

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Aggeu Magalhães

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

Irassandra Rooze Pereira Uchôa Cavalcanti de Aquino

**Desenvolvimento e avaliação imunológica de uma vacina de DNA contra o
vírus Chikungunya**

Recife

2023

Irassandra Rooze Pereira Uchôa Cavalcanti de Aquino

**Desenvolvimento e avaliação imunológica de uma vacina de DNA contra o
vírus Chikungunya**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientador: Dr. Rafael Dhalia

Co-orientadores: Dr. Christian Robson de Souza Reis

Dr. Rafael Freitas de Oliveira França

Recife

2023

Título do trabalho em inglês: Development and immunological evaluation of a DNA vaccine against the Chikungunya virus.

O presente trabalho foi realizado com apoio de Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) - Código de Financiamento 001.

A657d Aquino, Irassandra Rooze Pereira Uchôa Cavalcanti de.
Desenvolvimento e avaliação imunológica de uma vacina de DNA contra o vírus Chikungunya / Irassandra Rooze Pereira Uchôa Cavalcanti de Aquino. -- 2023.
111 p. : il.color, mapas.

Orientador: Rafael Dhalia.
Coorientadores: Christian Robson de Souza Reis e Rafael Freitas de Oliveira França.
Tese (Doutorado em Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Aggeu Magalhães, Recife, 2023.
Bibliografia: f. 83-93.

1. Vírus Chikungunya. 2. Antígeno 12E7. 3. Vacina de DNA. 4. Desenvolvimento de Vacinas. 5. Eficácia de Vacinas. I. Título.

CDU 577.2

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Rede de Bibliotecas da Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecário responsável pela elaboração da ficha catalográfica: Adagilson Batista Bispo da Silva - CRB-1239
Biblioteca Luciana Borges Abrantes dos Santos

Irassandra Rooze Pereira Uchôa Cavalcanti de Aquino

**Desenvolvimento e avaliação imunológica de uma vacina de DNA contra o
vírus Chikungunya**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Aprovada em: 10 de março de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Rafael Dhália (Presidente da Banca)
Instituto Aggeu Magalhães – Fiocruz/PE

Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos
Instituto Aggeu Magalhães – Fiocruz/PE

Dr. Marcelo Henrique Santos Paiva
Instituto Aggeu Magalhães – Fiocruz/PE

Dra. Elisa de Almeida Neves Azevedo
Instituto Aggeu Magalhães – Fiocruz/PE

Dr. Wagner José Tenório dos Santos
Bio-Manguinhos – Fiocruz/RJ

À minha família

AGRADECIMENTOS

Agradeço Aquele que tem me sustentado em todos os momentos. Que tem sido o meu alívio, a minha calma e a sabedoria de sempre seguir firme. Às vezes nem tão forte, mas sempre firme.

Ao meu esposo, pai dos meus filhos, meu melhor amigo e minha maior rede de apoio, Pedro Aquino. Aos meus filhos lindos (Lorena e Yohan), minha mãe (Rilva), meu pai (Iraquitán), meu irmão (Iraelson), minha cunhada (Lays), minha sobrinha (Julia) e toda família, de forma geral, por todo auxílio, amor e compreensão.

Agradeço ao meu orientador, Rafael Dhália, pela confiança depositada em mim para o desenvolvimento desse trabalho. Mesmo sabendo que seria um grande desafio, a chance foi me dada. Porém gostaria de agradecer ainda mais pelo crescimento profissional e por ter compartilhado o seu conhecimento durante todos esses anos.

Agradeço aos meus co-orientadores, Rafael França e Christian Reis, por todo ensinamento e atenção. Em especial, a Rafael França que me acompanhou desde dos primeiros experimentos e com toda paciência me ensinou as técnicas necessárias para desenvolver a pesquisa. Também foi o responsável pela colaboração com o Dr. Fernando Cunha, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – SP, para alcançarmos os objetivos finais do projeto.

Agradeço a todos que trabalham na virologia (e até os que não fazem mais parte), sem exceção. Aqui fiz amigos e colegas de trabalho que irei levar para vida.

Agradeço ao “Do Caso controle para a vida”, Verônica e Tatiane, pela amizade, força e companhia de sempre. Nossos caminhos se cruzaram em 2016 e até então, estamos juntas compartilhando alegrias e desafios.

Agradeço à toda equipe da Pesquisa Clínica. Essa área tão encantadora e repleta de desafios diários que nos incentiva a sermos melhores a cada dia.

Agradeço ao Instituto Aggeu Magalhães, por toda a estrutura e equipamentos necessários para a execução da pesquisa e ao Programa de Pós-graduação em Biociência e Biotecnologia em Saúde que permitiu a concretização de um sonho.

Agradeço também a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e a Fundação de Apoio à Fiocruz (Fiotec) que financiaram a realização desse estudo.

Apenas quem tem coragem consegue viver o sobrenatural.

(Desconhecido).

RESUMO

AQUINO, Irassandra Rooze Pereira Uchôa Cavalcanti de. Desenvolvimento e avaliação imunológica de uma vacina de DNA contra o vírus Chikungunya. 2023. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2023.

A febre Chikungunya é uma infecção debilitante que afeta alguns indivíduos por vários anos. O agente causador da doença é o vírus Chikungunya (CHIKV), de grande relevância médica, transmitido aos seres humanos por espécies de mosquitos *Aedes*. Estudos demonstraram a importância da proteção mediada por anticorpos neutralizantes que se ligam a epítomos conservados no domínio B, da glicoproteína E2 viral, inibindo a entrada ou a saída do vírus na célula. Neste projeto foi analisada a estrutura tridimensional da proteína E2 do vírus CHIKV, através de predição de epítomos (*in silico*), e foram identificadas duas regiões de interesse na porção do domínio B da Proteína E2 do CHIKV (DBE2-CHIKV). O DNA que codifica esta região foi comercialmente otimizado e subclonado em vetores de expressão para camundongos e humanos, visando a imunização de camundongos (para avaliação da resposta imunológica e ensaios de desafio letal). Em ambas as construções plasmidiais o antígeno DBE2 foi fusionado a região C-terminal de LAMP-1 (*Lysosomal Associated Membrane Protein - 1*), porção proteica que ativa a via MHC II de apresentação antigênica (favorecendo a formação de células B de memória). Camundongos foram imunizados com as formulações de DNA e os soros obtidos utilizados para avaliar a resposta imunológica, através da avaliação de resposta humoral, neutralizante e de eficiência vacinal por desafio letal. Os resultados indicam uma produção de anticorpos específicos em camundongos nocautes para a via de Interferon do tipo I, imunizados com três doses das construções vacinais, e um percentual de 82% de neutralização viral em ensaios de placa. Entretanto, a proteção não foi considerada efetiva frente à infecção com o vírus selvagem no ensaio de desafio letal. Os animais utilizados neste trabalho mostraram-se essenciais para avaliação do produto vacinal *in vitro* e da doença *in vivo*, porém não foram considerados como modelo ideal para avaliar a eficiência de um novo produto vacinal, frente a desafio letal, devido às suas limitações imunológicas.

Palavras-chaves: vírus Chikungunya; antígeno 12E7; vacina de DNA; desenvolvimento de vacinas; eficácia de vacinas.

ABSTRACT

AQUINO, Irassandra Rooze Pereira Uchôa Cavalcanti de. Development and immunological evaluation of a DNA vaccine against the Chikungunya virus. 2023. Thesis (Doctorate in Biosciences and Biotechnology in Health) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2023.

Chikungunya fever is a debilitating infection that affects some individuals for several years. The causative agent of the disease is the Chikungunya Virus (CHIKV), of great medical relevance, transmitted to humans by species of *Aedes* mosquitoes. Studies have demonstrated the importance of protection mediated by neutralizing antibodies that bind to conserved epitopes in domain B of the viral glycoprotein E2, inhibiting the entry or exit of virus into the cell. In this project, the three-dimensional structure of the CHIKV virus E2 protein was analyzed through epitope prediction (in silico), and two regions of interest were identified in the B domain portion of the CHIKV E2 Protein (DBE2-CHIKV). The DNA encoding this region was commercially optimized and subcloned into mouse and human expression vectors, aiming at mouse immunization (for evaluation of immune response and lethal challenge assays). In both plasmid constructions, the DBE2 antigen was fused to the C-terminal region of LAMP-1 (Lysosomal Associated Membrane Protein - 1), a protein portion that activates the MHC II antigenic presentation pathway (favoring the formation of memory B cells). Mice were immunized with the DNA formulations and the sera obtained used to evaluate the immune response, through the evaluation of humoral and neutralizing response and vaccine efficiency by lethal challenge. The results indicate the production of specific antibodies in knockout mice for the type I Interferon pathway, immunized with three doses of the vaccine constructions, and a percentage of 82% of viral neutralization in plaque assays. However, the protection was not considered effective against infection with the wild virus in the lethal challenge assay. The animals used in this work proved to be essential for evaluating the vaccine product *in vitro* and the disease *in vivo*, but they were not considered an ideal model to evaluate the efficiency of a new vaccine product, in the face of a lethal challenge, due to their immunological limitations.

Keywords: Chikungunya virus; 12E7 antigen; DNA vaccine; vaccine development; vaccine efficacy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Ciclo de vida do vírus Chikungunya mostrando a relação entre o ciclo enzoótico/silvestre e o ciclo urbano	21
Figura 2 -	Países e territórios onde foram relatados casos de Febre Chikungunya	23
Figura 3 -	Genótipos do Vírus Chikungunya	24
Figura 4 -	Sintomas mais comuns da Febre Chikungunya	28
Figura 5 -	Desenvolvimento das manifestações clínicas da CHIKV associada aos métodos de diagnóstico diferenciais	29
Figura 6 -	Estrutura dos Alfavírus	31
Figura 7 -	Proteínas estruturais dos Alfavírus	31
Figura 8 -	Organização genômica dos Alfavírus	32
Figura 9 -	Etapas do ciclo replicativo dos Alfavírus	33
Figura 10 -	Complexo protéico do envelope viral dos Alfavírus	34
Figura 11 -	Produção da resposta imunológica induzida pela vacina	36
Figura 12 -	Tipos de vacinas licenciadas	38
Figura 13 -	Vantagens e desvantagens de algumas estratégias vacinais	39
Figura 14 -	Etapas do desenvolvimento vacinal	40
Figura 15 -	Estrutura tridimensional da proteína E2	43
Figura 16 -	Predição de epítomos da proteína E2	44
Figura 17 -	Domínio B da proteína E2	45
Figura 18 -	Apresentação Antigênica de Produtos Vacinais	46
Figura 19 -	Fluxograma do estudo	48
Figura 20 -	Designers das construções vacinais	50
Figura 21 -	Esquema de experimentação animal com camundongos nocautes da linhagem IFNAR BI/6	56
Figura 22 -	Esquema da curva de sobrevivência de camundongos da linhagem IFNAR BI/6 infectados com o vírus Chikungunya	57
Figura 23 -	Esquema do desafio letal com camundongos da linhagem IFNAR BI/6 previamente imunizados com os produtos vacinais de estudo	58
Figura 24 -	Digestão das construções plasmidiais do DBE2-CHIKV para camundongo e humano do vetor comercial	62

Figura 25 - Digestão das construções plasmidiais do DBE2-CHIKV no vetor de expressão para humanos	63
Figura 26 - Digestão diferencial das construções plasmidiais do DBE2-CHIKV no vetor de expressão para humanos.	65
Figura 27 - Digestão das construções plasmidiais do DBE2-CHIKV no vetor de expressão para camundongo	65
Figura 28 - Digestão diferencial das construções plasmidiais do DBE2-CHIKV no vetor de expressão para camundongo	66
Figura 29 - Detecção do DBE2-CHIKV obtido dos extratos celulares de transfecção, infecção e proteína recombinante purificada	68
Figura 30 - Localização subcelular de proteínas do vírus Chikungunya detectadas em extratos celulares de transfecção e infecção viral	70
Figura 31 - Análise das concentrações do anticorpo secundário em ensaios de ELISA	71
Figura 32 - Curva padrão estabelecida para ensaios de ELISA	72
Figura 33 - Análise da produção de anticorpos de camundongos nocautes imunizados com os produtos vacinais	73
Figura 34 - Análise da produção de anticorpos neutralizantes de camundongos nocautes imunizados após a primeira dose	74
Figura 35 - Análise da produção de anticorpos neutralizantes de camundongos nocautes imunizados após a segunda dose	75
Figura 36 - Análise da produção de anticorpos neutralizantes de camundongos nocautes imunizados após a terceira dose	75
Figura 37 - Avaliação do percentual de peso de camundongos nocautes infectados com o vírus Chikungunya	77
Figura 38 - Avaliação observacional do edema de pata de camundongos nocautes infectados com o vírus Chikungunya	78
Figura 39 - Curva de sobrevivência de camundongos nocautes infectados com o vírus Chikungunya	79
Figura 40 - Avaliação do percentual de peso inicial de camundongos nocautes previamente imunizados e desafiados com o vírus Chikungunya	80

Figura 41 - Avaliação percentual da medida inicial da junta de camundongos nocautes previamente imunizados e desafiados com o vírus Chikungunya	81
Figura 42 - Percentual de sobrevivência de camundongos previamente imunizados e desafiados com o vírus Chikungunya	82
Gráfico 1 - Coeficiente de incidência e óbitos de Febre Chikungunya nos anos de 2014 a 2019	25
Gráfico 2 - Casos prováveis de Chikungunya entre os anos 2019 e 2022 no Brasil	26
Quadro 1 - Principais candidatos à vacina contra o Vírus Chikungunya	42
Quadro 2 - Denominação das construções plasmidiais do estudo	49

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Valores de Cycle threshold (Ct) dos vírus para a determinação qualitativa dos resultados	58
Tabela 2 - Proteínas do estudo e seus respectivos tamanhos, em kDa, observadas nos ensaios de Western Blot	67
Tabela 3 - Grupos de camundongos previamente imunizados com 3 doses vacinais e os respectivos valores de Cycle threshold (Ct) seguido dos resultados correspondentes da detecção de RNA viral após 2 dias de infecção do vírus Chikungunya	80

LISTA DE ABREVIATURAS

APCs	<i>Antigen-presenting cells</i>
ApE	A Plasmid Editor
BCG	Bacilo Calmette – Guérin
BPL	Betapropiolactona
CHIKV	Vírus Chikungunya
COVID-19	Coronavírus disease – 2019
CHIKF	<i>Chikungunya Fever</i>
CP	proteína do capsídeo
cryo-EM	<i>Cryo-electron Microscopy</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
dpid	dias pós início da doença
E	Proteína do Envelope
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DBE2-CHIKV	Domínio B da Proteína E2 do CHIKV
DBE2-CHIKV/BIG-LAMP/Hu	DBE2-CHIKV fusionado às regiões N- e C- terminal da Proteína de Associação à Membrana Lisossomal – LAMP -1 (BIG-LAMP) no vetor para expressão em Humanos (Hu)
DBE2-CHIKV/C-LAMP/Hu	DBE2-CHIKV fusionado à região C- terminal da Proteína de Associação à Membrana Lisossomal – LAMP -1 (C-LAMP) no vetor para expressão em Humanos (Hu)
DBE2-CHIKV/C-LAMP/Mi	DBE2-CHIKV fusionado à região C-LAMP no vetor para expressão em camundongos (Mi, do inglês, Mice).
DBE2-CHIKV/WT/Mi	DBE2-CHIKV selvagem (WT, do inglês, <i>Wild Type</i>) no vetor para expressão em camundongos (Mi, do inglês, Mice).
ECSA	<i>East/Central/South African Genotypes</i>
EEEV	<i>Eastern equine encephalitis virus</i>
ELISA	Ensaio Imunoenzimático Indireto

FMRP- USP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo
HEK 293 T	<i>Human Embryo Kidney</i>
HRP	Peróxido de hidrogênio Oxidorredutase
Ig	Imunoglobulina
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
<i>IOL</i>	<i>Indian Ocean lineage</i>
LAMP-1	<i>Lysosomal Associated Membrane Protein - 1</i>
LD50	Dose Letal que reduz o número de animais vivos em 50%
MEM	Modified Eagle's Medium
MHC II	<i>Major Histocompatibility Complex Class II</i>
MOI	multiplicidade de infecção
NC	Nucleocapsídeo
NPT	Núcleo de Plataforma Tecnológicas
nsP	Proteínas não estruturais
PFU	<i>Plaque-Forming Unit</i>
PI	Programa de Imunização
PRNT	<i>Plaque Reduction neutralization Test</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	<i>Open Reading Frames</i>
RE	Reticulo endoplasmático
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAg	RNA genômico
RNAss+	RNA cadeia simples de polaridade positiva
SE	Semanas Epidemiológicas
SFV	<i>Semliki Forest vírus</i>
TF	Proteínas transmembranas
VERO	<i>African green monkey kidney epithelial cells</i>
VLPs	<i>Viral Like particles</i>
WAF	<i>West African genotype</i>
WEEV	<i>Western equine encephalitis virus</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL	20
2.1	ORIGEM	20
2.2	EPIDEMIOLOGIA.	22
2.3	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA DOENÇA	27
2.4	CARACTERÍSTICAS DO VÍRUS	29
2.5	VACINAS	35
2.6	PRODUTO VACINAL PROPOSTO NO ESTUDO	42
3	OBJETIVOS	47
3.1	OBJETIVO GERAL	47
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
4	METODOLOGIA	48
4.1	FLUXOGRAMA METODOLÓGICO	48
4.2	SUBCLONAGEM EM VETOR DE EXPRESSÃO	48
4.3	CULTIVO DE CÉLULA VERO	51
4.3.1	Estoque viral	51
4.3.2	Inativação viral	52
4.4	CULTIVO DE CÉLULA HEK 293T	52
4.4.1	Ensaio de transfecção com as construções de DNA vacinais	53
4.4.2	Ensaio de Infecção com o vírus Chikungunya	53
4.5	WESTERN BLOT	54
4.6	IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA	55
4.7	EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	55
4.7.1	Imunização dos camundongos	56
4.7.2	Curva de Sobrevida dos camundongos infectados com o vírus Chikungunya	57
4.7.3	Desafio letal de camundongos previamente imunizados com os produtos vacinais do estudo	57
4.8	ENSAIOS DE ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)	59
4.8.1	Padronização da concentração de soros	59
4.8.2	Padronização da concentração do conjugado	59

4.8.3	Análise dos títulos de anticorpos IgG anti-DBE2/CHIKV	59
4.8.4	Análise Estatística	60
4.9	TESTE DE NEUTRALIZAÇÃO POR REDUÇÃO DE PLACAS (PLAQUE REDUCTION NEUTRALIZATION TEST – PRNT)	60
5	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	60
6	RESULTADOS	62
6.1	OBTENÇÃO DAS CONSTRUÇÕES DE DNA VACINAIS PARA CAMUNDONGOS E HUMANOS	62
6.1.1	Construções de DNA vacinal em vetor para expressão para humanos	63
6.1.2	Construções de DNA vacinal em vetor para expressão em camundongo	65
6.2	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO FRAGMENTO GÊNICO DBE2 DO VÍRUS CHIKUNGUNYA EM CÉLULAS HUMANAS	67
6.3	IDENTIFICAÇÃO DA LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DA SUB- UNIDADE PROTÉICA DBE2-CHIKV EM CÉLULAS HUMANAS	68
6.4	PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS	71
6.4.1	Definição da concentração do anticorpo conjugado	71
6.4.2	Definição da concentração dos soros	71
6.5	ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA HUMORAL DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM AS CONSTRUÇÕES VACINAIS	72
6.6	ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA NEUTRALIZANTE DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM AS CONSTRUÇÕES VACINAIS	73
6.7	ANÁLISE DA EFICIÊNCIA VACINAL EM CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM AS CONSTRUÇÕES VACINAIS	76
6.7.1	Análise da sobrevivência de camundongos nocautes (IFNAR BL/6) infectados com o Vírus Chikungunya	76
6.7.2	Análise do desafio letal de camundongos previamente imunizados com as construções vacinais	79
7	DISCUSSÃO	83

REFERÊNCIAS**ANEXO A - PARECER CEUA FMRP-USP****ANEXO B - PARECER CEUA IAM/FIOCRUZ****APÊNDICE - ARTIGO PUBLICADO**

1 INTRODUÇÃO

As arboviroses têm representado um desafio à saúde pública, devido a grande diversidade de patógenos que causam significativas taxas de morbidade e/ou mortalidade, além de estarem associados a grandes epidemias. Mas também devido às mudanças climáticas e ambientais e aos desmatamentos que favorecem a amplificação, a transmissão viral, além da transposição da barreira entre espécies. Os Arbovírus (*Arthropod-borne virus*) são assim designados pelo fato de parte de seu ciclo de replicação ocorrer nos insetos, podendo ser transmitidos aos seres humanos e outros animais pela picada de artrópodes hematófagos. Das mais de 545 espécies de arbovírus conhecidas, cerca de 150 causam doenças em humanos.

O Vírus Chikungunya (CHIKV), atualmente um dos arbovírus de grande relevância médica, pertencente ao gênero Alphavirus (família *Togaviridae*) apresenta RNA de polaridade positiva, cadeia simples, organizado em cinco proteínas estruturais (capsídeo, E3, E2, 6K/TF e E1) e quatro não estruturais (nsP1-4). O CHIKV é transmitido aos seres humanos por espécies de mosquitos *Aedes* e causa uma infecção debilitante caracterizada por febre, erupção cutânea, miosite e artrite, com dores nas articulações que dura em alguns indivíduos por vários anos. Historicamente, já causaram surtos na África e na Ásia. Em 2013, a transmissão do CHIKV ocorreu no Hemisfério Ocidental, e em apenas 18 meses causou mais de 1,4 milhão casos de infecção nas Américas, em mais de 40 países.

No Brasil, a febre Chikungunya foi detectada pela primeira vez em 2020, quando foram notificados 82.419 casos prováveis, com uma maior taxa de incidência nas regiões Nordeste e Sudeste, e em 2021 foram notificados 95.852 casos prováveis com um aumento significativo no primeiro trimestre, em comparação ao ano anterior. Em 2022 ocorreram 174.517 casos prováveis com um aumento de 78,9% quando comparado com o ano de 2021, sendo a maior incidência na região nordeste.

Embora atualmente não haja vacinas ou terapias licenciadas disponíveis para CHIKV ou qualquer outro *alphavírus*, estudos demonstraram a importância da proteção mediada por anticorpos neutralizantes que se ligam a epítopos conservados do domínio B, da glicoproteína viral E2, e inibem a entrada ou a saída do vírus na célula. A proteína E2 madura contém três domínios: um domínio A, que está localizado centralmente na superfície e possui local de ligação para um suposto receptor; o domínio B, localizado na extremidade distal, cobrindo o loop de fusão em E1; e o

domínio C, na extremidade proximal. Os determinantes antigênicos do domínio B, devido sua capacidade de gerar anticorpos neutralizantes, podem ser direcionados para o desenvolvimento terapêutico de vacinas ou anticorpos contra múltiplos *alphavírus* de interesse global.

Em trabalhos prévios realizados pela colaboradora Marjorie Caroline Liberato Cavalcanti Freire do grupo BIOMAT – Fiocruz/PE, coordenado pelo Dr. Roberto Dias Lins Neto) foi utilizada a estrutura tridimensional da proteína E2 do vírus CHIKV, pertencente a linhagem *Indian Ocean*, para uma avaliação de predição de possíveis epítomos (*in silico*) baseando-se em características estruturais de flexibilidade, hidrofobicidade, superfície de exposição ao solvente e características físico-químicas dos aminoácidos. Dessa forma, foram identificadas duas regiões de interesse na porção do domínio B (Domínio B da Proteína E2 do CHIKV, DBE2-CHIKV). O DNA que codifica a referida região foi comercialmente otimizado e sintetizado, para desenvolver e avaliar uma formulação vacinal contra o vírus Chikungunya em modelo animal.

2 REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL

2.1 ORIGEM

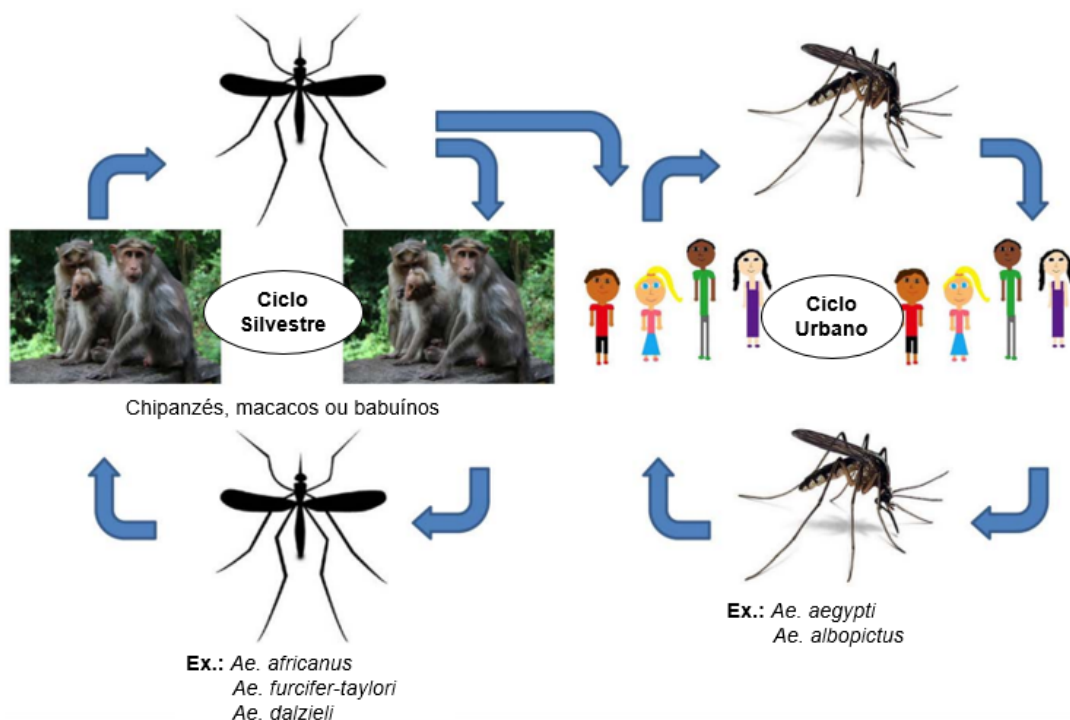
Em julho de 1952, uma epidemia até então desconhecida foi relatada ao longo dos planaltos costeiros de Mawia, Rondo e Makonde na atual Tanzânia, país localizado na África Oriental e conhecido por suas vastas áreas selvagens e safári. As maiores taxas de ataque foram identificadas nas regiões epidêmicas constituída por aldeias (40-50%), áreas rurais cujos planaltos apresentavam solos altamente permeáveis facilitando o armazenamento de água, pelos moradores. Como consequência surgiram grandes populações de mosquitos, indicando que estas poderiam ter uma função relevante na propagação e persistência da doença. O vírus Chikungunya (*Chikungunya Virus*, CHIKV), causador do surto, foi isolado em 1953 a partir de amostras de várias espécies de mosquitos *Aedes* e de sangue de indivíduos que apresentaram sintomas febris característicos da, até então, desconhecida moléstia (LUMSDEN, 1955; ROSS, 1956).

A Febre Chikungunya (*Chikungunya Fever*, CHIKF) foi derivada de um termo descritivo aplicado pelas pessoas de Makonde como a “doença que dobra as articulações”, pois apresentava um início muito nítido de dores incapacitantes nas articulações, febre severa e, eventualmente, erupções cutâneas. Alguns estudos apontam que a baixa incidência da Malária (uma das doenças infecciosas humanas generalizada e potencialmente letal que, na época, infestava todos os continentes, exceto a Antártica), nas regiões dos planaltos costeiros, pode ter facilitado a identificação e descrição da nova epidemia. Vale salientar que por muitas vezes a doença foi associada a outros arbovírus, como O’nyong nyong e dengue, pela similaridade de sintomas e co-circulação viral, que muitas vezes, ainda representa um desafio nos dias atuais (HAMMON; RUNDNICK; SATHER, 1960; POWERS et al., 2000; ROSS, 1956; WEAVER, 2014).

