2020).

Figura 2 – Número de casos prováveis e incidência de CHIKF até a SE 5 de 2020.

Região/UF	Chikungunya SE 5	
	Casos	Incidência (casos/100 mil hab.)
Norte	230	1,25
Nordeste	843	1,48
Sudeste	2.127	2,41
Minas Gerais	135	0,64
Espírito Santo	1.096	27,27
Rio de Janeiro	706	4,09
São Paulo	190	0,41
Sul	85	0,28
Centro-Oeste	154	0,94
Brasil	3.439	1,64

Fonte: MS (2020, adaptada pela autora).

Nota: Número de casos prováveis e taxa de incidência (casos/100 mil habitantes) de CHIKF no Brasil e separados por regiões e pelos estados do Sudeste, no ano de 2020, da semana epidemiológica 1 até a 5 (MS, 2020).

2.3 IMPACTO ECONÔMICO

O fardo econômico causado por um surto de Chikungunya é classificado de duas formas: custos diretos e indiretos. Os custos diretos estão relacionados ao emprego de verbas em determinados setores em virtude da epidemia, como nos testes de diagnóstico, no controle de vetores, no tratamento, entre outros. Já os custos indiretos estão relacionados com a diminuição do lucro, devido à baixa produtividade, pelo absenteísmo do indivíduo que se encontra incapaz de exercer suas atividades, e do comprometimento da qualidade de vida do mesmo (MAYER; TESH; VASILAKIS, 2017). Por atingir uma grande parcela da população e causar uma morbidez em massa, os surtos provocados pelo CHIKV também estão associados a impactos econômicos e sociais negativos consideráveis (REYES-SANDOVAL, 2019; CDC, 2018).

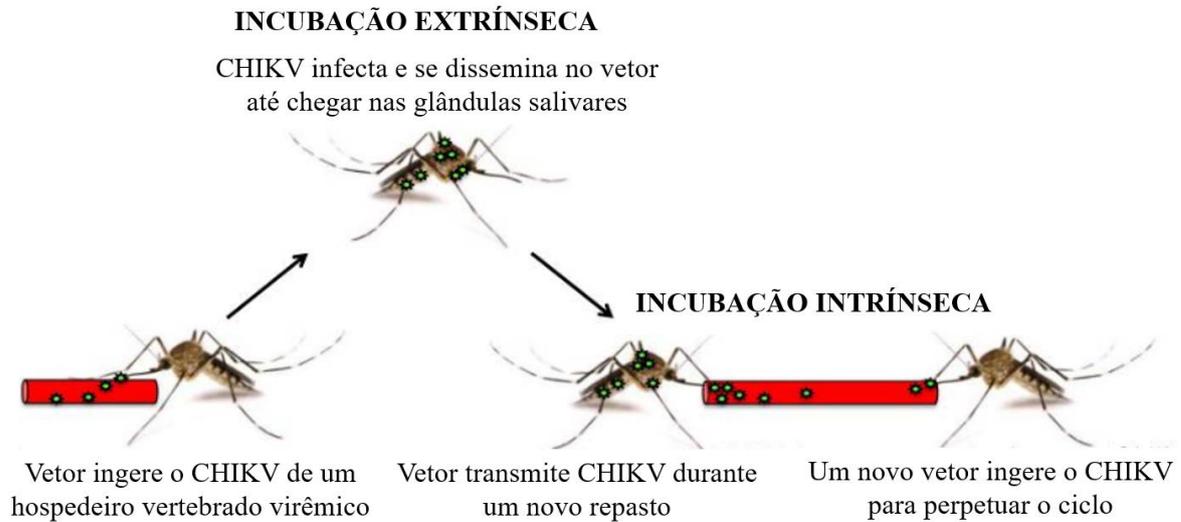
No Brasil, após um surto de arboviroses em 2015/2016, foi realizado um estudo para avaliar o ônus econômico provocado pelas epidemias. Foi observado que houve um investimento de cerca de 1,5 bilhão de reais no controle dos vetores, dos quais, alguns estados receberam repasses federais de mais de 100 milhões. Em relação as demais arboviroses, a CHIKF gerou o maior custo indireto ao país, de mais de R\$ 120 milhões, além do maior número de AVAIs (Anos de Vida Ajustados por Incapacidade) de 0,036. Pernambuco foi o

segundo estado que mais teve prejuízo com os ônus indiretos, totalizando mais de 22 milhões de reais, ficando atrás apenas da Bahia (TEICH; ARINELLI; FAHHAM, 2017).

2.4 TRANSMISSÃO E VETOR

O CHIKV pode ser transmitido de três formas distintas em humanos: mediante o repasto sanguíneo do inseto vetor, por transmissão vertical, ou seja, da mãe para o filho no momento do parto, ou através de transfusão de sangue virêmico. As transmissões vertical e por transfusão são formas mais raras (APPASSAKIJ *et al.*, 2016; GÉRARDIN *et al.*, 2008). Os mosquitos do gênero *Aedes* são artrópodes hematófagos que fazem parte dos dois ciclos biológicos do CHIKV, que são o zoonótico e o urbano. Estes ciclos consistem na passagem do vírus por vertebrados, que atuam como reservatórios virais, e pelos vetores. No ciclo zoonótico, as espécies de *Aedes* arborícolas exercem a função de vetor e os primatas não humanos são apontados como os principais organismos reservatórios. Por vezes, as infecções se estendem e afetam pessoas que vivem nas áreas entorno, assim, iniciando o ciclo urbano, no qual as espécies antropofílicas (*Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*) são os vetores (COFFEY; FAILLOUX; WEAVER, 2014; GALÁN-HUERTA *et al.*, 2015).

O ciclo de transmissão é dado quando a fêmea do mosquito faz o repasto sanguíneo em um indivíduo em viremia, assim, adquirindo o vírus que infecta as células epiteliais do seu intestino médio. Após um período de incubação e dispersão no aparelho digestivo do inseto (período de incubação extrínseco), o vírus atinge as suas glândulas salivares quando se torna capaz de infectar novos organismos (período de incubação intrínseco). O ciclo se reinicia quando um novo mosquito se alimenta do indivíduo contaminado (Figura 3) (COFFEY; FAILLOUX; WEAVER, 2014; NGOAGOUNI *et al.*, 2017).

Figura 3 – Ciclo de transmissão do CHIKV através de vetores.

Fonte: Coffey; Failloux; Weaver (2014).

O *Ae. aegypti* e o *Ae. albopictus* estão presentes em regiões tropicais e subtropicais e, em menor quantidade, em áreas com o clima temperado, como Estados Unidos e Europa. Assim, é notável que estas espécies, sobretudo o *Ae. albopictus*, apresentam uma grande capacidade de adaptação a diversas condições, o que facilita a ocupação de novos habitats. Além disso, o *Ae. albopictus* possui um tempo de vida maior quando comparado a outros mosquitos e, é uma espécie antropofílica e zoofílica (GALÁN-HUERTA *et al.*, 2015; SILVA; DERMODY, 2017). Já o *Ae. aegypti* é uma espécie domesticada, que tem como principal criadouro os reservatórios de água em meios urbanos (GARCIA-SÁNCHEZ; PINILLA; QUINTERO, 2017; JANSEN; BEEBE, 2010).

Inicialmente, apenas o *Ae. aegypti* atuava como principal vetor no ciclo urbano, porém, após a aquisição da mutação A226V na glicoproteína do envelope E1 do genótipo ECSA, dando origem a cepa IOL, o *Ae. albopictus* passou também a protagonizar o ciclo urbano como vetor. Isso se dá pelo fato da linhagem IOL ser transmitida de maneira mais eficiente pelo *Ae. albopictus*, conferindo um maior potencial epidêmico ao vírus, pois a transmissão passou a ocorrer em regiões cujo *Ae. aegypti* foi erradicado (COFFEY; FAILLOUX; WEAVER, 2014; NUNES *et al.*, 2015; TSETSARKIN *et al.*, 2007).

2.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E TRATAMENTO

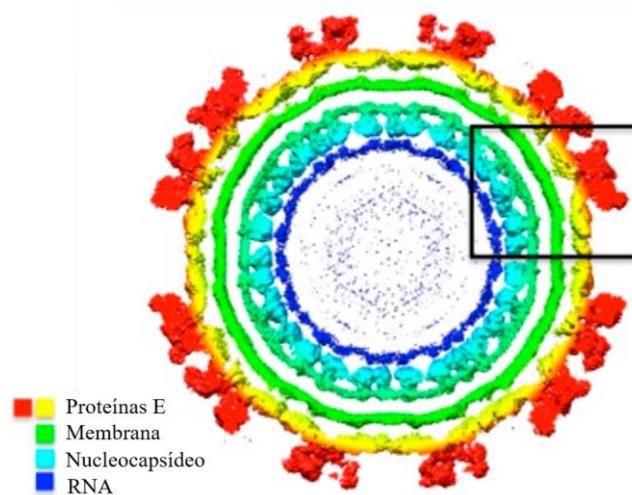
A sintomatologia dos indivíduos acometidos com a Febre Chikungunya se apresenta após um período de incubação do vírus, que dura cerca de dois a quatro dias e pode ser

classificada de três formas: fase aguda, fase crônica e sintomatologia atípica. Os primeiros 10 dias de manifestações clínicas caracterizam a fase aguda da doença e tem como principais sintomas dor de cabeça, erupções cutâneas, febre alta (acima de 38°C), mialgia e poliartralgia. A poliartralgia normalmente é multiarticular bilateral e simétrica, causando fortes dores e enrijecimento nas articulações das extremidades, como joelhos e punhos e, mais raramente, nas grandes articulações. Este sintoma é descrito como o mais comum desta virose, atingindo cerca de 87% dos pacientes durante a fase aguda, além de se destacar por ter caráter debilitante e incapacitante (CUNHA; TRINTA, 2017; MASCARENHAS *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2018). A fase aguda se extingue em cerca de 7 a 10 dias do seu início, exceto pela artralgia que permanece em uma parcela dos indivíduos, caracterizando a fase crônica que pode persistir até por cinco anos. O percentual de acometidos que atingem esta fase varia de acordo com a linhagem disseminada e com a população afetada (CAGLIOTI *et al.*, 2013; MCCARTHY; DAVENPORT; MORRISON, 2018). A CHIKV também está associada a algumas sequelas como a Síndrome de Guillain-Barré, encefalopatias, tendinites, sinovites, distúrbios oculares, dentre outros problemas que são classificados como manifestações atípicas (CAGLIOTI *et al.*, 2013; MASCARENHAS *et al.*, 2018).

Atualmente, não existe terapia licenciada que iniba a replicação do CHIKV, por isso, o tratamento consiste em mitigar os sintomas. Assim, a sintomatologia geralmente é tratada com o uso de antipiréticos, analgésicos e anti-inflamatórios não esteroidais que reduzem a febre e amenizam as dores. Além disso, é válido ressaltar a importância da ingestão de líquidos para manter níveis apropriados de fluídos corporais. Porém, recomenda-se evitar medicamentos com propriedades anticoagulantes. Fisioterapia e acupuntura são indicados como tratamentos alternativos (GANESAN; DUAN; REID, 2017; MASCARENHAS *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2018).

2.6 ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO DO GENOMA DO CHIKV

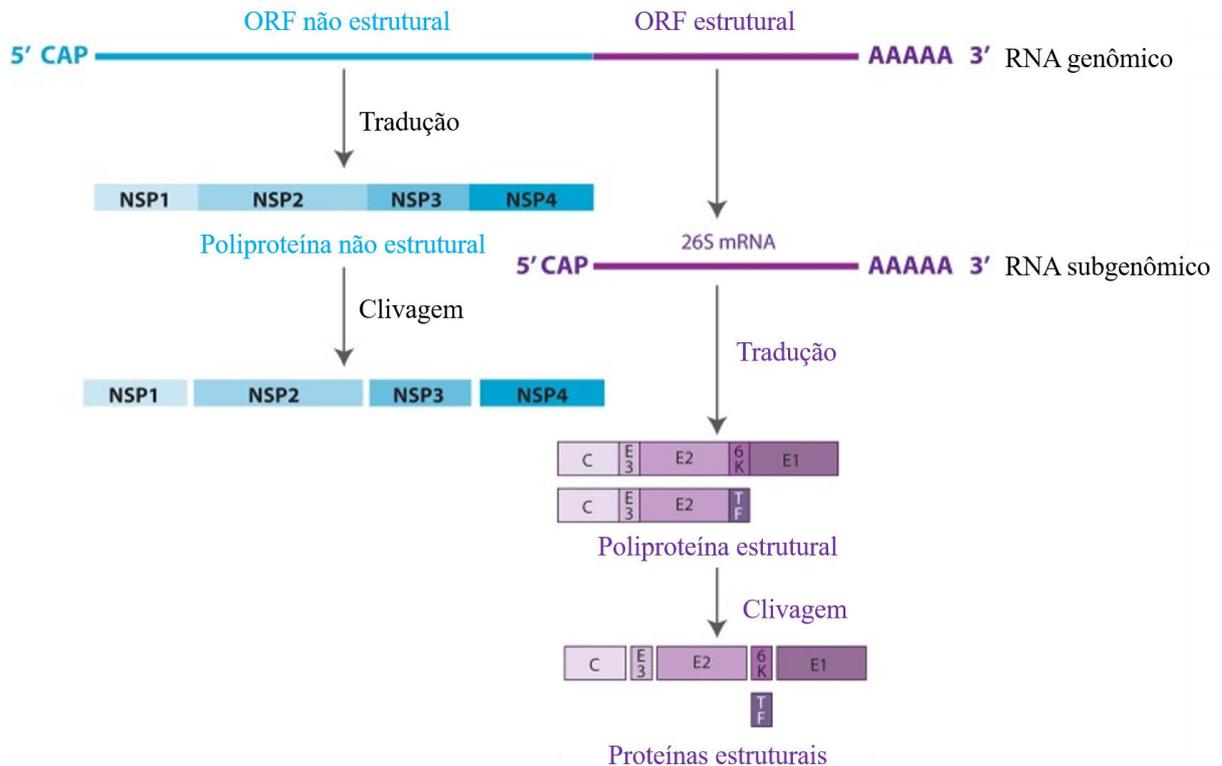
O CHIKV pertence ao gênero *Alphavirus*, Família *Togaviridae*, e possui estrutura icosaédrica com 70 nm de diâmetro composta por um genoma de RNA fita simples (ssRNA) linear envolto pelos capsídeo, membrana e envelope (Figura 4) (GEBHART *et al.*, 2015; YAP *et al.*, 2017).

Figura 4 – Estrutura do CHIKV.

Fonte: Yap *et al.* (2017).

Nota: Corte transversal do CHIKV, composto por: proteínas do envelope (E), membrana, nucleocapsídeo e genoma (RNA) (YAP *et al.*, 2017).

O ssRNA do CHIKV é de fita positiva e possui aproximadamente 12 kb, contendo uma região cap 5' e uma cauda poliA 3' que lhe confere estabilidade, além de acentuar a síntese proteica (LEUNG; NG; CHU, 2011). Este RNA é constituído por duas ORFs (do inglês, *Open Reading Frame* - Fase de leitura aberta) que codificam proteínas não estruturais e estruturais, respectivamente. A primeira ORF tem como produto final as proteínas nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4 que são essenciais no processo de replicação do RNA viral. Contudo, inicialmente é produzida uma poliproteína não estrutural, denominada P123, que posteriormente é clivada gerando os produtos finais citados. Já a segunda ORF, primeiramente gera um transcrito subgenômico de sentido negativo que é controlado pelo promotor 26S. O RNA produzido codifica uma poliproteína estrutural que é clivada, gerando as proteínas C (capsídeo), E1, 6K e p62. Posteriormente, a p62 é clivada dando origem às proteínas E2 e E3 no retículo endoplasmático. Logo, os produtos finais da segunda ORF são: C, E1, E2, E3 e 6K (Figura 5) (CAREY *et al.*, 2019; KENDRA *et al.*, 2018; YAP *et al.*, 2017).

Figura 5 – Genoma do CHIKV, codificação e clivagem de suas proteínas.

Fonte: Acosta-Ampudia *et al.* (2018).

Nota: O RNA genômico dos *alphavirus* é composto por duas ORFs: A primeira gera as proteínas nsP1 a nsP4, após a poliproteína não estrutural nsP1234 ser clivada. A segunda dá origem às proteínas C, E3, E2, 6K e E1 após as clivagens da poliproteína estrutural (ACOSTA-AMPUDIA *et al.*, 2018).

2.7 CONTROLE E PREVENÇÃO

Em se tratando do controle e da prevenção da CHIKF, as maiores apostas são as medidas de proteção pessoal, o controle dos vetores, os programas de educação e a imunização em massa através da vacinação (MASCARENHAS *et al.*, 2018). As medidas de prevenção pessoal consistem na minimização da exposição dos indivíduos aos vetores, através da utilização de repelentes, inseticidas e telas protetoras. O controle dos vetores resume-se na redução da população do vetor, eliminando os criadouros dos mosquitos, principalmente os locais com água parada. Já os programas educativos atuam na transmissão de conhecimentos e orientações através dos meios de comunicação, a fim de que a população saiba, de maneira geral, como agir diante da ameaça do CHIKV (MS, 2017).

Atualmente, no Brasil, existe o Programa Nacional de Apoio ao Combate às Doenças Transmitidas pelo *Aedes* (Pronaedes), que tem como finalidade financiar projetos voltados ao combate da proliferação deste vetor. Este programa foi estabelecido após aprovação da lei de

número 13.301 de 27 de junho de 2016 (artigo 7º). O Brasil conta também com o Programa Nacional de Controle da Dengue, que foi instituído em 24 de julho de 2002, e tem como principal objetivo o controle do *Aedes aegypti* através de ações de profissionais da saúde e da população (FUNASA, 2002). Contudo, frente aos dados epidemiológicos do país, conclui-se que tais programas possuem baixa eficiência no que diz respeito à redução dos vetores (TEICH; ARINELLI; FAHHAM, 2017). Alguns fatores como o crescimento populacional descontrolado, as condições precárias de saneamento básico, as mudanças climáticas e o aumento da resistência dos mosquitos aos inseticidas são apontados como um desafio para a efetividade do combate ao *Aedes* (LIMA-CAMARA, 2016; SILVA *et al.*, 2018).

Sendo a vacinação um potente dispositivo no controle de doenças infecciosas e devido ao fato de que, até o momento atual, não há disponibilidade de vacina licenciada contra o CHIKV, existem muitos estudos que buscam estratégias vacinais eficientes (MASCARENHAS *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2018). São diversas pesquisas envolvendo diferentes abordagens promissoras como partícula viral, vírus atenuado, vacina de DNA, quimérica e de subunidade. Contudo, todas se encontram em fases de testes (GAO; SONG; ZHANG, 2019; POWERS, 2018; VAIRO *et al.*, 2019). Apesar da imunização em massa ser o artifício de controle de melhor razão custo/benefício, a carência com relação à produção da vacina deve-se aos entraves encontrados nas etapas necessárias para a sua validação (WEAVER *et al.*, 2012).

2.8 DIAGNÓSTICO

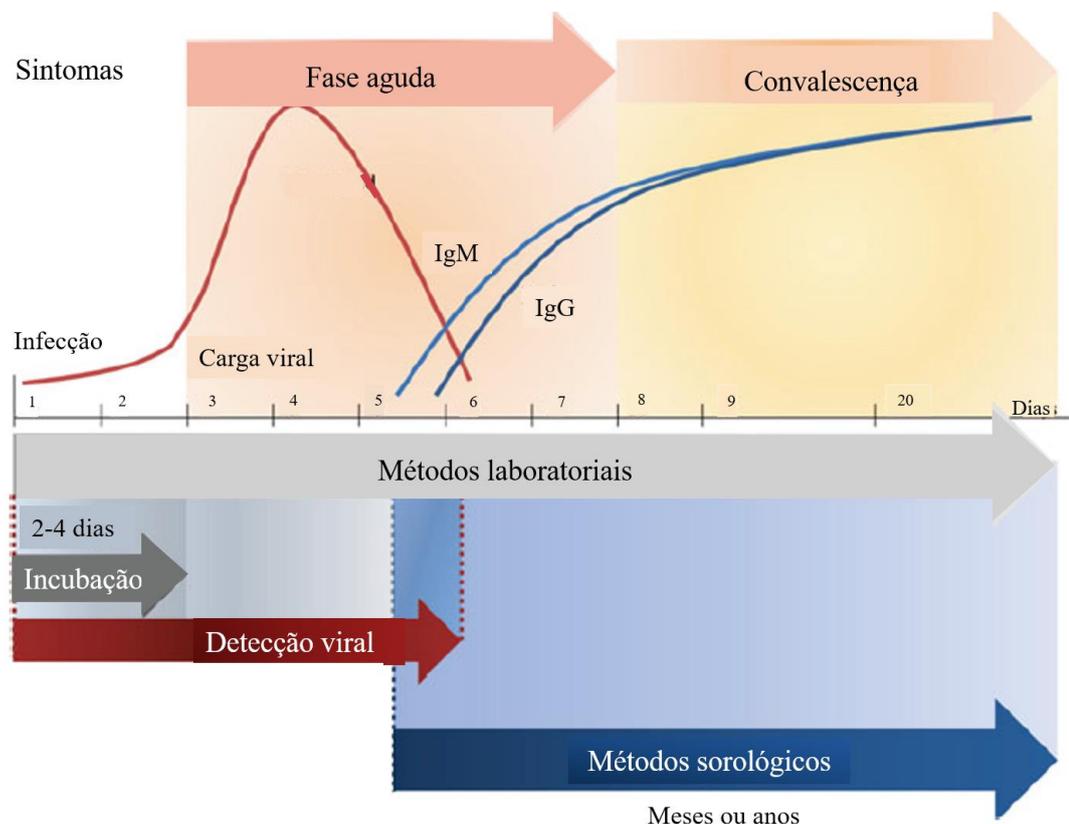
O diagnóstico clínico diferencial entre a CHIKV e outras arboviroses, como Dengue e Zika, é bastante difícil, sobretudo quando estes vírus estão em co-circulação numa determinada área. Isso se deve ao fato de que estas enfermidades provocam aspectos clínicos semelhantes, como febre, erupções cutâneas, dor de cabeça, mialgia e artralgia (CARVALHO *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2018). Neste tipo de diagnóstico é de extrema importância considerar os dados epidemiológicos e avaliar se houve exposição do indivíduo em regiões endêmicas ou com notificações de casos recentes. Leptospirose, malária, artrite pós-infecciosa e infecções causadas por outros *alphavirus*, como o vírus Mayaro, são alguns outros exemplos de doenças que fazem parte do diagnóstico diferencial clínico da Febre Chikungunya (MS, 2017).