A infecção humana se estendeu para o Leste da África (Ugana) e África Subsaariana, principalmente em regiões rurais. A primeira evidência da epidemia fora da África foi em 1958 em Bangkok, Tailândia (Ásia), quando o CHIKV foi isolado e associado também a ciclos urbanos pela transmissão do *Ae. aegypti*. Entretanto, um estudo reportado em 1971 sugeriu a presença do vírus na Ásia desde 1779, correlacionando-o com os surtos de dengue. Um estudo realizado em 1964 detectou

anticorpos contra o CHIKV em primatas não humanos, em Zimbábue (Sul da África), sugerindo que estes podem ser hospedeiros de amplificação competentes para a transmissão do vírus por mosquitos. Esse cenário caracteriza dois ciclos do vírus bem estabelecidos: um enzoótico/silvestre (macacos – mosquitos - macacos) realizados, principalmente, por várias espécies do gênero *Aedes*, e um urbano (humanos – mosquitos - humanos) associado aos *A. aegypti* e *A. albopictu* (Figura 1) (CAREY, 1971; COFFEY; FAILLOUX; WEAVER, 2014; HAMMON; RUNDNICK; SATHER, 1960; PATERSON; MCINTOSH, 1964; WEINBREN; HADDOW; WILLIAMS, 1958).

Figura 1 - Ciclo de vida do vírus Chikungunya mostrando a relação entre o ciclo enzoótico/silvestre e o ciclo urbano. Na esquerda, observa-se o vírus mantido em um ciclo silvestre que compreende primatas não humanos e principalmente diferentes espécies de mosquitos *Aedes* (*Ae. Africanus*, *Ae. furcifer-taylori*, *Ae. dalzieli*, etc.). Na direita, observa-se o vírus em um ciclo urbano entre humanos e mosquitos de duas espécies do gênero *Aedes*, *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*.



Fonte: adaptado de Thiboutot et al. (2010).

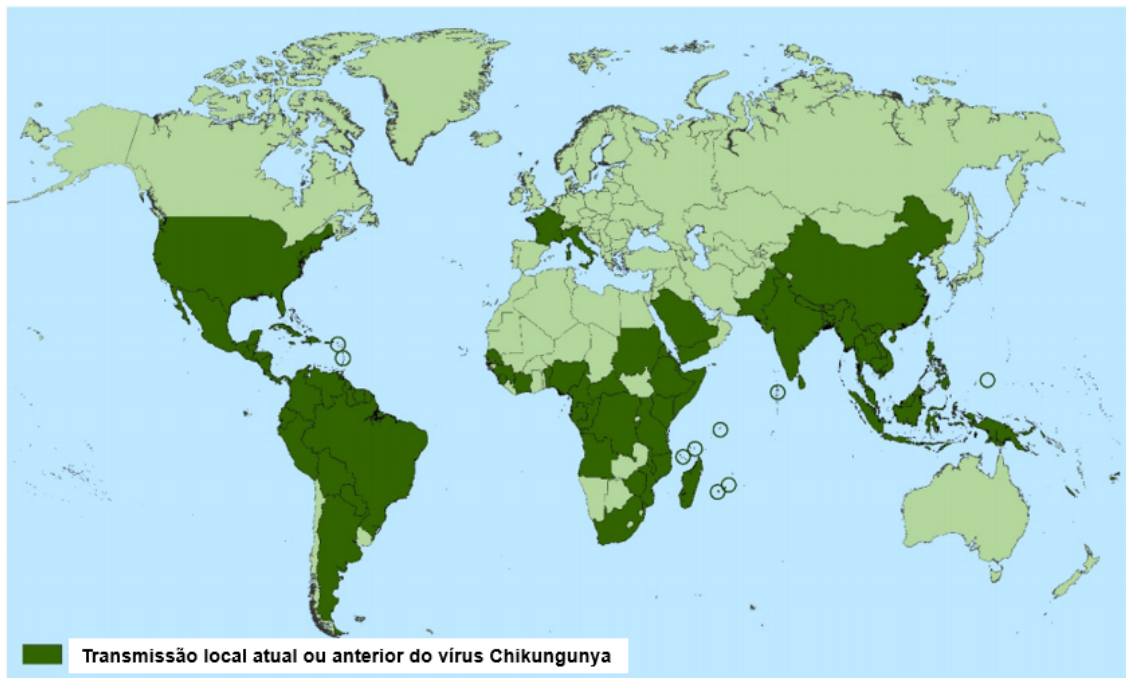
Os surtos foram expandidos em muitas partes da África e esporadicamente na Ásia. Por vários anos foi detectado o vírus no Senegal (ocidente da África), sugerindo extinções e reintroduções locais do CHIKV ou circulação enzoótica estável, acompanhada de um ciclo silvestre ainda não bem esclarecido. Posteriormente, estudos evidenciaram a soroprevalência e o isolamento do vírus em primatas não

humanos senegaleses, indicando o seu papel como hospedeiros amplificadores. Diante desse cenário, o macaco verde africano (encontrado nesta região da África e exportado para vários países, em navios de escravos, desde o século XVII) poderia ser um possível reservatório do vírus e, desta forma, introduzi-los em novas regiões como o Caribe e a América Latina. No entanto, a existência de uma ampla faixa de vetores enzoóticos sugere que outros vertebrados também poderiam ser reservatórios e, através de análises de isolamento viral, o CHIKV foi detectado em outras espécies de mamíferos, como o esquilo dourado e os morcegos. Essa diversidade de reservatórios potenciais provavelmente contribuiu para a disseminação do vírus, dentre outros fatores (DIALLO et al., 2012, 2013, 1999; WEAVER; FORRESTER, 2015a).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

Atualmente, 114 países distribuídos em 6 dos 7 continentes (com exceção da Antártida) têm reportado casos da CHIKF no mundo, totalizando mais de 2 milhões de casos desde 2005 (Figura 2). No entanto, a epidemia foi por muito tempo restrita e assídua apenas na África e Ásia, apresentando o seu maior número de casos entre 1960 e 1980, nas referidas regiões. Após uma diminuição significativa até 2004, quando mais uma vez números alarmantes de novos casos foram relatados no Quênia (país da África Ocidental com litoral para o Oceano Índico), um novo surto da doença rapidamente se disseminou, em 2005, para o Oceano Índico, Sul da Ásia e Índia. A febre da Chikungunya reapareceu na Índia, após uma interrupção de 32 anos da doença, apresentando mais de 1,3 milhões de casos em 13 estados, até 2006. Vale salientar que foi identificada a co-infecção do CHIKV e dengue, em vários desses estados. Logo mais, no ano de 2007, a doença reemergiu no oeste da África e pequenos surtos foram reportados na Europa, sendo a Itália um dos países afetados (ARANKALLE et al., 2007; POWERS; LOGUE, 2007; REZZA et al., 2007; SASWAT et al., 2015; SERGON et al., 2008; WHO, 2015).

Figura 2 - Países e territórios onde foram relatados casos de Febre Chikungunya. Um total de 114 países notificaram casos da doença, distribuídos nos continentes da África, Ásia, América, Oceania/Ilhas Pacíficas e Europa.



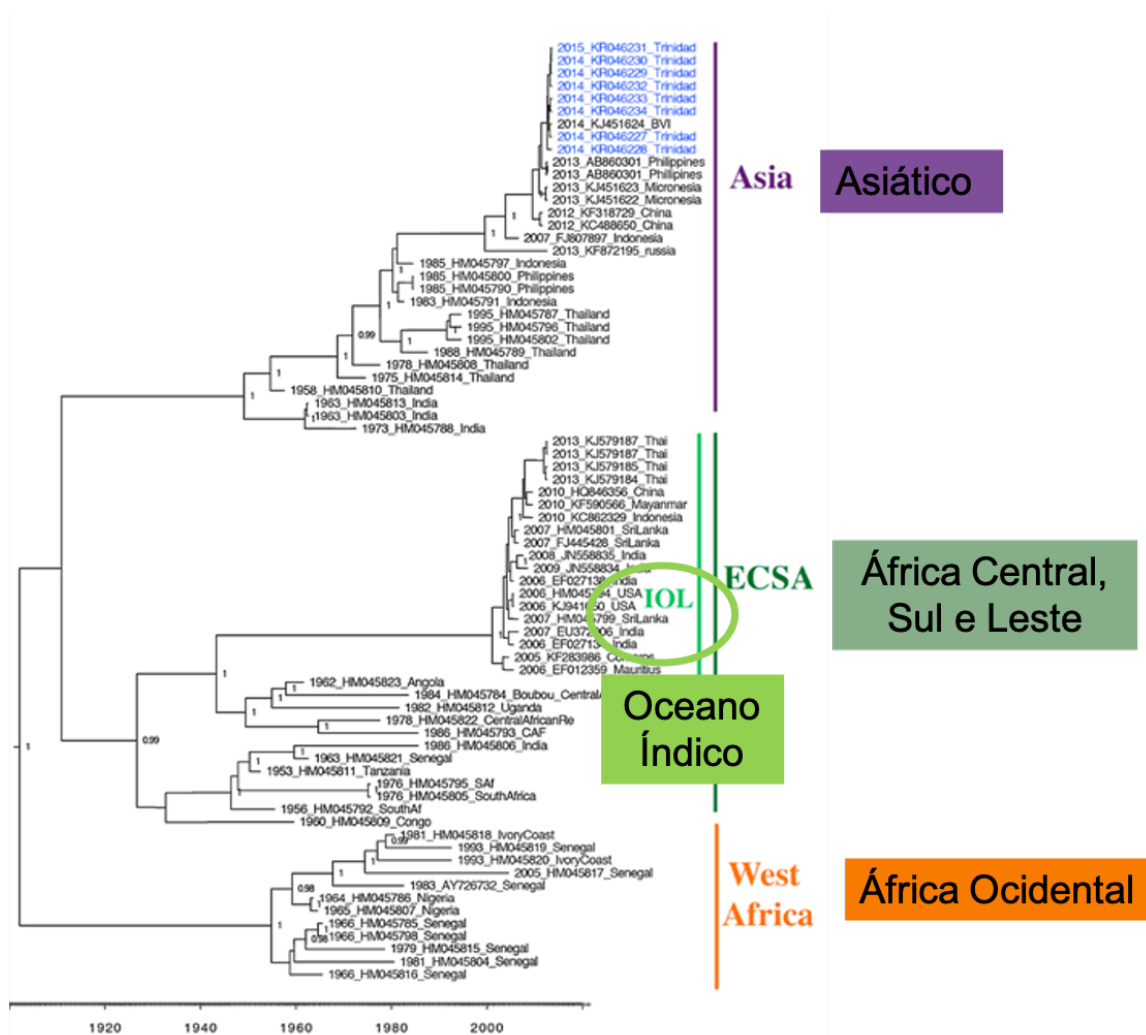
Fonte: adaptado de CDC (2019).

Em 2013, o CHIKV foi introduzido na região do Caribe e velozmente o número de casos evidenciou a transmissão da doença em comunidades indígenas de vários países do Caribe. Não durou muito e, em 2014, a CHIKF emergiu em toda América (central, sul e norte). No Brasil, os primeiros casos de um surto começaram a ser detectados em junho de 2014, após a introdução simultânea da cepa asiática no Oiapoque (Amapá) e da cepa africana em Feira de Santana (Bahia). Alguns estudos relataram a detecção de casos importados da CHIKF em vários países das Américas, incluindo o Brasil, de viajantes que retornaram da Indonésia e da Índia em 2010. Esses dados sugerem que o vírus provavelmente já teria sido introduzido no Brasil, antes das evidências do primeiro surto de 2014 (ALBUQUERQUE et al., 2012; BRASIL, 2015).

De acordo com a distribuição geográfica mundial da doença foram identificados quatro genótipos do CHIKV, através de análises filogenéticas. Dois genótipos foram descritos na África: a linhagem Leste, Central e Sul-Africana (do inglês *East, Central, and South-African*, ECSA) e o da África Ocidental (do inglês *West African*, WAF). O terceiro foi detectado na Ásia (do inglês, *Asian genotype*) e, em 2004 um novo grupo

filogenético derivado da ECSA foi identificado causando grandes epidemias: a linhagem do Oceano Índico (do inglês *Indian Ocean Lineage*, IOL) (Figura 3). Enquanto a transmissão da IOL foi relacionada, principalmente, com os mosquitos *Ae. Albopictus*, um estudo recente detectou também a presença do ECSA em mosquitos da mesma espécie e, curiosamente, em mosquitos *Culex quinquefasciatus* na Ilha Caribenha do Haiti. No Brasil, embora o surto tenha sido desencadeado pelo genótipo ECSA oriundo da Angola, análises de amostras clínicas detectaram uma possível co-circulação e também infecção simultânea dos genótipos ECSA e Asiático na região nordeste do Brasil (MACHADO et al., 2019; NUNES et al., 2015; POWERS et al., 2000; SCHUFFENECKER et al., 2006; VOLK et al., 2010; WAHID et al., 2017; WHITE et al., 2018).

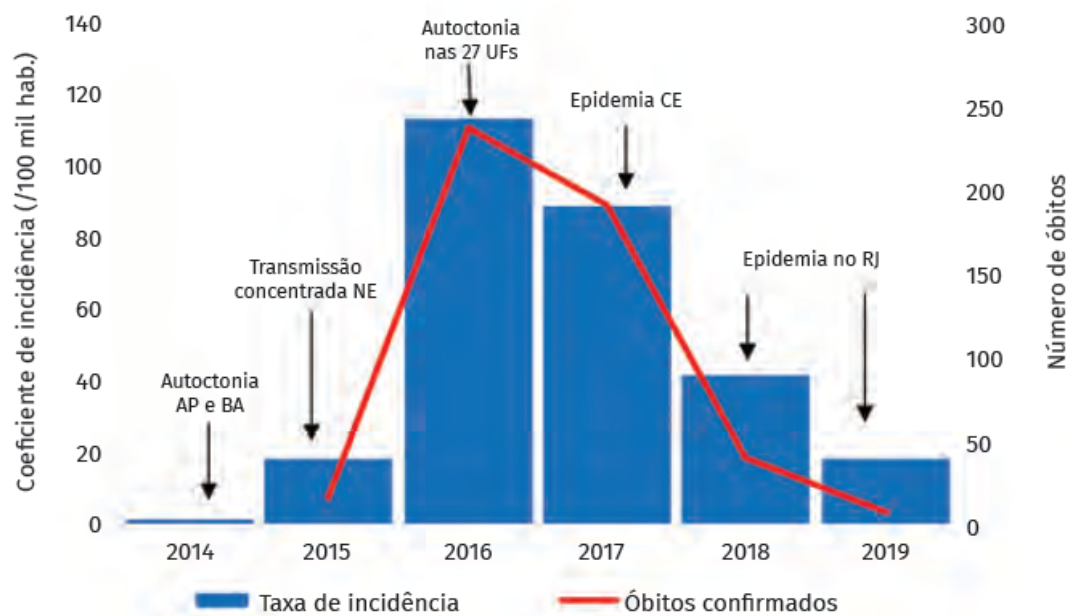
Figura 3 - Genótipos do Vírus Chikungunya. Identificação dos genótipos do vírus Chikungunya por análises de filogenética ressaltando a linhagem do Oceano Índico (IOL), derivada do genótipo do Leste, Central e Sul-Africano (ECSA).



Fonte: adaptado de Wahid et al. (2017).

Com relação a progressão da doença no Brasil, entre os anos de 2014 a 2019, foram notificados 589.076 casos prováveis, destacando a região nordeste nos anos iniciais da epidemia (Bahia, Rio Grande do Norte, Pernambuco e Ceará). Nos anos mais recentes, 2018 e 2019, a região sudeste tem relatado mais número de casos, principalmente no Rio de Janeiro, seguida da região nordeste. Os maiores coeficientes de incidência, 114,0 e 89,4 casos (por 100 mil habitantes), foram observados nos anos de 2016 e 2017, respectivamente, mesmo período que o país também registrou o ápice de outras epidemias semelhantes com os vírus dengue e zika. Em relação ao número de eventos fatais, 495 óbitos foram confirmados por critério laboratorial, triados previamente por critérios clínico-epidemiológicos. A faixa etária de óbitos foi de 0 à 96 anos, no entanto, observou-se uma maior taxa de letalidade em pessoas com idade acima de 79 anos (1,13%) e em menores de 1 ano (0,4%) (Gráfico 1) (BRASIL, 2014, 2015, 2016, 2018, 2019a, 2020a).

Gráfico 1 - Coeficiente de incidência e óbitos de Febre Chikungunya nos anos de 2014 a 2019. Coeficiente de incidência da Febre Chikungunya relacionado com o número de óbitos, assim como com as regiões que mais se destacaram durante a epidemia entre os anos de 2014 a 2019.

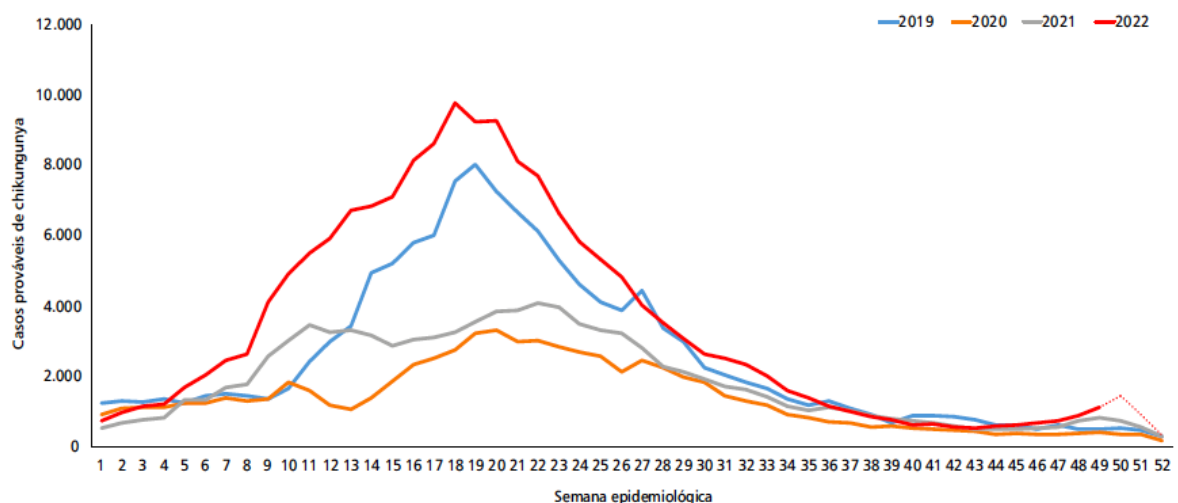


Fonte: adaptado de Brasil (2019b).

Em 2020, a partir do mês de abril observou-se uma diminuição da notificação de casos prováveis no país comparado ao mesmo período de 2019. Esse fato pode ser atribuído ao início da pandemia do novo Coronavírus (Covid-19), que necessitou

da mobilização das equipes de vigilância e assistência para o enfrentamento da doença, o que pode ter gerado uma subnotificação nos dados das arboviroses. O receio da população de procurar um atendimento médico, nesse contexto pandêmico, também pode ter contribuído para esta redução. Ao final de 2020 foram notificados 82.419 casos prováveis com uma maior taxa de incidência nas regiões Nordeste e Sudeste. Em 2021 foram notificados 95.852 casos prováveis e observou-se um aumento significativo no primeiro trimestre em comparação com o ano anterior, seguida de uma diminuição dos casos. A região Nordeste apresentou o maior número de casos prováveis, seguida das regiões Sudeste e Norte. Em Pernambuco, houve um aumento de 469% do número de casos da doença nos primeiros sete meses de 2021. No ano de 2022, foram registrados 174.517 casos prováveis com um aumento de 32,4% e 78,9% quando comparado com os anos de 2019 e 2021, respectivamente. Sendo a maior incidência na região nordeste, seguida das regiões Centro-Oeste e Norte (Gráfico 2). (BRASIL, 2020b, 2021a, 2021b, 2021c, 2023; PERNANBUCO, 2021).

Gráfico 2 - Casos prováveis de Chikungunya entre os anos 2019 e 2022 no Brasil. Durante os registros de notificações de casos prováveis de Chikungunya coletados entre as semanas epidemiológicas 1 e 52 do ano de 2022, observa-se um aumento de 32,4% e 78,9% de casos registrados para o mesmo período nos anos de 2019 e 2021, respectivamente.



Fonte: adaptado de Brasil (2023).

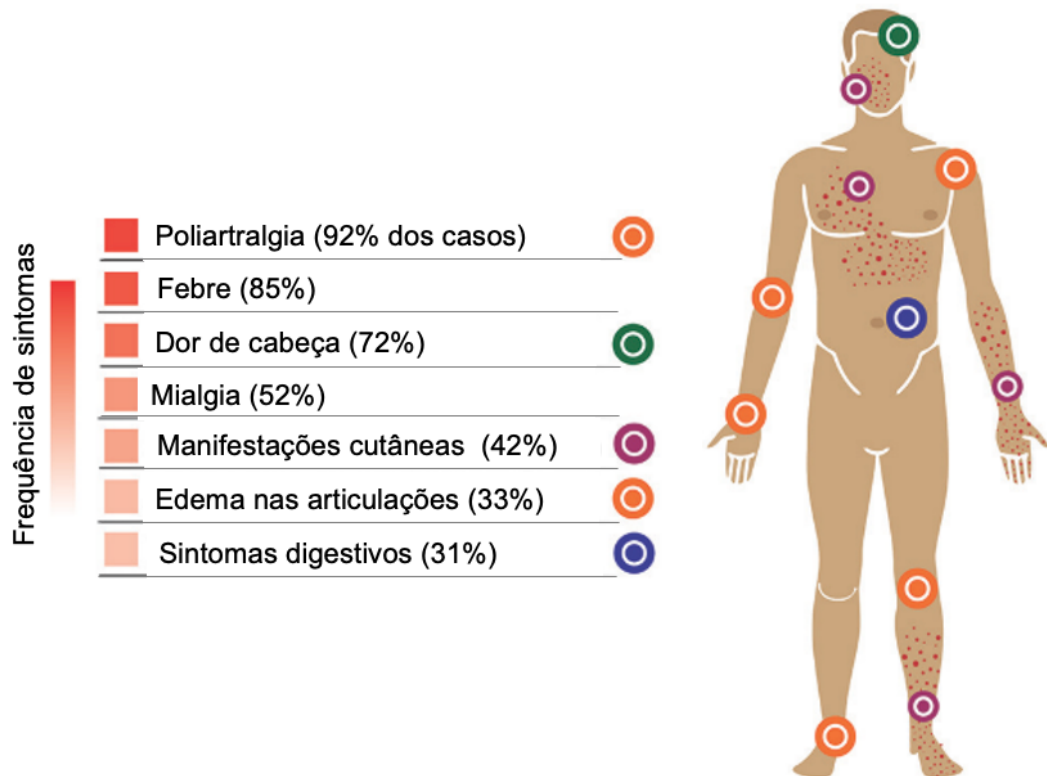
Vale ressaltar que a dispersão do vírus Chikungunya tem características similares a de outros arbovírus, com ciclos epidêmicos de transmissão idênticos a Febre

Amarela, Dengue e, mais recentemente, Zika. Estudos realizados no sudeste do Senegal evidenciaram uma periodicidade de CHIKV a cada 4-7 anos, em concordância com a renovação da população de macacos. Contudo, o aumento da circulação do vírus nos mosquitos vetores a partir do ciclo silvestre a cada 4-7 anos, pode não necessariamente causar surtos em paralelo em humanos. Outros fatores importantes podem também contribuir para a disseminação desses vírus, como à crescente atividade de transportes para fins comerciais ou culturais (marítimos, aéreos, etc.), os processos de urbanização intensificados a partir do século XX, a capacidade vetorial do local e às características intrínsecas do vírus no desenvolvimento da doença (DEGALLIER et al., 2001; DIALLO et al., 2012, 2013, 1999; DONALISIO; FREITAS; ZUBEN, 2017; WEAVER; FORRESTER, 2015a).

2.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA DOENÇA

A maioria dos indivíduos infectados pelo CHIKV desenvolvem a CHIKF e inicialmente apresentam febre, manchas vermelhas pelo corpo, mialgia, dor de cabeça e intensa poliartralgia (Figura 4). No entanto, há relatos de casos mais severos caracterizados por encefalite, miocardite, hepatite e falência de múltiplos órgãos. Os idosos (acima de 65 anos), com comorbidades preexistentes, e neonatos apresentam maior risco de desenvolver os sintomas mais graves da doença. Em neonatos foi relatada a infecção por transmissão vertical (mãe-feto) durante a gestação ou no momento do nascimento, quando a mãe está em fase virêmica, causando neuroinvasão viral que pode resultar em casos de encefalopatias, problemas cognitivos, microcefalia e paralisia cerebral. Apenas 15% dos indivíduos acometidos pelo CHIKV são assintomáticos (BANDEIRA et al., 2016; GÉRARDIN et al., 2014; LEMANT et al., 2008; MINER et al., 2015; RAJAPAKSE; RODRIGO; RAJAPAKSE, 2010; SCHILTE et al., 2013).

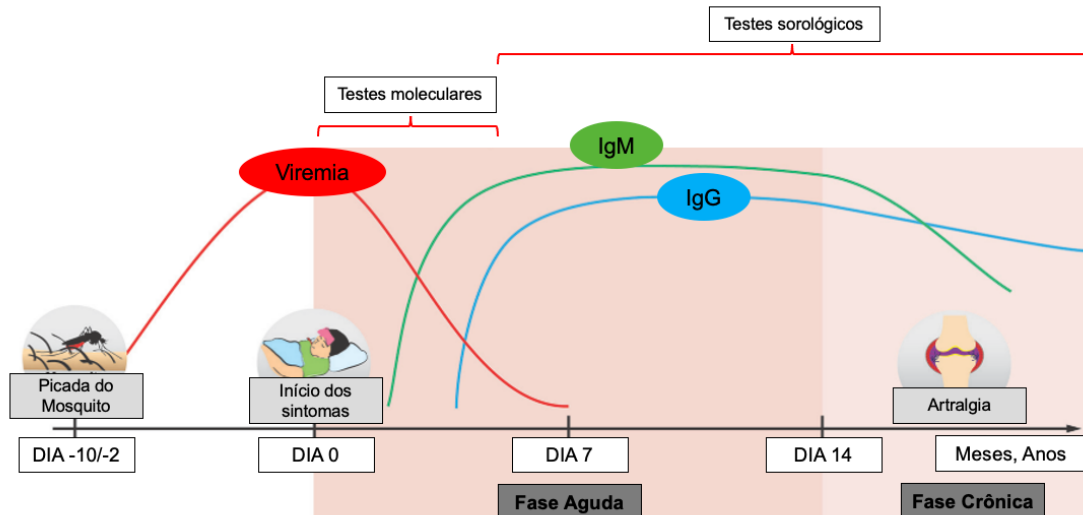
Figura 4 - Sintomas mais comuns da Febre Chikungunya. A Poliartralgia é o sintoma mais frequente entre os indivíduos acometidos pela doença, em 92% dos casos, seguida da febre (85%), dor de cabeça (72%), mialgia (52%), manifestações cutâneas (42%), edemas nas articulações (33%) e sintomas digestivos (31%).



Fonte: adaptado de Tanabe et al. (2018)

A CHIKF é dividida em duas fases: aguda e crônica. A primeira é caracterizada pelos sintomas iniciais da doença e podem desaparecer em uma ou duas semanas, sendo ainda subdividida em uma fase viral (3 - 5 dias pós início da doença - dpid) e outra convalescente (5 - 14 dpid). No entanto, as fortes dores nas articulações (algumas vezes acompanhadas por edema local) podem permanecer por meses, ou até mesmo anos, caracterizando a fase crônica. A identificação das fases clínicas auxilia na escolha do teste diagnóstico mais adequado preciso, molecular (detecção viral) ou sorológico (detecção de anticorpos), e está diretamente relacionada com a eficácia do resultado obtido (Figura 5) (ALFONSO J. RODRÍGUEZ-MORALES, JAIME A. CARDONA-OSPINA, SIVIA FERNANDA URBANO-GARZÓN, 2016; BURT et al., 2017; TANABE et al., 2018).

Figura 5 - Desenvolvimento das manifestações clínicas da CHIKF associada aos métodos de diagnóstico diferenciais. Após a picada do mosquito, o CHIKV apresenta um período de incubação de 2-10 dias para que seja iniciada a fase aguda (dia 0). Nos dias 3-5 dessa fase são utilizados testes moleculares para detecção viral e no período de convalescência (a partir do dia 5) são escolhidos os métodos sorológicos para detecção dos anticorpos (IgM e IgG). A fase crônica é caracterizada por artralgia persistente e estabilidade dos níveis de IgG que podem estar presentes por mais de anos.



Fonte: adaptado de Tanabe et al. (2018)

Embora casos severos e mortes sejam atribuídos ao CHIKV em diferentes países, a taxa de mortalidade não é considerada, por muitos autores, alarmante. No entanto, a intensa e duradoura sintomatologia da CHIKF pode causar severos problemas sociais e de produtividade econômica, devido às altas taxas de morbidade evidenciadas pela doença. Porém, os desafios para essa enfermidade não se limitam apenas aos aspectos socioeconômicos. Também podemos mencionar a dificuldade em um diagnóstico preciso da infecção devido a similaridade das manifestações clínicas com outras arboviroses, como Dengue e Zika. E por fim, ainda vale salientar que não existe, até o momento, um tratamento eficaz contra a CHIKF, o que direciona a busca de estudos mais aprofundados para o conhecimento da biologia molecular desse vírus, no intuito de identificar alvos vacinais e terapêuticos (BURT et al., 2017; DE BRITO, 2017).

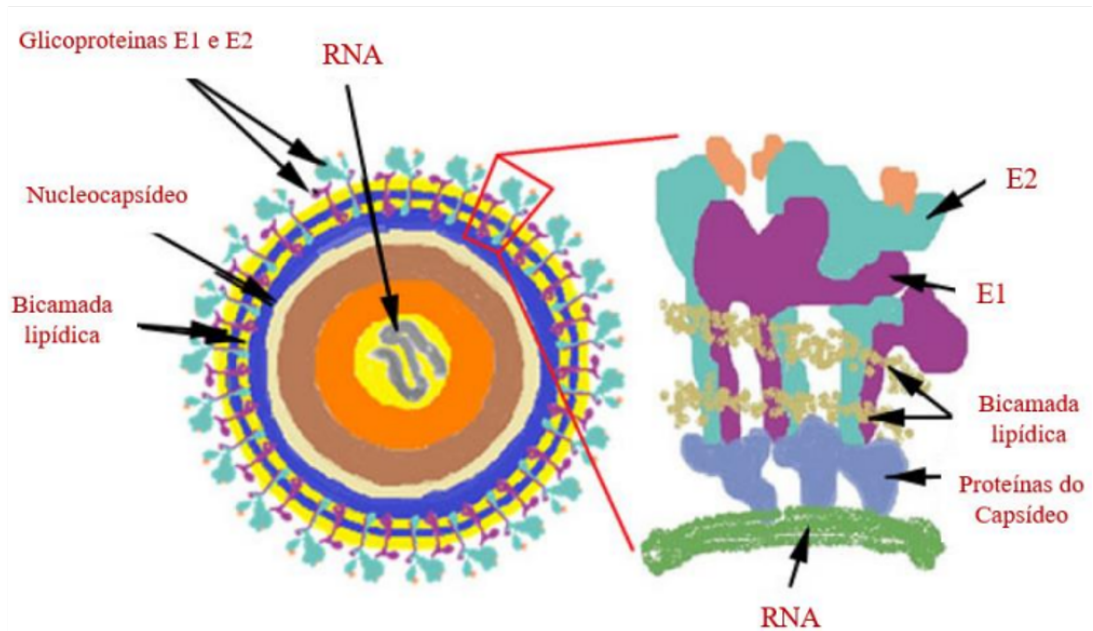
2.4 CARACTERÍSTICAS DO VÍRUS

O CHIKV pertence à Família *Togaviridae* e gênero *Alphavirus*. Os vírus que compõem este gênero são classificados não apenas pela diversidade molecular e

antigênica, mas também categoricamente como Alfavírus do Novo ou Velho Mundo, a depender da localização geográfica que foram isolados inicialmente e das manifestações clínicas que desenvolvem. Os Alfavírus relacionados ao Novo Mundo normalmente causam encefalite em humanos e outros mamíferos, como o Vírus da encefalite equina ocidental (do inglês *Western equine encephalitis vírus*, WEEV) e o Vírus da encefalite equina oriental (do inglês *Eastern equine encephalitis vírus*, EEEV). O Velho Mundo é representado por viroses que causam febre, manifestações cutânea, artralgia e rara letalidade, como o CHIKV e o vírus da floresta Semliki (do inglês *Semliki Forest vírus*, SFV) (POWERS et al., 2001; STRAUSS; STRAUSS, 1994; WEAVER; FORRESTER, 2015b).

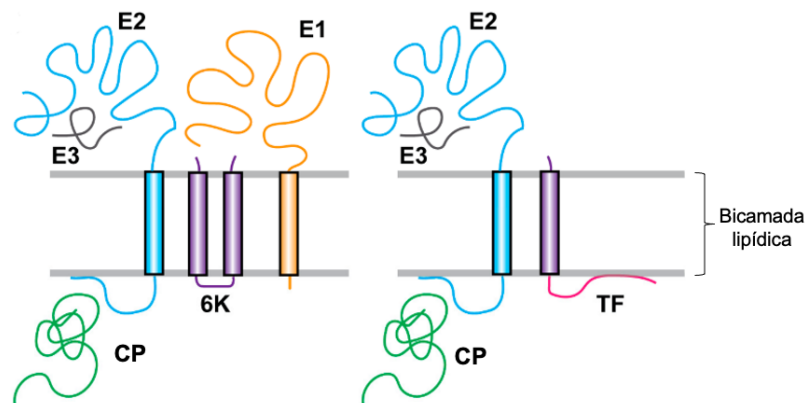
Após vários estudos, a estrutura dos Alfavírus foi descoberta através da técnica de Microscopia Eletrônica por Criopreservação (do inglês *Cryo-electron Microscopy*, cryo-EM) e as imagens obtidas reconstruídas. O virion tem 70 nm de diâmetro, formato esférico, natureza icosaédrica e apresenta projeções pontiagudas em sua superfície que se assemelham a pétalas. A partir de um corte longitudinal foi possível identificar que a camada mais interna é formada por uma molécula do RNA genômico e a proteína do capsídeo (CP), que juntos formam o nucleocapsídeo (NC). Em seguida, são visualizados uma bicamada lipídica e um envelope (E) com a presença das glicoproteínas transmembranas, E1 e E2, responsáveis pelas projeções na superfície (Figura 6). Em uma análise mais minuciosa é possível observar a glicoproteína E3 associada ao E2 e as proteínas transmembranas 6K/TF (Figura 7) (BROWN; WAN; KIELIAN, 2018; MIGUEL-HERNÁNDEZ; MIGUEL-RODRÍGUEZ, 2015; ROSSMANN et al., 2014; VOSS et al., 2010).

Figura 6 - Estrutura dos Alfavírus. Na figura à esquerda, pode-se observar que o vírion é formado por uma molécula de RNA protegida por uma cápsula denominada capsídeo e juntos formam o nucleocapsídeo. Em seguida tem a bicamada lipídica e um envelope formado por glicoproteínas. Em um corte longitudinal, figura à direita, obtemos uma melhor visualização das estruturas mais internas e externas que compõem o vírion já descritas anteriormente.



Fonte: adaptado de Miguel-Hernández e Miguel-Rodríguez (2015)

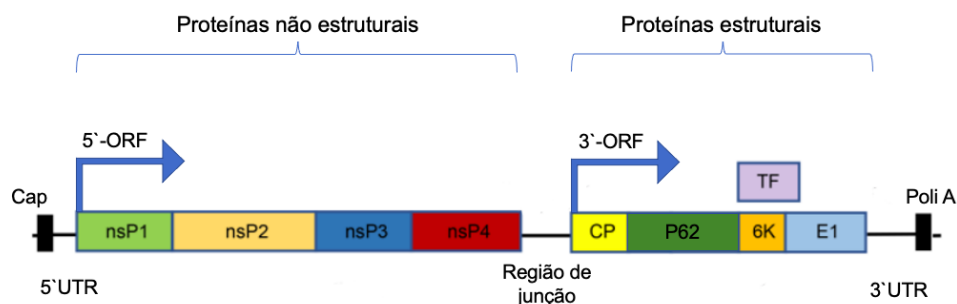
Figura 7 - Proteínas estruturais dos Alfavírus. As principais proteínas estruturais e suas formas representadas na figura à esquerda. Assim como as interações da E2 com a E3 e o capsídeo (CP). A proteína secundária TF sendo representada na figura à direita ligada à proteína 6K juntamente com a descrição de outros componentes estruturais já mencionados. A E1, E2, E3 são proteínas voltadas para a superfície externa, enquanto que o CP, 6K e TF são internas.



Fonte: adaptado de Brown, Wan e Kielian (2018)

O genoma do CHIKV apresenta uma molécula de RNA cadeia simples de polaridade positiva (RNAss+), tamanho de aproximadamente 12 kb, organizado por genes que codificam proteínas não estruturais (nsP) e as proteínas estruturais, direcionados por duas regiões de leitura aberta (do inglês *Open Reading Frames*, ORFs), necessárias para iniciar o processo de replicação do RNA viral e posteriormente, a síntese proteica. A primeira ORF está localizada na extremidade 5' do RNA genômico (RNAg) que é traduzido de forma direta para produzir as proteínas não estruturais (nsP1-nsP4) que estão relacionadas ao complexo de replicação viral. E a segunda, localizada na porção 3', produz um RNA subgenômico que será traduzido no precursor poliproteico das proteínas estruturais (CP, p62 ou pE2, E1 e 6K/TF) responsáveis pela montagem do arcabouço viral (Figura 8). A Proteína Transframe (TF) é produzida durante a tradução do gene 6K por um evento denominado *Frameshift* (deslocamento do quadro de leitura de códons por inserção ou perda de bases) e auxilia também na montagem e liberação do novo virion (AN et al., 2017; SOLIGNAT et al., 2009; VOSS et al., 2010; WEGER-LUCARELLI et al., 2015).

Figura 8 - Organização genômica dos Alfavírus. O genoma é formado por uma molécula de RNA com Cap e poliadenilação nas extremidades 5'UTR e 3'UTR, respectivamente, além de apresentar duas ORFs: uma que gerencia os genes de proteínas não estruturais (nsP1-4) e, a outra, os genes das proteínas estruturais (CP, p62, 6K/TF e E1).

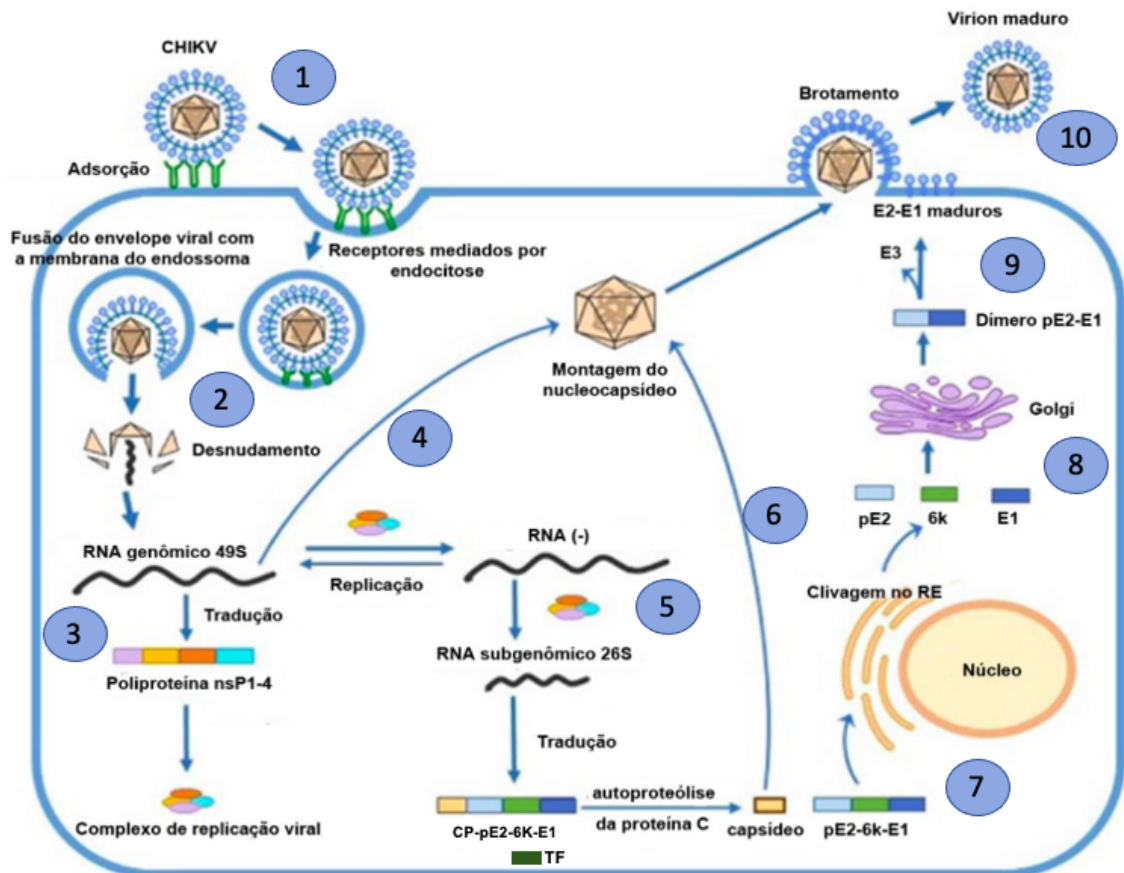


Fonte: adaptado de An et al. (2018)

O Capsídeo é formado por um domínio amino terminal que participa da formação do NC e interage com o RNA para encapsular o genoma e, um domínio carboxila terminal que é uma protease, responsável pela autoproteólise e consequente dissociação do CP da poliproteína precursora. A Proteína Transframe (TF) é liberada logo após a sua produção, mas o 6K permanece associado ao p62 e E1 até a sua clivagem no Reticulo endoplasmático (RE). O precursor da E2 (p62)

associado ao E1 forma um heterodímero, que os protege da exposição a baixos pH durante o tráfego celular para sinalização e endereçamento proteico no RE e Golgi. A clivagem do p62, produzindo E2 e E3 maduras, ocorre apenas no final da via secretora (pós compartimento Golgi) e ambas são transportadas para a membrana plasmática formando as projeções pontiagudas na superfície do novo virion que será liberado por brotamento da membrana na célula infectada, como demonstrado na figura 9 (ABDELNABI; NEYTS; DELANG, 2015; AGGARWAL et al., 2015; DE CURTIS; SIMONS, 1988; SNYDER et al., 2013; ZHANG et al., 2003; ZHANG; KIELIAN, 2004).

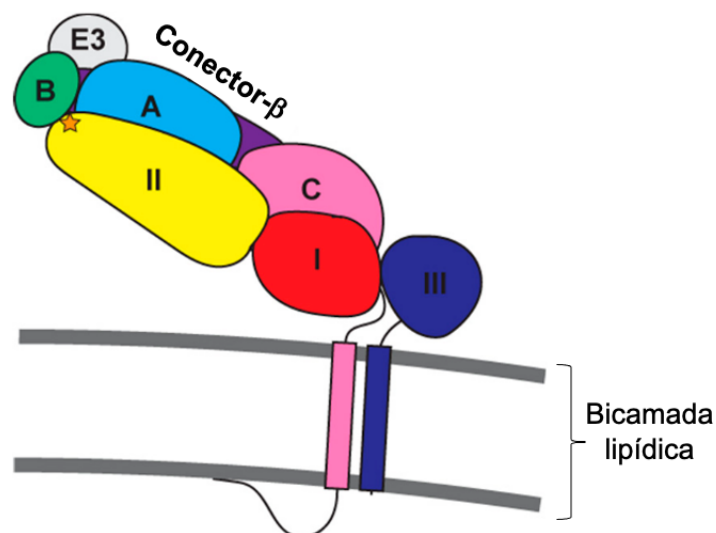
Figura 9 - Etapas do ciclo replicativo dos Alfavírus. 1 – Reconhecimento do receptor celular, endocitose e fusão do envelope viral com a membrana do endossoma; 2 – Desnudamento viral e liberação do material genômico; 3 – Replicação e tradução do RNA genômico produzindo as proteínas não estruturais (nsP1-4) formando o complexo de replicação viral; 4 – Esse complexo segue para auxiliar na montagem do nucleocapsídeo (NC); 5 – Replicação e tradução do RNA subgenômico produzindo as proteínas estruturais (CP, pE2, 6K/TF, E1); 6 – Em seguida ocorre a autoproteólise do Capsídeo (CP) que segue para formação do NC; 7 – O complexo pE2-6K-E1 é direcionado para o retículo endoplasmático (RE) para a clivagem; 8 – Apenas o 6K é clivado da poliproteína; 9 – O heterodímero pE2-E1 segue para o complexo de Golgi para endereçamento e transporte; 9 – Em etapa posteriormente ao Golgi ocorre a clivagem do dímero produzindo E3, E2 e E1 maduras que seguem para a membrana plasmática formando o envelope do novo vírion; 10 – Por brotamento da membrana celular é finalizado o ciclo viral liberando um vírion maduro.



Fonte: adaptado de Abdelnabi, Neyts e Delang (2015)

O complexo de proteínas do envelope viral (E1-E2-E3) é responsável pelo reconhecimento celular e fusão na membrana, para que seja iniciado o processo de infecção viral na célula do hospedeiro. A glicoproteína E1 apresenta 3 domínios (I, II e III) e desempenha papel em eventos de pré e pós-fusão na membrana. O domínio III liga a proteína E1 à membrana e apresenta uma dobra semelhante a imunoglobulina (Ig). A E2 está na região mais externa da superfície do vírion e é formada por três domínios que se assemelham às imunoglobulinas: A, B e C. O domínio C é um ligante para a região da membrana, o A está localizado no centro da proteína servindo como âncora para os outros dois domínios e, o domínio B se liga à glicoproteína E3 e está localizado na extremidade distal da membrana. Outros componentes fazem parte desse complexo, como o conector de fita β que tem a função de ligar o domínio A ao B e o B ao C, e um subdomínio D recentemente descoberto que antecede a hélice transmembrana da proteína auxiliando na fixação do E2 à bicamada lipídica (Figura 10) (AN et al., 2017; SNYDER; MUKHOPADHYAY, 2012; SNYDER et al., 2013; VOSS et al., 2010; ZHANG et al., 2011).

Figura 10 - Complexo proteico do envelope viral dos Alfavírus. A glicoproteína E1 é formada pelos domínios I, II e III. Este último apresenta uma porção transmembranar que fixa a proteína a bicamada lipídica. A E2 é representada nessa figura pelos domínios A, B e C, sendo esses interligados pelo conector- β . O domínio C tem uma porção transmembranar e sua extensão interage com o capsídeo (não demonstrado na figura). E por fim, a E3, uma proteína pequena que se liga à extremidade da E2, localizada mais distal da superfície viral (domínio A e B).



Fonte: adaptado de Brown, Wan e Kielian (2018)

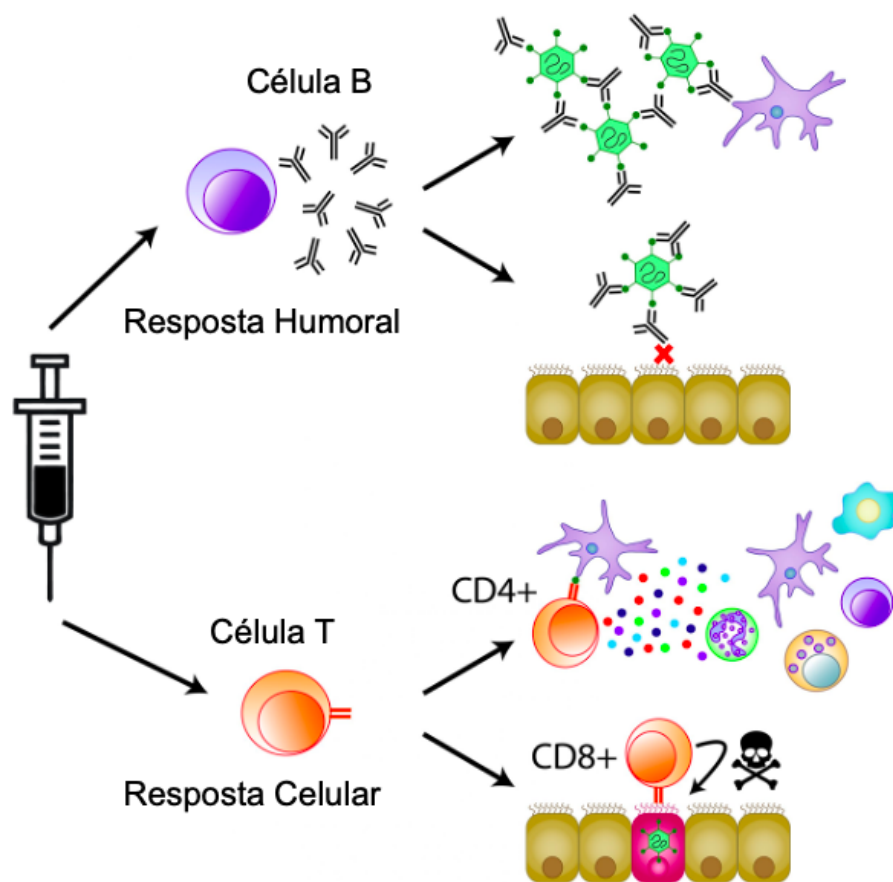
Embora os receptores específicos para o reconhecimento do CHIKV na célula hospedeira ainda não sejam determinados, estudos demonstram que a entrada do vírion na célula é mediada pela glicoproteína E2. Weber e colaboradores realizaram ensaios de ligação celular com os domínios A, B e C da E2 e concluíram que os domínios A e B são os responsáveis pelo reconhecimento e fixação do CHIKV na célula. Um outro trabalho realizou ensaios de mutagênese com o receptor Mxra8 (já associado com outros alfavírus artritogênicos) e concluíram que este se liga à uma região mais exposta da superfície do vírion, nos domínios A e B da E2. Através de análises por bioinformática, Khan e colaboradores realizaram a predição de epítomos utilizando a sequência da glicoproteína E2 obtidas de amostras positivas para CHIKV no Paquistão, em um surto de 2016, e identificaram vários epítomos conservados e imunogênicos. Esses dados sugerem que a E2 apresenta um alto potencial para o desenvolvimento de possíveis alvos terapêuticos e vacinais, sendo este último uma das medidas mais eficazes para prevenção de doenças (KHAN et al., 2020; WEBER et al., 2017; ZHANG et al., 2018).

2.5 VACINAS

De acordo com Fernandes e colaboradores, as vacinas são formulações produzidas a partir da exposição do agente causador de uma doença, seus produtos sintéticos ou selvagens. Os antígenos são desenvolvidos para desencadear uma resposta imunológica robusta (celular e humoral, de preferência) ativando células efectoras, produzindo anticorpos, citocinas e células de memória (Figura 11). Desta forma, a vacina induz uma proteção imunológica ativa artificial contra determinado patógeno, mas sem causar doença. O Programa de Imunização (PI) foi criado em 1974, pela Organização Mundial de Saúde (OMS), para gerir uma política mundial de imunização visando a redução da morbimortalidade por doenças imunopreveníveis. Atualmente, estima-se que 2-3 milhões de vidas são salvas por ano pelo PI e este fato contribuiu para a drástica redução de 60% da mortalidade de menores de 5 anos. Em 1990 foram registradas 93 mortes por 1.000 nascidos vivos, em comparação a 38 por 1.000 em 2019. Desta forma, é evidente o impacto das vacinas na saúde pública mundial para a prevenção de doenças, com conseqüente sobrevida infantil e melhoria

na qualidade de vida da população (FERNANDES et al., 2021; PENNINGTON, 2020; SHEN; CLAY; PABLOS-MENDEZ, 2014; WHO, 2013, 2021).

Figura 11 - Produção da resposta imunológica induzida pela vacina. Em condições ideais, uma vacina induz uma resposta imunológica robusta e duradoura, quando ativa as vias humoral e celular do sistema imunológico. Os linfócitos do tipo B são ativados na resposta humoral produzindo os anticorpos, responsáveis pela neutralização do patógeno evitando a entrada deste nas células hospedeiras. A resposta celular desencadeia a ativação de dois tipos de linfócitos T, o CD4+ e o CD8+. O linfócito T – CD4+ é uma célula auxiliar que irá produzir principalmente citocinas e, o linfócito T – CD8+ é uma célula citotóxica que ao reconhecer o patógeno, realiza a endocitose seguida de apoptose celular. No entanto, um dos aspectos fundamentais da ativação de ambas vias é a produção de células de memória o que favorece a durabilidade da imunidade ativa induzida pela vacina.




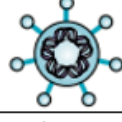



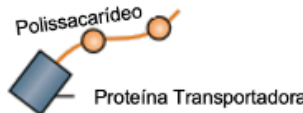
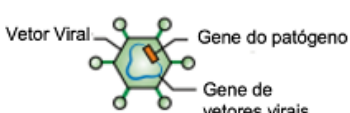

Fonte: adaptado de Pennington (2020).

Os primeiros relatos na história de medidas protetivas frente a uma doença foram registrados em meados do século XV na China e Turquia para combater a varíola, severa doença da época. Os chineses e turcos utilizavam cascas secas trituradas da ferida provocadas pela doença em indivíduos acometidos e sopravam o pó sobre o rosto, ou diretamente nas narinas das pessoas. Uma forma de vacinação empírica, baseada na técnica denominada de variolação, para a prevenção da forma fatal da

enfermidade. Mas foi em 1798, com as experiências marcantes do médico e cientista Edward Jenner que a vacinação foi cientificamente registrada como um marco histórico. Jenner observou que trabalhadores da zona rural que adquiriam a varíola bovina estavam imunes ou contraíam a varíola humana de forma mais branda. E, aprimorando a técnica da variolação, demonstrou que a exposição de pessoas à fluidos de uma pústula de varíola bovina poderiam protegê-las da varíola humana. E desta forma o cientista inoculou o material purulento em um garoto de 8 anos que posteriormente foi exposto ao vírus da varíola humana e não desenvolveu a doença. (FENNER et al., 1988; FIOCRUZ, 2016; PLOTKIN, 2005; PLOTKIN; PLOTKIN, 2004).

Em 1870, Louis Pasteur desenvolveu a primeira vacina bacteriana atenuada para a imunização de galinhas contra a cólera aviária. A partir da inoculação de uma cultura bacteriana (submetida a diferença de temperatura) nas galinhas, Pasteur concluiu que condições ambientais, como temperaturas, oxigênio e produtos químicos podem atenuar patógenos. A cepa bacteriana *Pasteurella multocida* atenuada foi nomeada de Vacina (do latim *vacca*, que significa “vaca”), uma forma de retribuir ao legado deixado por Jenner com a varíola. Posteriormente a este fato, vários grupos cientistas no mundo começaram a estudar e produzir vacinas com patógenos atenuados e inativados para doenças como a febre tifoide, cólera, peste, difteria, Bacilo Calmette – Guérin (*Mycobacterium bovis*, conhecida como BCG), febre amarela e poliomielite. O ápice do desenvolvimento de vacinas foi a partir do século XX com as descobertas de outros tipos de vacinas, como as de subunidades (proteínas purificadas, proteínas recombinantes, *Viral Like particles* – VLPs e polissacarídeos), conjugadas e toxóides. Atualmente, no século XXI, tecnologias até então desconhecida pela maioria da população, tem permitido o desenvolvimento de vacinas de ácidos nucleicos, RNA e DNA (Figura 12) (FERNANDES et al., 2021; PASTEUR, 1880; PLOTKIN, 2005; POLLARD; BIJKER, 2021).