Nos casos em que há a solicitação de exames inespecíficos, como o hemograma e testes bioquímicos, o perfil sanguíneo do paciente infectado com o CHIKV possui alterações

idênticas aos perfis causados por outras viroses. Na fase aguda da doença, algumas anormalidades hematológicas apresentadas são: plaquetopenia, leucopenia com neutropenia e linfocitose, além do VSH (Velocidade de Sedimentação das Hemácias) e a Proteína C Reativa elevados (CASTRO *et al.*, 2016; MS, 2017).

Quanto mais cedo e preciso for realizado o diagnóstico da CHIKF, melhor, pois o paciente terá o tratamento adequado, além de ser importante para a prevenção de surtos e vigilância epidemiológica (FUMAGALLI *et al.*, 2018; MARDEKIAN; ROBERTS, 2015). Os testes específicos para o diagnóstico do CHIKV são divididos em dois grupos: virológico, baseado na detecção molecular e isolamento do vírus, e sorológico, baseado na pesquisa de anticorpos. O que determina qual dos exames será utilizado é a data de coleta da amostra em relação ao início dos sintomas. Caso a amostra seja coletada em até seis dias do surgimento das primeiras manifestações clínicas, será realizado um teste virológico, pois, para que este seja válido, é necessário que haja uma viremia elevada. Caso a amostra seja coletada após esse período, será realizado um ensaio sorológico (Figura 6) (JOHNSON; RUSSELL; GOODMAN, 2016; BRASIL, 2014).

Figura 6 – Viremia e resposta imunológica da infecção pelo CHIKV



Fonte: Gaibani; Landini; Sambri (2016, adaptada pela autora).

Nota: Para as amostras coletadas no início da infecção, recomenda-se avaliação por testes virológico devido à alta viremia. A partir do sexto dia após o início das manifestações clínicas, é sugerida a realização de exames sorológicos (GAIBANI; LANDINI; SAMBRI, 2016).

2.8.1 Viroológico

Atualmente, o isolamento viral não é utilizado como exame de rotina para o diagnóstico nos laboratórios, mas é muito usado na pesquisa (SILVA *et al.*, 2018). Este teste consiste na inoculação do soro do paciente com suspeita de infecção por CHIKV em mamíferos, como camundongos, mosquitos ou células em cultura. Para a realização dos ensaios *in vitro*, as células utilizadas devem ser sensíveis ao vírus, por exemplo: BHK-21, HeLa e Vero. Duas células bastante utilizadas são a C6/36 e a AP61, que são derivadas dos *Ae. albopictus* e *Ae. pseudoscutellaris*, por ter maior sensibilidade à infecção pelo CHIKV (MARDEKIAN; ROBERTS, 2015). Entre uma e duas semanas após a inoculação, é possível observar o resultado através da presença ou ausência dos efeitos citopáticos. Tais efeitos podem ser confirmados por técnicas imunológicas, com a utilização de anticorpos anti-CHIKV, como a imunofluorescência, ou por detecção do genoma viral por Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) (DASH; MOHANTY; PADHI, 2011; BRASIL, 2014).

Apesar de ser um exame com alta especificidade (100%), o isolamento viral não é realizado na rotina laboratorial devido a algumas imposições e dificuldades enfrentadas na execução dos testes, como por exemplo os altos custos de manutenção e mão-de-obra especializada. Além disso, o período de coleta em relação ao curso da doença e a inviabilidade da amostra, caso a mesma não seja transportada em temperatura adequada (entre 2 e 8°C), podem influenciar negativamente no resultado que terá um tempo de resposta de, no mínimo, uma semana (MARDEKIAN; ROBERTS, 2015).

Já a pesquisa do genoma viral pode ser feita por três diferentes técnicas: RT-PCR, RT-PCR em tempo real (RT-qPCR) e RT-LAMP (do inglês, *Loop Mediated Isothermal Amplification* – Amplificação Isotérmica Mediada por Loop). Estas técnicas baseiam-se na detecção de ácidos nucleicos e, para a realização de qualquer uma delas, são executadas as seguintes etapas: extração de RNA, amplificação, detecção e, por último, caracterização de sequências específicas do vírus (DASH; MOHANTY; PADHI, 2011; MARDEKIAN; ROBERTS, 2015). Destas, a mais utilizada é a RT-qPCR, que é baseada no anelamento de *primers* ou sondas numa sequência específica do genoma viral e, a partir deste reconhecimento, é gerado um DNA complementar (cDNA) por transcrição reversa. Com o

cDNA é possível realizar a amplificação do produto, que é monitorada em tempo real, pois a cada ciclo é emitida uma fluorescência que é detectada simultaneamente ao processo. Por fim, a quantidade de fluorescência identificada é proporcional à quantidade de RNA viral encontrado na amostra (GULLETT; NOLTE, 2015).

A detecção molecular, quando comparada ao isolamento viral, é mais vantajosa com relação ao tempo de processamento da amostra e leitura do resultado, além de apresentar maior sensibilidade. Outra vantagem é que vários tipos de amostras podem ser submetidos a esses testes, como tecido, soro, plasma ou sangue total (MARDEKIAN; ROBERTS, 2015). Porém, o teste só será válido se a amostra for coletada em até sete dias após o início dos sintomas, quando há uma carga viral alta. Além disso, os equipamentos e reagentes necessários à técnica são de alto custo, o que inviabiliza a sua inserção na rotina de diagnóstico de alguns laboratórios (DASH; MOHANTY; PADHI, 2011; SILVA *et al.*, 2018).

2.8.2 Sorológico

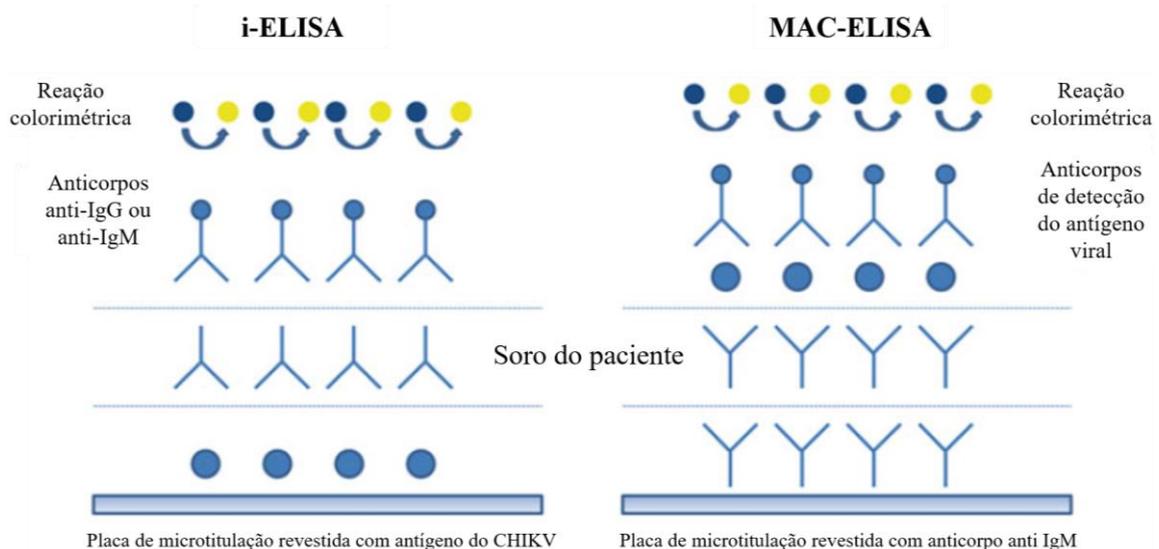
Os testes sorológicos são baseados na pesquisa de anticorpos anti-CHIKV no soro do indivíduo com a suspeita de infecção pelo vírus. As principais técnicas são: o PRNT (do inglês, *Plaque Reduction Neutralization Testing* - teste de neutralização por redução de placas) e o ELISA (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* – ensaio de imunoabsorção enzimática) (MARDEKIAN; ROBERTS, 2015; BRASIL, 2014).

O PRNT é um teste que avalia a capacidade de neutralização viral dos anticorpos séricos anti-CHIKV. A técnica consiste na adição de uma solução do vírus com a amostra sorológica que está sendo analisada, em uma cultura de células que apresentem efeito citopático (placas) frente à infecção por CHIKV. O conjunto é incubado com sobreposição de meio semi-sólido e em determinada temperatura por um período de três a cinco dias. A leitura do resultado é feita através da contagem das placas geradas pela infecção. Quanto maior o número de placas, menor a eficiência da neutralização por meio dos anticorpos presentes no soro do paciente (AZAMI; MOI; TAKASAKI, 2016). O diagnóstico de CHIKV é dado quando a amostra tem um aumento na titulação de anticorpos de, no mínimo, quatro vezes em amostras de fase aguda (coletadas de 6 a 10 dias do início dos sintomas) ou convalescença (coletadas de 10 a 14 dias após início das manifestações) (DASH; MOHANTY; PADHI, 2011; BRASIL, 2014). Apesar de ter alta especificidade, tem como desvantagem a incapacidade de diferenciar imunoglobulinas IgG de IgM, deixando de apontar a fase na qual

a enfermidade se encontra. Além disso, o tempo de processamento da amostra é um problema diante da necessidade de um diagnóstico rápido (MARDEKIAN; ROBERTS, 2015).

Existem dois tipos de ELISA que são amplamente utilizados no diagnóstico do CHIKV: o ELISA de captura (MAC-ELISA) e o ELISA indireto (i-ELISA). O MAC-ELISA é fundamentado na pesquisa de IgM, que é capturado por um anticorpo monoclonal anti-IgM humano que se encontra fixado na placa de microtitulação. Em seguida é adicionado um antígeno do vírus e o anticorpo primário de reconhecimento ao mesmo. Já no i-ELISA, o antígeno é o elemento fixado na placa, onde é colocado o soro do paciente e, posteriormente, é adicionado o anticorpo secundário, sendo este anti-IgG ou anti-IgM humano (Figura 7) (GAIBANI; LANDINI; SAMBRI, 2016). O anticorpo secundário é conjugado a alguma enzima, como por exemplo a peroxidase, que após reagir com seu substrato específico resulta numa reação colorimétrica. Esta reação final é mensurada através de um leitor de ELISA e é diretamente proporcional à quantidade de anticorpos pesquisados no teste (LIN, 2015).

Figura 7 – Representação esquemática do i-ELISA e do MAC-ELISA.



Fonte: Gaibani; Landini; Sambri (2016).

Nota: No i-ELISA, o antígeno é fixado na placa e os anticorpos do soro do paciente infectado o reconhecem. Posteriormente, é adicionado o anti-IgG ou anti-IgM humano conjugado à enzima que catalisará a reação colorimétrica. Já o MAC-ELISA, se inicia com anticorpos anti-IgM humano fixado na placa e este, fará a captura dos IgMs no soro do paciente. Posteriormente, é adicionado o antígeno do vírus e anticorpos que o detectam conjugados à enzima que cataliza a reação colorimétrica (GAIBANI; LANDINI; SAMBRI, 2016).

O ELISA é um teste rápido e, atualmente, alguns kits são licenciados e estão disponíveis para a comercialização com parâmetros aceitáveis. Porém, são relatados alguns

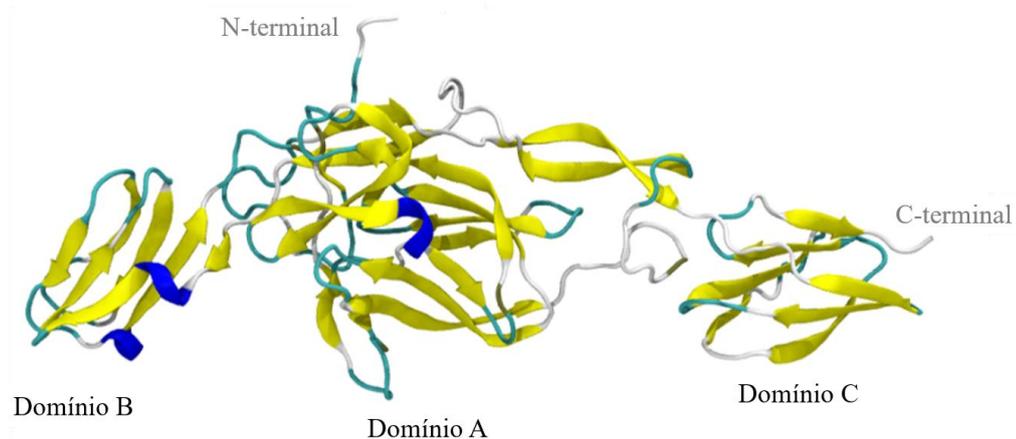
problemas com resultados falso-positivos devido à reação cruzada com outros *alphavirus*, como por exemplo o vírus Mayaro (endêmico na região Norte do Brasil) (NATRAJAN; ROJAS; WAGGONER, 2019). Assim, recomenda-se que o PRNT seja executado para confirmar o resultado do ELISA. Neste teste de confirmação, deve-se incluir algum outro *alphavirus*, a fim de validar a especificidade do ensaio, contudo, nem sempre será possível realizar o PRNT (BRASIL, 2014; GAIBANI; LANDINI; SAMBRI, 2016).

2.9 A GLICOPROTEÍNA E2

A E2 é uma glicoproteína que, juntamente com a E1, confere forma às espículas triméricas do CHIKV. As duas macromoléculas se unem formando um heterodímero no qual ambas possuem endo e ectodomínios, ou seja, domínios localizados nas regiões interna e externa do vírus, respectivamente (BYRD; KIELIAN, 2018). A referida proteína também faz interação com a E3 e, juntas, apresentam um papel importante na montagem e replicação viral (SNYDER; MUKHOPADHYAY, 2012).

A principal função da proteína E2 é intermediar a entrada do vírus na célula hospedeira, que acontece através de endocitose mediada por receptor (BERNARD *et al.*, 2010; SMITH *et al.*, 1995; SONG *et al.*, 2019). Por fazer interação com o receptor da célula, estudos apontam que esta proteína pode ter relação com o tropismo celular do CHIKV (WEGER-LUCARELLI *et al.*, 2016). Além disso, a E2 apresenta características de imunogenicidade, sendo capaz de desencadear resposta imunológica nos indivíduos infectados. A partir disso, foi observado que a E2 possui epítomos que podem ser utilizados na detecção de anticorpos, para o diagnóstico de CHIKV, e na produção de vacinas e terapias (FOX *et al.*, 2015; JIN *et al.*, 2015; WEGER-LUCARELLI *et al.*, 2015).

A proteína E2 é dividida em três diferentes domínios: A, B e C. O domínio A se localiza na porção central da proteína (N-terminal), o domínio B na ponta distal e o C na região proximal (C-terminal) ancorando toda a molécula na bicamada lipídica (Figura 8) (BASORE *et al.*, 2019; VOSS *et al.*, 2010).

Figura 8 – Domínios da proteína E2.

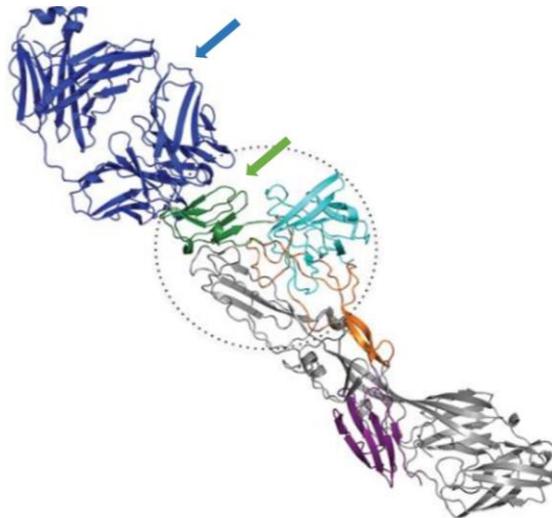
Fonte: Voss *et al.* (2010).

Nota: Os domínios A, B e C da proteína E2, sendo o A central na porção N-terminal, o B na lateral e o C na porção C-terminal.

2.9.1 O domínio B

O domínio B da proteína E2 (DBE2) do vírus Chikungunya se encontra no ápice das espículas virais, estando exposto ao microambiente celular. Estudos demonstram que o DBE2 possui resíduos que fazem a interação com o receptor celular responsável pela endocitose do vírus e, conseqüentemente, da infecção da célula (SONG *et al.*, 2019; VOSS *et al.*, 2010).

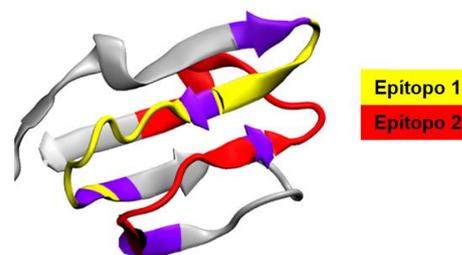
Estudos também apontam que este domínio possui potencial imunogênico, desempenhando um papel relevante na ativação da resposta imune específica contra o CHIKV. Além disso, o DBE2 se mostra importante em se tratando de neutralização viral. Foram mapeados quatro epítomos na região do referido domínio, sendo dois destes indutores da produção de anticorpos neutralizantes, ou seja, anticorpos que impedem a entrada do vírus na célula hospedeira (Figura 9), impedindo a infecção viral (FOX *et al.*, 2015; WEGER-LUCARELLI *et al.*, 2015).

Figura 9 – Interação do DBE2/CHIKV com o anticorpo.

Fonte: Fox *et al.* (2015).

Nota: Interação entre o DBE2/CHIKV e o anticorpo, sendo o domínio B marcado pela seta de cor verde e o anticorpo marcado pela seta em azul marinho.

Baseando-se no potencial imunogênico do DBE2/CHIKV, foram realizados estudos *in silico* da sua estrutura tridimensional extraída da proteína. Através de biomodelagem, foram feitas simulações computacionais para avaliar a estabilidade de sua estrutura terciária e a conformação dos epítomos no domínio isolado (Figura 10). Este se mostrou estável, mantendo a sua estrutura idêntica ao que se apresenta na proteína nativa. Toda parte computacional foi executada no Departamento de Virologia e Terapia Experimental do IAM/FIOCRUZ, pelos colaboradores Marjorie C. L. Cavalcanti Freire e Carlos Henrique Bezerra da Cruz do grupo BIOMAT (Biomaterial Modelling), coordenada pelo doutor Roberto Lins (dados ainda não publicados).

Figura 10 – Estrutura do DBE2/CHIKV e seus epítomos.

Fonte: Msc. Marjorie Freire (dados ainda não publicados) e adaptada pela autora.

Nota: Estrutura tridimensional do DBE2 evidenciando em vermelho e amarelo seus epítomos neutralizantes mapeados. A cor violeta representa os resíduos que são reconhecidos pelos anticorpos monoclonais neutralizantes.

Assim, o presente trabalho visou a produção de anticorpos policlonais contra este domínio, para oferecer suporte a um estudo de validação de vacina de DNA contra o CHIKV, além de avaliação e a aplicabilidade do DBE2/CHIKV no diagnóstico sorológico de Chikungunya.

3 JUSTIFICATIVA

A Febre Chikungunya promove taxas significativas de morbidade, gerando um impacto social e econômico pela sua característica debilitante. Assim, faz-se necessário buscar medidas efetivas de controle e prevenção da doença, visto que, atualmente, ainda não existe vacina ou terapia licenciada disponível contra esta virose. Principalmente, devido ao fato do Brasil ser considerado alvo de surtos epidêmicos pelas condições climáticas e sanitárias favoráveis à proliferação do vetor.

A vacinação é uma das armas mais eficientes na prevenção de infecções e a produção de uma vacina contra o CHIKV é uma intervenção eficaz no controle da doença, juntamente com o combate ao mosquito transmissor. Uma vez que as técnicas imunológicas têm um papel importante nos estudos de desenvolvimento de vacinas, o presente trabalho teve a finalidade de produzir anticorpos policlonais que detectam o domínio B da proteína E2 do vírus Chikungunya. Estes anticorpos foram utilizados para dar suporte a um trabalho de validação de uma vacina de DNA contra a referida doença, baseada nessa proteína, através de ensaios de *western blot* e ELISA. Tal estudo de validação continua sendo realizado no Departamento de Virologia e Terapia Experimental do Instituto Aggeu Magalhães.

Este trabalho também tem como objetivo avaliar a aplicabilidade do DBE2/CHIKV como antígeno no diagnóstico sorológico da Chikungunya, por meio de ensaios de ELISA, visto que o diagnóstico precoce é importante para que sejam realizadas as medidas de controle, prevenção e tratamento dos indivíduos infectados.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

- Obter anticorpos policlonais capazes de reconhecer o domínio B da proteína E2 do vírus Chikungunya e avaliar o potencial diagnóstico deste domínio.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Expressar a proteína recombinante DBE2/CHIKV;
- Produzir soros com anticorpos policlonais específicos contra o DBE2/CHIKV;
- Avaliar a eficiência dos anticorpos produzidos quanto ao reconhecimento da respectiva proteína recombinante;
- Avaliar a aplicabilidade do DBE2/CHIKV no diagnóstico sorológico da Chikungunya.