Figura 12 - Tipos de vacinas licenciadas. As vacinas são obtidas mediante diferentes metodologias. As Vivas Atenuadas contém o vírus ou bactéria alterados para serem menos virulentos que a sua forma selvagem; As Inativadas utilizam o agente infeccioso completo morto e por isso não tem a capacidade de causar a doença; A Toxóide tem como base as toxinas de algumas bactérias que são inativadas pela temperatura ou agentes químicos; As de Subunidades contém fragmentos do patógenos ao invés do microrganismo inteiro; As VLPs utilizam a técnica de engenharia genética para a expressão proteica e montagem espontânea de partículas virais aumentando a capacidade imunogênica; As Conjugadas são produzidas pela ligação química de polissacarídeos a uma proteína transportadora tornando a produção mais complexa; A de Vetor viral utiliza um vírus não patogênico em humanos (replicante ou não) que realiza a entrega do códon genético para a produção de antígenos pertencentes a outros patógenos; E as de Ácidos nucleicos (DNA ou RNA) que após a vacinação essas moléculas serão captadas pelas células e as proteínas antigênicas codificadas.

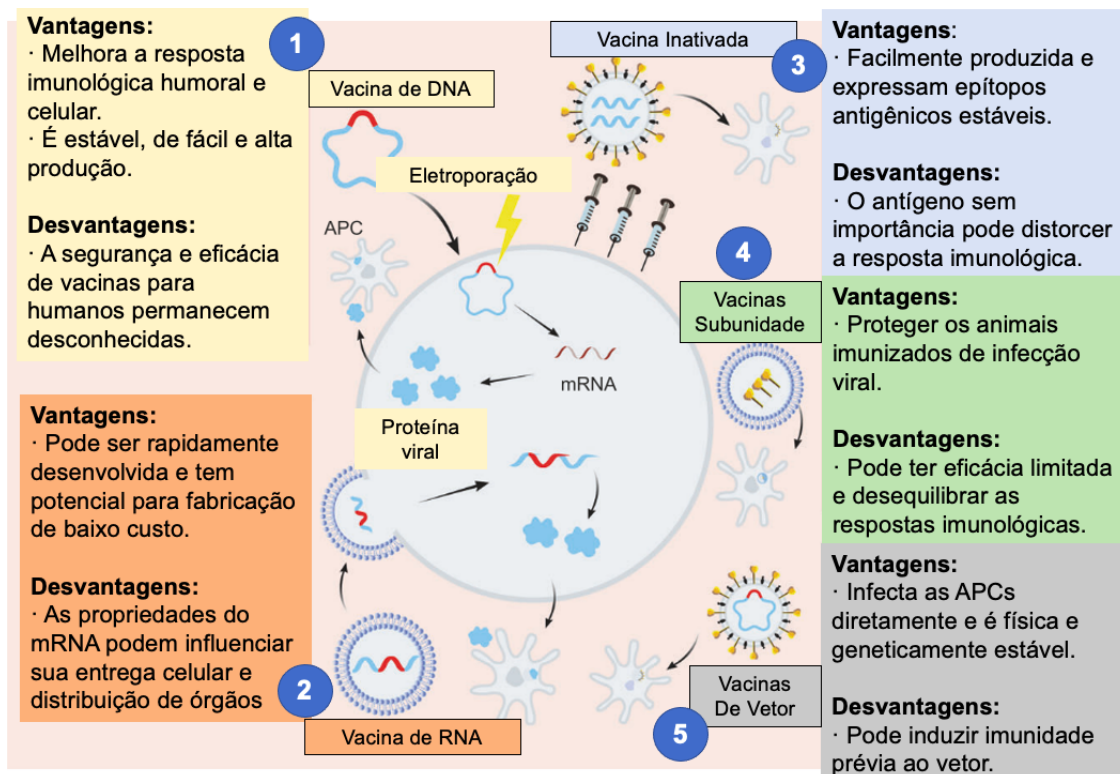
Tipos de Vacinas		Vacinas Licenciadas	Primeira Introdução
<u>Vivo atenuado</u> (enfraquecido)		Sarampo, caxumba, rubéola, febre amarela, gripe, poliomielite oral, febre tifóide, rotavírus, BCG, varicela zóster	1798 (Variola)
<u>Inativado</u> (Organismo inteiro morto)		Coqueluche de células inteiras, poliomielite, gripe, encefalite japonesa, hepatite A, raiva	1896 (Febre tifóide)
<u>Toxoide</u>		Difteria, tétano	1923 (Difteria)
<u>Subunidade</u> (proteína purificada, proteína recombinante, polissacarídeo, peptídeo)		Coqueluche, influenza, hepatite B, meningocócica, pneumocócica, febre tifóide, hepatite A	1970 (Antraz)
<u>Viral Like particles</u> (VLPs)		Vírus do papiloma humano	1986 (Hepatite B)
<u>Conjugado</u> (proteína-polissacarídeo)		<i>Haemophilus influenzae</i> tipo B, pneumocócica, meningocócica, febre tifóide	1987 (<i>H. influenzae</i> tipo b)
<u>Vetor Viral</u>		Ebola	2019 (Ebola)
<u>Ácidos Nucleicos</u>		SARS-CoV-2	2020 (SARS-CoV-2)

Fonte: adaptado de Pollard e Bijker (2021)

Além dos antígenos, as vacinas apresentam outros componentes, são eles: estabilizantes, conservantes e adjuvantes. A caseína, uma proteína encontrada no

leite e seus derivados, é um estabilizante que auxilia na qualidade e na segurança do produto vacinal durante o armazenamento. O Timerosal (etilmercúrio) é um tipo de conservante à base de mercúrio que é adicionado para evitar o crescimento de microrganismos nos frascos das doses vacinais. E, os sais de alumínio (hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio) muito utilizado como adjuvante em algumas vacinas humanas desde 1930, para estimular uma imunidade mais robusta. Outros constituintes são os resíduos de material celular (por exemplo, a albumina) e os resíduos de substâncias inativadoras (por exemplo, o formaldeído) obtidos do processo de produção vacinal. Porém, todos os componentes mencionados são eliminados pelo organismo, logo não oferecem perigo de intoxicação ou outro risco à saúde. É importante ressaltar que o conhecimento dos constituintes, produção e estratégias de segurança e eficiência dos tipos vacinais são fundamentais para determinar as vantagens e desvantagens de cada método na escolha do desenvolvimento vacinal almejado, como demonstrado na figura 13 (CHUNG, 2014; DONG et al., 2020; ELDRED et al., 2006; VETTER et al., 2018).

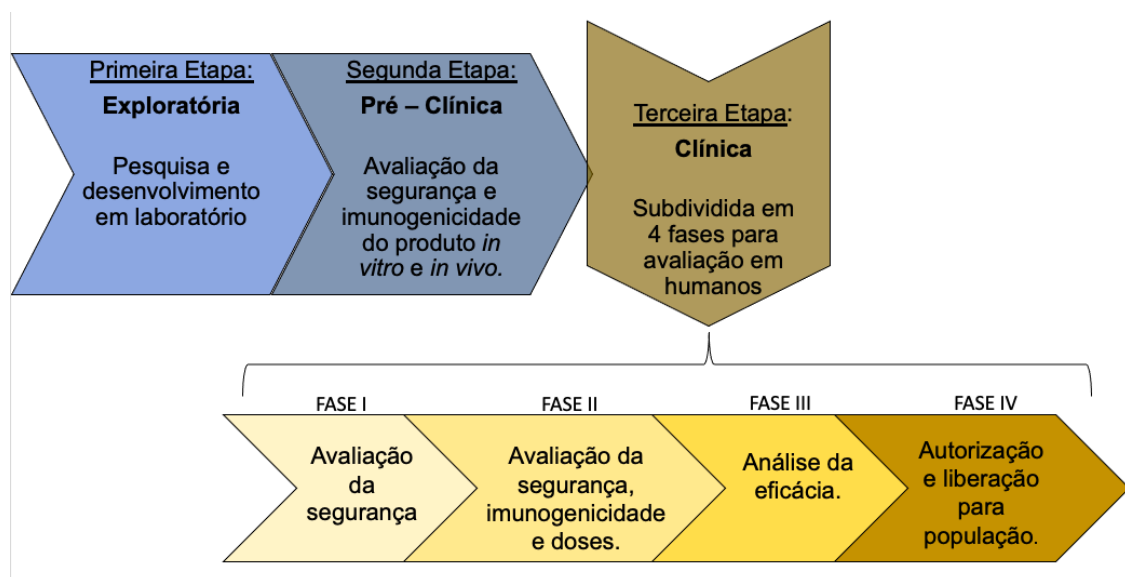
Figura 13 - Vantagens e desvantagens de algumas estratégias vacinais. As vacinas de DNA e RNA, apesar de serem recentes, apresentam um equilíbrio entre custo e benefício. Em comparação com as inativadas, de subunidades e de vetor viral que embora sejam metodologias mais estabelecidas podem apresentar distorções na resposta imunológica.



Fonte: adaptado Dong et al. (2020)

O desenvolvimento de vacinas apresenta processos criteriosos que demandam estudos acerca do patógeno que causa determinada doença. Geralmente, as enfermidades em questão, tem impactos numéricos e socioeconômicos significativos e atingem, principalmente, os países de baixa e média renda. A depender do patógeno ou da estratégia vacinal definida podem ser necessárias várias colaborações institucionais e uma rede diversificada de conhecimentos para a obtenção do produto final. Três etapas dividem este processo: Exploratória/Laboratorial, Pré-clínica e Clínica. A primeira é a etapa de pesquisa e produção vacinal em laboratórios. Na pré-clínica serão avaliadas a imunogenicidade e a segurança do candidato em modelos *in vitro* e animais. Por fim, a vacina será analisada em humanos, na etapa Clínica, subdividida em quatro fases (I, II, III e IV) e, mediante o avanço de fases, o número de voluntários aumenta de dezenas, centenas e milhares. Os objetivos dessas fases são: avaliar a segurança (fase I); imunogenicidade, segurança e esquema de doses (fase II); eficácia a partir de uma análise comparativa de voluntários vacinados e não vacinados (fase III); E, após a liberação da licença pelo órgão responsável, observação de eventos adversos raros (fase IV) que não foram identificados em etapas anteriores (Figura 14) (LURIE et al., 2020; RAPPUOLI; HANON, 2018; STERN, 2020).

Figura 14 - Etapas do desenvolvimento vacinal. Três etapas dividem o desenvolvimento de vacinas: Exploratória/Laboratorial, Pré-clínica (*in vitro* e em animais) e a Clínica (em humanos). Esta última ainda é subdividida em 4 fases (I-IV) para avaliação da segurança, imunogenicidade, esquema de doses e eficácia até a liberação do produto final para toda a população.



Fonte: adaptado de Rappuoli e Hanon (2018).

Desde do ressurgimento do CHIKV em 2004 no Oceano Índico, Sudeste asiático e sua rápida expansão para outras regiões no mundo, vários candidatos vacinais contra o CHIKV surgiram. As diversas abordagens utilizadas buscam um produto final que estimule uma resposta imunológica potente e duradoura, mas que também apresente segurança gerando grandes expectativas de avanço para produção em ampla escala. As opções incluem vacina inativada (com formaldeído), vacina viva-atenuada, vacina de VLP, vacina de DNA, vacina quimérica e vacina de subunidade (Quadro 1). Os candidatos (pelo menos 29 registrados até o ano de 2018) estão em diferentes etapas de desenvolvimento, ou seja, ainda não há vacinas licenciadas contra o CHIKV, até o momento. A mais avançada é a vacina VLA1553, produzida pela empresa Valneva (franco-austríaca), que finalizou a Fase III nos Estados Unidos recentemente, evidenciando resultados promissores. O Instituto Butantan estabeleceu uma colaboração com a referida empresa e está executando a Fase III também no Brasil. Este estudo clínico iniciou desde de agosto/2022 em 10 centros espalhados pelo país (sendo um deles em Recife/PE, localizado no Real Hospital Português de Beneficência em Pernambuco), vacinou mais de 750 adolescentes e segue aguardando a análise dos dados. Sabe-se que embora muitas ideias e pesquisas sejam iniciadas, apenas um número pequeno de candidatos prosseguirá e este fato contribui para que novos estudos sejam instituídos constantemente (AN et al., 2017; BUTANTAN, 2023; HARRISON et al., 1971; POWERS, 2018).

Quadro 1 - Principais candidatos à vacina contra o Vírus Chikungunya. Vários candidatos vacinais contra o CHIKV estão em diferentes estágios no processo de desenvolvimento (em estudos pré-clínicos e clínicos), porém alguns se destacam pelo avanço e resultados obtidos. No entanto, ainda não há nenhuma vacina licenciada para prevenir a doença, até o momento.

Nome	Tipo de vacina	Antígeno	Modelo experimental	Resposta imune induzida	Estágio	Referência
Formalina-CHIKV inativado	Inativada	Vírus inteiro	Humanos	N/A	Fase I	Harrison et al., 1971
TSI-GSD-218	Viva - atenuada	Vírus inteiro	Humanos	Humoral	Fase II	Edelman et al., 2000
VLA1553	Viva - atenuada	Vírus inteiro	Humanos	Humoral e neutralizante	Fase III	French-Austrian pharmaceutical Valneva, 2021
VRC-CHKVLP 059-OO-VP	VLP	C-E2-E1	Humanos	Humoral	Fase II	Chang et al., 2014
MV-CHIK	Quimérica	C-E3-E2-6K-E1	Humanos	Humoral	Fase II	Ramsauer et al., 2015
LR2006-OPYI-modified	DNA	$\Delta 5nsP3; \Delta 6K$	Camundongos	Humoral e Celular	Pré-clínica	Hallengard et al., 2014
CHIK-E1/E2	Subunidade	E1, E2	Camundongos	Humoral e Celular	Pré-clínica	Khan et al., 2012

Nota: Δ significa deleção da sequência de nucleotídeos; N/A: não disponível.

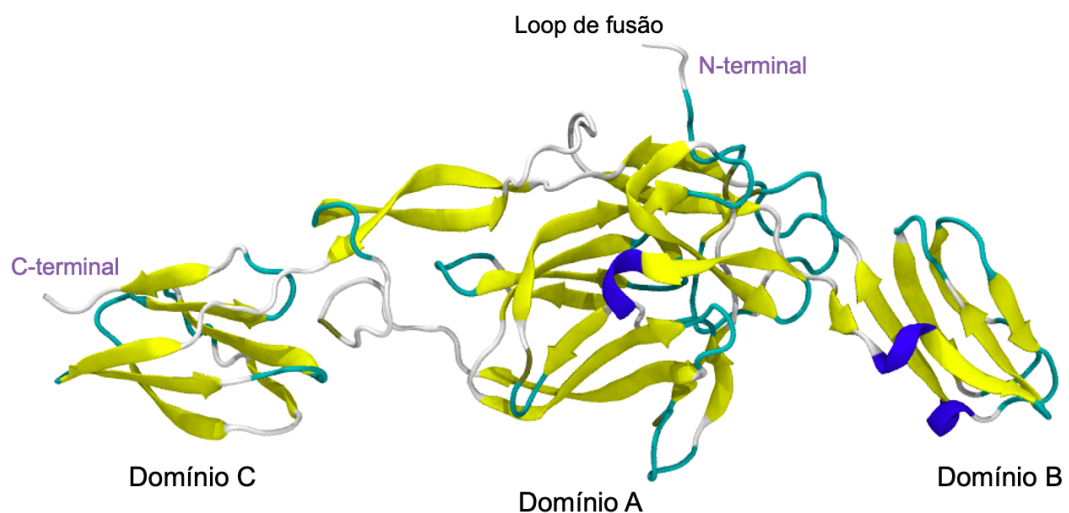
Fonte: adaptado de An et al. (2017).

2.6 PRODUTO VACINAL PROPOSTO NO ESTUDO

Estudos demonstraram a importância da proteção mediada por anticorpos neutralizantes que se ligam a epítopos conservados do domínio B, da glicoproteína E2, e inibem a entrada ou a saída do vírus na célula. Como descrito no tópico 2.4, a proteína E2 madura contém três domínios: um domínio A, que está localizado centralmente na superfície e possui local de ligação para um suposto receptor; o domínio B, localizado na extremidade distal, cobrindo o loop de fusão em E1; e o domínio C, na extremidade proximal. É importante ressaltar que os vírus envelopados requerem uma proteína de fusão para fundir a membrana viral à célula hospedeira, logo a exposição de um loop de fusão auxilia nessa junção de membranas facilitando a infecção. Os determinantes antigênicos do domínio B, devido sua capacidade de gerar anticorpos neutralizantes, podem ser direcionados para o desenvolvimento terapêutico de vacinas ou anticorpos contra múltiplos alphavírus de interesse global (FOX et al., 2015; MODIS, 2013).

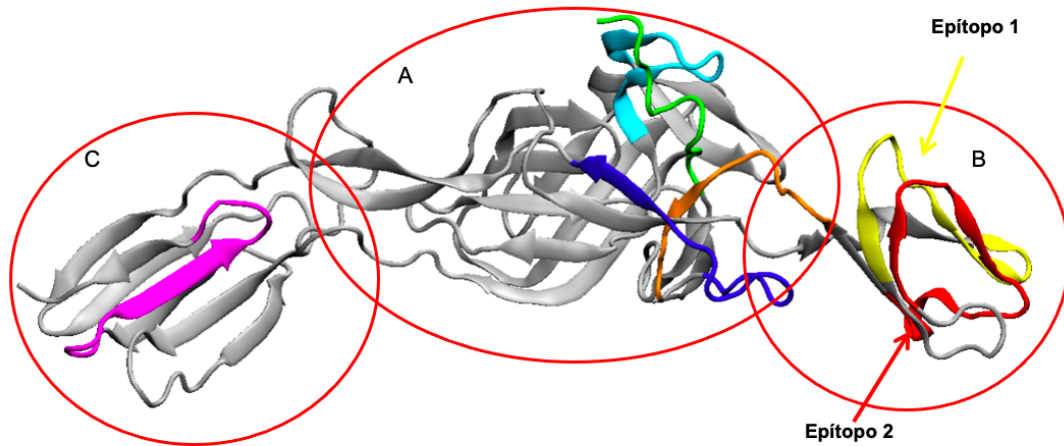
Neste projeto foi utilizada a estrutura tridimensional da proteína E2 do vírus CHIKV (PDB ID: 3N44) descrita no estudo de Voss e colaboradores (2010) (Figura 15), pertencente a linhagem *Indian Ocean*, sendo realizada uma avaliação de predição de epítomos de células B (*in silico*) através da utilização de um consenso de três servidores *online* ElliPro, Epitepia e Discotope 2.0, que realizam a predição de regiões de possíveis epítomos baseando-se em características estruturais de flexibilidade, hidrofobicidade, superfície de exposição ao solvente e características físico-químicas dos aminoácidos. A identificação da localização destes epítomos de célula B, teve como finalidade direcionar o estudo para um desenho mais racional de desenvolvimento de vacinas. Foram identificadas duas regiões de interesse (contendo dois epítomos neutralizantes: aqui chamados de Epítomo 1 e 2) na porção do domínio B (Domínio B da Proteína E2 do CHIKV, DBE2-CHIKV) (Figura 16), compreendendo as regiões imunogênicas já experimentalmente identificadas por Fox e colaboradores (2015) (FOX et al., 2015; FREIRE (Comunicação pessoal, 2017); KRINGELUM et al., 2012; PONOMARENKO et al., 2008; RUBINSTEIN et al., 2009; VOSS et al., 2010).

Figura 15 - Estrutura tridimensional da proteína E2. Proteína E2 da linhagem Indian Ocean (IOL) na sua estrutura tridimensional evidenciando os domínios (A, B e C), as terminações carboxila e amino e, por fim, um loop de fusão, que auxilia na fusão da membrana viral à membrana da célula hospedeira.



Fonte: adaptado de Voss et al. (2010).

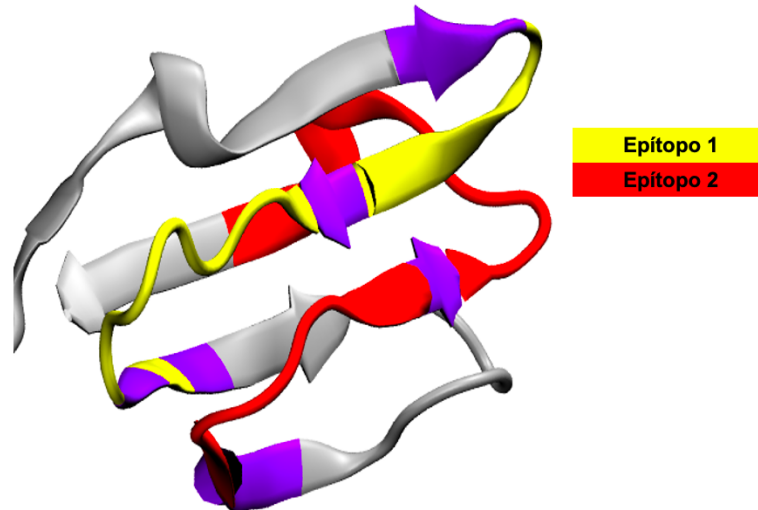
Figura 16 - Predição de epítomos da proteína E2. Na predição de epítomos de células B, *in silico*, foram encontrados 2 epítomos no domínio B da proteína E2. Os epítomos 1 e 2 estão identificados nas cores amarelo e vermelha, respectivamente.



Fonte: adaptado de Freire (Comunicação pessoal, 2017)

O DBE2-CHIKV é composto por 60 aminoácidos e apresenta uma predominância estrutural de folhas betas conectadas por *loops*. Esse domínio foi extraído (Figura 17) da estrutura tridimensional completa de E2, e foram realizadas simulações computacionais de Dinâmica Molecular para a avaliação da estabilidade e manutenção da estrutura terciária do domínio isolado, bem como a flexibilidade e conformação das regiões dos epítomos identificados. O domínio DBE2-CHIKV mostrou-se estável, mantendo as regiões de epítomos em uma conformação semelhante à na forma nativa (encontrada na estrutura completa da E2) e assim, possibilitando a utilização desse domínio no presente projeto. Essa parte teórica inicial foi realizada em estudos prévios por Marjorie C.L. Cavalcanti Freire do Grupo BIOMAT (Biomaterial Modelling Group), coordenado pelo Dr. Roberto Lins, do Laboratório de Virologia e Terapia Experimental – LaViTE/Fiocruz-PE, em colaboração.

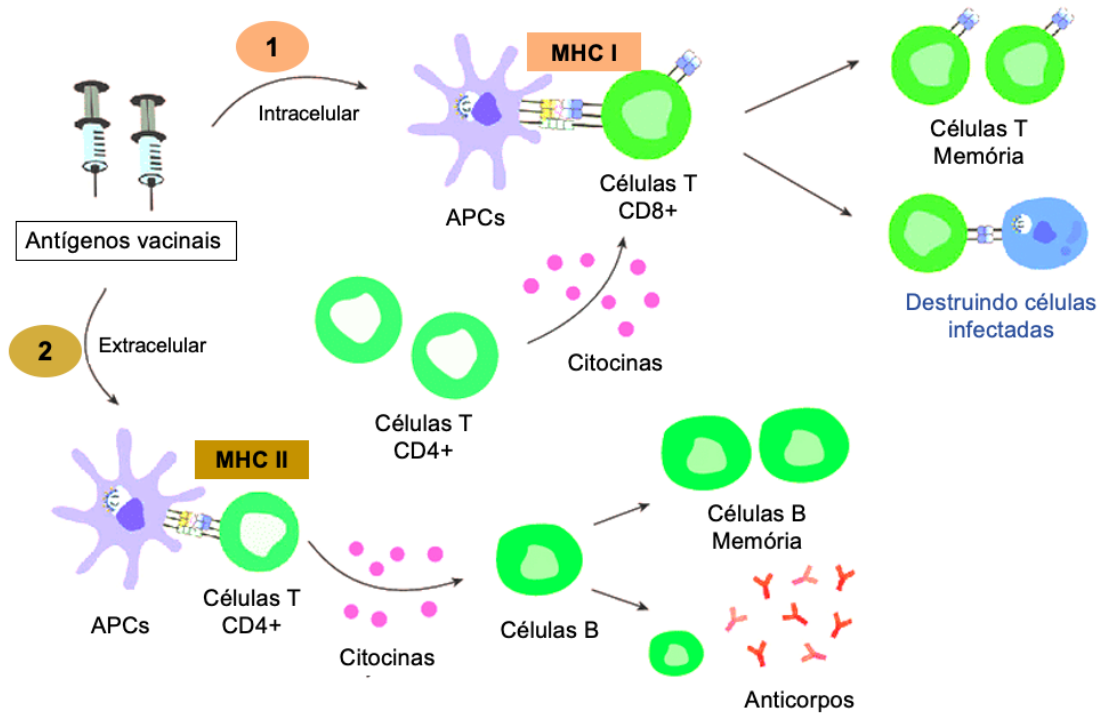
Figura 17 - Domínio B da proteína E2 extraído. O domínio B da proteína E2 foi extraído da estrutura tridimensional da proteína E2 e verificada a sua integridade estrutural, assim como a permanência dos epítomos através de simulações computacionais.



Fonte: adaptado de Freire (Comunicação pessoal, 2017)

O DNA que codifica a referida região foi comercialmente otimizado, sintetizado e já se encontrava disponível, para iniciar a etapa experimental. Os vetores p43.2 e p8L foram utilizados nas etapas posteriores de subclonagem, visando a imunização de camundongos e humanos (etapa posterior a este projeto), respectivamente. Ambos apresentam a região C-terminal de LAMP-1 (*Lysosomal Associated Membrane Protein - 1*) que ativa o complexo Maior de Histocompatibilidade Classe II (do inglês, *Major Histocompatibility Complex Class II*, MHC II) de apresentação antigênica. É esperado que o candidato vacinal ao ativar a via de MHC II estimule a produção de células T CD4⁺ e CD8⁺, assim como anticorpos e células de memória, produzindo uma resposta imunológica mais robusta, diferentemente de um antígeno que ativa a via de MHC I produzindo células T CD8⁺, apenas, como demonstrado na figura 18.

Figura 18 - Apresentação antigênica de produtos vacinais. Um antígeno vacinal pode ser apresentado de duas formas pelas Células Apresentadoras de Antígenos (do inglês, *Antigen-presenting cells*, APCs): 1 – Via MHC de classe I, ativando apenas as células T CD8+ que produzirá células de memória T e apoptose de células infectadas pelo vírus; 2 – Via MHC de classe II, ativando células T CD4+ com produção de citocinas, células B de memória e anticorpos. As citocinas são capazes de ativar também células T CD8+, assim como todo o processo após a sua ativação. E, os anticorpos neutralizantes produzidos tem a importante função de impedir a entrada do vírus (infecção viral). Desta forma, uma vacina que ativa a via MHC classe II, geralmente, induz uma resposta imunológica potente (pela amplitude de ativação e produção de células efetoras) e duradoura (pela produção de células de memória).



Fonte: adaptado de Dong et al. (2020).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a resposta imunológica e eficiência da vacina de DNA codificando o domínio DBE2 do vírus Chikungunya, fusionado a região C- terminal da Proteína de Associação à Membrana Lisossomal – LAMP -1, em camundongos imunizados com essa construção.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

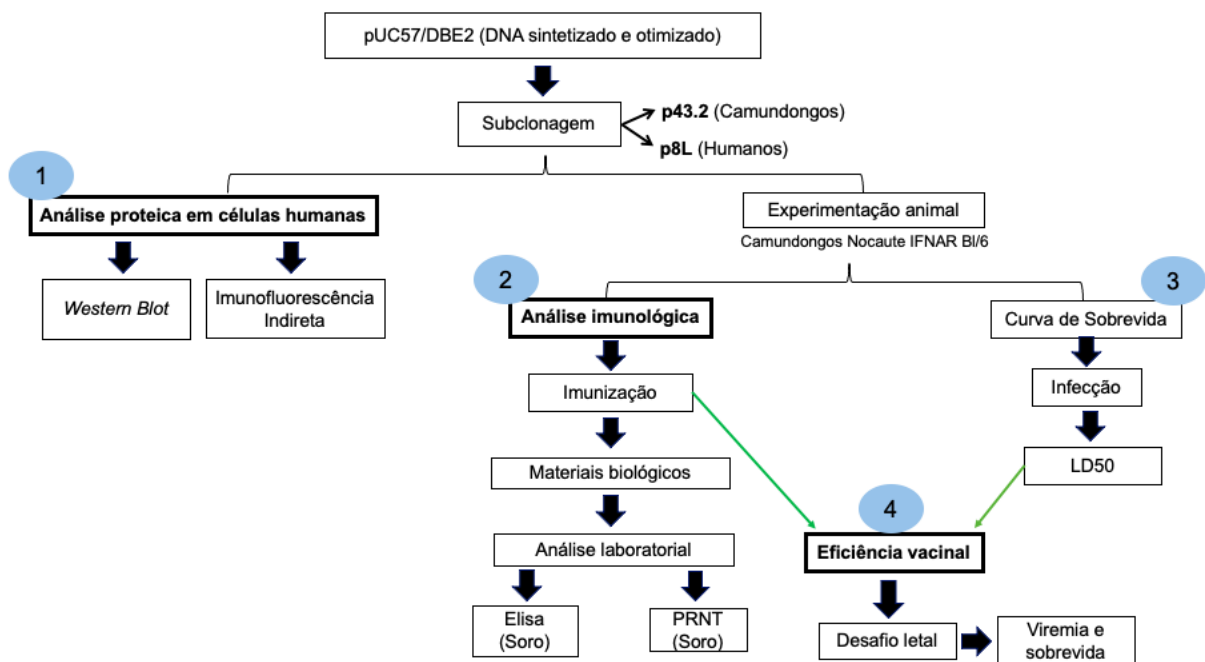
- Construir as formulações vacinais, selvagem e fusionada à LAMP-1, para camundongos e humanos;
- Analisar a expressão das proteínas recombinantes, selvagem e fusionada à LAMP-1, em linhagens de células humanas;
- Analisar a localização subcelular das proteínas recombinantes em linhagens de células humanas;
- Avaliar as respostas imune, humoral e neutralizante, em camundongos nocautes (IFNAR BI/6) imunizados com a vacina de DNA codificando para o domínio DBE2 do vírus Chikungunya;
- Avaliar a eficiência vacinal em camundongos nocautes (IFNAR BI/6) imunizados com as formulações de DNA codificando o domínio DBE2 do vírus Chikungunya, frente a uma infecção pelo vírus (desafio letal).

4 METODOLOGIA

4.1 FLUXOGRAMA METODOLÓGICO

O trabalho proposto apresenta técnicas *in vitro* e *in vivo* (experimentação animal) para avaliar a formulação vacinal desenvolvida em relação à expressão da proteína DBE2-CHIKV, do estímulo imunológico gerado e da eficiência vacinal contra a infecção por CHIKV.

Figura 19 - Fluxograma do estudo. A partir do gene DBE2-CHIKV sintetizado e otimizado foram realizadas subclonagens em vetores plasmidiais visando a imunização de camundongos e humanos. Posteriormente a expressão proteica foi avaliada a partir das construções de DNA vacinais obtidas, assim como a localização subcelular da proteína. Por fim, os produtos vacinais foram avaliados em experimentação animal, utilizando camundongos nocautes, para análise imunológica e eficiência vacinal dos mesmos animais previamente imunizados. As setas em verdes sinalizam que os resultados prévios (onde as setas de originam) foram essenciais para a realização do ensaio de eficiência vacinal (onde as setas se convergem).



Fonte: elaborado pela autora (2023).

4.2 SUBCLONAGEM EM VETOR DE EXPRESSÃO

O inserto (fragmento gênico DBE2-CHIKV) foi removido do plasmídeo comercial (pUC57) (Genescript™), através de digestão enzimática utilizando as enzimas de restrição *Sall/EcoRI* (construção comercial otimizada para humano) e

NheI/EcoRI (construção comercial otimizada para camundongo) (Invitrogen™). A liberação do inserto foi confirmada em gel de agarose 1%, utilizando os seguintes parâmetros para eletroforese: 120 V, 150 mA e 100 W por 45 minutos. O fragmento foi excisado e purificado utilizando o Kit da QIAGEN™ (QIAquick Gel Extraction Kit), conforme recomendações do fabricante. Os fragmentos do DBE2-CHIKV foram inseridos nos plasmídeos, p8L (para imunização de humanos) e p43.2 (para imunização de camundongos), numa proporção de 3:1 (inserto/plasmídeo) utilizando a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen™) e seu respectivo tampão, para volume final de 10 µl. Os referidos vetores plasmidiais vazios já estavam disponíveis no laboratório (Laboratório de Virologia do Instituto Aggeu Magalhães). Ao final foram obtidas as construções plasmidiais (Vetor/Inserto) codificando o gene de estudo (DBE2-CHIKV), selvagem (WT, do inglês, Wild Type) e fusionado a Proteína de Associação à Membrana Lisossomal – LAMP -1 (BIG-LAMP, regiões N- e C- terminal; C-LAMP, região C- terminal), para a expressão em humanos (Hu, Humano) e Camundongos (Mi, do inglês, Mice) (Quadro 2). Os esquemas das construções vacinais podem ser observados na figura 20 (DHALIA et al., 2009; MACIEL et al., 2015; PALMA et al., 2017).

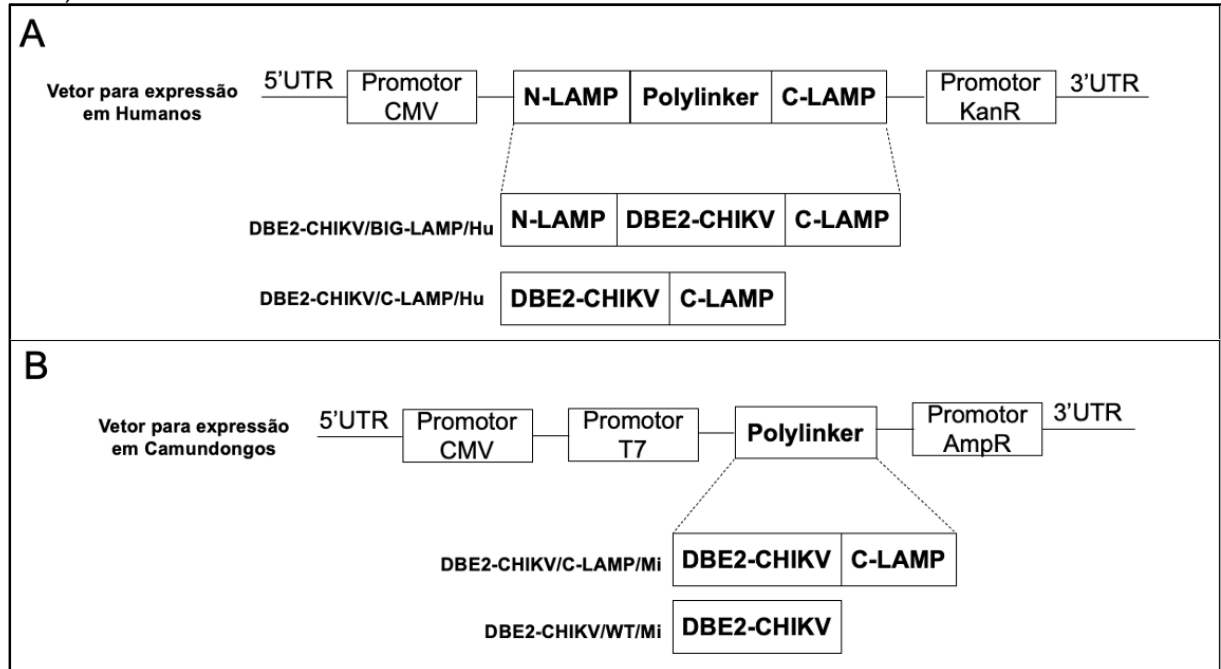
Quadro 2 - Denominação das construções plasmidiais do estudo. Siglas e as respectivas descrições das construções plasmidiais obtidas no estudo.

CONSTRUÇÕES PLASMIDIAIS	
NOME	DESCRIÇÃO
DBE2-CHIKV/BIG-LAMP/Hu	DBE2-CHIKV fusionado às regiões N- e C-terminal da Proteína de Associação à Membrana Lisossomal – LAMP -1 (BIG-LAMP) no vetor para expressão em Humanos (Hu)
DBE2-CHIKV/C-LAMP/Hu	DBE2-CHIKV fusionado à região C-terminal da Proteína de Associação à Membrana Lisossomal – LAMP -1 (C-LAMP) no vetor para expressão em Humanos (Hu).
DBE2-CHIKV/C-LAMP/Mi	DBE2-CHIKV fusionado à região C-LAMP no vetor para expressão em camundongos (Mi, do inglês, <i>Mice</i>).
DBE2-CHIKV/WT/Mi	DBE2-CHIKV selvagem (WT, do inglês, <i>Wild Type</i>) no vetor para expressão em camundongos (Mi, do inglês, <i>Mice</i>).

Nota: Gene do Domínio B da proteína E2 do vírus Chikungunya (DBE2-CHIKV)

Fonte: elaborado pela autora (2023).

Figura 20 - Esquemas das construções vacinais. Estratégias dos constructos vacinais codificando o Gene do Domínio B da proteína E2 do vírus Chikungunya (DBE2-CHIKV) selvagem e fusionado à Proteína de Associação à Membrana Lisossomal – LAMP -1 (BIG-LAMP, regiões N- e C- terminal; C-LAMP, região C- terminal) para a expressão em humanos (Hu, Humano) e Camundongos (Mi, do inglês, Mice).



Fonte: elaborado pela autora (2023).

Posteriormente, os produtos das construções foram utilizados para transformar 50 μ L de cepas de *Escherichia coli* top10 quimiocompetentes (Invitrogen™) por choque térmico e as bactérias semeadas em placas contendo meio LB sólido e o antibiótico ampicilina (50 mg/ml) para o semeio das construções no vetor p43.2 e, o antibiótico Kanamicina (10 mg/mL) para o p8L. As células foram incubadas a 37°C, por 16 horas, e as colônias crescidas utilizadas para a extração de DNA plasmidial através do kit da Axygen™ (AxyPrep Plasmid Kit Nucleic Acid Purification), conforme as orientações do fabricante. A confirmação dos constructos foi obtida por digestão a 37°C com as referidas enzimas de restrições, por 1 hora, visualizadas em gel de agarose 1%, utilizando os parâmetros para eletroforese já descritos anteriormente.

Para a confirmação diferencial ainda foi realizada uma nova digestão utilizando a enzima *NcoI* (Invitrogen™), pois essa enzima tem um sítio de clivagem dentro e fora do plasmídeo proporcionando a visualização de bandas de tamanhos diferenciais, previamente já observados no programa computacional ApE (A Plasmid Editor). Logo após, alíquotas de cada DNA foram enviadas para o sequenciamento de DNA no Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ-

PE) e as análises foram realizadas utilizando os programas SeqMan (DNA Star) e Blastx (online).

Ao final, para maximizar o rendimento final das construções plasmidiais obtidas, os produtos já confirmados foram utilizados novamente para transformar 50 μL de cepas de *Escherichia coli* DH5 α quimiocompetentes (Invitrogen™), por choque térmico, e as bactérias semeadas em placas contendo meio LB sólido e os respectivos antibióticos de resistência. As células foram incubadas a 37°C e após 16 horas, as colônias foram expandidas para a extração de DNA plasmidial utilizando o kit da Invitrogen™ (*PureLink™ HiPure Expi Plasmid Gigaprep Kit*), conforme as orientações do fabricante. A confirmação dos constructos foi obtida por digestão a 37°C, com as referidas enzimas de restrições e visualizadas em gel de agarose 1%, utilizando os parâmetros para eletroforese já descritos anteriormente.

4.3 CULTIVO DE CÉLULA VERO

As células VERO (ATCC® CCL-81™), células epiteliais de rim de macaco verde africano, são aderentes e possuem um formato de estrela que formam aglomerados para formação da matriz celular e conseqüente aderência. Estas foram cultivadas utilizando o meio MEM (Modified Eagle's Medium), em estufa com CO₂, à 37° C.

4.3.1 Estoque viral

As células VERO foram cultivadas inicialmente em uma garrafa de 175 cm², na concentração de 5x10⁵ células/ml, para um volume final de 30 ml de meio MEM e incubadas na estufa de CO₂, a 37°C. Após 24 horas, observando uma confluência de 70 a 80%, o meio foi removido e adicionado 4 ml de meio MEM (suplementado com Soro Fetal Bovino à 2%). Posteriormente, as células foram infectadas com o vírus Chikungunya junto ao meio MEM suplementado para um valor final de 4 ml. As células foram incubadas na estufa de CO₂ a 37°C e homogeneizadas a cada 15 minutos, até completar 1 hora. Em seguida foi adicionado 22 ml de meio MEM suplementado e realizada a incubação por 24 horas. Em seguida, o produto obtido da garrafa de cultura

foi centrifugado a 1500 rpm (rotação por minuto) e a partir do sobrenadante foram realizadas alíquotas, que seguiram para o armazenamento à -80 °C. O estoque viral obtido apresentou um título de $2,1 \times 10^7$ Unidades Formadoras de Placa (do inglês *Plaque-Forming Units*, PFUs). O vírus utilizado neste trabalho foi isolado de um paciente da Paraíba/PE e é identificado como PB-302, no Biobanco do Serviço de Referência de Arbovirose do IAM/Fiocruz-PE.

4.3.2 Inativação Viral

Uma parte do estoque viral obtido foi inativado com Betapropiolactona (BPL) à 0,025%, conforme estudo realizado por Goodman e colaboradores (2014). As células foram cultivadas inicialmente em uma garrafa de 175 cm² na concentração de 5×10^5 células/ml, para um volume final de 30 ml de meio MEM, e incubadas na estufa de CO₂ a 37°C. Após 24 horas, observando uma confluência de 70 a 80%, o meio foi removido e adicionado 4 ml de meio MEM suplementado. Posteriormente, as células foram infectadas com o vírus Chikungunya, junto ao meio MEM suplementado, para um valor final de 4 ml. As células foram incubadas na estufa de CO₂ a 37°C e homogeneizadas a cada 15 minutos, até completar 1 hora. Em seguida foi adicionado 22 ml de meio MEM suplementado e realizada a incubação por 24 horas. Posteriormente, foi observado o efeito citopático e a garrafa foi congelada -80 °C. Após 24 horas, o produto obtido da garrafa de cultura foi descongelado e centrifugado à 1500 rpm. Ao sobrenadante foi adicionado 0,025% de BPL e realizada a incubação à 4°C, com agitação por 24 horas. Em seguida foram realizadas alíquotas que seguiram para o armazenamento à -80°C (GOODMAN et al., 2014).

4.4 CULTIVO DE CÉLULA HEK 293T

As células HEK 293 T, células de rim de embrião humano, possuem formato esférico, são aderentes e se desprendem facilmente da matriz celular formada no cultivo (ATCC® CRL-3216™). As mesmas foram cultivadas utilizando o meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) na estufa com CO₂, à 37° C, em garrafas de tampa semi-aberta.

4.4.1 Ensaios de transfecção com as construções de DNA vacinais

O cultivo foi iniciado em garrafas de cultivo celular de 25 cm², na concentração de 6x10⁵ células/ml, para um volume final de 8 ml e incubadas na estufa de CO₂ à 37°C, por 24 horas. A técnica de transfecção foi realizada com as construções plasmidiais de estudo (descritas no tópico 4.2) e os reagentes comerciais Polifectamina (PolyFect® Transfection Reagent, QIAGEN™) e Lipofectamina (Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent, Invitrogen™), de acordo com as instruções dos fabricantes. Em seguida os extratos celulares, de 48h e 72h após transfecção, foram obtidos através de ensaio de radioimunoprecipitação utilizando o RIPA Lysis Buffer, (Merck™), conforme recomendações do fabricante. As amostras foram armazenadas a -80° C, para posterior avaliação através de ensaios de *Western blot*.

Células HEK 293T foram preparadas em placas de 24 poços na concentração de 3,5x10⁵ células/ml, cultivadas em poços com lamínulas circulares (coverslips), e incubadas em estufa de CO₂ a 37°C. Após 24h, as células foram transfectadas com as construções plasmidiais do estudo e o reagente de transfecção Lipofectamina (Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent, Invitrogen™), de acordo com as instruções dos fabricantes. Após incubação por 48h em estufa de CO₂, nas condições previamente descritas, a expressão protéica foi analisada nas células transfectadas através de ensaios de imunofluorescência indireta.

4.4.2 Ensaios de Infecção com o vírus Chikungunya

As células HEK 293T foram cultivadas inicialmente em uma garrafa de 25 cm², na concentração de 5x10⁵ células/ml, para um volume final de 8 ml de meio DMEM e incubadas na estufa de CO₂, a 37°C. Após 24 horas, observando-se uma confluência de 70 a 80%, o meio de cultura foi removido e adicionados 500 µl de DMEM suplementado, acrescido de 500 µl do CHIKV. Em seguida as células foram homogeneizadas, a cada 15 minutos, até completar 1 hora e posteriormente foi adicionado 7 ml de DMEM suplementado. As células foram então incubadas, nas mesmas condições descritas por 24 horas, e os efeitos citopáticos observados em

microscópio óptico de luz branca invertido. Em seguida os extratos celulares, foram obtidos através de ensaios de radioimunoprecipitação utilizando o RIPA Lysis Buffer (Merck™), conforme as recomendações do fabricante. As amostras foram armazenadas a -80° C, para posterior avaliação em ensaios de *Western blot*.

Placas de 24 poços também foram utilizadas para cultivo de Células HEK 293T, na concentração de $3,5 \times 10^5$ células/ml, em lamínulas circulares (coverslips) para um volume final de 3 ml e incubadas em estufa de CO₂, a 37°C. Após 24h o meio de cultura foi removido e adicionado 500 µl do CHIKV, diluído por multiplicidade de infecção (MOI) de 0,01 / 0,1 / 0,5 em meio DMEM suplementado. As células foram em seguida homogeneizadas, a cada 15 minutos, até completar 1 hora e foi adicionado 2,5 ml de DMEM suplementado. Posteriormente as células foram incubadas por 24 horas, nas mesmas condições descritas em estufa de CO₂, e os efeitos citopáticos de cada ponto de MOI foram avaliados, para a utilização nos ensaios de imunofluorescência indireta.

4.5 WESTERN BLOT

Todos os extratos celulares obtidos foram quantificados utilizando o reagente Bradford (Bradford protein assay, Merck™) e o leitor (Bio-Rad Benchmark Plus Microplate Reader), para posterior avaliação em ensaios de *Western Blot*. As amostras foram fracionadas em gel SDS-PAGE 15% e transferidas para membrana de PVDF (Immobilon-P – Millipore™), juntamente com uma amostra de marcador proteico (Prestained protein ladder, Invitrogen™), que foi em seguida bloqueada com solução de TBS (20 mM Tris, 500 mM, NaCl, pH 7.5), leite desnatado 5% e Tween-20 a 0,05%, em temperatura ambiente por 1h, com agitação. Em seguida, a membrana foi incubada com o soro Anti-CHIKV produzido em coelho (anticorpo primário) em uma diluição de 1:1500, por 16 horas a 4°C, em solução de bloqueio *overnight*. No dia seguinte a membrana foi lavada três vezes, por 10 minutos, com TBS-Tween 20 e foi realizada a incubação com o anticorpo secundário [Anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase - HRP (Peróxido de hidrogênio Oxidorredutase - Invitrogen™)] seguindo o protocolo do fabricante, em uma diluição de 1:10.000 por 1h à temperatura ambiente, em solução de bloqueio. Após mais três lavagens de 10 minutos com TBS-Tween-20,

as membranas foram incubadas por 3 minutos com a solução comercial de quimioluminescência – ECL (Chemiluminescent Substrate Reagent Kit), para revelação, de acordo com as recomendações do fabricante (Invitrogen™). A visualização das reações foi realizada através do equipamento ImageQuant (LAS 500 chemiluminescence CCD câmera), do fabricante GE Healthcare Life Sciences™.

4.6 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

Após os ensaios descritos no tópico 4.4, as células foram fixadas utilizando a solução de Paraformaldeído 4% em PBS 1X, lavadas 3 vezes com PBS 1X e permeabilizadas com TRITON X-100 a 0,1%. Em seguida foram lavadas com PBS 1X e bloqueadas com albumina de soro bovino (do inglês, Bovine Serum Albumin - BSA) a 3%, por 1 hora, em câmara escura/úmida a 37° C. As incubações foram realizadas com o anticorpo primário monoclonal comercial anti-hLAMP (Anti-Chikungunya Virus Monoclonal, A54Q, Invitrogen™) ou anti-CHIKV policlonal de camundongos (obtido mediante a infecção de camundongos com o vírus selvagem) nas concentrações 1:50 e 1:200, respectivamente, seguida do anticorpo secundário anti-IgG de camundongo Alexa Fluor 488 (anti-mouse secondary antibody, Abcam™) na concentração 1:500, respectivamente, ambos por 1 hora em câmara escura/úmida à temperatura ambiente. Após cada incubação, as lâminulas foram lavadas com PBS 1X e montadas na lâmina utilizando um montante contendo o marcador nuclear DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (DAPI Fluoromount-G®, Invitrogen™), de acordo com as especificações do fabricante. Para análise, as lâminas foram enviadas ao Núcleo de Plataforma Tecnológicas (NPT) do IAM. A observação das células foi realizada utilizando uma objetiva de 63x, e a captura das imagens foram obtidas através de microscópio de fluorescência (Leica DMI8).

4.7 EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

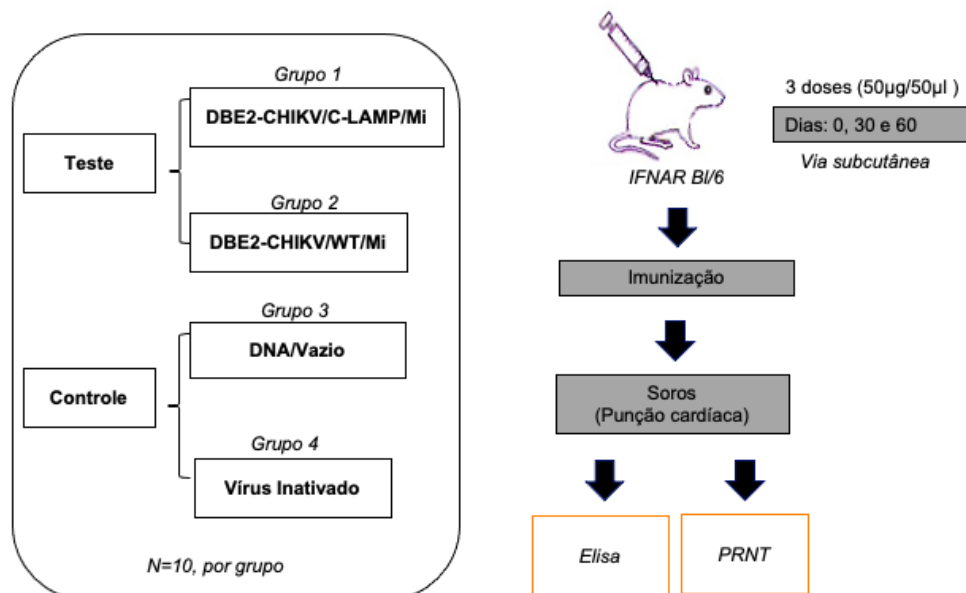
Os animais nocautes (IFNAR BI/6), Livres de Germes Patogênicos (SPF), foram adquiridos e alojados no Laboratório da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Universidade de São Paulo - FMRP, USP, Brasil), e no Laboratório Experimental Animal da Fiocruz/PE (Oswaldo Cruz Fundação, Recife, Brasil), de acordo com as

recomendações da Comissão para Uso Ético Animal de ambas instituições (166/2019 e 174/2021, respectivamente).

4.7.1 Imunização dos camundongos

Os camundongos nocautes (10 por grupo) foram imunizados com três doses, pela via subcutânea (s.c.) com as construções de DNA (50µg/50µl) ou vírus inativado (controle positivo, 50µl), nos dias zero, 30 e 60, de acordo com o estudo de Maciel e colaboradores (2015). Os soros foram coletados (um dia antes de cada imunização) e, no final (após 15 dias da última imunização), por punção cardíaca durante a eutanásia. Por fim, os soros foram utilizados para os ensaios de ELISA e Teste de Neutralização por Redução de Placas (do inglês, *Plaque Reduction Neutralization Test* – PRNT) (MACIEL et al., 2015). O experimento foi realizado em duplicata (na FMRP-USP e na FIOCRUZ-PE).

Figura 21 - Esquema de experimentação animal com camundongos nocautes da linhagem IFNAR BI/6. Os animais foram divididos em grupos de 10 (testes e controles) e imunizados com as formulações vacinais de DNA, vetor vacinal ou vírus inativado. As amostras biológicas obtidas foram utilizadas para ensaios de avaliação imunológica (ELISA e Teste de Neutralização por Redução de Placa – PRNT).

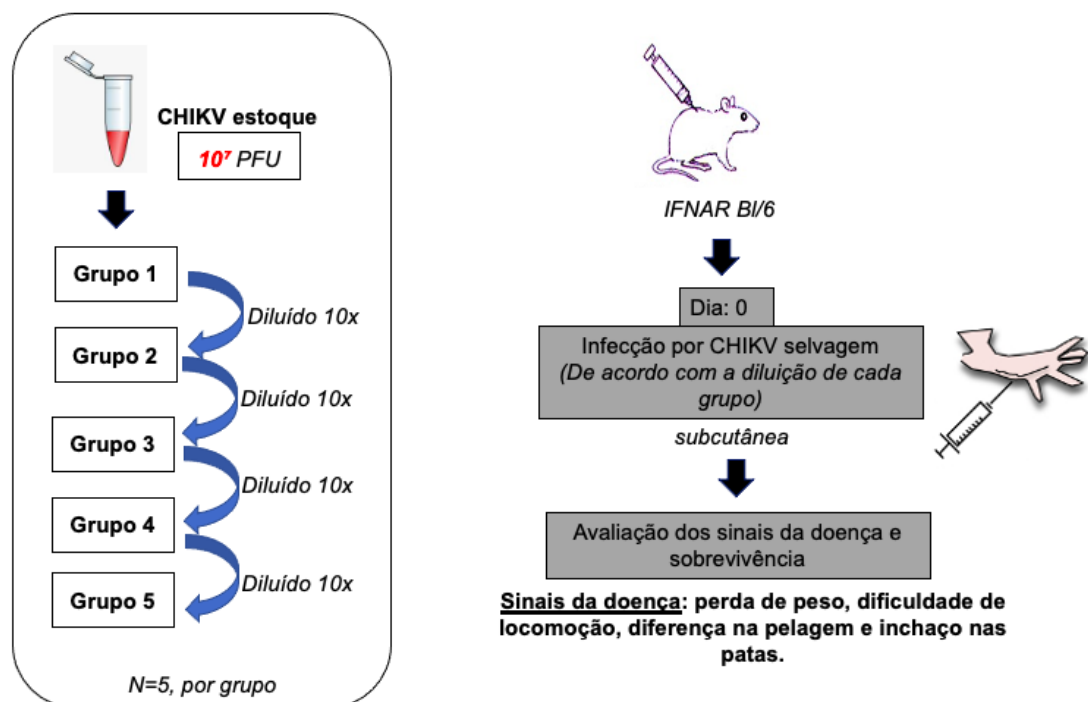


Fonte: elaborado pela autora (2023).

4.7.2 Curva de Sobrevida dos camundongos infectados com o vírus Chikungunya

Os animais nocautes (IFNAR BI/6) foram divididos em 5 grupos testes (5 animais por grupo) no qual, em cada grupo foi inoculado uma dose diluída (10 vezes) do CHIKV (a partir de um lote viral titulado inicialmente com 10^7 PFU) pela via subcutânea, na almofada da pata traseira (direita e esquerda) com CHIKV, um volume total de 0,1 ml (0,05 ml por local) (Figura 22). O intuito era avaliar a dose necessária para a redução do número de animais vivos em 50% (LD50) e, por conseguinte, a dose definida foi utilizada no experimento posterior de desafio letal, em animais nocautes previamente imunizados com as construções vacinais.

Figura 22 - Esquema da curva de sobrevida de camundongos da linhagem IFNAR BI/6 infectados com o vírus Chikungunya. Os ensaios de curva de sobrevivência foram realizados mediante a infecção do CHIKV selvagem, avaliação dos sinais da doença e sobrevida dos camundongos imunizados.



Fonte: elaborado pela autora (2023).