5 PERGUNTAS CONDUTORAS

Pergunta 1: Os anticorpos policlonais produzidos reconhecem o DBE2/CHIKV, com sensibilidade e especificidade, frente a extratos de células Vero infectadas com o Vírus Chikungunya ou a própria proteína heteróloga expressa em procariotos?

Pergunta 2: O antígeno DBE2/CHIKV é uma molécula promissora para ser utilizada no diagnóstico sorológico de Chikungunya?

6 HIPÓTESES

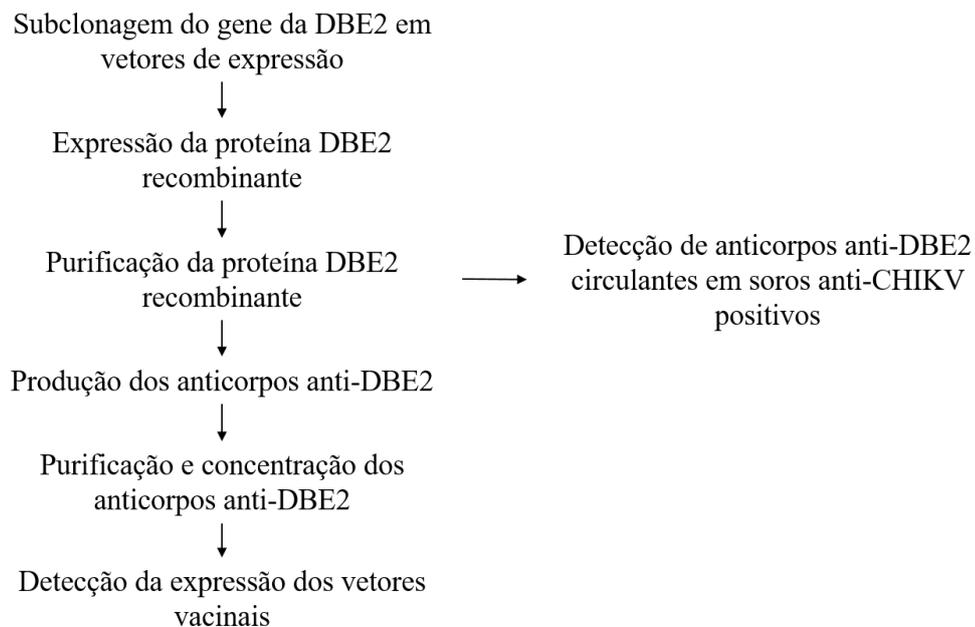
Hipótese 1: Os anticorpos policlonais produzidos reconhecem o DBE2/CHIKV, com sensibilidade e especificidade, frente a extratos de células Vero infectadas com o Vírus Chikungunya ou a própria proteína heteróloga expressa em procariotos.

Hipótese 2: O antígeno DBE2/CHIKV é uma molécula promissora para ser utilizada no diagnóstico sorológico de Chikungunya.

7 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

Segue abaixo (Figura 11) um fluxograma de maneira resumida dos procedimentos metodológicos realizados para cumprir os objetivos deste trabalho.

Figura 11 – Fluxograma dos procedimentos metodológicos.



Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: Fluxograma esquemático em resumo dos procedimentos metodológicos realizados no presente trabalho.

7.1 TRANSFORMAÇÃO E DIGESTÃO DO GENE DBE2

A sequência gênica que codifica o domínio B da proteína E2 do vírus Chikungunya encontrada no GenBank foi otimizada para expressão em *E. coli* e sintetizada comercialmente pela empresa GenScript (EUA), e o gene foi inserido no plasmídeo de clonagem pUC57 simples. A construção foi enviada liofilizada para o Brasil com o intuito de conservar o material biológico. Ao chegar no laboratório, o DNA foi ressuspensionado em água ultrapura autoclavada.

A fim de produzir mais da construção plasmidial sintetizada, foi realizada a transformação de 500 ng do plasmídeo em células de *E. coli* quimiocompetentes, da linhagem TOP 10. A transformação foi feita por choque térmico, aplicando-se o DNA em 50 µL de células, seguida de incubação por 30 minutos no gelo e a 37°C por 2 minutos, e, por último, um novo resfriamento. Após a transformação, as células foram semeadas em meio de cultura

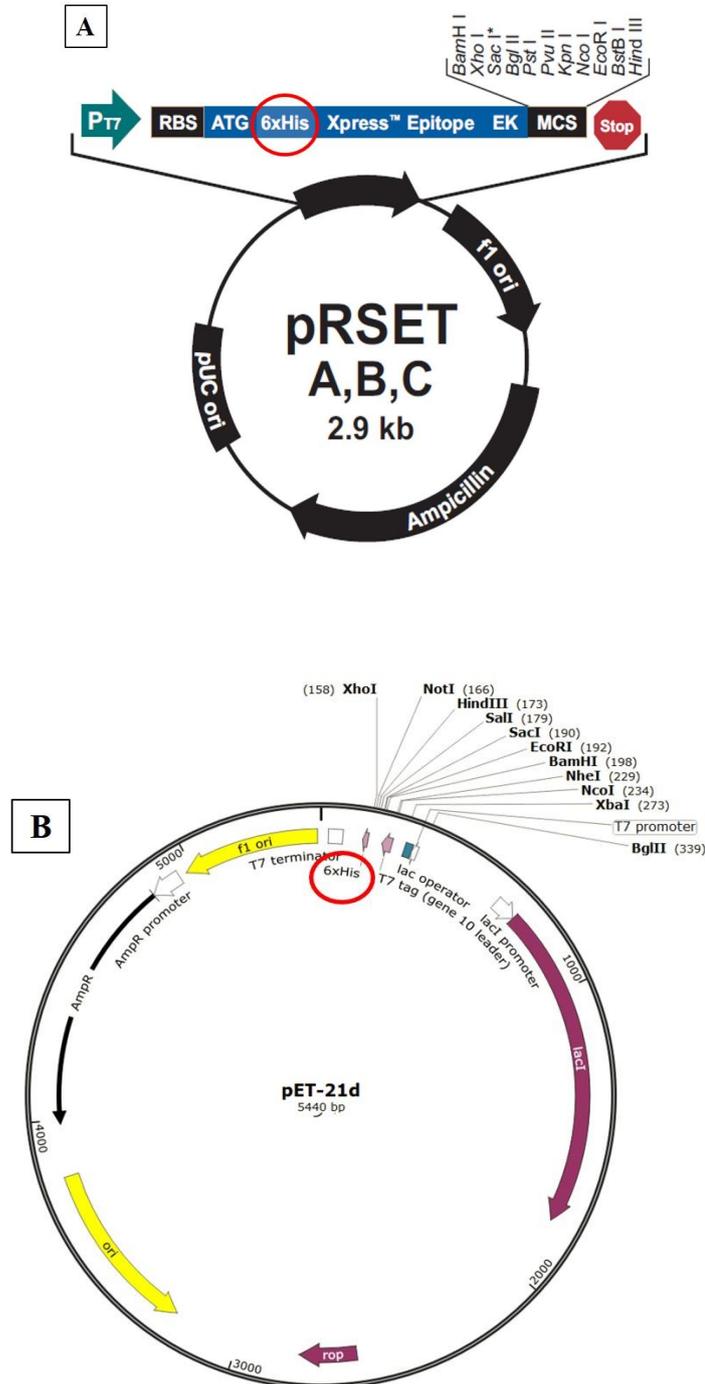
sólido LB/AMP (Lúria-Bertani contendo 50 µg/mL de Ampicilina) e incubadas na estufa a 37°C por 16 horas. As colônias formadas na placa foram utilizadas para extração de DNA plasmidial em pequena escala (minipreparação) através do AxyPrep™ Plasmid Miniprep Kit (Axygen Bioscience), conforme as recomendações do fabricante.

As amostras foram então submetidas à digestão enzimática dupla com o intuito de liberar o gene DBE2/CHIKV, para posterior subclonagem. Foram realizados dois ensaios de digestão diferentes: um utilizando as enzimas de restrição NheI/NcoI (para subclonagem no vetor pRSETA) e outro com as enzimas HindIII/XhoI (para subclonagem no vetor pET21d). As digestões foram feitas utilizando 1 µg de DNA, 0,2 µL de cada enzima (5 U/µL) tampão Anza™ Red (10x) e água para completar o volume final quando necessário. Em seguida as amostras foram incubadas a 37°C por 30 minutos. A confirmação das digestões foi observada em eletroforese de gel de agarose (1%), corados com brometo de etídio e visualizados no transluminador de luz ultravioleta.

7.2 SUBCLONAGEM DO GENE DO DBE2 EM VETORES DE EXPRESSÃO

Para as etapas de subclonagem, foram realizadas digestões do pUC57/DBE2 e dos vetores de expressão procariótica pRSETA e pET21d, com as enzimas correspondentes (NheI/NcoI para o pRSETA e HindIII/XhoI para o pET21d). Os dois plasmídeos acrescentam uma sequência de seis histidinas à proteína de interesse no momento da tradução em sistema procariótico, porém o pRSETA promove a fusão da cauda na porção N-terminal (His/DBE2) (Figura 12A), enquanto o pET21d permite a expressão com a fusão na porção C-terminal do domínio proteico (DBE2/His) (Figura 12B). As digestões foram então submetidas à eletroforese em gel de agarose (0,8%), visualizadas ao transluminador de luz ultravioleta e os fragmentos de interesse foram purificados com o MinElute® Purification Kit (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante.

Figura 12 – Mapas de restrição dos vetores pRSETA e pET21d.



Fontes: (A) Invitrogen (2010); (B) Ls (2015).

Nota: (A) Mapa de restrição do pRSETA. Em destaque o posicionamento da sequência que codifica a cauda de histidina. (B) Mapa de restrição do pET21d. Em destaque o posicionamento da sequência que codifica a cauda de histidina.

Em seguida, o gene do DBE2 foi submetido ao ensaio de ligação utilizando diferentes proporções de plasmídeo e inserto (1:2, 1:3 e 1:6). Para este ensaio, foram utilizados os programas Nanodrop 2000™ (para a quantificação das amostras em ng/μL por

espectrofotometria) e a plataforma online NEBioCalculator™ (para calcular a quantidade de inserto adequada para cada proporção). A ligação foi realizada através da Anza™ T4 DNA Ligase Master Mix, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante.

As subclonagens foram verificadas de três formas diferentes. A primeira, por digestão de confirmação, utilizando as mesmas enzimas de restrição aplicadas na ligação. A segunda, por prova de digestão, utilizando uma enzima que atua num sítio de restrição interno ao gene e uma outra que intervêm num sítio presente no vetor (para a identificação do mapa de restrição da construção e seleção dos sítios, foi utilizado o *software* ApE – A Plasmid Editor). E a terceira, por sequenciamento de Sanger, cujas amostras foram enviadas para o Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do Instituto Aggeu Magalhães e foram processadas no sequenciador ABI 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems). Os sequenciamentos foram analisados nos programas SeqMan, MegAlign e EditSeq, do pacote DNA Star (Lasergene) e na plataforma online BLAST® NCBI.

7.3 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Para a expressão das proteínas fusionadas à sequência de poli-histidina, as construções foram transformadas em células de *E. coli* BL21 por choque térmico, seguindo o mesmo protocolo utilizado para a cepa TOP 10, descrito anteriormente. Após a transformação, foi realizado o semeio das células em meio LB/AMP sólido e a incubação da placa em estufa a 37°C por 16 horas.

Inicialmente, foram feitos testes de indução da expressão proteica heteróloga em pequena escala a fim de avaliar quais as melhores condições de temperatura para obter um maior rendimento da proteína alvo. Uma colônia com cada construção plasmidial obtida foi inoculada em 5 mL de LB/AMP líquido e foram crescidas a 37°C por 16 horas, sob agitação de 180 rpm. Em seguida, 500 µL destas células foram inoculados em 10 mL do mesmo meio de cultura para dar prosseguimento a análise da expressão, enquanto o restante do cultivo foi estocado a -80°C com glicerol na proporção de 1:1 para uso posterior. Nesta etapa, o crescimento celular foi monitorado através da densidade ótica (OD – do inglês, *Optical Density*), fazendo a leitura pelo espectrofotômetro com o comprimento de onda de 600 nm. Ao atingir a OD entre 0,5 e 0,8 foi adicionado o IPTG (isopropil-β-D-tio-galactosídeo), para a concentração final de 1 mM, que atua como um indutor da síntese proteica. Após a adição do IPTG, foram separadas três alíquotas de 2 mL e submetidas a diferentes temperaturas e intervalos de tempo: 37°C por 2 horas, 30°C por 4 horas e 18°C por 16 horas.

Para analisar o rendimento da expressão, extratos de células aliqüotados antes e após o acréscimo do indutor foram levados à eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) e corados com Azul de Coomassie R-250. Assim, foi possível comparar o perfil das amostras pré e pós indução e analisar a produção e o rendimento da proteína em estudo com o tamanho esperado de 7,8 kDa para a DBE2/His, produto da construção plasmidial pET21d/DBE2 e 8,3 kDa para a His/DBE2, produto da expressão do pRSETA/DBE2.

Após a escolha da temperatura, foi possível fazer a indução da expressão em larga escala, utilizando um inóculo de 25 mL em uma cultura de 500 ml, para que posteriormente fosse realizada a purificação da proteína recombinante.

7.4 PURIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

A cultura que passou pelo processo de indução da expressão foi centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos, formando um sedimento bacteriano, que por sua vez, foi ressuspensionado em 20 mL de tampão de equilíbrio (20 mM de Na₂HPO₄, 300 mM de NaCl, 30 mM de imidazol, pH 7,4). A suspensão foi submetida ao processo de ultrassonicação, com seis pulsos de 30 segundos com intervalos de 1 minuto, para a lise bacteriana. Para assegurar que o máximo de células possível fosse lisado, foi adicionado 1% de detergente Triton-X.

A purificação realizada tem como princípio a cromatografia de afinidade por íons metálicos (IMAC – do inglês, *Immobilized Metal Affinity Chromatography*), na qual foi utilizada uma resina de níquel ativada que possui afinidade pela carga positiva, característica das caudas de histidina. Após a lise celular, o material foi centrifugado por 15 minutos, a 20.000 rpm, a 4°C e, foram adicionados 10 mM de 2-mercaptoetanol ao sobrenadante. Este reagente atua como redutor e inibe a formação de ligações dissulfeto entre os resíduos de cisteína encontrados na DBE2/CHIKV, assim, evitando a formação de dímeros proteicos. Então, o sobrenadante foi incubado por 1 hora a 4°C sob leve agitação com 700 µL da resina HisPur™ Ni-NTA (Thermo Fisher), previamente equilibrada como recomenda o fabricante. Após a incubação, foi realizada uma centrifugação de 700 g por 2 minutos, o sobrenadante foi descartado e foram realizadas três lavagens com 1,4 mL do tampão de lavagem (20 mM de Na₂HPO₄, 300 mM de NaCl, 40 mM de imidazol, pH 7,4). Por último, foram feitas duas eluições, nas quais a resina foi ressuspensionada em 700 µL de tampão de eluição (20 mM de Na₂HPO₄, 300 mM de NaCl, 500 mM de imidazol, pH 7,4) por duas vezes e incubada sob leve agitação a 4°C. A primeira eluição foi incubada por 1 hora e a segunda por 16 horas. Foram separadas alíquotas de cada etapa para posterior análise em gel SDS-PAGE.

Foram realizados dois métodos de quantificação das proteínas purificadas: um por comparação com a proteína de referência Albumina Sérica Bovina (BSA - do inglês, *Bovine Serum Albumin*) de concentração conhecida e outro por espectrofotometria. O sistema comparativo foi utilizado para quantificar as proteínas imobilizadas em SDS-PAGE utilizadas na produção dos anticorpos. Com este método, foi possível estimar a concentração da proteína de interesse por comparação com o padrão de massas do BSA, através do programa de domínio público *ImageJ* e da elaboração de uma curva padrão ($R^2 > 0,95$). Já a espectrofotometria foi realizada para quantificar as proteínas em condição solúvel aplicadas ao ELISA. Para isto, foi utilizado o equipamento *Biowave II UV/Visible Spectrophotometer* com a espectroscopia à 280 nm, seguido da correção pelo coeficiente de extinção molar. Este coeficiente foi calculado a partir da sequência de aminoácidos da proteína em estudo, através da plataforma online gratuita ProtParam (disponível em <https://web.expasy.org/protparam/>).

7.5 PRODUÇÃO DOS SOROS HIPERIMUNES ANTI-HIS/DBE2

Ao obter um total de 1 miligrama da proteína alvo, os purificados foram submetidos a eletroforese em gel de poliácridamida de 15%. Em seguida o gel foi corado com Stain (0,1% Comassie Blue G-250, 25% metanol e 5% ácido acético) e descorado com Destain (5% ácido acético e 10% metanol) para visualização das bandas. Ao identificar a proteína de interesse, a mesma foi excisada do gel e enviada para a empresa Célula B da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para a produção dos soros policlonais anti-His/DBE2 positivos, através da imunização de dois coelhos.

Após as imunizações, foram obtidos cerca de 25 mL de soro de cada coelho, que nos foi enviado pela empresa. Ao chegar no laboratório, o soro foi fracionado em alíquotas de 1 mL e armazenado a -20°C .

7.6 PURIFICAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DO ANTI-HIS/DBE2

A purificação dos anticorpos de reconhecimento específico da His/DBE2 foi realizada através da técnica de imunoabsorção. Para isso, foi necessário submeter 150 μg da proteína de interesse purificada por IMAC à corrida eletroforética em SDS-PAGE 15% e transferi-la para uma membrana de PVDF 0,2 μm (Thermo Fisher Scientific) através de sistema de transferência semiseco. Após a transferência, a membrana foi corada com *ponceau* (Sigma Aldrich) para que fosse possível visualizar as bandas. Ao identificar a banda da proteína alvo,

a mesma foi excisada da membrana e incubada com 1 mL do soro anti-his/DBE2 positivo a 4°C por 48 horas sob agitação.

Após o período de incubação, o soro foi descartado e a membrana foi lavada 3 vezes com PBS 1x. Em seguida, a etapa de eluição foi realizada adicionando 200 µL de uma solução de glicina 1M pH 2.5 e vortexando o conjunto por 5 minutos para que os anticorpos desprendessem das proteínas. Posteriormente, o sobrenadante foi passado para um tubo novo de microcentrífuga e foi adicionado 10% de tris-HCl pH 8.0 a fim de alcalinizar o meio.

Objetivando aumentar a sensibilidade do anticorpo purificado, foi realizado o processo de concentração do mesmo através da utilização do concentrador Amicon® Ultra 0,5 mL (Merck Millipore) com *cut off* 3kDa. A solução obtida na purificação dos anticorpos foi colocada na coluna de concentração e levada à centrifugação por 5 minutos a 14.000 rpm, assim, sendo concentrada 2x. Por último, os anticorpos purificados foram armazenados a -20°C.

7.7 CURSO DA INFECÇÃO POR CHIKV EM CÉLULAS VERO (ATCC® CCL81™)

Visando avaliar se os anticorpos produzidos identificam o CHIKV através do reconhecimento da glicoproteína viral E2 em amostras de células infectadas, através de *western blot*, foi realizado o acompanhamento do curso da infecção em células Vero. Por meio deste ensaio, também foi possível identificar o tempo de infecção e a Multiplicidade da Infecção (MOI) no qual as proteínas virais estão mais concentradas no extrato celular. Para isto, foram células Vero foram infectadas com os MOIs de 0,01, 0,1, 0,5 e 1 PFU/cél, excluído o controle negativo (sem infecção). Foram realizadas coletas e preparação de extratos celulares de 8 em 8 horas a partir do momento da infecção (T₀) até o tempo total de 24 horas.

Inicialmente, foi preparado um frasco T25 (Corning®) para cada amostra de cultura a ser coletada com 5×10^5 células/mL em 1 mL de Meio Essencial Mínimo (MEM) (Gibco™), suplementado com 10% de Soro fetal Bovino (SFB) termicamente inativado e 1% de Penicilina-Streptomicina (Pen-Strep) (Gibco™). Posteriormente, completou-se o meio para um volume final de 8 mL em cada frasco e os mesmos foram incubados semiabertos a 37°C em atmosfera de 5% de dióxido de carbono (CO₂), em incubadora de CO₂, para aderência e expansão celular.

Após 24 horas de incubação, todo o meio de cultura foi descartado e substituído por 500µL de MEM, desta vez suplementado com 2% de SFB, e 500 µL de MEM, sem

suplementação, com a concentração de CHIKV necessária para obter o MOI de escolha anteriormente. O vírus da cepa denominada *CHIKV/H.sapiens/Brazil/PB-302/2016* foi previamente estocado, titulado e doado pela Msc. Irassandra Uchôa, doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biociência e Biotecnologia em Saúde. Em seguida, foi realizada a adsorção, mantendo as células a 37°C, 5% CO₂, por 1 hora, sendo homogeneizadas a cada 15 minutos. Após esta etapa, foi adicionado MEM 2% SFB para um volume final de 8 mL e as culturas foram colocadas novamente na incubadora de CO₂. Neste momento, foi marcado o tempo 0 (T₀) da infecção.

7.7.1 Obtenção do extrato celular

Ao atingir os tempos programados para as coletas das culturas infectadas (T₁ = 8 h, T₂ = 16 h e T₃ = 24 h), as células foram desprendidas da superfície do frasco com o *Cell Scraper* e levadas à centrifugação por 15 minutos a 4.300 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi incubado por 30 minutos no gelo, com o tampão de lise RIPA (Sigma Aldrich) contendo inibidor de proteases. O conjunto foi novamente submetido a centrifugação, dessa vez a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C. A dosagem das proteínas foi realizada pelo método de Bradford (BIO-RAD) conforme as recomendações do fabricante.