4.7.3 Desafio letal de camundongos previamente imunizados com os produtos vacinais do estudo

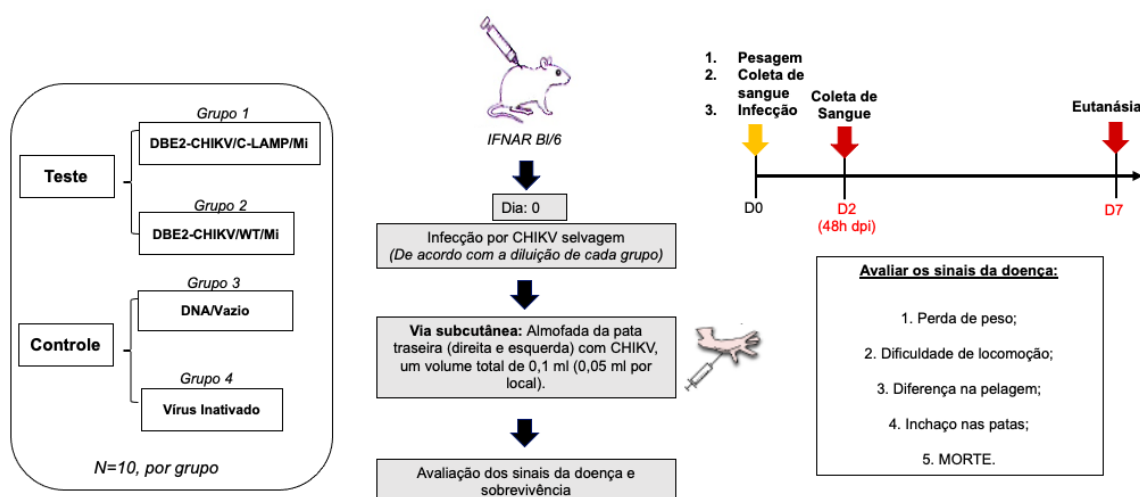
Os soros dos camundongos previamente imunizados, como descrito no tópico 4.7.1, foram coletados um dia antes de cada imunização, da inoculação pelo vírus da CHIKV e após 2 dias da infecção. Sendo esses últimos para detecção do vírus (viremia) através da utilização do Kit comercial BIOMOL ZDC - Zika, Dengue e Chikungunya, de acordo com as instruções do fabricante (Tabela 1) (IBMP, 2019). Após 120 dias da última imunização (D123), os animais foram infectados com a LD50 definida no ensaio anterior de CHIKV selvagem, pela via subcutânea, na almofada da pata traseira (direita e esquerda). Os grupos ainda foram observados até 7 dias após a infecção para avaliar os sinais da doença ou sobrevivência (Figura 23).

Tabela 1 - Valores de Cycle threshold (Ct) dos vírus para a determinação qualitativa dos resultados.

RESULTADO	Ct dos vírus
POSITIVO	Ct < 36
INDETERMINADO	Ct ≥ 36
NEGATIVO	Ausência de amplificação

Fonte: IBMP (2019).

Figura 23 - Esquema do desafio letal com camundongos da linhagem IFNAR BI/6 previamente imunizados com os produtos vacinais de estudo. O ensaio de desafio letal foi realizado nos grupos mediante a infecção do CHIKV selvagem, seguida da avaliação dos sinais da doença e sobrevivência dos camundongos imunizados.



Fonte: elaborado pela autora (2023).

4.8 ENSAIOS DE ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)

A análise de anticorpos específicos IgG total contra o DBE2-CHIKV, produzidos pelos camundongos imunizados, foi realizada através do Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA). Antes da realização do teste, foi realizada a padronização das concentrações do soro e conjugado.

4.8.1 Padronização da concentração de soros

Placas de microtitulação de 96 poços (Nunc MaxiSorp®) foram adsorvidas com a proteína DBE2 recombinante purificada na concentração de 0,5 µg/ml em tampão de carbonate/bicarbonato (já padronizada em trabalhos prévios) e incubadas com soro dos animais (triplicata), em cinco concentrações diferentes: 1:20 / 1:40 / 1:60 / 1:80 / 1:100, diluídos no tampão de ensaio (solução de leite 5% em PBS 1x e 0.1% Tween 20).

4.8.2 Padronização da concentração do conjugado

As concentrações avaliadas do anticorpo secundário anti-Mouse IgG Peroxidase Conjugate (Goat anti-mouse IgG (H+L) – HRP, Invitrogen™) foram 1:2000, 1:10000 e 1:15000, diluídos no tampão de ensaio (solução de leite 5% em PBS 1x e 0.1% Tween 20) utilizando soros sabidamente positivos para esta validação. Após a etapa de padronização do soro e conjugado, as amostras obtidas durante os ensaios de experimentação animal foram testadas na melhor condição.

4.8.3 Análise dos títulos de anticorpos IgG anti-DBE2/CHIKV

A titulação de anticorpos IgG anti-DBE2/CHIKV foi realizada através da técnica de ELISA utilizando os soros dos animais imunizados dos grupos descritos no tópico 4.7.1, obtidos após a terceira imunização. Os soros testes foram avaliados diluídos em 1:20 no tampão de ensaio (solução de leite 5% em PBS 1x e 0.1% Tween 20). As absorbâncias resultantes foram medidas em uma densidade óptica de 450 nm, através de leitor de ELISA (Bio-Rad Benchmark Plus Microplate Reader), após a adição do substrato (Kit reagente substrato BD opteia ELISA®, BD™). O valor de cut-off foi utilizado para determinar o ponto limite entre as amostras positivas e negativas, no qual foi representado pela média obtida do grupo negativo + 3x desvio padrão.

4.8.4 Análise Estatística

A análise estatística dos dados gerados foi realizada utilizando o software Graph Pad Prism 9.0, sendo realizado os testes de análise de variância (ANOVA), Correlação e de curva de sobrevivência. As diferenças obtidas foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de P foi menor que 0,05.

4.9 TESTE DE NEUTRALIZAÇÃO POR REDUÇÃO DE PLACAS (*PLAQUE REDUCTION NEUTRALIZATION TEST – PRNT*)

Os soros obtidos após cada imunização dos camundongos foram utilizados no teste de neutralização conduzido em células da linhagem Vero (300.000 cel/mL) e em meio de cultura (Minimal Essential Medium, GIBCO), acrescido de 10% de SFB, em microplacas de 24 poços (0,5 mL/poço), preparadas 48 horas antes do ensaio. As amostras de soro foram inativadas (30 minutos a 56°C) e diluídas (1/2, 1/4, 1/8 e 1/16) em microplacas de 96 poços, e posteriormente incubadas com o vírus (CHIKV) a uma concentração contendo 30-70 UFP/mL. Após incubação (37°C, 5% CO₂) por 1 hora, as placas de 24 poços foram inoculadas, em duplicata, com 50µl de cada mistura vírus/soro, e incubadas (37°C, 5% CO₂) por 1 hora. Após incubação, as células foram cobertas com 500µl de meio semi-sólido. Após incubação por 2 dias, as células foram fixadas com formalina a 3,5M, coradas com cristal violeta e posteriormente, contadas. Os títulos de anticorpos neutralizantes foram baseados em uma redução de 50% ou mais no número de placas (PRNT₅₀) na menor diluição de soro (1/2), em comparação com as amostras dos vírus inoculados na diluição empregada. Os títulos de anticorpos foram calculados utilizando regressão não-linear e transformados para escala logarítmica (log₁₀). Os dados obtidos foram inseridos no software Graph Pad Prism 9.0 para análise em gráficos.

5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Antes de qualquer procedimento em animais, este projeto foi avaliado e aprovado pela Comissão para Uso Ético Animal da Faculdade de Medicina de

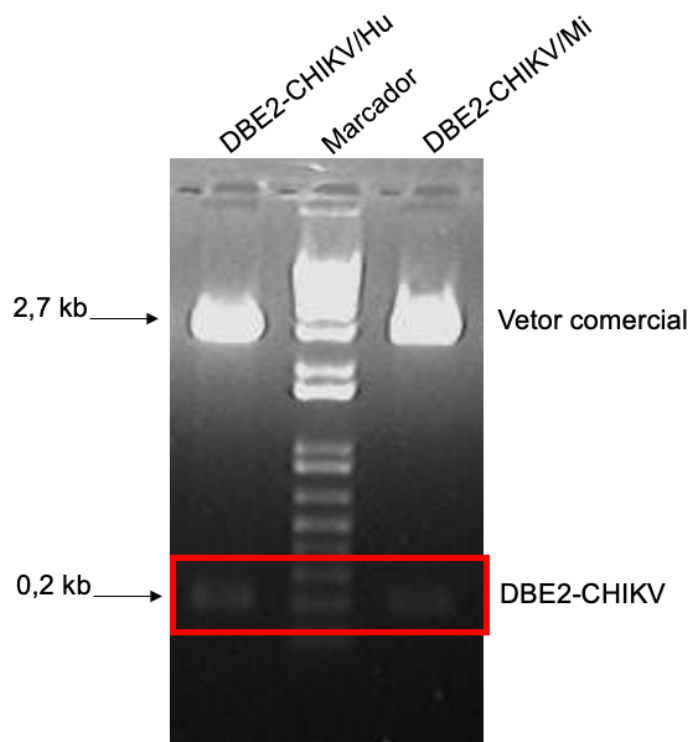
Ribeirão Preto (Universidade de São Paulo - FMRP, USP, Brasil) e da Fiocruz/PE (Oswaldo Cruz Fundação, Recife, Brasil) de acordo com os certificados de nº 166/2019 e nº 174/2021, respectivamente.

6 RESULTADOS

6.1 OBTENÇÃO DAS CONSTRUÇÕES DE DNA VACINAIS PARA CAMUNDONGOS E HUMANOS

Inicialmente as construções plasmidiais contendo o fragmento gênico DBE2-CHIKV foram otimizadas e sintetizadas, no vetor comercial (pUC57), visando a sua posterior expressão em camundongos e humanos. Os insertos foram confirmados através de digestão enzimática, utilizando as enzimas de restrição *Sall/EcoRI* e *NheI/EcoRI*, respectivamente, e visualizados através de eletroforese em gel de agarose: banda de aproximadamente 2,7 kb (quilobase, do inglês, kilobase), referente ao vetor comercial, e banda de aproximadamente 0,2 kb referente ao fragmento gênico DBE2-CHIKV (Figura 24).

Figura 24 - Digestão das construções plasmidiais DBE2-CHIKV, para camundongo e humano, do vetor comercial. Os insertos do DBE2-CHIKV foram removidos do vetor comercial *pUC57* e visualizados por meio de eletroforese com brometo de etídio. Pode-se observar fragmentos de 2,7 kb referente ao plasmídeo comercial, e de 0,2 kb referente ao inserto, utilizando o marcador 1 kb de peso molecular.

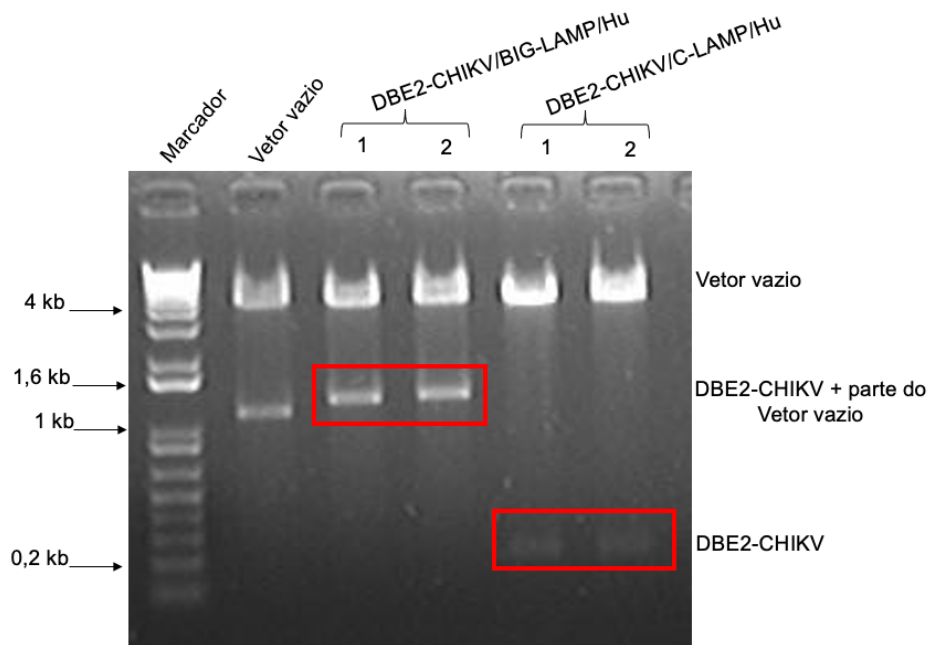


Fonte: elaborado pela autora (2023).

6.1.1 Construções de DNA vacinal em vetor para expressão para humanos

O fragmento purificado do DBE2-CHIKV foi utilizado na etapa de subclonagem no vetor de expressão para humanos (p8L), entre os sítios das enzimas de restrição *XhoI/EcoRI* para a DBE2-CHIKV/BIG-LAMP/Hu e *Sall/EcoRI* para a obtenção da construção DBE2-CHIKV/C-LAMP/Hu. A comprovação dos produtos obtidos foi realizada por digestão enzimática, utilizando as enzimas *Sall/EcoRI*, e os seguintes fragmentos foram observados: 4 kb (vetor), 1,6 kb (DBE2-CHIKV/BIG-LAMP/Hu) e 0,2 kb (DBE2-CHIKV/C-LAMP/Hu). O vetor p8L vazio (sem o inserto) foi utilizado apenas como controle, e os seguintes fragmentos foram observados: 4 kb (vetor) e 1kb [sequência N-terminal de LAMP (N-LAMP)] (Figura 25).

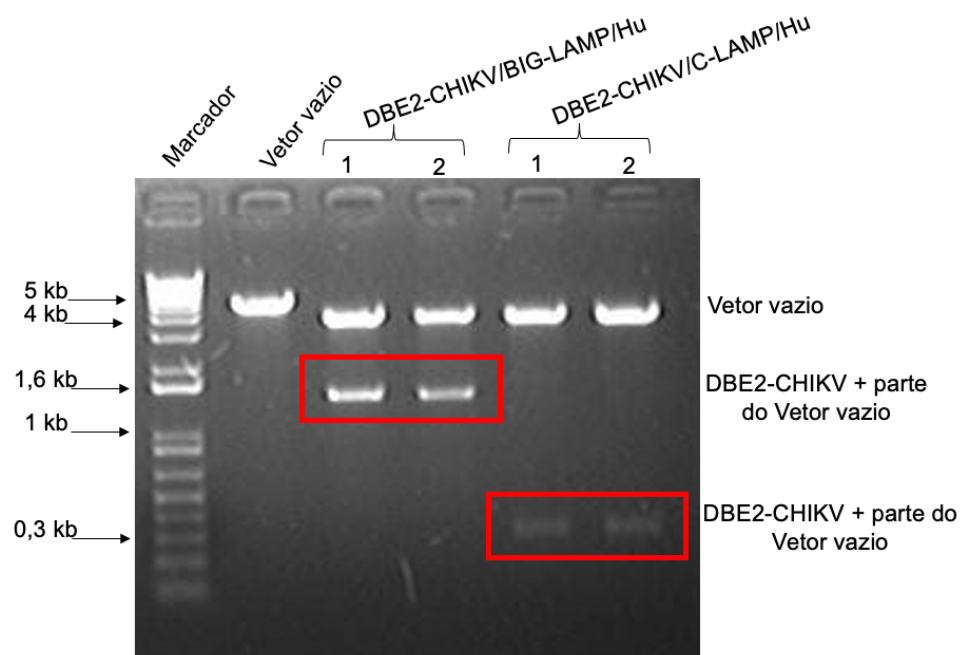
Figura 25 - Digestão das construções plasmidiais do DBE2-CHIKV no vetor de expressão p8L para humanos. As digestões dos construtos do DBE2-CHIKV otimizado para humanos, DBE2-CHIKV/BIG-LAMP/Hu e DBE2-CHIKV/C-LAMP/Hu foram visualizados por meio de eletroforese com brometo de etídio: 4 kb (vetor plasmidial), 1,6 kb (inserto e parte do vetor) e 0,2 kb (referente ao inserto). O vetor vazio (sem o inserto) foi utilizado como controle: 4 kb e 1 kb, sendo esta última referente a porção N-LAMP presente no plasmídeo. Foi utilizado como referência, para a avaliação do tamanho dos fragmentos, o marcador de peso molecular de DNA 1kb.



Fonte: elaborado pela autora (2023).

Para melhor visualização e comprovação das construções do estudo, foi realizada uma digestão diferencial utilizando a enzima *NcoI*, que tem um sítio de restrição dentro e fora do plasmídeo. Os fragmentos esperados nesta digestão foram previamente observados no programa ApE, utilizando a sequência completa de cada construção plasmidial. Foi possível observar por eletroforese os seguintes fragmentos: 4 kb (vetor), 1,6 kb (DBE2-CHIKV juntamente com uma parte do p8L) e 0,3 kb (DBE2-CHIKV/C-LAMP/Hu), de acordo com os tamanhos preditos. O vetor vazio (sem inserto), utilizado como controle de digestão, apresentou a banda esperada de 5 kb (Figura 26).

Figura 26 - Digestão diferencial das construções plasmidiais do DBE2-CHIKV no vetor p8L de expressão para humanos. Os construtos DBE2-CHIKV/BIG-LAMP/Hu e DBE2-CHIKV/C-LAMP/Hu, foram visualizados por meio de eletroforese com brometo de etídio: 4 kb (vetor plasmidial), 1,6 kb (DBE2-CHIKV e parte do vetor), 0,3 kb (DBE2-CHIKV e algumas bases do plasmídeo). O vetor vazio (sem inserto), utilizado como controle de digestão, apresentou a banda esperada de 5 kb. Foi utilizado como referência, para a avaliação do tamanho dos fragmentos, o marcador de peso molecular de DNA 1kb.



Fonte: elaborado pela autora (2023).

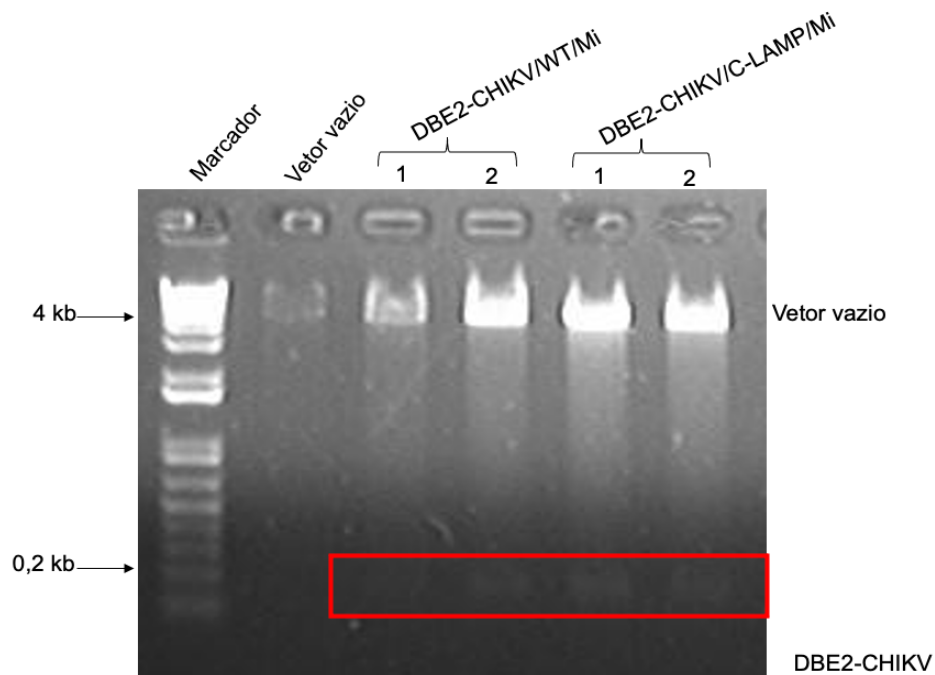
Uma amostra do produto de cada construção plasmidial, e primers específicos para anelamento nestas sequências, foram enviados para o sequenciamento de DNA, no Núcleo de Plataforma Tecnológicas (NPT) do IAM/FIOCRUZ. Após análise foi

observada a ausência de mutações, e 98% de identidade com o DBE2 do CHIKV selvagem e 100% de Query cover (alinhamento da sequência obtida com a sequência do GenBank).

6.1.2 Construções de DNA vacinal em vetor para expressão em camundongos

O fragmento purificado do DBE2-CHIKV foi utilizado na etapa de subclonagem no vetor de expressão em camundongos (p43.2) entre os sítios das enzimas de restrição *NheI/EcoRI*, gerando as construções plasmidiais DBE2-CHIKV/WT/Mi e DBE2-CHIKV/C-LAMP/Mi. A comprovação dos produtos obtidos foi realizada por digestão enzimática e os seguintes fragmentos foram observados: 4 kb (vetor) e 0,2 kb (inserto), respectivamente (Figura 27).

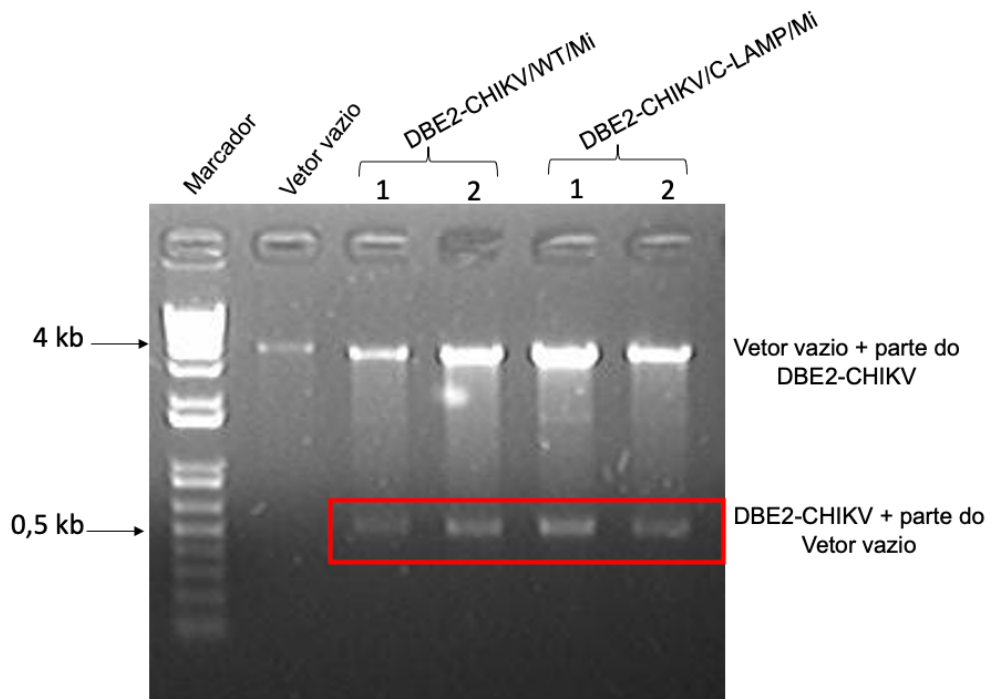
Figura 27 - Digestão das construções plasmidiais do DBE2-CHIKV no vetor p43.2 de expressão para camundongo. As digestões dos construtos do DBE2-CHIKV otimizado para camundongo, DBE2-CHIKV/WT/Mi e DBE2-CHIKV/C-LAMP/Mi foram visualizados por meio de eletroforese com brometo de etídio: 4 kb (vetor plasmidial) e 0,2 kb (inserto). O vetor vazio (sem inserto), utilizado como controle de digestão, apresentou a banda esperada de 5 kb. Foi utilizado como referência, para a avaliação do tamanho dos fragmentos, o marcador de peso molecular de DNA 1kb.



Fonte: elaborado pela autora (2023).

Para melhor visualização e comprovação das construções obtidas foi realizada uma digestão diferencial utilizando a enzima *NcoI*, que tem um sítio de restrição dentro e fora do plasmídeo. Os fragmentos esperados nessa digestão foram previamente observados no programa ApE, utilizando a sequência completa de cada construção plasmidial. Foi possível observar por eletroforese os seguintes fragmentos: 4 kb (vetor juntamente com algumas bases do inserto) e 0,5 kb (inserto com algumas bases do plasmídeo), de acordo com os tamanhos preditos. O vetor vazio (sem inserto), utilizado como controle, apresentou a banda esperada de 4 kb (Figura 28).

Figura 28 - Digestão diferencial das construções plasmidiais do DBE2-CHIKV no vetor p43.2 de expressão para camundongo. Os constructos DBE2-CHIKV/WT/Mi e DBE2-CHIKV/C-LAMP/Mi foram visualizados por meio de eletroforese com brometo de etídio: 4 kb (vetor plasmidial juntamente com algumas bases do inserto) e 0,5 kb (inserto juntamente com algumas bases do plasmídeo). O vetor vazio (sem inserto), utilizado como controle de digestão, apresentou a banda esperada de 4 kb. Foi utilizado como referência, para a avaliação do tamanho dos fragmentos, o marcador de peso molecular de DNA1kb.



Fonte: elaborado pela autora (2023).

Uma amostra do produto de cada construção plasmidial, e primers específicos para anelamento nestas sequências, foram enviados para o sequenciamento de DNA, no Núcleo de Plataforma Tecnológicas (NPT) do IAM/FIOCRUZ. Após a análise foi

observada a ausência de mutações, e 98% de identidade com o DBE2 do CHIKV selvagem e 100% de Query cover (alinhamento da sequência obtida com a sequência do GenBank).

6.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO FRAGMENTO GÊNICO DBE2 DO VÍRUS CHIKUNGUNYA EM CÉLULAS HUMANAS

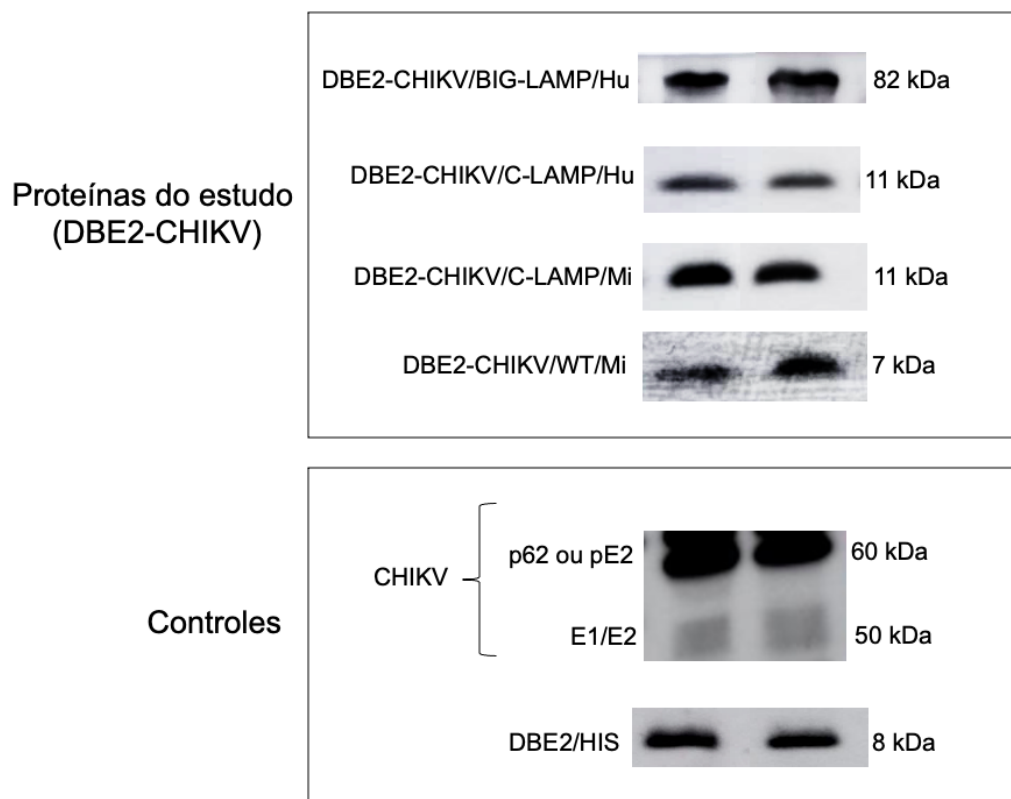
Extratos proteicos de células humanas transfectadas com as construções de DNA do estudo, ou infectadas com o CHIKV, foram utilizados para a detecção da subunidade da proteína DBE2 do vírus Chikungunya. Amostras da proteína DBE2-CHIKV recombinante purificada com cauda de poli-histidina (His/DBE2-CHIKV), já disponíveis no laboratório, foram utilizadas como controle positivo do ensaio, assim como os extratos de células infectadas. Cerca de 30 µg de cada extrato foi fracionado em gel de poliacrilamida, transferidos para membrana de nitrocelulose e analisados por *Western Blot*. Foi possível detectar: DBE2-CHIKV [nas amostras de transfecções (DBE2-CHIKV/BIG-LAMP/Hu, DBE2-CHIKV/C-LAMP/Hu, DBE2-CHIKV/C-LAMP/Mi e DBE2-CHIKV/WT/Mi)], p62/pE2 e E1/E2 (nas amostras de células infectadas por CHIKV) e His/DBE2-CHIKV (proteína recombinante purificada), nos tamanhos esperados como demonstrado na tabela 2 e figura 29.

Tabela 2 - Proteínas do estudo e seus respectivos tamanhos, em kDa, observadas nos ensaios de Western Blot.

DETECÇÃO	TAMANHO APROXIMADO (kDa)
DBE2-CHIKV/BIG-LAMP/Hu	82
DBE2-CHIKV/C-LAMP/Hu	11
DBE2-CHIKV/C-LAMP/Mi	11
DBE2-CHIKV/WT/Mi	7
P62/pE2	60
E1/E2	50
His/DBE2-CHIKV	8

Fonte: elaborado pela autora (2023).

Figura 29 - Detecção do DBE2-CHIKV obtido dos extratos celulares de transfecção, infecção e proteína recombinante purificada. Amostras dos extratos de células humanas transfectadas com as construções plasmidiais do estudo e infectadas com o vírus Chikungunya, foram detectadas em ensaios de *Western-blot*. As proteínas do estudo (DBE2-CHIKV/BIG-LAMP/Hu, DBE2-CHIKV/C-LAMP/Hu, DBE2-CHIKV/C-LAMP/Mi e DBE2-CHIKV/WT/Mi), p62/pE2 e E1/E2 do CHIKV selvagem e His/DBE2-CHIKV purificada, foram visualizadas nos seus tamanhos preditos de aproximadamente 82 kDa, 11 kDa, 11 kDa, 7 kDa, 60 kDa, 50 kDa e 8 kDa. Foi utilizado como referência, para a avaliação do tamanho das referidas proteínas, o marcador de peso molecular 190 kDa (não mostrado na figura).



Fonte: elaborado pela autora (2023).

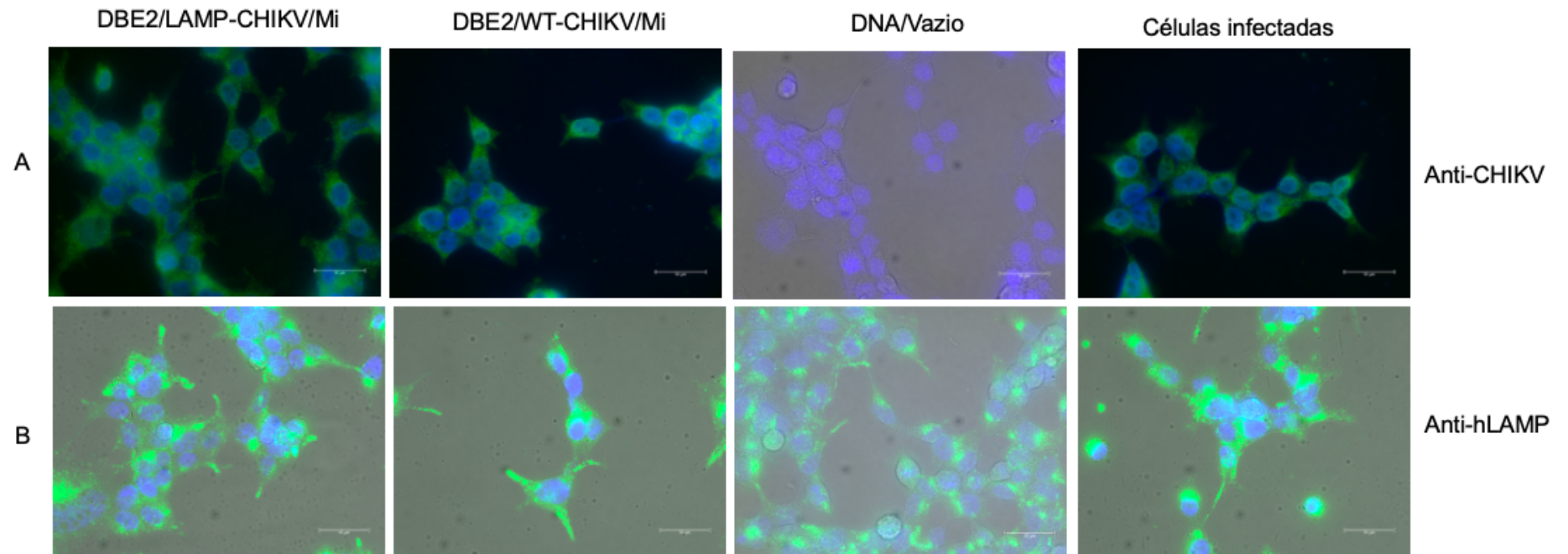
6.3 IDENTIFICAÇÃO DA LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DA SUB-UNIDADE PROTÉICA DBE2-CHIKV EM CÉLULAS HUMANAS

Após os ensaios de transfecção das células humanas, com as construções vacinais do estudo, os extratos celulares foram preparados para análise de imunofluorescência indireta, utilizando anticorpos primário contra o CHIKV e secundário conjugado a um fluoróforo, para visualização da localização subcelular da sub-unidade protéica DBE2-CHIKV e proteínas virais selvagens. O núcleo celular foi corado com o DAPI, em todos os ensaios, para facilitar a visualização e diferenciação

dos compartimentos da célula. As imagens foram obtidas através de microscópio de fluorescência do Núcleo de Plataforma Tecnológicas (NPT) do IAM/FIOCRUZ.

Ao analisar os resultados obtidos com a utilização de anticorpos anti-CHIKV por uma objetiva de maior aumento (63X), no microscópio de fluorescência, é possível observar a detecção das proteínas DBE2-CHIKV/C-LAMP/Mi, DBE2-CHIKV/WT/Mi e selvagens (células infectadas), predominantemente, com uma distribuição reticular na região citoplasmática e, a não detecção de proteínas no controle negativo (DNA/Vazio), como esperado (Figuras 30A). Com o objetivo de avaliar e comparar a distribuição das proteínas do estudo em compartimentos lisossomais (que caracteriza o LAMP) e reticulares, foi realizado um ensaio utilizando anticorpos anti-hLAMP para a detecção do LAMP endógeno de células humanas (HEK 293T). A distribuição em compartimentos lisossomais é nítida em todas as imagens obtidas, inclusive no controle (DNA/Vazio), conforme previsto (Figuras 30B).

Figura 30: Localização subcelular de proteínas do vírus Chikungunya detectadas em extratos celulares de transfecção e infecção viral. Em **A**, observa-se a detecção das proteínas DBE2-CHIKV/C-LAMP/Mi, DBE2-CHIKV/WT/Mi e selvagens distribuídas, predominantemente, em compartimentos reticulares na porção citoplasmática das células. Assim como a não detecção no controle negativo (DNA/Vazio). As imagens em **B**, identificam-se proteínas LAMP selvagem de células bem distribuídas em compartimentos lisossomais, também na porção citoplasmática de células transfectadas e infectadas. Os núcleos foram marcados com DAPI, em todos os ensaios, e as figuras foram obtidas através de microscópio de fluorescência (Leica DMI8) na objetiva de 63x.



Fonte: elaborado pela autora (2023).

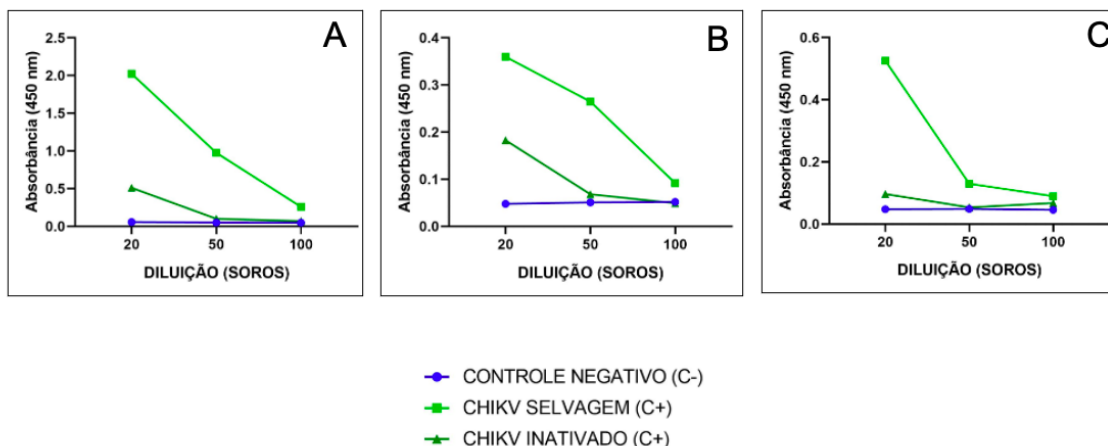
6.4 PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS

Os soros de camundongos imunizados com as três doses das formulações de DNA vacinais, e com o CHIKV inativado, foram utilizados para mensurar a produção de anticorpos produzidos após cada imunização. No entanto, antes foi necessário a padronização do ensaio com amostras sabidamente positivas e negativas, em relação à infecção por CHIKV.

6.4.1. Definição da concentração do anticorpo conjugado

Inicialmente foram analisadas três concentrações, 1:2000, 1:10000 e 1:15000, do anticorpo secundário (conjugado a peroxidase), em ensaios de ELISA com soros de camundongos sabidamente positivos (animais infectados com o vírus selvagem ou imunizados com o vírus selvagem inativado) e negativos (animais não infectados). A concentração estabelecida para ser utilizada em ensaios subsequentes foi a 1:2000 por apresentar valores capazes de distinguir melhor os grupos de amostras (Figura 31).

Figura 31 - Análise das concentrações do anticorpo secundário em ensaios de ELISA. Em **A**, observa-se o resultado utilizando a concentração 1:2000. Em **B**, os soros foram mensurados com o anticorpo secundário na concentração de 1:10000. E por fim, em **C**, observa-se os resultados com 1:15000 do anticorpo conjugado.

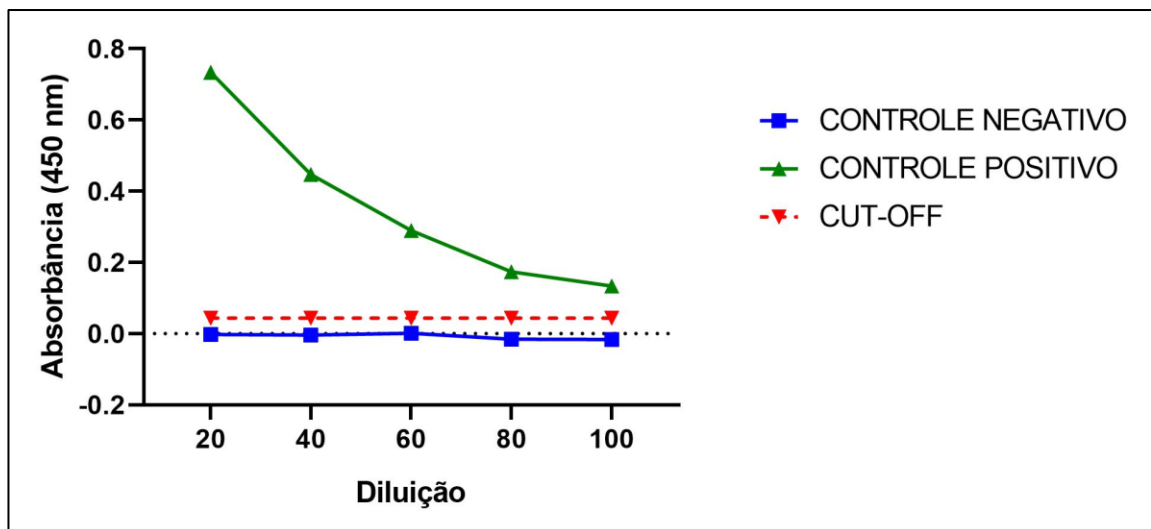


Fonte: elaborado pela autora (2023).

6.4.2 Definição da concentração dos soros

Uma curva padrão foi realizada com as amostras de soro sabidamente positivas e negativas para o CHIKV diluídas em cinco pontos (1:20, 1:40, 1:60, 1:80 e 1:100), para definir a concentração dos soros testes de camundongos imunizados que seriam analisados em ensaios de ELISA. A diluição definida foi a de 1:20, por apresentar valores capazes de distinguir melhor os grupos de amostras. O valor do Cut-off (ponto de corte) também foi determinado, sendo utilizado para avaliar se as amostras testadas são positivas ou negativas (Figura 32).

Figura 32 - Curva padrão estabelecida para ensaios de ELISA. Soros sabidamente positivos (em verde) e negativos (em azul) foram diluídos em cinco pontos (1:20, 1:40, 1:60, 1:80 e 1:100) e avaliados em ensaios de ELISA, juntamente com o cut-off (em vermelho). É possível observar que o primeiro ponto da diluição (1:20) é capaz de distinguir melhor os grupos amostrais.



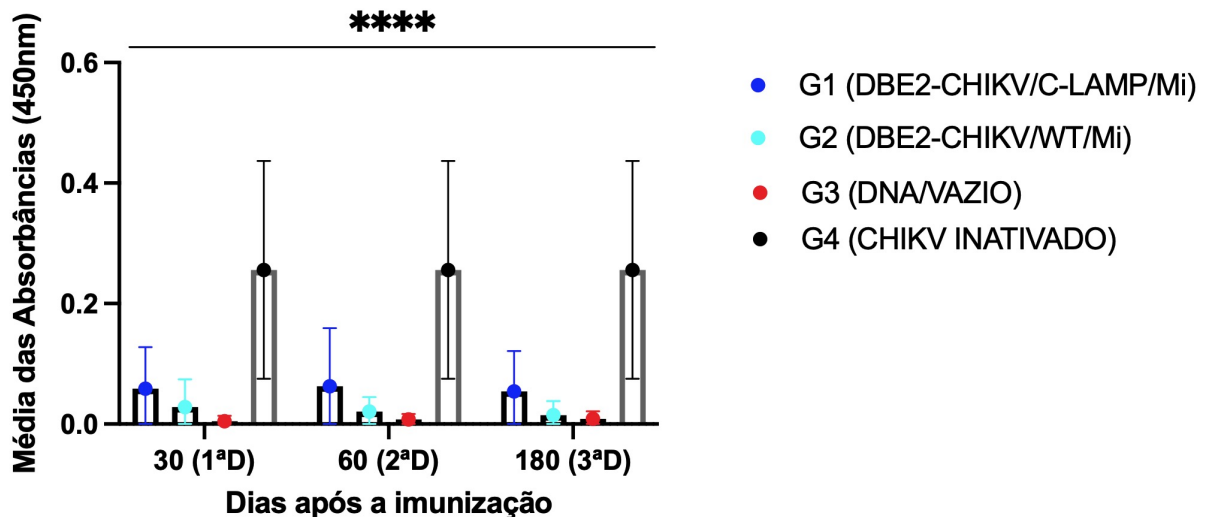
Fonte: elaborado pela autora (2023).

6.5 ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA HUMORAL DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM AS CONSTRUÇÕES VACINAIS

Para esta análise foram utilizados os soros dos animais nocautes, imunizados com as construções de DNA (DBE2-CHIKV/C-LAMP/Mi, DBE2-CHIKV/WT/Mi e DNA/VAZIO) e com o CHIKV inativado, no dia zero, 30 e 60. Os soros foram coletados no dia 30 (após primeira dose), dia 60 (após segunda dose) e dia 180 (após terceira dose) seguindo para análise por ensaio de ELISA, já estabelecido e padronizado em etapas anteriores, para avaliar a produção de anticorpos contra o CHIKV. A média dos valores obtida em cada grupo foi avaliada e observa-se que o G1 (DBE2-CHIKV/C-LAMP/Mi) praticamente manteve a produção de anticorpos após as 3 doses, apesar

de apresentar um discreto aumento após a segunda dose (Dia 60). O G2 (DBE2-CHIKV/WT/Mi) evidencia um discreto aumento após a primeira dose, que não se mantém mesmo após a segunda e terceira dose. Diferentemente do G4 (CHIKV inativado) que apresenta o maior aumento da detecção de anticorpos, logo após a primeira dose e se mantém após induções subsequentes. Apenas níveis basais foram detectados no G3, como esperado (Figura 33).

Figura 33 - Análise da produção de anticorpos de camundongos nocautes imunizados com os produtos vacinais. A média dos valores da absorbância (nm) obtidos por grupo após cada imunização foi analisada e observa-se uma manutenção dos níveis de detecção de anticorpos do G1 e G4 após as 3 doses. O G2 evidencia um discreto aumento após a primeira dose, mas não se mantém mesmo após as doses subsequentes. O G3 (DNA/VAZIO) foi utilizado como controle negativo. Os asteriscos representam os níveis de significância encontrados (**** $p < 0,0001$).

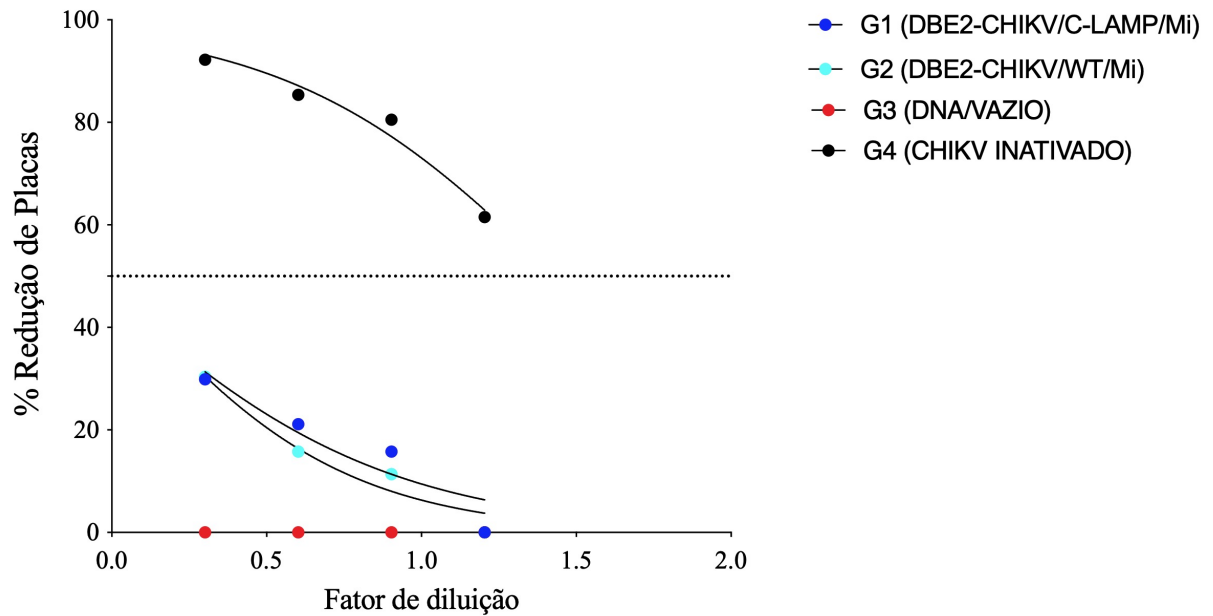


Fonte: elaborado pela autora (2023).

6.6 ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA NEUTRALIZANTE DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM AS CONSTRUÇÕES VACINAIS

Os mesmos soros dos animais previamente imunizados, para a realização do teste anterior (tópico 6.5), foram utilizados para detecção de anticorpos neutralizantes em ensaio de placas com o CHIKV selvagem. Após a primeira dose é possível observar apenas a detecção de anticorpos neutralizantes do G4 (CHIKV inativado) com 92% de redução de placa de acordo com a Figura 34.

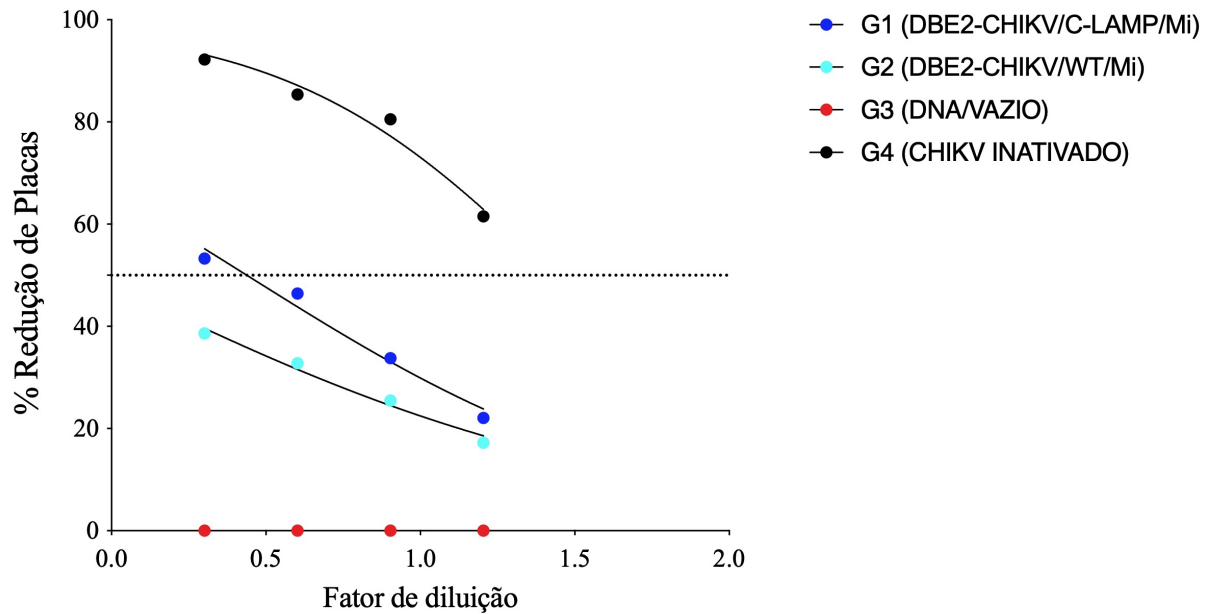
Figura 34 - Análise da produção de anticorpos neutralizantes de camundongos nocautes imunizados após a primeira dose. A média do percentual de redução de placas obtidos por grupo após a primeira imunização foi analisada e observa-se a detecção de anticorpos neutralizantes apenas do G4 (CHIKV inativado).



Fonte: elaborado pela autora (2023).

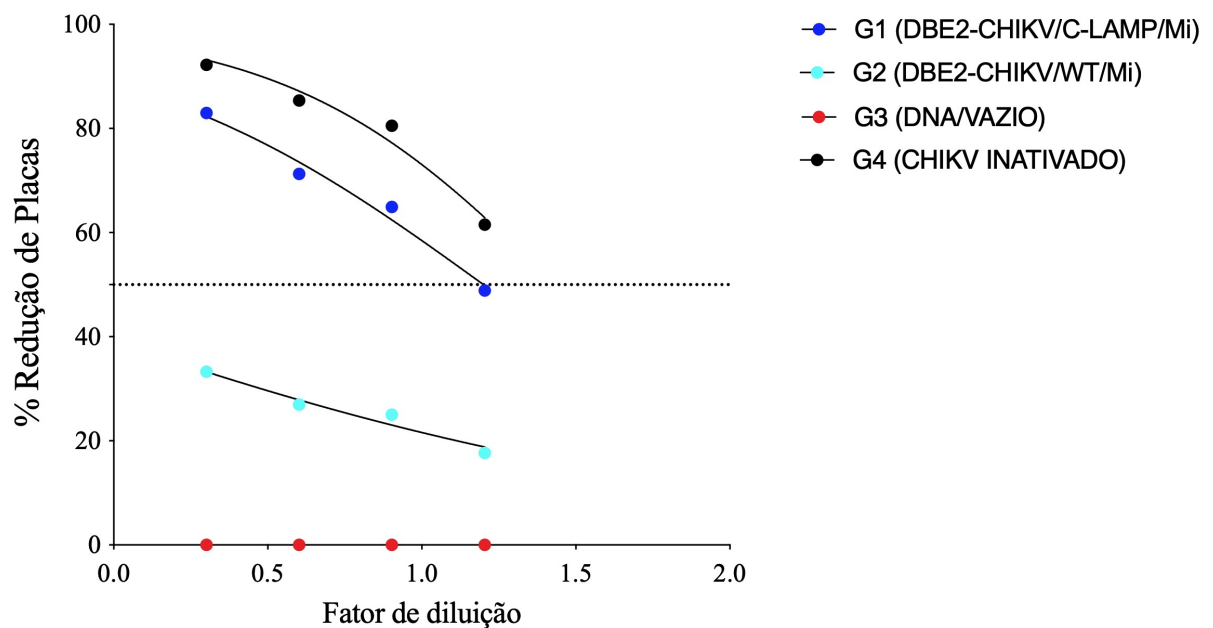
Em seguida, foram analisados os resultados após a segunda e terceira dose. E observou-se a crescente detecção de anticorpos neutralizantes do G1 (DBE2-CHIKV/C-LAMP/Mi) com 53% e 82% de redução de placas após a segunda e terceira dose, respectivamente. Enquanto que o G2 (DBE2-CHIKV/WT/Mi) não ultrapassou 38%. Já o G4 se manteve com 92% de redução de placa (Figuras 35 e 36).

Figura 35 - Análise da produção de anticorpos neutralizantes de camundongos nocautes imunizados após a segunda dose. A média do percentual de redução de placas obtidos por grupo após a segunda imunização foi analisada e observa-se a detecção de anticorpos neutralizante apenas do G4 (CHIKV inativado), representando cerca de 92% na redução de placas.



Fonte: elaborado pela autora (2023).

Figura 36 - Análise da produção de anticorpos neutralizantes de camundongos nocautes imunizados após a terceira dose. A média do percentual de redução de placas obtidos por grupo após a terceira imunização foi analisada e observa-se 82% e 92% na redução de placas para o G1 e G4 (CHIKV inativado). O G2 não ultrapassou 38% na redução de placas.



Fonte: elaborado pela autora (2023).

6.7 ANÁLISE DA EFICIÊNCIA VACINAL EM CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM AS CONSTRUÇÕES VACINAIS

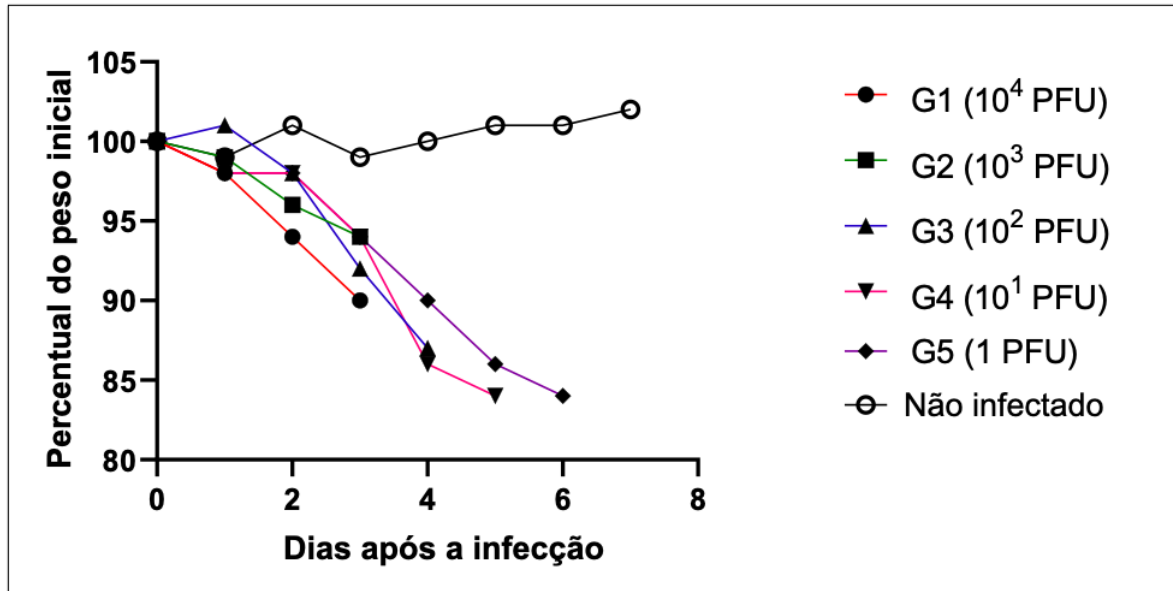
Em paralelo, foi realizado um experimento para caracterizar a infecção de camundongos nocautes pelo CHIKV, para definir a dose letal do vírus selvagem. A definição da dose letal é necessária para a avaliação dos ensaios de desafio letal, com os camundongos nocautes imunizados. Desta forma, foi possível analisar se os produtos vacinais propostos são capazes de proteger os camundongos nocautes, previamente imunizados contra a infecção pelo CHIKV selvagem.