7.8 ENSAIOS DE WESTERN-BLOT

Foram realizados ensaios de *western blot* a fim de avaliar a sensibilidade e especificidade dos anticorpos produzidos na identificação do His/DBE2. Além disso, também foi analisada a detecção das proteínas produtos da expressão dos vetores vacinais contra o CHIKV e que foram expressas em sistema eucarioto, através de transfecção em células HEK293T. O quadro 1 mostra as macromoléculas alvo e suas especificações.

Quadro 1 – Proteínas em estudo no projeto de vacina de DNA contra o CHIKV.

Proteína	Especificações
DBE2/WT	Não possui cauda fusionada a DBE2. WT do inglês, <i>Wild Type</i> - Tipo selvagem. Traduzida através de um vetor de expressão para camundongos (p43.2).
DBE2/C-lamp Camundongo	Possui uma cauda lamp (do inglês, <i>Lisosomal Associated Membrane Protein</i> - Proteína de Associação à Membrana Lisossomal) na sua porção C-terminal. Traduzida através de um vetor de expressão para camundongo (p43.2).
DBE2/C-lamp Humano	Possui uma cauda lamp na sua porção C-terminal. Traduzida através de um vetor de expressão para humanos (p8L).
DBE2/Big-lamp	Possui uma cauda lamp nas suas regiões C- e N-terminal. Traduzida através de um vetor de expressão para humanos (p8L).

Fonte: Elaborado pela autora.

Estes ensaios foram iniciados com o fracionamento eletroforético das amostras de interesse, seguida de suas transferências para membranas de PVDF 0,2 µm (Thermo Fisher Scientific) em sistema semisseco. Após a transferência, foi iniciado o ensaio de *western blot*, que consiste em 3 etapas: na primeira, as membranas foram incubadas em solução de leite desnatado 5% (Molico) em TBS Tween-20 (20 mM Tris, 500 mM NaCl, Tween 20 1%, pH 7,5) por 1 hora, sendo este o processo de bloqueio das membranas. Na segunda etapa, as mesmas foram incubadas com o anticorpo primário de reconhecimento específico da proteína de interesse, utilizando diversas diluições em solução de leite durante 16 horas a 4°C. Após a realização de 3 lavagens de 10 minutos com TBS Tween-20, foi realizada a terceira etapa na qual as membranas foram incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário, conjugado à peroxidase, em solução de leite, também com diluições variadas. Por último, foram repetidas as lavagens das membranas e seguiu-se para a revelação. O quadro 2 mostra os anticorpos aplicados, suas respectivas marcas, diluições e a etapa na qual os mesmos foram utilizados nos ensaios.

Quadro 2 – Diluições e etapas dos anticorpos nos ensaios de *western blot*.

Anticorpo	Produção	Diluição	Etapa
Anti-His/DBE2	<i>in house</i>	1:500	Primário
Anti-IgG camundongo	Sigma Aldrich	1:5.000	Secundário
Anti-IgG coelho	Invitrogen	1:10.000	Secundário
Beta-actina	Invitrogen	1:1.000	Primário
Soro 1	Célula B	1:1.000	Primário
Soro 2	Célula B	1:1.500	Primário

Fonte: Elaborado pela autora.

Para revelar as proteínas, após as lavagens, as membranas foram incubadas por 3 minutos em uma solução comercial de quimioluminescência Novex® ECL HRP (Invitrogen) e, em seguida, foram reveladas no equipamento ImageQuant™ LAS 500 (GE).

7.9 ENSAIOS DE ELISA INDIRETO

Ensaios de ELISA indireto foram padronizados com dois objetivos: (a) avaliar o reconhecimento e o limite de detecção do soro de coelho anti-His/DBE2 positivo através desta técnica e (b) analisar o potencial diagnóstico da His/DBE2 através do seu reconhecimento por soros humanos anti-CHIKV positivos. Para isto, placas de 96 poços (Corning® 3690) foram sensibilizadas por 16 horas, a 4°C, em câmara úmida, com variadas concentrações do antígeno His/DBE2 em tampão carbonato/bicarbonato (0,2 M, pH 9,4). As concentrações de 100 ng/mL a 100 fg/mL em diluição seriada 1:10 foram utilizadas para a identificação do limite de detecção do sistema com o soro de coelho. Já para o sistema com soros humanos, a concentração do antígeno foi de 500 ng/mL, definida na etapa de padronização. Após incubação, o conteúdo foi descartado e os poços foram bloqueados por 15 minutos com solução de PBS Tween-20 (0,1%) e leite (5%). Em seguida, foram adicionados os soros na proporção de 1:50 em solução de leite e foram incubados por 2 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, foram realizadas 5 lavagens com PBS Tween-20 0,1%, para que, em seguida, fosse colocado o anticorpo secundário associado à peroxidase também em solução de leite, sendo incubados por 1 hora em temperatura ambiente. O anti-IgG Humano (Jackson) foi utilizado na diluição de 1:30.000 e o anti-IgG Coelho (Invitrogen) na proporção de 1:10.000. As lavagens foram repetidas e foi adicionado TMB Peroxidase Substrate™ (Sera Care) que atuou por 30 minutos ao abrigo de luz para revelar os resultados. A reação foi interrompida com 50 µL de HCl 1N por poço e, por último, foi feita a leitura das placas no

espectrofotômetro de microplaca *Benchmark Plus* da BIO-RAD utilizando o programa *Microplate Manager 5.2* a 450 nm.

7.10 DETECÇÃO DE ANTI-DBE2 EM SOROS HUMANOS

Foram analisados 90 soros do painel de amostras do Inquérito de Arboviroses do Recife da Fiocruz Pernambuco, coletados entre setembro de 2018 e agosto de 2019 na Região Metropolitana do Recife. Estes soros foram previamente caracterizados pela presença ou ausência de IgG anti-CHIKV através do teste de ELISA indireto comercial Euroimmun. As amostras foram separadas em 4 grupos: o CHIKV +, que apresentavam o IgG anti-CHIKV (n= 34); o ZIKV +, positivos para IgG anti-ZIKV (n=27); o DENV +, com IgG anti-DENV (n=21); e o grupo dos Sadios, sendo negativo para os três anticorpos pesquisados (n= 8). Cada soro foi analisado em duplicata e os valores médios de OD foram utilizados para calcular o resultado do teste com respostas dicotômicas: positivo (acima do *cut off* - ponto de corte de positividade) ou negativo (abaixo do *cut off*). O *cut off* foi definido a partir da média da OD do grupo já testado negativo somado ao dobro do desvio padrão da média deste mesmo grupo.

7.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram calculadas as estimativas de parâmetro de diagnóstico (sensibilidade e especificidade) do teste para expressar a sua confiabilidade em detectar a infecção por CHIKV através da ferramenta online gratuita *MedCalc's Diagnostic Test Evaluation Calculator* (disponível em https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_teste.php). Os gráficos de dispersão e de linhas foram gerados utilizando o software *SigmaPlot* versão 12.5 e a curva ROC foi gerada no software *GraphPad Prism* versão 5.0 para Windows.

7.12 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

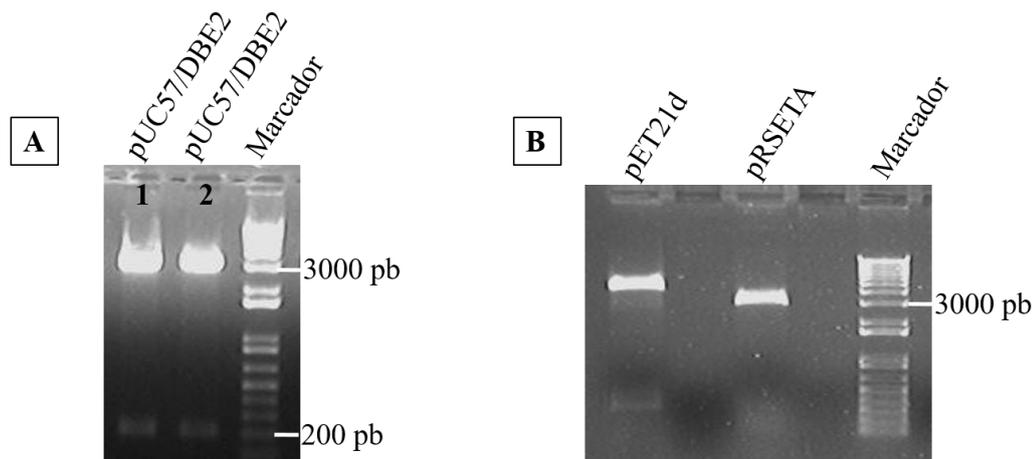
A empresa Célula B possui parecer favorável do Comitê de Ética de Utilização Animal (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob o número 38748. Além disso, as amostras de soro humano utilizadas neste estudo estão sob o parecer de número CAAE: 79605717.9.0000.5190 aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas do IAM/Fiocruz (CEP).

8 RESULTADOS

8.1 SUBCLONAGEM DO GENE DO DBE2 EM VETORES DE EXPRESSÃO

O DNA sintetizado comercialmente pela empresa GenScript foi utilizado para transformação bacteriana, seguida de minipreparação plasmidial. A sequência gênica otimizada que codifica o DBE2/CHIKV possui o tamanho de 213 pares de base (pb) e foi extraída do plasmídeo pUC57 simples (2710 pb), no qual estava inserida, para posterior subclonagem nos vetores pRSETA (2897 pb) e pET21d (5440 pb). Para isso, foram realizadas digestões do pUC57/DBE2 e dos vetores comerciais com as enzimas *NheI*/*NcoI* (pRSETA) e *HindIII*/*XhoI* (pET21d) para que fosse realizada a purificação das bandas, seguida do ensaio de ligação. Os tamanhos dos fragmentos foram analisados por eletroforese em gel de agarose (Figura 13).

Figura 13 – Análise dos tamanhos dos fragmentos de DNA.

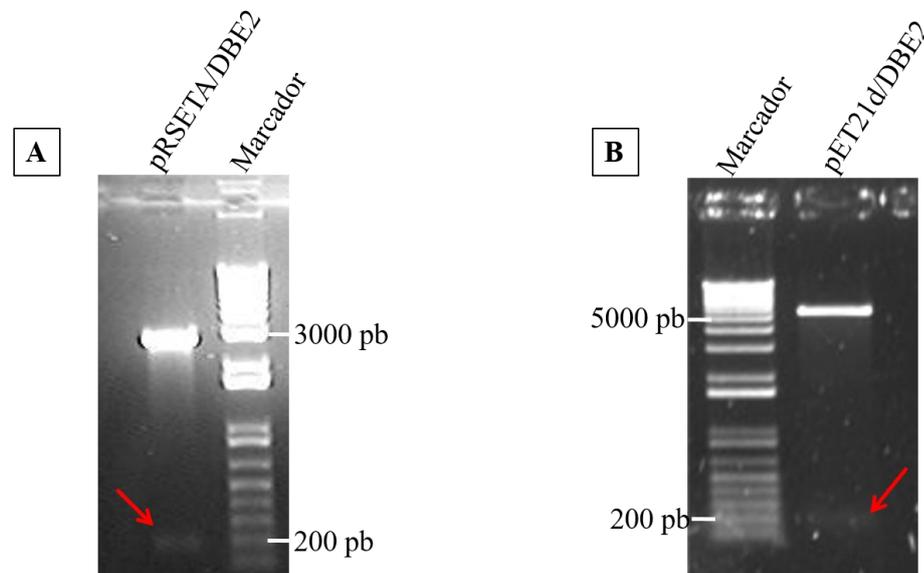


Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: (A) Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio confirmando os tamanhos esperados dos fragmentos do gene otimizado após digestão dupla, sendo a amostra 1 digerida com as enzimas *NheI* e *NcoI*, e a amostra 2 digerida com *HindIII* e *XhoI*. É possível observar o DBE2 com 213 pb e o pUC57 com 2710 pb. (B) Gel de agarose 1% confirmando os tamanhos esperados dos vetores comerciais, sendo o pET21d com 5440 pb e o pRSETA com 2897 pb.

Com os tamanhos dos fragmentos confirmados foi possível seguir para a etapa de ligação. A confirmação da subclonagem foi realizada através da visualização de bandas do tamanho esperado (213 pb), correspondente ao DBE2, em corrida eletroforética, após digestão de confirmação da construção plasmidial (Figura 14).

Figura 14 – Digestão para confirmação da ligação do gene DBE2 nos respectivos vetores de expressão.



Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: (A) Gel de agarose 1% evidenciando o fragmento de 213 pb liberado após digestão dupla com as mesmas enzimas de restrição (NheI e NcoI) utilizadas na ligação ao pRSETA (2897 pb). (B) Gel de agarose 1% evidenciando o fragmento de 213 pb liberado após digestão dupla com as mesmas enzimas de restrição (HindIII e XhoI) utilizadas na ligação ao pET21d (5440 pb).

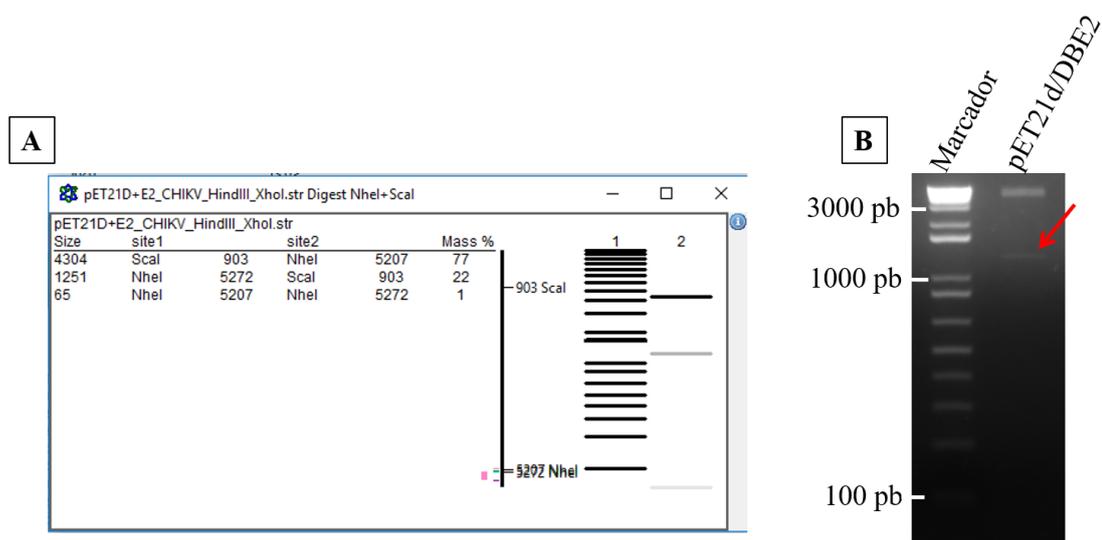
Com o intuito de ter uma segunda confirmação da subclonagem, foi realizada uma prova de digestão utilizando enzimas diferentes das que foram aplicadas na clonagem. Através do mapa de restrição e do *software* ApE, para cada construção plasmidial foram selecionadas duas enzimas, sendo uma com atuação num sítio interno ao inserto e outra com ação num sítio do plasmídeo. Para o pRSETA/DBE2 foram selecionadas XhoI (inserto) e ScaI (vetor) que geraram fragmentos de 1873 e 1127 pb (Figura 15).

Figura 15 - Prova de digestão do DBE2 no vetor pRSETA (pRSETA/DBE2).

Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: (A) Simulação da digestão da construção plasmidial pRSETA/DBE2 com as enzimas XhoI e ScaI resultando em fragmentos de 1873 pb e 1127 pb. (B) Gel de agarose 1% mostrando os fragmentos com tamanhos esperados após a digestão com as enzimas selecionadas.

Já para o pET21d/DBE2 foram selecionadas as enzimas NheI (inserto e vetor) e ScaI (vetor) gerando fragmentos de 4304, 1251 e 65 pb. Porém, não foi possível visualizar o menor dos fragmentos após a migração em gel de agarose (Figura 16).

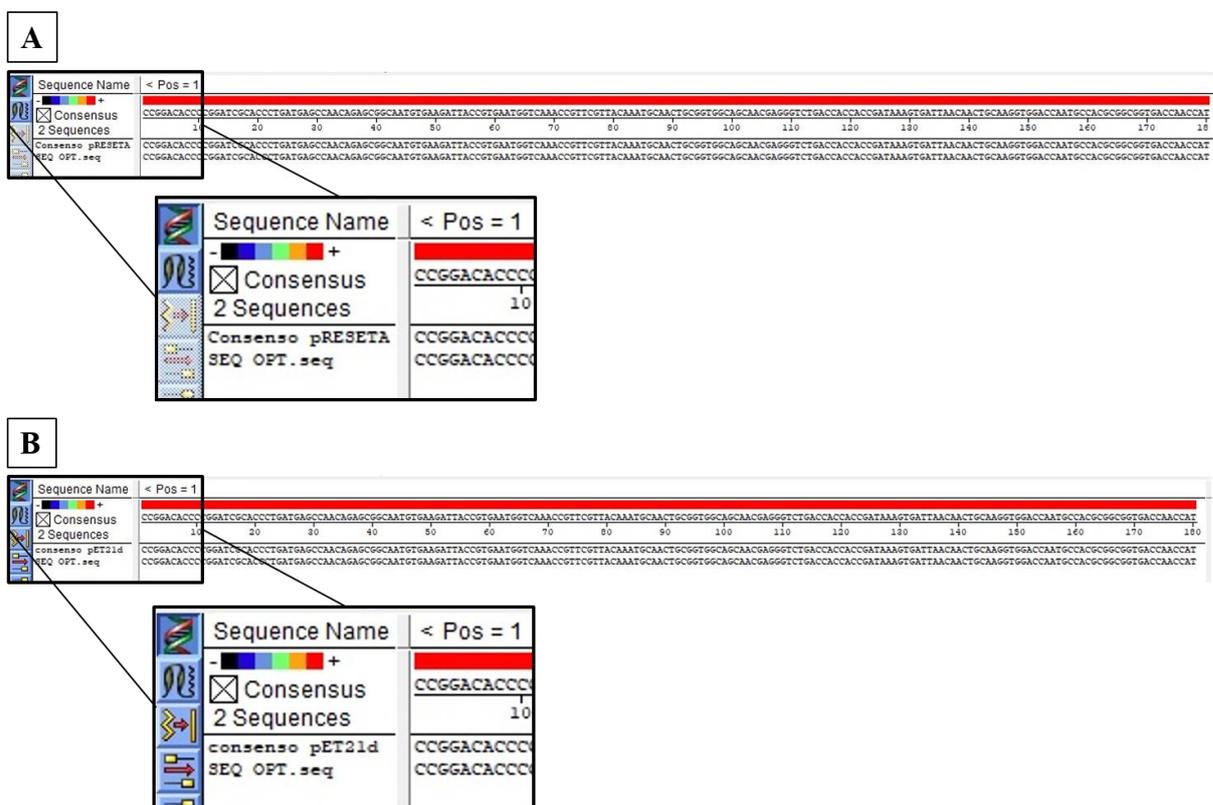
Figura 16 – Prova de digestão do DBE2 no vetor pET21d (pET21d/DBE2).

Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: (A) Simulação da digestão da construção plasmidial pET21d/DBE2 com as enzimas NheI e ScaI resultando em fragmentos de 4304, 1252 e 65 pb. (B) Gel de agarose 2% mostrando os dois maiores fragmentos com os tamanhos esperados após a digestão com as enzimas selecionadas. Não foi possível visualizar o fragmento de 65 pb.

Assim, para analisar a integridade da sequência que codifica o DBE2 inserida nos vetores e, principalmente, para ter uma segunda confirmação da subclonagem no pET21d, visto que a prova de ligação não mostrou um resultado satisfatório, as construções foram sequenciadas. As sequências obtidas como resultado foram alinhadas com a sequência gênica otimizada comercialmente no programa MegAlign. No alinhamento foi possível observar que as sequências possuem 100% de identidade, não apresentando qualquer mutação (Figura 17).

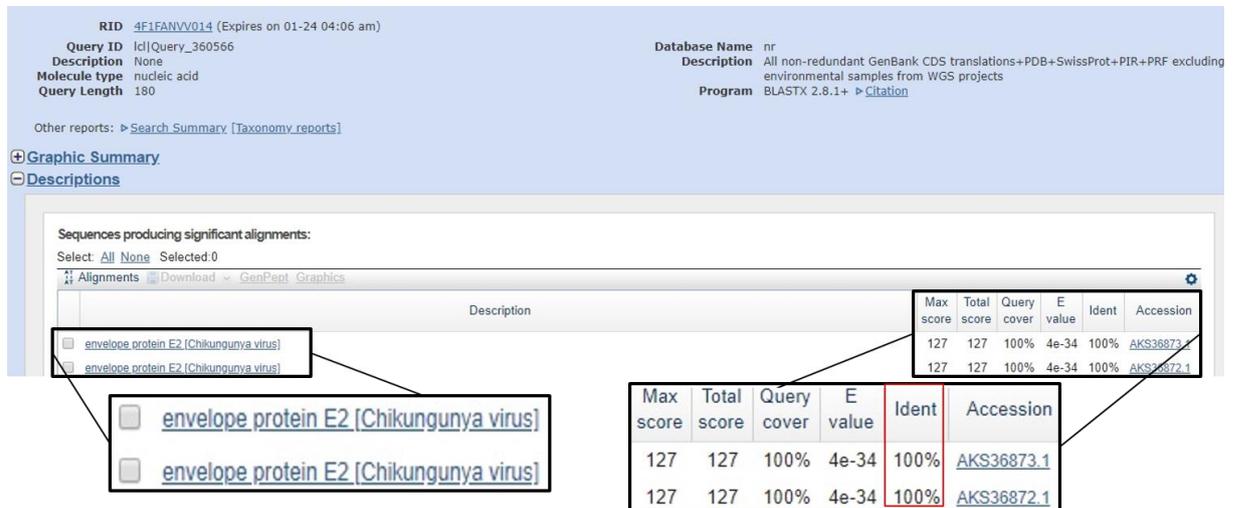
Figura 17 – Alinhamento das sequências de DNA.



Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: A cor vermelha no decorrer da sequência indica a similaridade dos nucleotídeos alinhados. **(A)** Alinhamento do sequenciamento da construção plasmidial pRESETA/DBE2 com a sequência otimizada. **(B)** Alinhamento do sequenciamento da construção plasmidial pET21d/DBE2 com a sequência otimizada.

Por último, foi utilizada a ferramenta blastx da plataforma online BLAST® NCBI, que faz a tradução do DNA para a proteína e o produto é comparado com o conteúdo catalogado no banco de dados, avaliando sua similaridade. Com esta ferramenta observou-se que a proteína gerada a partir da sequência subclonada tem 100% de identidade com o domínio B da proteína E2 do vírus chikungunya (Figura 18), conforme esperado.

Figura 18 – BLASTx do sequenciamento.

Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: Blastx da sequência subclonada nos vetores de expressão. Encontra-se em evidência a proteína encontrada no banco de dados (proteína do envelope E2 do vírus Chikungunya) e a identidade entre a mesma e a proteína de entrada (100%).

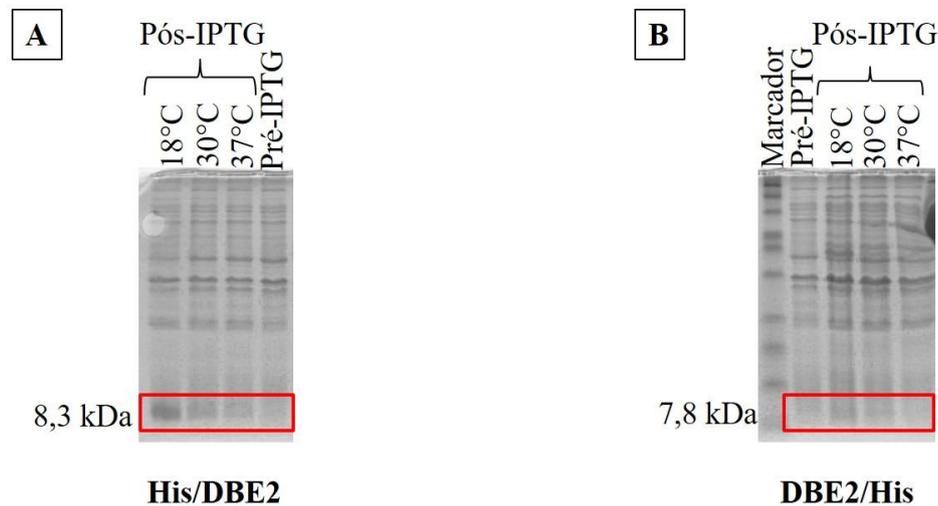
8.2 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Com as subclonagens confirmadas, iniciou-se a etapa de expressão das proteínas recombinantes. A proteína gerada a partir do pET21d/DBE2 possui uma cauda composta por seis histidinas na sua porção C-terminal (DBE2/His) e tem um tamanho esperado de 7,8 kDa. Já a proteína expressa pela construção plasmidial pRSETA/DBE2 apresenta a mesma cauda poli-histidina, porém na sua porção N-terminal (His/DBE2) e espera-se o tamanho de 8,3 kDa.

As construções plasmidiais foram transformadas em células de *E. coli* BL21 e, inicialmente, foi realizado um teste de indução em pequena escala para avaliar quais as melhores condições de expressão das proteínas recombinantes. Três condições de temperatura e tempo de indução foram analisadas para os dois clones: 18°C por 16 horas, 30°C por 4 horas e 37°C por 2 horas. Neste ensaio, foram separadas alíquotas pré e pós a adição do indutor (IPTG), para que as mesmas fossem comparadas entre si após corrida eletroforética em SDS-PAGE (Figura 19). Neste teste, foi observado que há a expressão da proteína His/DBE2 a 30°C e a 18°C, porém obteve-se melhor rendimento com a temperatura mais baixa e maior tempo de indução. Já no ensaio com a proteína DBE2/His é possível perceber que há expressão apenas a 18°C. Contudo, ao comparar as proteínas recombinantes obtidas,

observou-se que o rendimento proteico da His/DBE2 induzida a 18°C é maior que o das demais.

Figura 19 – Teste de expressão das proteínas DBE2 recombinantes.



Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: (A) Gel de poliacrilamida 15% evidenciando a proteína His/DBE2 com o tamanho esperado de 8,3 kDa nas frações pós-IPTG induzidas a 18°C e 30°C, sendo o melhor rendimento da expressão proteica promovido pela menor temperatura. (B) Gel de poliacrilamida 15% mostrando a proteína DBE2/His com o tamanho esperado de 7,8 kDa somente na fração pós-IPTG induzida a 18°C.

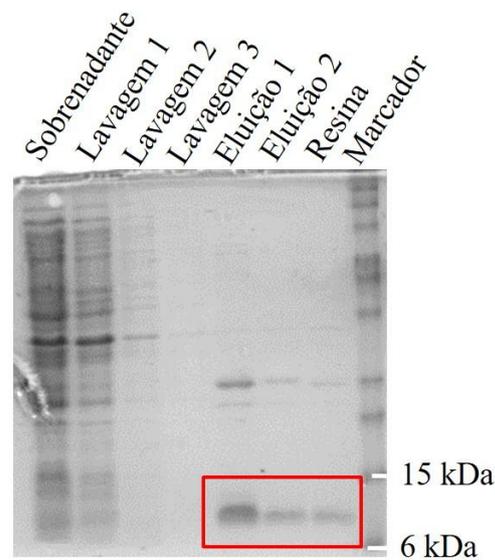
A estratégia de utilizar dois vetores produzindo a mesma proteína, com diferença apenas no posicionamento da cauda de poli-histidina, foi elaborada visando uma maior segurança nas etapas expressão e purificação. Assim, assegurando que fosse possível descartar uma das possibilidades, caso não houvesse êxito em alguma delas ou se uma tivesse melhor rendimento que a outra. Visto que a recombinante DBE2/His obteve um resultado menos satisfatório, seguiu-se apenas com a proteína His/DBE2 induzida a 18°C por 16 horas em larga escala para a etapa de purificação.

8.3 PURIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA HIS/DBE2

O método de purificação escolhido foi a IMAC, fazendo uso de uma resina de níquel ativada. Foram feitas algumas modificações no protocolo recomendado pelo fabricante, para que fosse alcançada uma maior pureza da proteína de interesse. Na Figura 20, verificam-se alíquotas de cada etapa do processo de purificação, inclusive dos eluatos, a fim de analisar em qual dessas fases é possível fazer alterações para que haja o melhoramento do método. Nas eluições 1 e 2 pode-se visualizar a His/DBE2 purificada com 8,3 kDa, sendo a primeira mais

concentrada que a segunda. A mesma proteína também é vista na fração correspondente a resina.

Figura 20 – Purificação das proteínas fusionadas à cauda de histidina (His/DBE2).



Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: SDS-PAGE 15% mostrando cada etapa do processo de purificação por cromatografia de afinidade e evidenciando a proteína His/DBE2 no tamanho de 8,3 kDa nos dois eluatos coletados e na resina.

A quantificação das proteínas purificadas foi realizada de duas formas distintas, sendo a aplicação posterior da molécula o critério de seleção entre as metodologias. Ao calcular a concentração proteica através do método de comparação com a concentração conhecida de uma proteína de referência, foi obtido um rendimento em torno de 5 mg por litro de cultura. Já ao quantificar por meio da espectrofotometria foi obtido um rendimento de cerca de 8 mg/L.

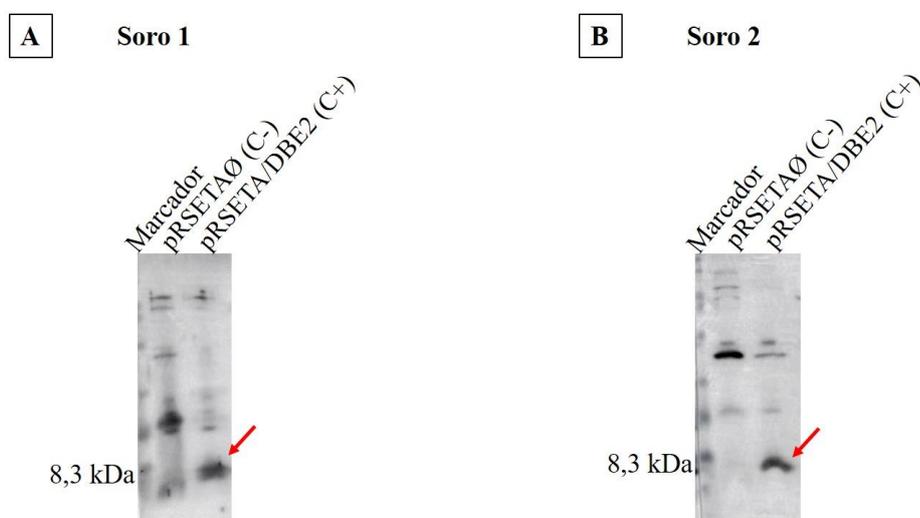
Após a quantificação das purificações, aproximadamente 1 mg da proteína His/DBE2 foi enviada para a empresa Célula B da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, imobilizada em cortes de gel de poliacrilamida. Através desta empresa foram obtidos os soros anti-His/DBE2 positivos, por meio da imunização de dois coelhos.

8.4 IDENTIFICAÇÃO DA HIS/DBE2 E LIMITE DE DETECÇÃO DOS SOROS ANTI-HIS/DBE2 POSITIVOS

Ao receber cerca de 25 mL de soro de cada coelho imunizado, foram realizados ensaios de *western blot* utilizando-os como anticorpo primário e o anti-IgG de coelho como

secundário. Primeiramente, foram realizados ensaios para analisar o reconhecimento da His/DBE2 através dos soros produzidos. Para isso, foram utilizadas duas amostras, sendo: uma de extrato celular da expressão da His/DBE2 (produto do vetor pRSETA/DBE2), como controle positivo (C+), e uma amostra de extrato celular da expressão do pRSETA sem inserto (pRSETA \emptyset), como controle negativo (C-). Na figura 21, observa-se que a proteína His/DBE2 foi reconhecida no tamanho predito de 8,3 kDa no controle positivo, enquanto a mesma banda não apareceu no controle negativo.

Figura 21 – Identificação da His/DBE2 através dos soros anti-His/DBE2.



Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: Ensaios de *western blot* cujas setas destacam a proteína His/DBE2 sendo reconhecida pelos soros no controle positivo, enquanto no controle negativo esta proteína não aparece. (A) Soro 1 aplicado como anticorpo primário. (B) Soro 2 aplicado como anticorpo primário.

Posteriormente, para avaliar a sensibilidade teste, foram realizados *westerns blot* aplicando os soros como anticorpo primário, frente a uma curva de diluição seriada da His/DBE2 purificada. Assim, podendo verificar o limite de detecção dos soros no ensaio, ou seja, a quantidade mínima de proteína em massa para que seja possível revelar a banda. Na figura 22, é possível notar que o limite de detecção do teste utilizando o soro 1 é de 0,250 μ g de proteína, enquanto o limite de detecção com o soro 2 é de 0,125 μ g. Logo, o ensaio com o soro 2 apresenta um limite de detecção menor que o soro 1, sendo aquele mais reativo que este. Assim, o soro 2 foi selecionado para as etapas posteriores com *western blot*.

Figura 22 – Limite de detecção dos soros anti-His/DBE2 por *western blot*.

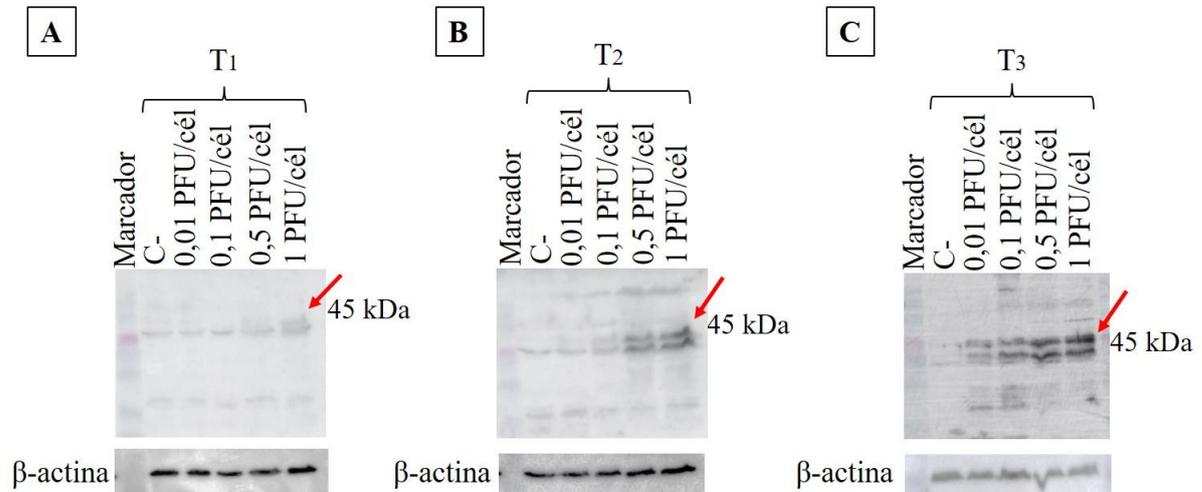
Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: Ensaio de *western blot* evidenciando o limite de detecção do teste aplicando os soros anti-His/DBE2 positivos. (A) Soro 1 apresenta limite de detecção de 0,250 µg de proteína. (B) Soro 2 apresenta limite de detecção de 0,125 µg de proteína.

8.5 CURSO DA INFECÇÃO POR CHIKV

A fim de avaliar se o soro anti-His/DBE2 positivo produzido é capaz de detectar o CHIKV através da identificação da proteína E2 em sua estrutura, foi realizada uma análise do curso da infecção em células Vero através de ensaios de *western blot*. Para isso, culturas com diferentes MOIs (0,01, 0,1, 0,5 e 1 PFU/cél) foram coletadas após 8 (T₁), 16 (T₂) e 24 horas (T₃) do T₀ (momento da infecção).

Na figura 23 é possível observar que duas novas bandas são reveladas no ensaio durante o decorrer da infecção. Estas bandas são as proteínas p62 (precursora da E2 e E3) e E2 com os tamanhos preditos de aproximadamente 45 e 40 kDa, respectivamente. Assim, observa-se que o soro produzido é capaz de reconhecer estas proteínas virais, podendo assim, identificar a presença do CHIKV em extratos celulares infectados. Também é possível perceber que no T₃ com o MOI de 1 PFU/cél as proteínas virais estão mais concentradas do que nas demais condições. O anticorpo anti-β-actina foi utilizado para controle de carga das amostras, visto que a expressão da proteína β-actina ocorre de maneira constitutiva na célula.

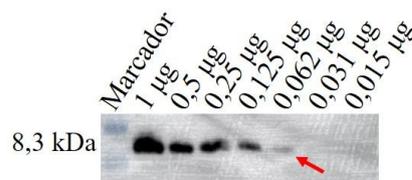
Figura 23 – Curso da infecção por CHIKV através de *western blot*.

Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: Ensaios de *western blot* revelando as proteínas p62 e E2 com 45 e 40 kDa, respectivamente, durante o curso da infecção por CHIKV em células Vero. Foram utilizados MOIs de 0,01, 0,1, 0,5 e 1 PFU/cél. O anticorpo anti-β-actina foi utilizado como controle de carga. (A) Amostras com 8 h (T1) de infecção. (B) Amostras de 16 h (T2) de infecção. (C) Amostras com 24 h (T3) de infecção. Nota-se que as proteínas de interesse se encontram mais concentradas no T3 com 1 PFU/cél.

8.6 LIMITE DE DETECÇÃO POR *WESTERN BLOT* DOS ANTICORPOS ANTI-HIS/DBE2 PURIFICADOS

Com o intuito aumentar a especificidade e sensibilidade do ensaio de *western blot* utilizando os anticorpos produzidos para a identificação da DBE2, foram realizadas purificações por imunoadsorção, seguidas da concentração destes anticorpos. Assim, na figura 24, observa-se que, após a purificação e a concentração, a sensibilidade do teste aumentou, passando a ter um limite de detecção de 0,062 µg da proteína alvo.

Figura 24 – Limite de detecção por *western blot* dos anticorpos anti-His/DBE2 purificados.

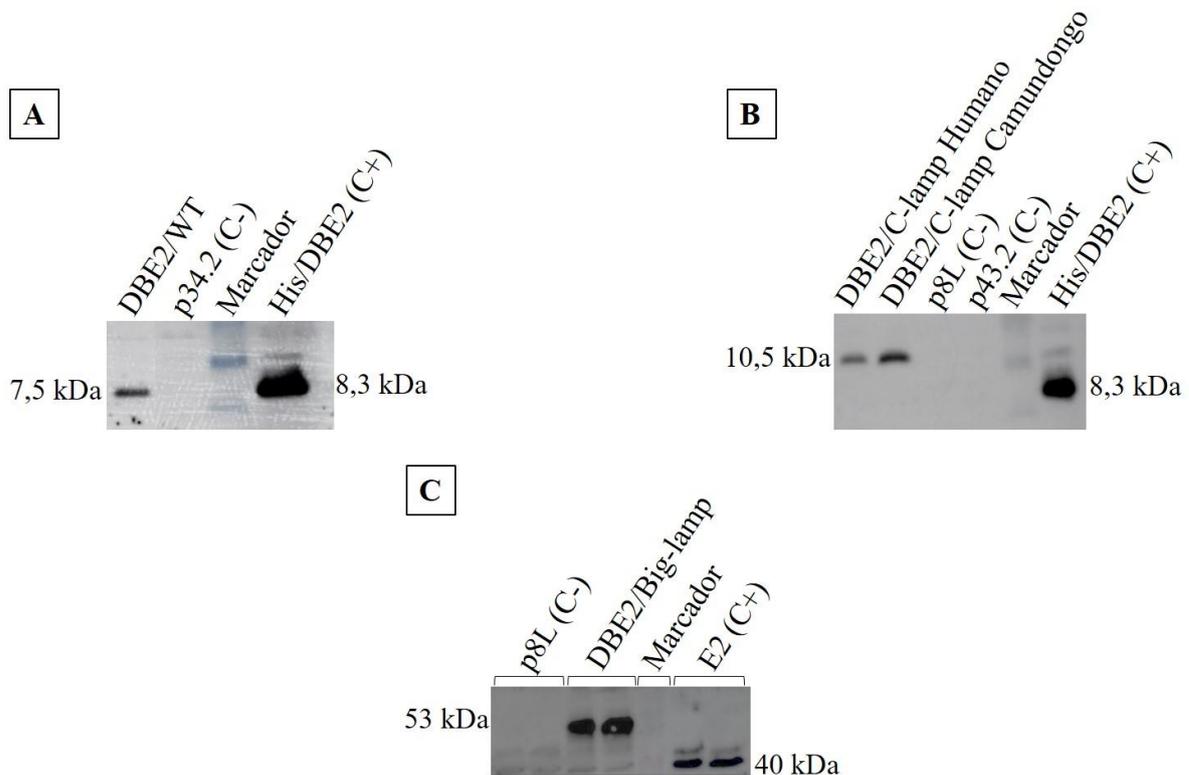
Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: Ensaio de *western blot* mostrando o limite de detecção de 0,062 µg do teste aplicando os anti-His/DBE2 purificados e concentrados como anticorpo primário. As amostras cuja massa da proteína alvo estão abaixo de 0,062 µg não foram detectadas.

8.7 DETECÇÃO DO DBE2 EM VARIADAS CONDIÇÕES

Visto que os anticorpos produzidos neste trabalho foram utilizados para dar suporte um estudo de validação de vacina de DNA contra o CHIKV, foram realizados ensaios de *western blot* objetivando avaliar se o soro produzido reconhece a expressão dos vetores vacinais estudados. As proteínas a serem detectadas são DBE2/WT, DBE2/C-lamp Camundongo, DBE2/C-lamp Humano e DBE2/Big-lamp nos pesos moleculares preditos de 7,5, 10,5 e 53 kDa, respectivamente. Na figura 25, observa-se que estas proteínas foram identificadas pelos anticorpos nos testes com os seus respectivos tamanhos.

Figura 25 – Detecção da expressão dos vetores vacinais.



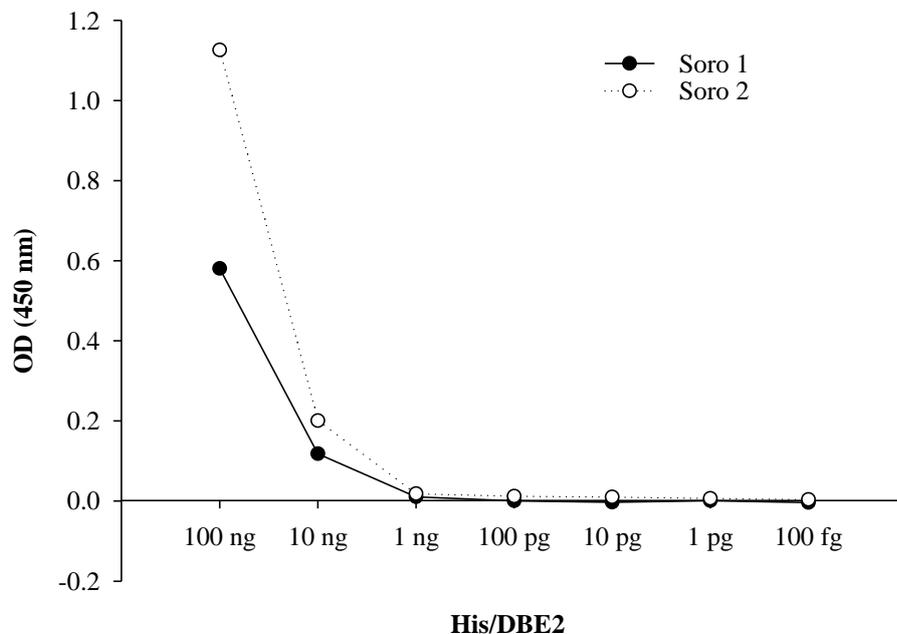
Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: Ensaios de *western blot* mostrando as proteínas que serão utilizadas no estudo de validação da vacina contra o CHIKV sendo detectadas pelos anticorpos anti-His/DBE2 produzidos. Os controles negativos são extratos de células transfectadas com o mesmo plasmídeo utilizado na expressão, porém sem o inserto. (A) Detecção da proteína DBE2/WT com 7,5 kDa. (B) Detecção da proteína DBE2/C-lamp produzida por dois vetores diferentes (p43.2 e p8L) com 10,5 kDa. (C) Detecção da proteína DBE2/Big-lamp com 53 kDa.

8.8 LIMITE DE DETECÇÃO POR ELISA DOS SOROS REATIVOS À DBE2

Foram realizados testes de ELISA indireto com diferentes concentrações da proteína His/DBE2 (em curva de diluição 1:10 de 100 ng/mL a 100 fg/mL) sendo aplicada como antígeno a fim de analisar o limite de detecção do sistema utilizando os soros aqui produzidos. Na figura 26 é possível ver que, tanto o soro 1, quanto o soro 2, apresentam o limite de detecção de 10 ng do antígeno. Porém, também é possível notar que o soro 2 demonstra maior reatividade por apresentar maiores valores de densidade óptica nas maiores concentrações, evidenciando ODs de 1,1 e 0,2 nas concentrações de 100 e 10 ng, respectivamente. Já o soro 1, gerou ODs de 0,5 e 0,1 nestas mesmas concentrações, sendo menos reativo que o soro 2.

Figura 26 – Limite de detecção dos soros reativos à His/DBE2 através de ELISA.



Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: Gráfico evidenciando o limite de detecção através do ensaio de ELISA dos soros aqui produzidos. A concentração mínima de antígeno reconhecida pelos soros é de 10 ng, sendo o soro 2 mais reativo que o soro 1 por apresentar densidades ópticas maiores.

8.9 DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-DBE2 CIRCULANTES EM SOROS HUMANOS

Para a padronização do ELISA com soros humanos, foram avaliadas três concentrações do antígeno His/DBE2 (2 µg/mL, 1 µg/mL e 0,5 µg/mL) e três diluições do anticorpo secundário (1:10.000, 1:20.000 e 1:30.000), mantendo fixa a proporção do soro em

1:50. Assim, no processo de padronização foram testadas 9 variações do ensaio de ELISA (Quadro 3).

Quadro 3 – Variações do ensaio de ELISA avaliadas no processo de padronização.

Ag: 2 µg/mL Soro: 1:50 Ac: 1:10.000	Ag: 2 µg/mL Soro: 1:50 Ac: 1:20.000	Ag: 2 µg/mL Soro: 1:50 Ac: 1:30.000
Ag: 1 µg/mL Soro: 1:50 Ac: 1:10.000	Ag: 1 µg/mL Soro: 1:50 Ac: 1:20.000	Ag: 1 µg/mL Soro: 1:50 Ac: 1:30.000
Ag: 0,5 µg/mL Soro: 1:50 Ac: 1:10.000	Ag: 0,5 µg/mL Soro: 1:50 Ac: 1:20.000	Ag: 0,5 µg/mL Soro: 1:50 Ac: 1:30.000

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Quadro evidenciando as variadas condições dos ensaios de ELISA indireto testados no processo de padronização desta técnica com o antígeno His/DBE2. Ag – antígeno; Soro – soro humano com sorologia testada previamente com IgG anti-CHIKV positivo; Ac – anticorpo secundário. Consta na célula em destaque as concentrações selecionadas para os testes posteriores.

Através da padronização do ensaio, foi estabelecido que a melhor condição de realização do ELISA, dentre as avaliadas, foi aquela com 0,5 µg/mL do antígeno e 1:30.000 do anticorpo secundário anti-IgG humano.

Após padronização do ensaio, foi possível avaliar se a referida proteína é promissora para ser utilizada no diagnóstico da Chikungunya, porém, necessitando ser melhor explorada posteriormente a cerca desta aplicação. Foram realizados 90 testes em duplicatas, sendo 34 soros previamente testados positivos para CHIKV e 56 testados negativos. O ELISA aqui padronizado apresentou um falso positivo e dois falsos negativos. Diante disso, foram estabelecidos os valores de sensibilidade, 94,12%, e especificidade, 98,21% do teste (Tabela 1) e foi plotada a curva ROC com a área abaixo da curva (AUC) de 0,9827 (Figura 27). Por último, foi observada a reatividade cruzada do teste com amostras positivas para outros arbovírus em co-circulação com o CHIKV (ZIKV e DENV) (Figura 28).

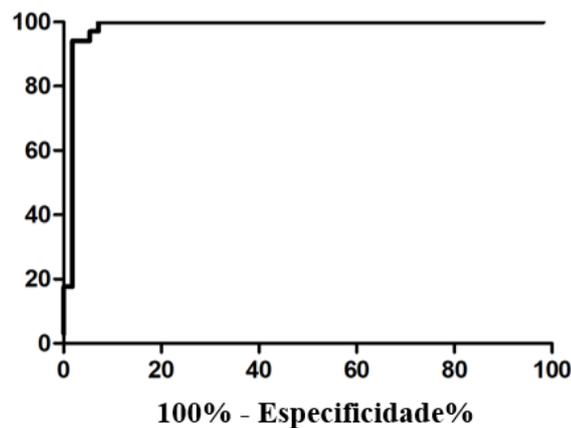
Tabela 1 – Sensibilidade e especificidade do ELISA indireto com a proteína His/DBE2 como antígeno.

Kit comercial (Euroimmun)	ELISA His/DBE2		
	Nº de pos	Nº de neg	Parâmetros
Pos. (n = 34)	32	2	Sensibilidade: 94,12%
Neg. (n = 56)	1	55	Especificidade: 98,21%

Fonte: Elaborada pela autora.

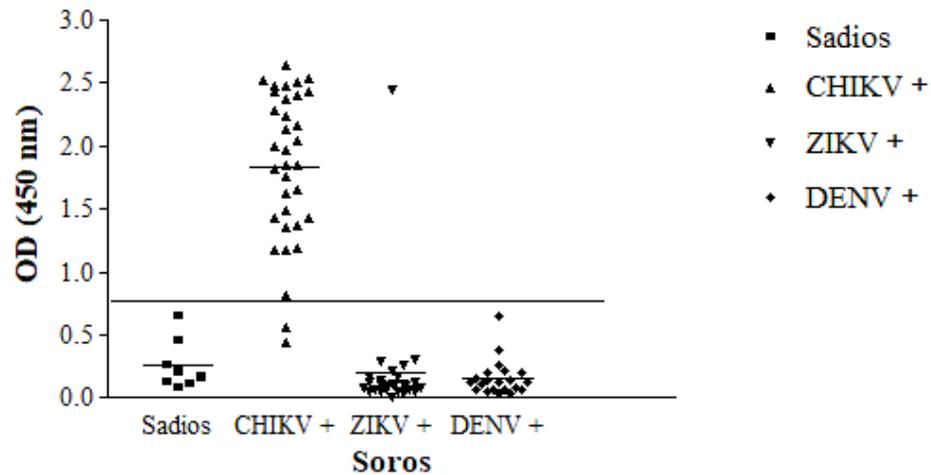
Nota: Tabela comparando o ELISA realizado com o antígeno His/DBE2 com o teste comercial Euroimmun para a pesquisa de IgG anti-CHIKV. Pos – positivos. Neg – negativos.

Figura 27 – Curva ROC estabelecida para o ELISA com a His/DBE2.



Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Curva ROC calculada para avaliar o desempenho do antígeno His/DBE2 no ensaio de ELISA com soros humanos, apresentando AUC = 0,9827 ($p < 0,0001$).

Figura 28 – Reatividade cruzada da His/DBE2 com soros ZIKV + e DENV +.

Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: Gráfico evidenciando as densidades óticas (eixo Y) dos testes de ELISA indireto utilizando a His/DBE2 como antígeno para soros previamente testados e separados em quatro grupos (eixo X): Sadios (negativos para CHIKV, ZIKV e DENV), CHIKV + (positivos para CHIKV), ZIKV + (positivos para ZIKV) e DENV + (positivos para DENV). A linha horizontal no plano cartesiano representa o *cut off* calculado no valor de 0,78. Amostras com a OD acima do *cut off* são consideradas positivas. Já amostras com a OD abaixo do *cut off* são consideradas negativas.

9 DISCUSSÃO

Atualmente, não existe método de controle e prevenção eficaz para a infecção por CHIKV. Esta virose, que apresenta caráter re-emergente e de rápida disseminação, provoca surtos epidêmicos que trazem impactos sociais e econômicos aos locais atingidos. Por isto, cada vez mais estudos têm buscado desenvolver uma vacina contra o seu agente patogênico, apostando na eficiência desta ferramenta (GAO; SONG; ZHANG, 2019; VAIRO *et al.*, 2019). Nos estudos de validação de vacinas, os ensaios imunológicos são muito relevantes e amplamente utilizados. São realizados a fim de analisar a presença de anticorpos específicos contra o antígeno estudado em soros de indivíduos previamente imunizados, bem como, a presença, a estabilidade e a integridade da proteína da formulação vacinal (KUMAR *et al.*, 2014). Assim, neste trabalho, anticorpos policlonais anti-His/DBE2 foram produzidos e avaliados para dar suporte a um estudo de validação de vacina de DNA contra o CHIKV. Além da avaliação dos anticorpos, ensaios imunológicos como *western blot* e ELISA foram realizados utilizando como antígeno a subunidade proteica His/DBE2.

Diferentes grupos vêm utilizando a estratégia de utilizar anticorpos policlonais de soros hiperimunes, através da imunização de coelhos, para dar suporte aos seus estudos vacinais. Ludvíková e colaboradores (LUDVÍKOVÁ *et al.*, 2005) fizeram uso desta abordagem para detectar a zona de fusão do produto da translocação gênica BCR-ABL, através de *western blot* e ELISA, em um estudo de vacina terapêutica para leucemia mieloide crônica. Já Maciel e colaboradores (MACIEL *et al.*, 2015) utilizaram o soro hiperimune produzido em coelho para a identificação do Vírus da Febre Amarela, por *western blot*, em um trabalho de avaliação de uma vacina de DNA contra este vírus. Mais recentemente, num estudo de desenvolvimento de uma vacina contra enterotoxinas de *E. coli*, Zhu e colaboradores (ZHU; SETTY; BOEDEKER, 2017) usaram anticorpos policlonais na detecção das toxinas alvos do trabalho. O reconhecimento das toxinas foi feito por soros de coelho, através dos ensaios de *western blot* e imunofluorescência indireta.

Para a produção destes anticorpos, inicialmente, foi necessário obter a proteína recombinante DBE2 conjugada a uma cauda de histidinas. Nesta etapa foi observada uma diferença no rendimento da expressão da proteína heteróloga, de acordo com variações de temperatura no sistema. Apenas em temperaturas mais baixas conseguimos obter o antígeno de interesse. Alguns fatores como taxa de crescimento celular, sobrecarga da maquinaria biossintética e secretora da célula, desnaturação térmica, dentre outros fatores, podem ter

influenciado no resultado. Tais variantes podem ter interferido não só na expressão, mas também, na solubilidade da proteína heteróloga que, em temperaturas mais baixas, tem mais tempo para alcançar a sua conformação estrutural adequada (SAMBROOK; RUSSEL, D, 2000).

Os dois soros hiperimunes anti-DBE2 obtidos reconheceram o domínio B, tanto isolado quanto na sua condição nativa (integrado aos demais domínios que compõem a proteína E2 nativa). Isto indica que há interação imunológica antígeno-anticorpo, através do reconhecimento de epítomos presentes na subunidade DBE2. Tais achados confirmam os estudos prévios de predição de epítomos *in silico* no domínio B, utilizados para fundamentar o projeto inicial deste trabalho. Foram utilizados três diferentes *softwares* na predição: ElliPro, Epitopia e DiscoTope, que identificaram a presença dos determinantes antigênicos nesta região da proteína (dados ainda não publicados). Esse resultado corrobora com os achados experimentais *in vitro*, por ensaios de microscopia crioeletrônica, e *in vivo*, em modelo animal, encontrados por Fox e colaboradores. Em seu trabalho, foi possível visualizar, por microscopia, o anticorpo CHK-265 ligado ao domínio B da E2 do CHIKV e, este mesmo anticorpo, se mostrou eficiente no tratamento de um modelo de infecção por CHIKV em camundongo (FOX *et al.*, 2015). Outros trabalhos que provaram a presença de epítomos nesta região da proteína E2 foram os de Porta, Pal e Voss e seus respectivos colaboradores. Em seus estudos, a partir da análise do cristal proteico, Porta mostrou a interação do anticorpo 5F10 com o domínio B, Pal observou a interação dos anticorpos CHK-102 e CHK-263 com este mesmo domínio e Voss reportou epítomos de transição na referida região (PAL *et al.*, 2013; PORTA *et al.*, 2016; VOSS *et al.*, 2010).

O reconhecimento da proteína p62 nas suas condições nativas, pelos soros reativos à DBE2, indica a presença de determinantes antigênicos nesta molécula e nos traz uma nova perspectiva. Devendo ainda ser melhor avaliada para tal finalidade, esta proteína pode ser uma alternativa inovadora, com potencial de ser um biomarcador para o sorodiagnóstico de Chikungunya. Um trabalho sugestivo da capacidade diagnóstica desta molécula é o de Adouchief e colaboradores, porém, utilizando um outro alphavirus, o Sindbis Vírus. Neste estudo, foram identificados epítomos na proteína p62 ao realizarem um mapeamento de epítomos *in vitro*, através da detecção por *pools* de soros IgG positivos para este patógeno (ADOUCHIEF *et al.*, 2016). Já o trabalho de Seruyange e colaboradores analisou a reatividade de soros contra o CHIKV, utilizando as proteínas p62 e E1 fusionadas como antígeno. Houve uma sororreatividade de 63% da população testada, porém não podemos

afirmar que esta reação se deu pelo reconhecimento exclusivo da p62, considerando a presença da E1 no antígeno (SERUYANGE *et al.*, 2019).

Um diagnóstico preciso e precoce para a Chikungunya é importante em diversos aspectos, como vigilância epidemiológica, prevenção de surtos, manejo adequado do tratamento do paciente e desenvolvimento de drogas e vacinas. Atualmente, o diagnóstico sorológico desta virose por ELISA é bem estabelecido, sendo utilizados kits comerciais com desempenhos aceitáveis, como os da EuroImmun, IBL, Abcam etc. Porém, há uma busca pelo melhoramento da acurácia dos testes, visto que há relatos de reação cruzada com outros *alphavirus* e baixa sensibilidade (BURDINO *et al.*, 2016; NATRAJAN; ROJAS; WAGGONER, 2019). Devido a reatividade cruzada, recomenda-se a realização de PRNT (após uma resposta positiva do ELISA) para a confirmação do diagnóstico (SILVA *et al.*, 2018).

Ainda neste trabalho, foi possível também avaliar a reatividade de soros humanos frente ao antígeno DBE2 em ensaios de ELISA, avaliando a possibilidade desta molécula ser utilizada no diagnóstico da Chikungunya. Foram observadas as taxas de sensibilidade e de especificidade do teste de 94,12% e 98,21%, respectivamente. Os resultados contrastam com os parâmetros obtidos nas avaliações de ELISA indireto com outras proteínas estruturais recombinantes do CHIKV como C, E1, E2 e E1+E2, utilizadas como antígeno para pesquisa de anticorpo. Apesar da taxa de sensibilidade da His/DBE2 ter se mostrado superior à do antígeno E1, foi inferior às das proteínas C, E2 e E1+E2. Por outro lado, a taxa de especificidade obtida no nosso teste utilizando a subunidade DBE2 apresentou-se superior à de todos os antígenos supracitados (KHAN *et al.*, 2014; PRIYA *et al.*, 2014).

Em relação a algumas plataformas de ELISA comerciais, as taxas de sensibilidade e especificidade encontradas no teste aqui desenvolvido mostraram-se superiores, como por exemplo quando comparadas às da marca IBL. Em relação aos kits de ELISA da Euroimmun e Abcam, observou-se que o valor de sensibilidade do nosso teste é inferior, porém, com especificidade superior ao do kit da Euroimmun (MENDOZA *et al.*, 2019; PRAT *et al.*, 2014).

Também quando comparado a proteína sintética recombinante rCHIKVp, o nosso antígeno apresentou sensibilidade inferior e maior especificidade. A rCHIKVp, obtida a partir de uma sequência consenso gerada a partir do alinhamento do genoma de linhagens do

CHIKV (cuja antigenicidade também foi previamente confirmada por análises *in silico*), apresentou 96% de sensibilidade e 97% de especificidade (BAGNO *et al.*, 2019).

O conjunto de resultados obtidos neste trabalho sugere que a proteína DBE2 tem potencial diagnóstico para Chikungunya, por apresentar taxas de sensibilidade e especificidade adequadas quando comparada a outros antígenos e kits comerciais de ELISA. Porém, faz-se necessários ensaios adicionais de validação incluindo testes de reação cruzada frente aos soros com sorologia positiva para outros *alphavirus*. Já os anticorpos policlonais obtidos contra DBE2 foram capazes de reconhecer eficientemente o antígeno recombinante utilizado para induzir a sua produção, o próprio CHIKV e a expressão da vacina de DNA que vem sendo desenvolvida pelo nosso grupo, alcançando os objetivos propostos.

10 CONCLUSÃO

Os anticorpos policlonais obtidos são capazes de reconhecer especificamente o domínio B da proteína E2 do vírus Chikungunya, tanto isolado na forma de proteína recombinante como nas suas condições nativas no contexto das proteínas E2 e p62. Foram capazes ainda de detectar a expressão dos vetores vacinais DBE2 C-lamp e DBE2 Big-lamp.

A proteína recombinante His/DBE2 demonstrou reatividade, frente aos soros humanos positivos para IgG anti-CHIKV através de ensaios de ELISA, apresentando performances adequadas de sensibilidade e especificidade e consequente potencial para o diagnóstico da Chikungunya.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA-AMPUDIA, Y. *et al.* Mayaro: an emerging viral threat? **Emerging Microbes & Infections**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 4 dez. 2018.
- ADOUCHIEF, S. *et al.* Mapping of human B-cell epitopes of Sindbis virus. **Journal of General Virology**, v. 97, n. 9, p. 2243–2254, 1 set. 2016.
- APPASSAKIJ, H. *et al.* Risk of transfusion-transmitted chikungunya infection and efficacy of blood safety implementation measures: experience from the 2009 epidemic in Songkhla Province, Thailand. **Transfusion**, v. 56, n. 8, p. 2100–2107, ago. 2016.
- AZAMI, N. A. M.; MOI, M. L.; TAKASAKI, T. Neutralization Assay for Chikungunya Virus Infection: Plaque Reduction Neutralization Test. In: [s.l.: s.n.], p. 273–282.
- BAGNO, F. F. *et al.* Development of an enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant protein antigen for the diagnosis of Chikungunya virus. **Data in Brief**, v. 25, 1 ago. 2019.
- BASORE, K. *et al.* Cryo-EM Structure of Chikungunya Virus in Complex with the Mxra8 Receptor. **Cell**, v. 177, n. 7, p. 1725–1737.e16, 13 jun. 2019.
- BERNARD, E. *et al.* Endocytosis of chikungunya virus into mammalian cells: Role of clathrin and early endosomal compartments. **PLoS ONE**, v. 5, n. 7, p. e11479, 8 jul. 2010.
- BRASIL, Ministério da saúde. Preparação e resposta à introdução do vírus Chikungunya no Brasil / Ministério da saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. - Brasília: Ministério da Saúde, 2014.
- BURDINO, E. *et al.* **Unmet needs for a rapid diagnosis of chikungunya virus infection** **Emerging Infectious Diseases**, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), , 1 out. 2016.
- BYRD, E. A.; KIELIAN, M. The Alphavirus E2 Membrane-Proximal Domain Impacts Capsid Interaction and Glycoprotein Lattice Formation. **Journal of Virology**, n. November, 2018.
- CAGLIOTI, C. *et al.* Chikungunya virus infection: an overview. **The new microbiologica**, v. 36, n. 3, p. 211–27, jul. 2013.

CAREY, B. D. *et al.* New World alphavirus protein interactomes from a therapeutic perspective. **Antiviral Research**, v. 163, p. 125–139, mar. 2019.

CARVALHO, F. R. *et al.* Simultaneous circulation of arboviruses and other congenital infections in pregnant women in Rio de Janeiro, Brazil. **Acta Tropica**, v. 192, p. 49–54, abr. 2019.

CASTRO, A. P. C. R. DE *et al.* Chikungunya: vision of the pain clinician. **Revista Dor**, v. 17, n. 4, p. 299–302, 2016.

COFFEY, L. L.; FAILLOUX, A.-B.; WEAVER, S. C. Chikungunya virus-vector interactions. **Viruses**, v. 6, n. 11, p. 4628–63, 24 nov. 2014.

CUNHA, R. V. DA; TRINTA, K. S. Chikungunya virus: clinical aspects and treatment - A Review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 8, p. 523–531, ago. 2017.

DASH, M.; MOHANTY, I.; PADHI, S. Laboratory diagnosis of chikungunya virus: Do we really need it? **Indian Journal of Medical Sciences**, v. 65, n. 3, p. 83, 2011.

DE SOUZA, T. M. A. *et al.* Following in the Footsteps of the Chikungunya Virus in Brazil: The First Autochthonous Cases in Amapá in 2014 and Its Emergence in Rio de Janeiro during 2016. **Viruses**, v. 10, n. 11, 2018.

FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviruses in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 224–229, abr. 2007.

FOX, J. M. *et al.* Broadly Neutralizing Alphavirus Antibodies Bind an Epitope on E2 and Inhibit Entry and Egress. **Cell**, v. 163, n. 5, p. 1095–1107, 19 nov. 2015.

FUMAGALLI, M. J. *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant envelope protein 2 antigen for diagnosis of Chikungunya virus. **Virology Journal**, v. 15, n. 1, p. 1–7, 2018.

GAIBANI, P.; LANDINI, M. P.; SAMBRI, V. Diagnostic Methods for CHIKV Based on Serological Tools. In: [s.l: s.n.]. p. 63–73.

GALÁN-HUERTA, K. A. *et al.* Chikungunya virus: A general overview. GALÁN-HUERTA, K. A. *et al.* Chikungunya virus: A general overview. **Medicina Universitaria**, v. 17, n. 68, p. 175–183, 2015. **Medicina Universitaria**, v. 17, n. 68, p. 175–183, 2015.

GANESAN, V. K.; DUAN, B.; REID, S. P. Chikungunya Virus: Pathophysiology, Mechanism, and Modeling. **Viruses**, v. 9, n. 12, 2017.

GAO, S.; SONG, S.; ZHANG, L. **Recent Progress in Vaccine Development Against Chikungunya Virus** *Frontiers in Microbiology* Frontiers Media S.A., , 19 dez. 2019.

Disponível em: </pmc/articles/PMC6930866/?report=abstract>. Acesso em: 23 jul. 2020

GARCIA-SÁNCHEZ, D. C.; PINILLA, G. A.; QUINTERO, J. Ecological characterization of *Aedes aegypti* larval habitats (Diptera: Culicidae) in artificial water containers in Girardot, Colombia. **Journal of vector ecology : journal of the Society for Vector Ecology**, v. 42, n. 2, p. 289–297, dez. 2017.

GEBHART, N. N. *et al.* Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. **Journal of General Virology**, v. 96, n. 9, p. 2483–2500, 1 set. 2015.

GÉRARDIN, P. *et al.* Multidisciplinary prospective study of mother-to-child chikungunya virus infections on the island of La Réunion. **PLoS medicine**, v. 5, n. 3, p. e60, 18 mar. 2008.

GOULD, E. *et al.* Emerging arboviruses: Why today? **One health (Amsterdam, Netherlands)**, v. 4, p. 1–13, dez. 2017.

GULLETT, J. C.; NOLTE, F. S. **Quantitative nucleic acid amplification methods for viral infections** *Clinical Chemistry*, 2015.

HUANG, Y.-J. S.; HIGGS, S.; VANLANDINGHAM, D. L. Emergence and re-emergence of mosquito-borne arboviruses. **Current Opinion in Virology**, v. 34, p. 104–109, 8 fev. 2019.

INVITROGEN. pRSET A, B, and C - User Manual. **Cloning**, n. 25, p. 1–27, 2010.

JANSEN, C. C.; BEEBE, N. W. The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 4, p. 272–279, abr. 2010.

JIN, J. *et al.* Neutralizing Monoclonal Antibodies Block Chikungunya Virus Entry and Release by Targeting an Epitope Critical to Viral Pathogenesis. **Cell Reports**, v. 13, n. 11, p. 2553–2564, 22 dez. 2015.

JOHNSON, B. W.; RUSSELL, B. J.; GOODMAN, C. H. Laboratory Diagnosis of Chikungunya Virus Infections and Commercial Sources for Diagnostic Assays. **The Journal of infectious diseases**, v. 214, n. suppl 5, p. S471–S474, 15 dez. 2016.

KENDRA, J. A. *et al.* Functional and structural characterization of the chikungunya virus translational recoding signals. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 45, p. 17536–17545, 9 nov. 2018.

KHAN, M. *et al.* Comparative evaluation of the diagnostic potential of recombinant envelope proteins and native cell culture purified viral antigens of Chikungunya virus. **Journal of Medical Virology**, v. 86, n. 7, p. 1169–1175, jul. 2014.

KUMAR, S. *et al.* Western blot assay for quantitative and qualitative antigen detection in vaccine development. **Current Protocols in Microbiology**, n. SUPPL.33, p. 18.4.1-18.4.11, 1 maio 2014.

LEUNG, J. Y.-S.; NG, M. M.-L.; CHU, J. J. H. Replication of alphaviruses: a review on the entry process of alphaviruses into cells. **Advances in virology**, v. 2011, p. 249640, 2011.

LS, Life Science Market. Disponível em: < <https://lifescience-market.com/plasmid-c-94/pet-21d-plasmid-p-95183.html>>. Acesso em: 25 out. 2020.

LIMA-CAMARA, T. N. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. **Revista de saude publica**, v. 50, 27 jun. 2016.

LIN, A. V. Indirect ELISA. In: [s.l: s.n.]. p. 51–59.

LIUMBRUNO, G. M. *et al.* The Chikungunya epidemic in Italy and its repercussion on the blood system. **Blood transfusion = Trasfusione del sangue**, v. 6, n. 4, p. 199–210, out. 2008.

LUDVÍKOVÁ, V. *et al.* Use of polyclonal rabbit antibodies for detection of the bcr-abl fusion zone in cells transfected with experimental bcr-abl DNA vaccines. **International Journal of Oncology**, v. 27, n. 1, p. 265–274, 1 jul. 2005.

LUMSDEN, W. H. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. II. General description and epidemiology. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 1, p. 33–57, jan. 1955.

MACIEL, M. *et al.* A DNA Vaccine against Yellow Fever Virus: Development and Evaluation. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 4, 13 abr. 2015.

MARDEKIAN, S. K.; ROBERTS, A. L. Diagnostic Options and Challenges for Dengue and Chikungunya Viruses. **BioMed research international**, v. 2015, p. 834371, 2015.

MARKLEWITZ, M.; JUNGLIN, S. Evolutionary and ecological insights into the emergence of arthropod-borne viruses. **Acta Tropica**, v. 190, p. 52–58, fev. 2019.

MASCARENHAS, M. *et al.* A scoping review of published literature on chikungunya virus. **PloS one**, v. 13, n. 11, p. e0207554, 2018.

MAYER, S. V.; TESH, R. B.; VASILAKIS, N. The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. **Acta tropica**, v. 166, p. 155–163, fev. 2017.

MCCARTHY, M. K.; DAVENPORT, B. J. J.; MORRISON, T. E. Chronic Chikungunya Virus Disease. In: [s.l: s.n.].

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, 1 dez. 2019.

MS, Ministério da Saúde. Guia de Vigilância em Saúde, 2017. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Volume único. 2ª Edição. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/outubro/06/Volume-Unico-2017.pdf>>.

MS, Ministério da Saúde. Boletim epidemiológico 3 - Monitoramento dos casos de Dengue, Febre Chikungunya e doença aguda pelo Vírus Zika até a semana epidemiológica 52, 2017. **Bol Epidemiol**, 2017. v. 48, n. 3. Janeiro de 2018.

MS, Ministério da Saúde. Boletim epidemiológico 59 - Monitoramento dos casos de Dengue, Febre Chikungunya e doença aguda pelo Vírus Zika até a semana epidemiológica 49, 2018. **Bol Epidemiol**, 2018. v. 49, n. 59. Dezembro de 2018.

MS, Ministério da Saúde. Boletim epidemiológico 2 - Monitoramento dos casos de Dengue, Febre Chikungunya e doença aguda pelo Vírus Zika até a semana epidemiológica 52, 2019. **Bol Epidemiol**, 2019. v. 51, n. 2. Janeiro de 2020.

MS, Ministério da Saúde. Boletim epidemiológico 7 - Monitoramento dos casos de Dengue, Febre Chikungunya e doença aguda pelo Vírus Zika até a semana epidemiológica 5, 2020. **Bol Epidemiol**, 2020. v. 51, n. 7. Fevereiro de 2020

NATRAJAN, M. S.; ROJAS, A.; WAGGONER, J. J. Beyond fever and pain: Diagnostic

methods for chikungunya virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57, n. 6, 1 jun. 2019.

NGOAGOUNI, C. *et al.* Potential of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* populations in the Central African Republic to transmit enzootic chikungunya virus strains. **Parasites & vectors**, v. 10, n. 1, p. 164, 27 mar. 2017.

NUNES, M. R. T. *et al.* Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine**, v. 13, n. 1, p. 102, 30 dez. 2015.

OLUWAYELU, D.; ADEBIYI, A.; TOMORI, O. Endemic and emerging arboviral diseases of livestock in Nigeria: a review. **Parasites & vectors**, v. 11, n. 1, p. 337, 7 jun. 2018.

PAL, P. *et al.* Development of a Highly Protective Combination Monoclonal Antibody Therapy against Chikungunya Virus. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 4, p. 1003312, abr. 2013.

PAUL, B. J.; SADANAND, S. Chikungunya Infection: A Re-emerging Epidemic. **Rheumatology and Therapy**, v. 5, n. 2, p. 317–326, 2018.

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, 1 fev. 2016.

POWERS, A. M. Vaccine and Therapeutic Options To Control Chikungunya Virus. **Clinical microbiology reviews**, v. 31, n. 1, 2018.

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, 1 dez. 2014.

PRIYA, R. *et al.* Cloning, expression and evaluation of diagnostic potential of recombinant capsid protein based IgM ELISA for chikungunya virus. **Journal of Virological Methods**, v. 203, p. 15–22, jul. 2014.

RAHMAN, M. *et al.* East/Central/South African Genotype in a Chikungunya Outbreak, Dhaka, Bangladesh, 2017. **Emerging infectious diseases**, v. 25, n. 2, p. 370–372, fev. 2019.

ROBINSON, M. C. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical features. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 1, p. 28–32, jan. 1955.

ROSS, R. W. The Newala epidemic. III. The virus: isolation, pathogenic properties and

relationship to the epidemic. **The Journal of hygiene**, v. 54, n. 2, p. 177–91, jun. 1956.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D, W. **Molecular Cloning, 3-Volume Set : A Laboratory Manual** Cold Spring Harboc Laboratory Press, 2000. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24532655>>

SERUYANGE, E. *et al.* Seroreactivity to Chikungunya and West Nile Viruses in Rwandan Blood Donors. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 19, n. 10, p. 731–740, 1 out. 2019.

SILVA, J. V. J. *et al.* A scoping review of Chikungunya virus infection: epidemiology, clinical characteristics, viral co-circulation complications, and control. **Acta tropica**, v. 188, p. 213–224, dez. 2018.

SILVA, L. A.; DERMODY, T. S. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. **The Journal of clinical investigation**, v. 127, n. 3, p. 737–749, 1 mar. 2017.

SMITH, T. J. *et al.* Putative receptor binding sites on alphaviruses as visualized by cryoelectron microscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 23, p. 10648–10652, 7 nov. 1995.

SNYDER, A. J.; MUKHOPADHYAY, S. The Alphavirus E3 Glycoprotein Functions in a Clade-Specific Manner. **Journal of Virology**, v. 86, n. 24, p. 13609–13620, 15 dez. 2012.

SONG, H. *et al.* Molecular Basis of Arthritogenic Alphavirus Receptor MXRA8 Binding to Chikungunya Virus Envelope Protein. **Cell**, v. 177, n. 7, p. 1714–1724.e12, 13 jun. 2019.

TEICH, V.; ARINELLI, R.; FAHHAM, L. Aedes aegypti e sociedade: o impacto econômico das arbovirose no Brasil Aedes aegypti and society: the economic burden of arboviruses in Brazil. **J Bras Econ Saúde**, v. 9, n. 3, p. 267–276, 2017.

TSETSARKIN, K. A. *et al.* A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. **PLoS pathogens**, v. 3, n. 12, p. e201, dez. 2007.

VAIRO, F. *et al.* **Chikungunya: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Features, Management, and Prevention** Infectious Disease Clinics of North America W.B. Saunders, , 1 dez. 2019. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891552019300650>>. Acesso em: 2 maio. 2020

VAN GENDEREN, F. T. *et al.* First Chikungunya Outbreak in Suriname; Clinical and Epidemiological Features. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. e0004625, 15 abr. 2016.

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 : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases**, v. 58, p. 69–76, 1 maio 2017.

WEAVER, S. C. *et al.* Chikungunya virus and prospects for a vaccine. **Expert review of vaccines**, v. 11, n. 9, p. 1087–101, set. 2012.

WEBER, C. *et al.* Identification of Functional Determinants in the Chikungunya Virus E2 Protein. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 1, p. e0005318, 2017.

WEGER-LUCARELLI, J. *et al.* Identifying the Role of E2 Domains on Alphavirus Neutralization and Protective Immune Responses. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 10, p. e0004163, 2015.

WEGER-LUCARELLI, J. *et al.* Dissecting the Role of E2 Protein Domains in Alphavirus Pathogenicity. **Journal of Virology**, v. 90, n. 5, p. 2418–2433, 1 mar. 2016.

YACTAYO, S. *et al.* Epidemiology of Chikungunya in the Americas. **The Journal of infectious diseases**, v. 214, n. suppl 5, p. S441–S445, 15 dez. 2016.

YAP, M. L. *et al.* Structural studies of Chikungunya virus maturation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 52, p. 13703–13707, 2017.

ZHU, C.; SETTY, P.; BOEDEKER, E. C. Development of live attenuated bacterial vaccines targeting *Escherichia coli* heat-labile and heat-stable enterotoxins. **Veterinary Microbiology**, v. 202, p. 72–78, 1 abr. 2017.

ARTIGO - Desenvolvimento de ensaio de imunoabsorção enzimática usando o domínio B da proteína E2 recombinante como antígeno para o diagnóstico da Chikungunya.

Tallyta Tâmara da Silva Monteiro ¹, Irassandra Rooze Pereira Uchôa Cavalcanti de Aquino ², Marjorie Caroline Liberato Cavalcanti Freire³, Suelen Cristina Gomes dos Santos ⁴, Christian Robson de Souza Reis ⁵, Rafael Dhalia ⁶.

¹ Bacharel em Biomedicina pela Universidade Federal de Pernambuco – UFPE; ² Mestre em Genética pela Universidade Federal de Pernambuco – UFPE; ³ Mestre em Ciências pelo Instituto Aggeu Magalhães; ⁴ Bacharel em Biomedicina pela Faculdade de Boa Viagem - UniFBV; ⁵ Doutor em Genética pela Universidade Federal de Pernambuco - UFPE; ⁶ Doutor em Biologia Molecular pela Universidade de Brasília - UnB.

RESUMO: As arboviroses são um grande desafio à saúde pública mundial. O Brasil é considerado alvo de epidemias, devido ao clima tropical e as precárias condições de saneamento que favorecem a proliferação dos vetores. Entre as arboviroses, a Febre Chikungunya (CHIKF) causada pelo Vírus Chikungunya (CHIKV) é transmitida por insetos do gênero *Aedes* e tem como principais sintomas: febre, dor de cabeça e artralgia. Atualmente existem algumas dificuldades no diagnóstico sorológico da CHIKF por apresentar reações cruzadas com outros arbovírus. O CHIKV consiste em um nucleocapsídeo e um RNA fita simples que codifica as proteínas virais. Dentre elas a glicoproteína E2, que compõe o envelope, pode ser dividida em três domínios A, B e C, dos quais o B (DBE2/CHIKV) tem papel imunogênico. Assim, o presente trabalho avaliar a aplicabilidade desta proteína no diagnóstico desta virose. Para isso, a sequência codificante da DBE2 foi otimizada para a expressão em sistema procarioto, subclonada no pRSETa, e teve sua expressão induzida em *Escherichia coli*. A proteína recombinante His/DBE2 produzida foi purificada por cromatografia de afinidade e foi avaliada a sua aplicabilidade no diagnóstico como antígeno no ELISA indireto para a pesquisa de anticorpo em 90 soros humanos. Foram calculadas as taxas de sensibilidade de 94,12% e especificidade de 98,21% e gerada a curva ROC do teste com AUC de 0,9827. Portanto, a His/DBE2 apresenta um potencial diagnóstico para a Chikungunya, porém, faz-se necessário mais estudos para tal aplicação.

PALAVRAS-CHAVE: Chikungunya, proteína E2, domínio B, diagnóstico, ELISA.

ABSTRACT: Arboviruses are a major challenge to global public health. Brazil is considered the target of epidemics, due to the tropical climate and the precarious sanitation conditions that favor the proliferation of vectors. Among arboviruses, Chikungunya Fever (CHIKF)

caused by the Chikungunya Virus (CHIKV) is transmitted by insects of the genus *Aedes* and has as main symptoms: fever, headache and arthralgia. Currently, there are some difficulties in the serological diagnosis of CHIKF due to cross-reactions with other arboviruses. CHIKV consists of a nucleocapsid and a single stranded RNA that encodes viral proteins. Among them, the E2 glycoprotein, which makes up the envelope, can be divided into three domains A, B and C, of which B (DBE2/CHIKV) has an immunogenic role. Thus, the present work evaluates the applicability of this protein in the diagnosis of this virus. For this, the coding sequence of DBE2 was optimized for expression in a prokaryotic system, subcloned in pRSETa, and its expression was induced in *Escherichia coli*. The recombinant His/DBE2 protein produced was purified by affinity chromatography and its applicability in the diagnosis as an antigen was evaluated in the indirect ELISA for antibody screening in 90 human sera. The sensitivity rates of 94,12% and specificity of 98,21% were calculated and the test ROC curve with AUC of 0,9827 was generated. Therefore, His/DBE2 presents a potential diagnosis for Chikungunya, however, further studies are needed for such application.

KEYWORDS: Chikungunya, E2 protein, B domain, diagnosis, ELISA.

INTRODUÇÃO

As arboviroses são viroses causadas por arbovírus, que por sua vez, são transmitidos por artrópodes hematófagos. O Brasil, por ser um país de clima tropical, possui características climáticas e ambientais favoráveis à proliferação dos vetores e à circulação das arboviroses (GOULD *et al.*, 2017; MARKLEWITZ; JUNGLEN, 2019).

Dentre as arboviroses, está a Febre Chikungunya (CHIKF) causada pelo Vírus Chikungunya (CHIKV) que é um *Alphavirus* da Família *Togaviridae*. Este arbovírus é transmitido por insetos do gênero *Aedes*, sendo o *Ae. aegypti* e o *Ae. albopictus* as espécies envolvidas na transmissão para humanos (GOULD *et al.*, 2017; PAUL; SADANAND, 2018). O CHIKV é formado por um nucleocapsídeo icosaédrico de 70 nm e um RNA fita simples positivo de aproximadamente 12 kb que codifica proteínas não-estruturais (nsP1-4) e estruturais (C, E1, E2, E3 e 6K) (CUNHA; TRINTA, 2017; YAP *et al.*, 2017).

A mialgia e a poliartralgia são os principais sintomas para o diagnóstico clínico da CHIKF e possuem caráter debilitante e incapacitante (CUNHA; TRINTA, 2017; PAUL; SADANAND, 2018). Devido a isso, esta virose não é somente uma adversidade para a saúde

pública, mas também é uma ameaça para a economia das áreas endêmicas, pois os surtos estão sempre atrelados a impactos econômicos (MAYER; TESH; VASILAKIS, 2017). O CHIKV já foi introduzido na África, Ásia, Europa, Oceania e nas Américas (SILVA; DERMODY, 2017; YACTAYO *et al.*, 2016). No Brasil, de acordo com o boletim epidemiológico publicado pelo Ministério da Saúde, em 2019 foram notificados 132.205 casos prováveis da Febre Chikungunya e confirmados 92 óbitos (MS, 2019).

De maneira geral, o diagnóstico sorológico do CHIKV é realizado através do ensaio de ELISA. Porém, neste tipo de diagnóstico, são descritos problemas de reação cruzada com outros *alphavirus*, apresentando falsos-positivos, além de existir limitações devido à baixa sensibilidade dos testes (BURDINO *et al.*, 2016; GAIBANI; LANDINI; SAMBRI, 2016).

A E2 é uma glicoproteína estrutural que faz parte do envelope do CHIKV, dando forma às espículas do vírus, junto com a E1. A E2 é dividida em três domínios: o A, que fica na parte central da molécula, o B, que se posiciona na região distal, e o C, que se apresenta na porção proximal, ancorando a proteína na membrana viral (WEBER *et al.*, 2017). Estudos identificaram que o domínio B da proteína E2 faz interação com o receptor celular, no processo de endocitose do vírus e, assim, a infecção celular. Além disso, foram identificados epítopos que induzem a produção de anticorpos neutralizantes na região deste domínio, tornando-o relevante para a produção de terapias, vacinas e plataformas de diagnóstico (WEGER-LUCARELLI *et al.*, 2015).

Diante dos dados epidemiológicos, é notável que se faz necessário tomar medidas de controle mais efetivas contra o CHIKV. Um diagnóstico rápido e preciso é importante para o manejo adequado do paciente, controle de surtos, vigilância epidemiológica e para o desenvolvimento de vacinas e terapias. Então, o presente trabalho visa avaliar o potencial diagnóstico do domínio B da proteína E2 no diagnóstico do CHIKV através de ensaios de ELISA indireto.

MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS

Análises *in silico* foram realizadas através dos softwares ElliPro, EpiTope e DiscoTope para a predição de epítopos lineares de linfócitos B, avaliando assim, o potencial

da DBE2 como ferramenta de diagnóstico. O genoma da *Linhagem Indian Ocean* (IOL) foi utilizado nestas análises e em todas as etapas experimentais posteriores deste trabalho.

7.2 DIGESTÃO E SUBCLONAGEM DO GENE DBE2

A sequência gênica que codifica o domínio B da proteína E2 do vírus Chikungunya encontrada no GenBank foi otimizada para expressão em *E. coli* e sintetizada comercialmente pela empresa GenScript (EUA), e o gene foi inserido no vetor de clonagem pUC57 simples. Então, o plasmídeo foi então submetido à digestão enzimática dupla utilizando as enzimas de restrição NheI/NcoI para subclonagem no vetor pRSETA que recebeu o mesmo tratamento. A confirmação da digestão foi observada em eletroforese de gel de agarose e os fragmentos de interesse foram purificados com o MinElute® Purification Kit (Qiagen). Por último, o gene do DBE2 foi submetido ao ensaio de ligação utilizando a Anza™ T4 DNA Ligase Master Mix, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante.

7.3 EXPRESSÃO HETERÓLOGA E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

Para a expressão da proteína, a construção plasmidial foi transformada em células de *E. coli* quimiocompetentes BL21 por choque térmico e crescidas em meio LB/AMP (Lúria Bertani acrescido de Ampicilina) sólido a 37°C por 16 horas. Em seguida, foi realizada a indução da expressão proteica com 1 mM de IPTG (isopropil- β -D-tio-galactosídeo) em 500 mL de LB/AMP líquido com agitação por 16 horas a 18°C, após a cultura atingir uma densidade óptica de 0,5 a 0,8.

Após a expressão, a cultura foi centrifugada formando um sedimento bacteriano que foi ressuspensionado em PBS (tampão fosfato salino) acrescido de 30 mM de imidazol, 1% Triton-X e ultrassonicado para a lise celular. Em seguida, foi realizada a purificação proteica por cromatográfica de afinidade por íons metálicos (IMAC) utilizando a resina de níquel HisPur™ Ni-NTA (Thermo Fisher). Ao obter a proteína purificada, a mesma foi quantificada em condição solúvel por espectrofotometria através do equipamento *Biowave II UV/Visible Spectrophotometer* com a espectroscopia à 280 nm, seguido da correção pelo coeficiente de extinção molar. Este coeficiente foi calculado a partir da sequência de aminoácidos da proteína em estudo, através da plataforma online gratuita ProtParam (disponível em <https://web.expasy.org/protparam/>).

7.4 ENSAIOS DE ELISA INDIRETO

Para isto, placas de 96 poços (Corning® 3690) foram sensibilizadas por 16 horas, a 4°C, em câmara úmida, com 500 ng/mL do antígeno His/DBE2 em tampão carbonato/bicarbonato (0,2 M, pH 9,4). Após incubação, o conteúdo foi descartado e os poços foram bloqueados por 15 minutos com solução de PBS Tween-20 (0,1%) e leite (5%). Em seguida, foram adicionados os soros na proporção de 1:50 em solução de leite e foram incubados por 2 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, foram realizadas 5 lavagens com PBS Tween-20 0,1%, para que, em seguida, fosse colocado o anticorpo secundário associado à peroxidase (Jackson) diluído também em solução de leite (1:30.000), sendo incubados por 1 hora em temperatura ambiente. As lavagens foram repetidas e foi adicionado TMB Peroxidase Substrate™ (Sera Care) que atuou por 30 minutos ao abrigo de luz para revelar os resultados. A reação foi interrompida com 50 µL de HCl 1N por poço e, por último, foi feita a leitura das placas no espectrofotômetro de microplaca *Benchmark Plus* da BIO-RAD utilizando o programa *Microplate Manager 5.2* a 450 nm.

7.5 DETECÇÃO DE ANTI-DBE2 EM SOROS HUMANOS

Foram analisados 90 soros do painel de amostras do Inquérito de Arboviroses do Recife da Fiocruz Pernambuco, coletados entre setembro de 2018 e agosto de 2019 na Região Metropolitana do Recife. Estes soros foram previamente caracterizados pela presença ou ausência de IgG anti-CHIKV através do teste de ELISA indireto comercial Euroimmun. As amostras foram separadas em 4 grupos: o CHIKV +, que apresentavam o IgG anti-CHIKV (n= 34); o ZIKV +, positivos para IgG anti-ZIKV (n=27); o DENV +, com IgG anti-DENV (n=21); e o grupo dos Sadios, sendo negativo para os três anticorpos pesquisados (n= 8).. Cada soro foi analisado em duplicata e os valores médios de OD foram utilizados para calcular o resultado do teste com respostas dicotômicas: positivo (acima do *cut off* - ponto de corte de positividade) ou negativo (abaixo do *cut off*). O *cut off* foi definido a partir da média da OD do grupo já testado negativo somado ao dobro do desvio padrão da média deste mesmo grupo.

7.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram calculadas as estimativas de parâmetro de diagnóstico (sensibilidade e especificidade) do teste para expressar a sua confiabilidade em detectar a infecção por CHIKV através da ferramenta online gratuita *MedCalc's Diagnostic Test Evaluation*

Calculator (disponível em https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_teste.php). Os gráficos foram gerados utilizando o software *GraphPad Prism* versão 5.0 para Windows.

7.7 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

As amostras de soro humano utilizadas neste estudo estão sob o parecer de número CAAE: 79605717.9.0000.5190 aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas do IAM/Fiocruz (CEP).

RESULTADOS

A sequência gênica otimizada que codifica o DBE2/CHIKV possui o tamanho de 213 pares de base (pb) e foi extraída do plasmídeo pUC57 simples, no qual estava inserida, para posterior subclonagem no vetor de expressão em sistema procarioto pRSETA (2897 pb). Para isso, foram realizadas digestões do pUC57/DBE2 e do vetor comercial com as enzimas *NheI/NcoI* para que fosse realizada a purificação das bandas do gel de agarose, seguida do ensaio de ligação.

Após ter os tamanhos dos fragmentos confirmados, excisados do gel e purificados foi possível seguir para a etapa de ligação. A confirmação da subclonagem foi realizada através da visualização de bandas do tamanho esperado, correspondente ao DBE2, em corrida eletroforética, após digestão de confirmação da construção plasmidial com as mesmas enzimas utilizadas anteriormente (Figura 1).

Com as subclonagens confirmadas pela liberação do fragmento de DNA com o tamanho previsto, iniciou-se a etapa de expressão da proteína recombinante. A proteína expressa pela construção plasmidial pRSETA/DBE2 apresenta uma cauda poli-histidina na sua porção N-terminal (His/DBE2) e se espera um tamanho de 8,3 kDa.

A purificação da proteína recombinante foi realizada por IMAC, fazendo uso de uma resina de níquel ativada. Na Figura 2, observa-se as frações dos eluatos 1 e 2 onde é possível visualizar a His/DBE2 purificada com 8,3 kDa, sendo a primeira eluição mais concentrada que a segunda. Ao quantificar a proteína alvo por espectrofotometria, calculamos um rendimento proteico de 8 mg/L.

Ao obter a proteína DBE2 recombinante, foi realizada a padronização do ELISA com soros humanos. Foram avaliadas três concentrações diferentes do antígeno His/DBE2 (2

$\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$ e 0,5 $\mu\text{g/mL}$) e três diluições do anticorpo secundário (1:10.000, 1:20.000 e 1:30.000), mantendo fixa a proporção do soro em 1:50. Assim, no processo de padronização foram testadas 9 variações do ensaio de ELISA. Através desta padronização, foi estabelecido que a melhor condição de realização do ELISA, dentre as avaliadas, foi aquela com 0,5 $\mu\text{g/mL}$ do antígeno e 1:30.000 do anticorpo secundário anti-IgG humano.

Após padronização do ensaio, foi possível avaliar se a referida proteína é promissora para ser utilizada no diagnóstico da Chikungunya, porém, necessitando ser melhor explorada posteriormente a cerca desta aplicação. Foram realizados 90 testes em duplicatas, sendo 34 soros previamente testados positivos para CHIKV e 56 testados negativos. O ELISA aqui padronizado apresentou um falso positivo e dois falsos negativos. Diante disso, foram estabelecidos os valores de sensibilidade, 94,12%, e especificidade, 98,21% do teste (Tabela 1) e foi plotada a curva ROC com a área abaixo da curva (AUC) de 0,9827 (Figura 3). Por último, foi observada a reatividade cruzada do teste com amostras positivas para outros arbovírus em co-circulação com o CHIKV (ZIKV e DENV) (Figura 4).

DISCUSSÃO

Um diagnóstico preciso e precoce para a Chikungunya é importante em diversos aspectos, como vigilância epidemiológica, prevenção de surtos, manejo adequado do tratamento do paciente e desenvolvimento de drogas e vacinas. Atualmente, o diagnóstico sorológico desta virose por ELISA é bem estabelecido, sendo utilizados kits comerciais com desempenhos aceitáveis, como os da EuroImmun, IBL, Abcam etc. Porém, há uma busca pelo melhoramento da acurácia dos testes, visto que há relatos de reação cruzada com outros *alphavirus* e baixa sensibilidade (BURDINO *et al.*, 2016; NATRAJAN; ROJAS; WAGGONER, 2019). Devido a reatividade cruzada, recomenda-se a realização de PRNT (após uma resposta positiva do ELISA) para a confirmação do diagnóstico (SILVA *et al.*, 2018).

Ainda neste trabalho, foi possível também avaliar a reatividade de soros humanos frente ao antígeno DBE2 em ensaios de ELISA, avaliando a possibilidade desta molécula ser utilizada no diagnóstico da Chikungunya. Foram observadas as taxas de sensibilidade e de especificidade do teste de 94,12% e 98,21%, respectivamente. Os resultados contrastam com os parâmetros obtidos nas avaliações de ELISA indireto com outras proteínas estruturais

recombinantes do CHIKV como C, E1, E2 e E1+E2, utilizadas como antígeno para pesquisa de anticorpo. Apesar da taxa de sensibilidade da His/DBE2 ter se mostrado superior à do antígeno E1, foi inferior às das proteínas C, E2 e E1+E2. Por outro lado, a taxa de especificidade obtida no nosso teste utilizando a subunidade DBE2 apresentou-se superior à de todos os antígenos supracitados (KHAN *et al.*, 2014; PRIYA *et al.*, 2014).

Em relação a algumas plataformas de ELISA comerciais, as taxas de sensibilidade e especificidade encontradas no teste aqui desenvolvido mostraram-se superiores, como por exemplo quando comparadas às da marca IBL. Em relação aos kits de ELISA da Euroimmun e Abcam, observou-se que o valor de sensibilidade do nosso teste é inferior, porém, com especificidade superior ao do kit da Euroimmun (MENDOZA *et al.*, 2019; PRAT *et al.*, 2014).

Também quando comparado a proteína sintética recombinante rCHIKVp, o nosso antígeno apresentou sensibilidade inferior e maior especificidade. A rCHIKVp, obtida a partir de uma sequência consenso gerada a partir do alinhamento do genoma de linhagens do CHIKV (cuja antigenicidade também foi previamente confirmada por análises *in silico*), apresentou 96% de sensibilidade e 97% de especificidade (BAGNO *et al.*, 2019).

O conjunto de resultados obtidos neste trabalho sugere que a proteína DBE2 tem potencial diagnóstico para Chikungunya, por apresentar taxas de sensibilidade e especificidade adequadas quando comparada a outros antígenos e kits comerciais de ELISA. Porém, faz-se necessários ensaios adicionais de validação incluindo testes de reação cruzada frente aos soros com sorologia positiva para outros *alphavirus*. Já os anticorpos policlonais obtidos contra DBE2 foram capazes de reconhecer eficientemente o antígeno recombinante utilizado para induzir a sua produção, o próprio CHIKV e a expressão da vacina de DNA que vem sendo desenvolvida pelo nosso grupo, alcançando os objetivos propostos.

CONCLUSÃO

A proteína recombinante His/DBE2 demonstrou reatividade, frente aos soros humanos positivos para IgG anti-CHIKV através de ensaios de ELISA, apresentando performances adequadas de sensibilidade e especificidade e consequente potencial para o diagnóstico da Chikungunya.

REFERÊNCIAS

BAGNO, F. F. *et al.* Development of an enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant protein antigen for the diagnosis of Chikungunya virus. **Data in Brief**, v. 25, 1 ago. 2019.

BURDINO, E. *et al.* **Unmet needs for a rapid diagnosis of chikungunya virus infection** *Emerging Infectious Diseases* Centers for Disease Control and Prevention (CDC), , 1 out. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5038423/>>. Acesso em: 30 out. 2020

CUNHA, R. V. DA; TRINTA, K. S. Chikungunya virus: clinical aspects and treatment - A Review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 8, p. 523–531, ago. 2017.

GAIBANI, P.; LANDINI, M. P.; SAMBRI, V. Diagnostic Methods for CHIKV Based on Serological Tools. In: [s.l: s.n.]. p. 63–73.

GOULD, E. *et al.* Emerging arboviruses: Why today? **One health (Amsterdam, Netherlands)**, v. 4, p. 1–13, dez. 2017.

KHAN, M. *et al.* Comparative evaluation of the diagnostic potential of recombinant envelope proteins and native cell culture purified viral antigens of Chikungunya virus. **Journal of Medical Virology**, v. 86, n. 7, p. 1169–1175, jul. 2014.

MARKLEWITZ, M.; JUNGLEN, S. Evolutionary and ecological insights into the emergence of arthropod-borne viruses. **Acta Tropica**, v. 190, p. 52–58, fev. 2019.

MAYER, S. V; TESH, R. B.; VASILAKIS, N. The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. **Acta tropica**, v. 166, p. 155–163, fev. 2017.

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, 1 dez. 2019.

NATRAJAN, M. S.; ROJAS, A.; WAGGONER, J. J. Beyond fever and pain: Diagnostic methods for chikungunya virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57, n. 6, 1 jun. 2019.

PAUL, B. J.; SADANAND, S. Chikungunya Infection: A Re-emerging Epidemic. **Rheumatology and Therapy**, v. 5, n. 2, p. 317–326, 2018.

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, 1 dez. 2014.

PRIYA, R. *et al.* Cloning, expression and evaluation of diagnostic potential of recombinant capsid protein based IgM ELISA for chikungunya virus. **Journal of Virological Methods**, v. 203, p. 15–22, jul. 2014.

SILVA, J. V. J. *et al.* A scoping review of Chikungunya virus infection: epidemiology, clinical characteristics, viral co-circulation complications, and control. **Acta tropica**, v. 188, p. 213–224, dez. 2018.

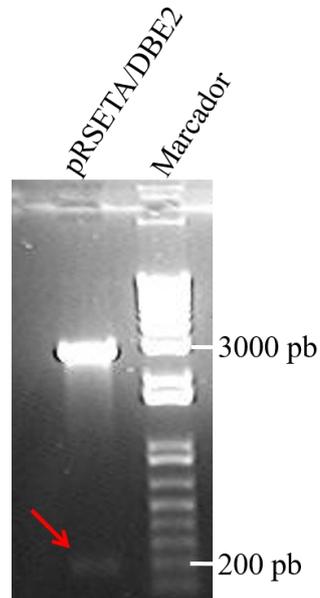
SILVA, L. A.; DERMODY, T. S. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. **The Journal of clinical investigation**, v. 127, n. 3, p. 737–749, 1 mar. 2017.

WEBER, C. *et al.* Identification of Functional Determinants in the Chikungunya Virus E2 Protein. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 1, p. e0005318, 2017.

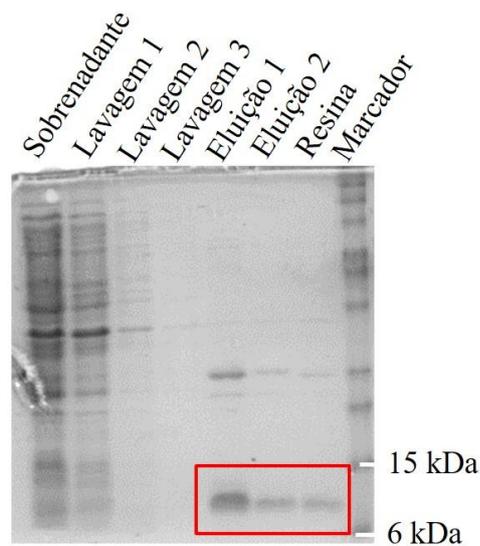
WEGER-LUCARELLI, J. *et al.* Identifying the Role of E2 Domains on Alphavirus Neutralization and Protective Immune Responses. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 10, p. e0004163, 2015.

YACTAYO, S. *et al.* Epidemiology of Chikungunya in the Americas. **The Journal of infectious diseases**, v. 214, n. suppl 5, p. S441–S445, 15 dez. 2016.

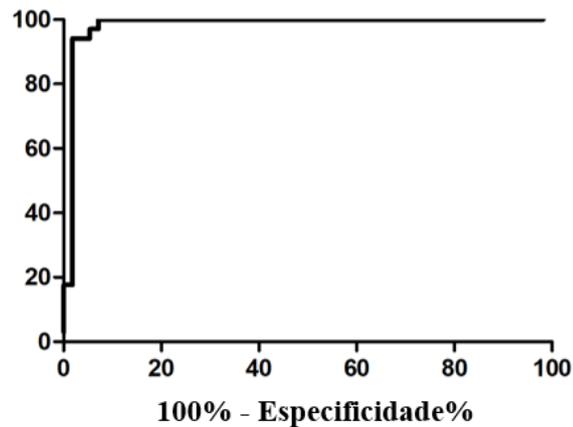
YAP, M. L. *et al.* Structural studies of Chikungunya virus maturation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 52, p. 13703–13707, 2017.

Figura 1 - Digestão de confirmação da ligação do gene DBE2 no pRSETA.

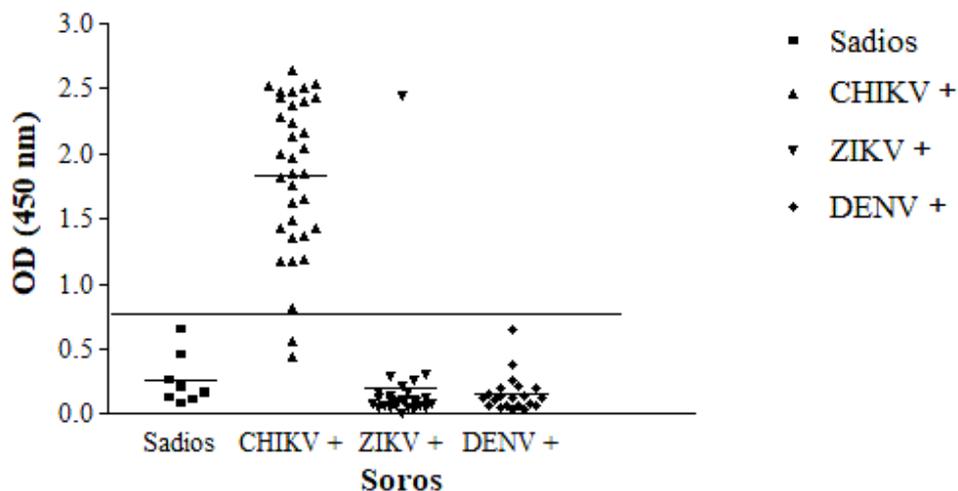
Nota: Gel de agarose 1% evidenciando o fragmento de 213 pb liberado após digestão dupla com as mesmas enzimas de restrição (NheI e NcoI) utilizadas na ligação ao pRSETA (2897 pb).

Figura 2 – Purificação da proteína recombinante His/DBE2.

Nota: SDS-PAGE 15% mostrando cada etapa do processo de purificação por cromatografia de afinidade e evidenciando a proteína His/DBE2 no tamanho de 8,3 kDa nos dois eluatos coletados e na resina.

Figura 3 – Curva ROC estabelecida para o ELISA com a His/DBE2.

Nota: Curva ROC calculada para avaliar o desempenho do antígeno His/DBE2 no ensaio de ELISA com soros humanos, apresentando AUC = 0,9827 ($p < 0,0001$).

Figura 4 – Reatividade cruzada da His/DBE2 com soros ZIKV + e DENV +.

Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: Gráfico evidenciando as densidades óticas (eixo Y) dos testes de ELISA indireto utilizando a His/DBE2 como antígeno para soros previamente testados e separados em quatro grupos (eixo X): Sadios (negativos para CHIKV, ZIKV e DENV), CHIKV + (positivos para CHIKV), ZIKV + (positivos para ZIKV) e DENV + (positivos para DENV). A linha horizontal no plano cartesiano representa o *cut off* calculado no valor de 0,78. Amostras com a OD acima do *cut off* são consideradas positivas. Já amostras com a OD abaixo do *cut off* são consideradas negativas.

Tabela 1 – Sensibilidade e especificidade do ELISA indireto com a proteína His/DBE2 como antígeno.

Kit comercial (Euroimmun)	ELISA His/DBE2		Parâmetros
	n° de pos	n° de neg	
Pos. (n = 34)	32	2	Sensibilidade: 94,12%
Neg. (n = 56)	1	55	Especificidade: 98,21%

Nota: Tabela comparando o ELISA realizado com o antígeno His/DBE2 com o teste comercial Euroimmun para a pesquisa de IgG anti-CHIKV. Pos – positivos. Neg – negativos.