6.7.1 Análise da sobrevivência de camundongos nocautes (IFNAR BL/6) infectados com o Vírus Chikungunya

Para caracterizar e avaliar a doença desencadeada pelo CHIKV no modelo animal utilizado neste estudo (camundongos nocautes) e definir a dose letal capaz de eliminar 50% de uma determinada população de animais (LD50), grupos de camundongos nocautes (nomeados de G1 a G5) foram infectados com CHIKV em cinco concentrações, 10^4 PFU, 10^3 PFU, 10^2 PFU, 10^1 PFU e 1 PFU, respectivamente. Esses animais foram acompanhados por 8 dias e os principais sinais da doença foram avaliados, como: perda de peso, edema de pata e sobrevivência.

Em relação à perda de peso, a avaliação foi realizada mediante o percentual do peso inicial (100%). A partir do segundo dia após a inoculação do CHIKV, todos os grupos de animais infectados já apresentavam uma diminuição do peso. No entanto, o G1 (que foi infectado com a maior carga viral) apresentou um maior percentual de perda de peso (10%) no terceiro dia, porém todos os animais desse grupo pereceram logo após a coleta dos dados. Em seguida, observa-se o G4 e G5 com uma perda de até 15% do peso inicial no quinto e sexto dia do experimento, respectivamente. Um grupo controle (não infectado) também foi avaliado e este, praticamente, se manteve no decorrer de todo ensaio (Figura 37).

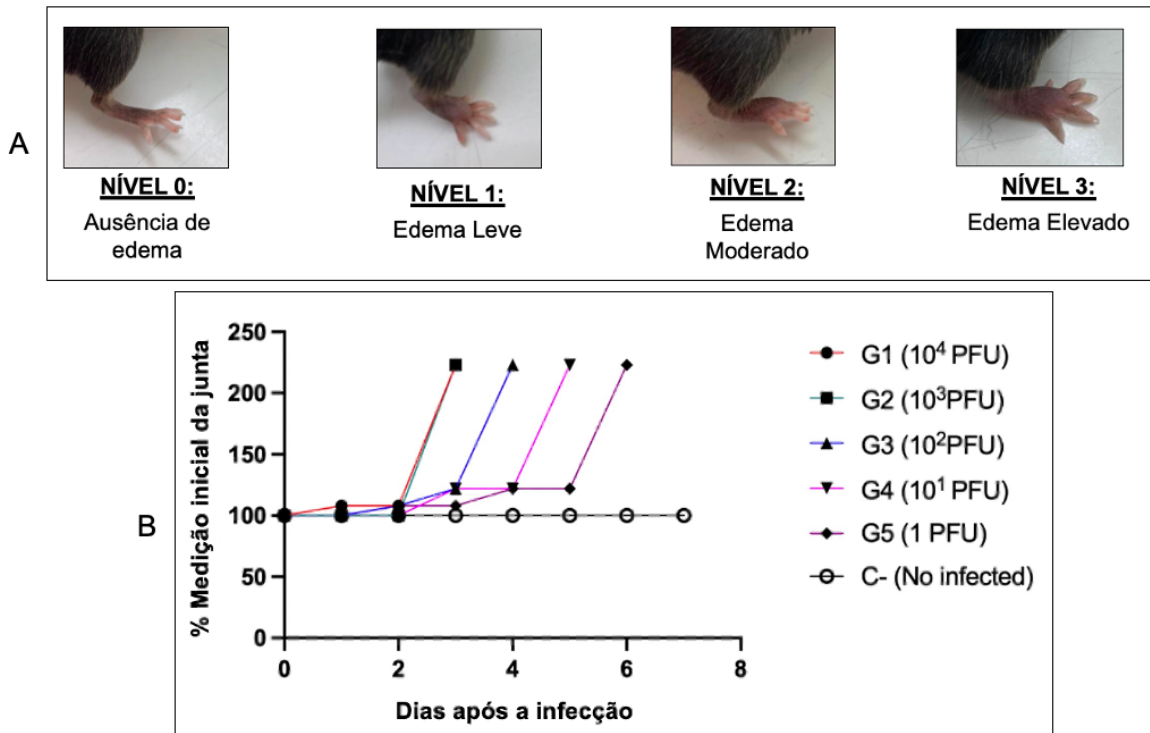
Figura 37 - Avaliação do percentual de peso de camundongos nocautes infectados com o vírus Chikungunya. Todos os grupos de animais infectados com o vírus Chikungunya apresentaram uma perda de peso significativa em relação ao peso inicial a partir do segundo dia após a inoculação viral. O G1 apresentou um percentual de 10% no terceiro dia, mas logo após a coleta dos dados todos os animais desse grupo faleceram. Em seguida, o G4 e G5 apresentaram um percentual de até 15% em relação ao peso inicial no quinto e sexto dia, respectivamente. O grupo controle (não infectado), manteve o peso no decorrer de todo o experimento.



Fonte: elaborado pela autora (2023).

Outro sinal característico da doença é o edema de pata. Para essa avaliação, inicialmente foram realizados a padronização observacional e o enquadramento dos animais em níveis denominados de 0 a 3, sendo o zero a ausência do sinal clínico e de 1-3 a presença do edema na forma leve, moderada e elevada, respectivamente (Figura 38A). Todos dos grupos, com exceção do não infectado, evidenciaram o edema de pata a partir do segundo dia de experimento e, até o final deste, alcançaram o nível mais elevado do sinal clínico (nível 3) (Figura 38B).

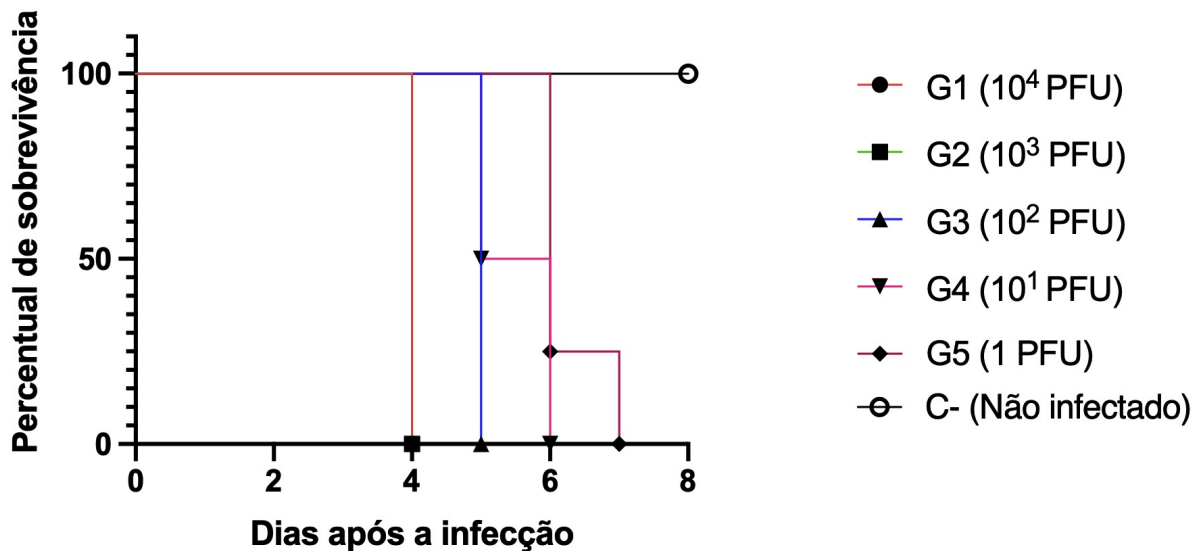
Figura 38 - Avaliação observacional do edema de pata de camundongos nocautes infectados com o vírus Chikungunya. Em **A**, destaca-se os níveis do edema de pata estabelecidos de forma observacional denominados de 0 a 3, onde zero é a ausência do sinal clínico e 3 é a forma mais elevada. Em **B**, observa-se que todos os grupos de animais infectados apresentaram o nível 3 do edema, até a finalização do experimento. O grupo controle (não infectado) apresentou a ausência de edema e se manteve estável durante o ensaio.



Fonte: elaborado pela autora (2023).

Os grupos de camundongos infectados apresentaram diferentes tempos de sobrevivência. Todos os animais do G1 e G2 morreram no dia 4 após a inoculação viral. O G3 encerrou o experimento no dia 5 e, neste mesmo dia, 50% da população do G4 também veio a óbito. No dia 6 os outros 50% do G4 morreram, assim como 70% da população do G5. E no dia 7, 30% dos animais restantes do G5 não sobreviveram. Os animais do grupo controle (não infectados) foram eutanasiados no dia seguinte (dia 8), finalizando o ensaio da curva de sobrevivência e a definição da LD50 na concentração 10^1 PFU, utilizada no G4 (Figura 39).

Figura 39 - Curva de sobrevivência de camundongos nocautes infectados com o vírus Chikungunya. Todos dos animais infectados não sobreviveram à infecção pelo vírus Chikungunya, independente da concentração. Os grupos G1 e G2 encerraram o experimento no dia 4 após a infecção; o G3 no dia 5, assim como 50% da população do G4; os outros 50% do G4 e 70% do G5 morreram no dia 6; e, por fim, os 30% restantes do G5 no dia 7. Os animais do controle (não infectados) se mantiveram estáveis no decorrer de todo experimento, sendo eutanasiados no dia 8.



Fonte: elaborado pela autora (2023).

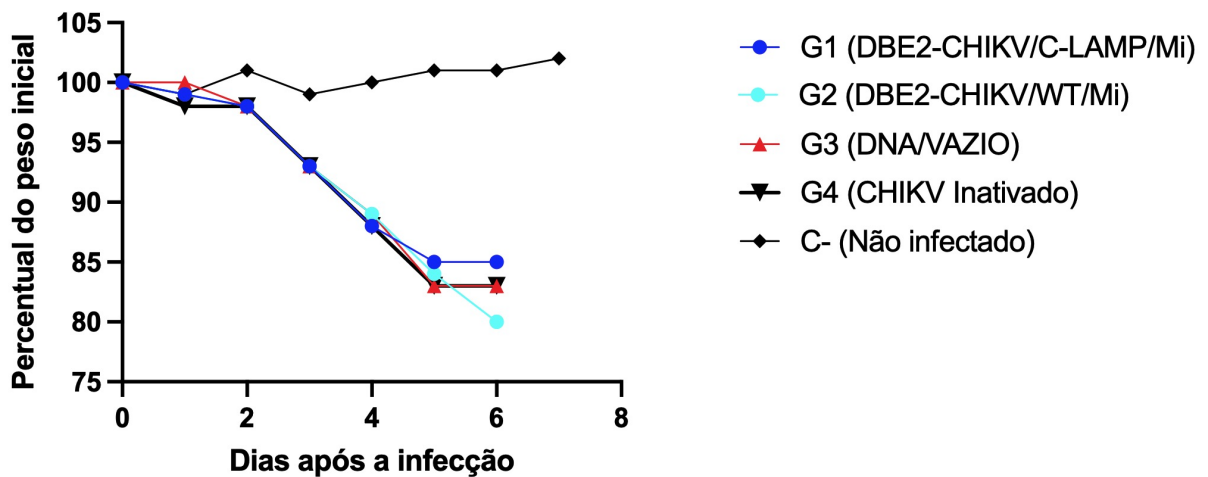
6.7.2 Análise do desafio letal de camundongos previamente imunizados com as construções vacinais

Os camundongos foram divididos em grupos testes e controles, sendo os testes denominados G1 (DBE2-CHIKV/C-LAMP/Mi) e G2 (DBE2-CHIKV/WT/Mi) e, os controles, G3 (DNA/VAZIO), G4 (CHIKV inativado) e C- (Não infectados). Os animais do G1, G2, G3 e G4 foram imunizados com 3 doses da formulação vacinal respectiva a cada grupo, e os respectivos soros foram avaliados em ensaios de ELISA (para mensurar a produção de IgG contra o CHIKV) como já demonstrado em tópicos anteriores. Após 120 dias, da última imunização, os animais foram desafiados com o vírus selvagem na concentração de 10¹ PFU (LD50). Todos os grupos foram acompanhados e avaliados mediante a padronização do experimento anterior de curva e sobrevivência (tópico 6.7.1).

De acordo com a análise do percentual do peso inicial (100%) é possível observar que a partir do segundo dia, após a inoculação do CHIKV, todos os grupos de animais infectados apresentaram uma diminuição de 5% do peso inicial e ao final

do experimento pode-se observar uma perda de 10 á aproximadamente 20%. O G2 evidenciou uma diminuição mais acentuada do peso inicial e o C- (não infectado) praticamente se manteve estável no decorrer de todo ensaio (Figura 40). Amostras de soros no dia de início dos sintomas (D2) também foram obtidas para detecção do RNA viral com o objetivo de confirmar os sinais da doença atribuíveis ao CHIKV, sendo todas consideradas positivas com o Ct < 36 (Tabela 3).

Figura 40 - Avaliação do percentual de peso inicial de camundongos nocautes previamente imunizados e desafiados com o vírus Chikungunya. Todos os grupos de animais infectados com o vírus Chikungunya apresentaram uma perda de peso significativa entre 10-20% (aproximadamente) do peso inicial. O G2 apresentou o percentual mais expressivo de aproximadamente 20% de perda, seguido do G4, G3 e G1. O grupo controle (não infectado) se manteve no decorrer de todo o experimento.



Fonte: elaborado pela autora (2023).

Tabela 3 - Grupos de camundongos, previamente imunizados com 3 doses vacinais, e os respectivos valores de Cycle threshold (Ct) seguido dos resultados correspondentes da detecção de RNA viral após 2 dias de infecção com o vírus Chikungunya e o controle positivo do kit comercial.

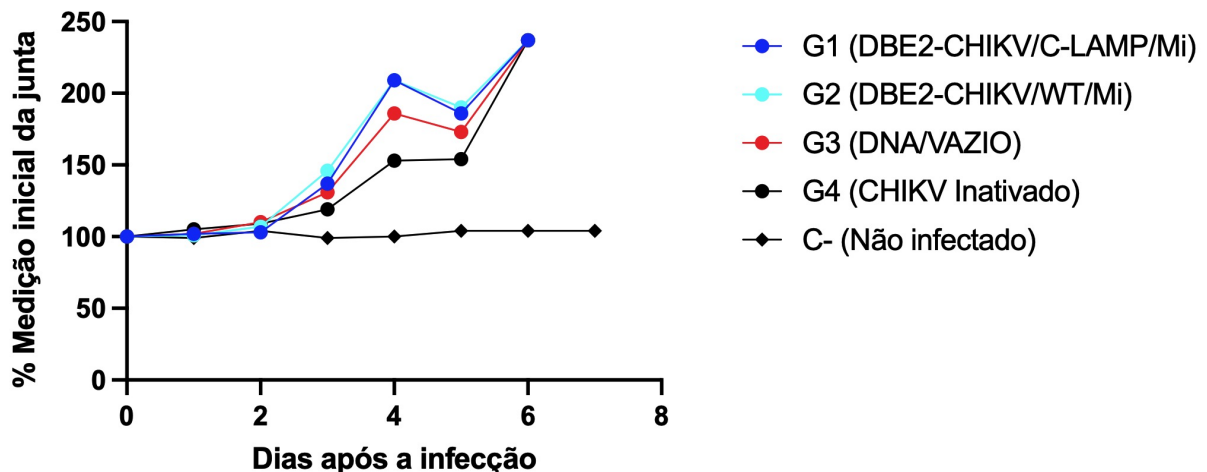
Grupos	Ct do vírus	Resultado
G1	23,9	Positivo
G2	24,3	Positivo
G3	23,2	Positivo
G4	22,0	Positivo
Controle positivo	11,43	Positivo

Fonte: elaborado pela autora (2023).

O edema de pata foi avaliado utilizando a mesma padronização observacional descrita na figura 38 (tópico 6.7.1), em relação ao enquadramento dos animais nos

níveis denominados de 0 a 3 e a medição realizada para a obtenção dos valores em milímetros (mm). Os dados foram analisados mediante o percentual da medida inicial da junta e, todos os grupos, com exceção do não infectado, evidenciaram alteração a partir do segundo dia de experimento estendendo-se até o final. É possível observar um aumento significativo de até 250% da medida inicial da junta, principalmente, no G2 seguida do G1, G3 e G4. O grupo não infectado se manteve estável durante toda a experimentação animal (Figura 41).

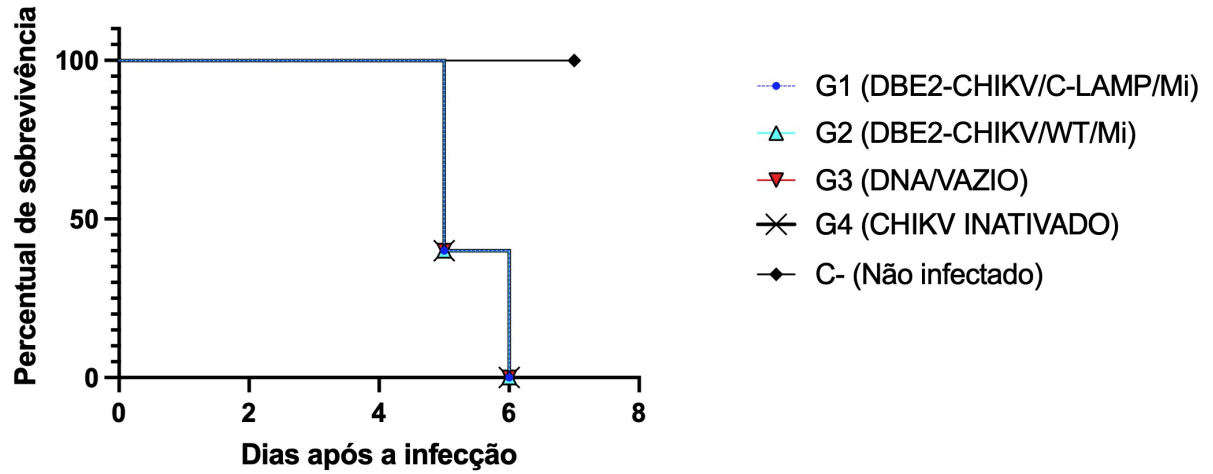
Figura 41 - Avaliação percentual da medida inicial da junta de camundongos nocautes previamente imunizados e desafiados com o vírus Chikungunya. É possível observar que todos os grupos de animais infectados apresentaram edema até a finalização do experimento com aumento expressivo acima de até 250%, sendo o G2 o grupo de maior destaque seguido no G1, G3 e G4. Em contrapartida, o grupo não infectado apresentou a ausência de edema e se manteve estável durante o ensaio.



Fonte: elaborado pela autora (2023).

Em relação à sobrevivência, os grupos de camundongos infectados apresentaram tempos semelhantes de sobrevivência. Aproximadamente 50% dos animais de cada grupo morreram no dia 5 após a inoculação viral e a outra parte restante (cerca de 50%) pereceu no dia seguinte (dia 6). Desta forma, não houve diferença na vacina utilizada para a sobrevivência dos camundongos imunizados nos grupos (G1, G2, G3 e G4). Os animais do grupo controle (não infectados) foram eutanasiados no dia seguinte (dia 8), finalizando o ensaio de desafio letal utilizando a LD50 (concentração 10^1 PFU) do CHIKV selvagem (Figura 42).

Figura 42 - Percentual de sobrevivência de camundongos previamente imunizados e desafiados com o vírus Chikungunya. Todos os animais previamente imunizados e posteriormente infectados com o vírus Chikungunya não sobreviveram. Os grupos G1, G2, G3 e G4 encerraram o experimento no dia 6 após a inoculação viral. Os animais do controle (não infectados) se mantiveram estáveis no decorrer de todo experimento, sendo eutanasiados no dia 8.



Fonte: elaborado pela autora (2023).

7 DISCUSSÃO

As construções de DNA vacinais selvagens e fusionadas a região N- e C-terminal da Proteína de Associação à Membrana Lisossomal (LAMP – 1), para humanos (DBE2-CHIKV/BIG-LAMP/Hu e DBE2-CHIKV/C-LAMP/Hu) e camundongos (DBE2-CHIKV/WT/Mi e DBE2-CHIKV/C-LAMP/Mi), não apresentaram mutações após a passagem por *E. coli*. (sequências confirmadas por sequenciamento de DNA). A região N-LAMP foi inserida com a finalidade de permitir o processamento da proteína DBE2-CHIKV, através da sua translocação para o retículo endoplasmático. Já a região C-LAMP foi inserida com a finalidade de direcionar a resposta imunológica para compartimentos precursores do lisossomo, envolvidos na ativação da resposta imunológica via MHC classe II. A estratégia vacinal utilizada nesse estudo já foi implementada em trabalhos anteriores de colaboradores, o que facilitou a obtenção e caracterização dos vetores e proteínas expressas (DHALIA et al., 2009; MACIEL et al., 2015; PALMA et al., 2017).

Após a padronização dos ensaios de transfecção com os vetores vacinais, as proteínas codificadas foram expressas com êxito e os seus pesos moleculares esperados (preditos pelas análises *in silico*), foram confirmados. Alguns estudos de expressão de proteínas do CHIKV auxiliaram na padronização e análises dos resultados obtidos, principalmente em relação aos tamanhos esperados das proteínas virais selvagens (AKAHATA; NABEL, 2012; PAREDES et al., 1998; WAGNER et al., 2014; ZHANG et al., 2011). A localização subcelular das proteínas codificadas pelos vetores vacinais, e proteínas expressas pelo vírus selvagem em cultura de células, foram também avaliadas. Após padronização do protocolo, em relação aos anticorpos primários (monoclonal anti-hLAMP e policlonal anti-CHIKV) e secundários (Alexa Fluor 488) utilizados, foi confirmada a detecção da proteína codificada pelo vetor vacinal DBE2-CHIKV/C-LAMP/Mi e DBE2-CHIKV/WT/Mi, distribuídas no citoplasma celular, com uma sobreposição maior das proteínas DBE2 fusionadas à LAMP aos compartimentos precursores lisossomais, semelhante aos achados da literatura (DHALIA et al., 2009; MACIEL et al., 2015; PALMA et al., 2017). Também foi confirmada a detecção reticular citoplasmática, esperada, das proteínas virais nativas expressas em culturas celulares infectadas por CHIKV.

Os ensaios com animais de experimentação foram realizados em momentos distintos, na FMRP-USP e na FIOCRUZ-PE, para verificação de reprodutibilidade e consistência dos resultados obtidos. Os títulos de anticorpos induzidos no grupo imunizado com o CHIKV selvagem inativado (G4) foram significativamente superiores, seguido dos animais imunizados com a vacina de DNA com DBE2 fusionado à LAMP (G1). Esta diferença pode ser diretamente relacionada aos Testes de Neutralização por Redução de Placas – PRNT, onde foi observado um percentual de neutralização de 92% do soro do grupo G4, logo após a primeira dose, contrastando com o percentual de redução abaixo de 40% do soro do grupo G1. Entretanto, essa diferença na eficiência de neutralização viral, entre o CHIKV selvagem inativado e DBE2 fusionado à LAMP, é significativamente reduzida após as doses subsequentes.

A capacidade de neutralização viral do soro do grupo G1 aumenta para 53%, após a segunda dose, e para 82% após a terceira e última dose. Provavelmente a maior eficiência de neutralização do G4, observada nos ensaios de PRNT, está relacionada a maior quantidade de antígenos indutores de anticorpos neutralizantes presentes no extrato viral inativado, quando comparado a apenas 2 epítomos neutralizantes presentes no antígeno DBE2 do grupo G1. Entretanto essa diferença na natureza dos antígenos é significativamente reduzida, após a terceira dose, onde a formulação vacinal baseada no DBE2 fusionado à LAMP apresenta uma eficiência de neutralização viral acima de 80%, compatível com formulações vacinais de eficiência satisfatória (FUCHES, 2010; MACIEL et al., 2015; QUINTILIO, 2005). A grande vantagem de se usar uma formulação vacinal baseada em uma sub-unidade proteica, em detrimento a organismos patogênicos inteiros, é que além de gerar uma resposta imunológica mais específica, a produção de vacinas baseadas em epítomos pode ser considerada mais segura em termos de biossegurança (CAI et al., 2021; KOSE et al., 2019; TAHIR UL QAMAR et al., 2018).

Após a caracterização da infecção dos camundongos nocautes com CHIKV em termos de perda de peso, presença de edema na pata do animal e sobrevida, foram definidos os parâmetros de LD50 utilizados nos ensaios de desafio letal. Todos os camundongos desafiados, seja imunizado com CHIKV inativado ou com as formulações baseadas em DBE2, foram à óbito. Este resultado, aparentemente contraditório com os resultados de PRNT (neutralização superior à 80%), provavelmente está relacionado à carga viral ou modelo animal utilizado. Enquanto

nos ensaios de neutralização foi utilizado uma carga viral de 10^{-4} PFU (AZAMI; MOI; TAKASAKI, 2016; CHUA et al., 2016), a carga viral utilizada no desafio letal foi de 10^1 PFU (HIROKI et al., 2020).

Os animais utilizados neste trabalho mostraram-se essenciais para avaliação do produto vacinal (*in vitro*) e da doença (*in vivo*), porém não foram considerados modelo ideal para a avaliar a eficiência de um novo produto vacinal. Afinal, até mesmo os animais do grupo imunizado com o vírus inativado (G4), que apresentaram elevados títulos de IgG e mais de 90% de eficiência de neutralização viral nos ensaios de PRNT, não sobreviveram nos ensaios de desafio letal. Entretanto muitos estudos contestam a utilização de animais nocautes, modificados geneticamente para validação vacinal, principalmente quando o método do nocaute é direcionado para alguns receptores importantes do sistema imunológico, como os receptores de interferons (LINS et al., 2022; TANABE et al., 2018).

A estratégia de fusionar antígenos ao LAMP-1, em vetores vacinais candidatos, possibilita o direcionamento dos antígenos codificados para o processamento pela via de apresentação/degradação antigênica do MHC II. Vários estudos demonstram que essa junção (antígeno/LAMP-1) é capaz de gerar uma maior proliferação de linfócitos antígeno específicos, títulos de anticorpos mais robustos e acentuada atividade T citotóxica em comparação aos selvagens (não fusionados ao LAMP-1) em estudos com camundongos, macacos e estudos clínicos em humanos. Proteínas quiméricas produzidas como candidatos vacinais contra arboviroses (vírus da Dengue - sorotipo 2 e da Febre amarela) evidenciaram elevados títulos de anticorpos neutralizantes, podendo induzir até 100% de neutralização quando confrontados com os resultados de animais imunizados com as construções selvagens.

Apesar dos resultados obtidos com os produtos vacinais aqui propostos corroboram com achados de outros estudos de vacinas de DNA candidatas contra outros arbovírus, referente a detecção significativa de anticorpos e um baixo percentual de sobrevivência (ANWAR et al., 2005; GRUBOR-BAUK et al., 2019; LIN et al., 1996; LU et al., 2003; MACIEL et al., 2015; PINTO et al., 2022; RAVIPRAKASH et al., 2001; WU et al., 1995), acreditamos que serão necessários novos ensaios e outros modelos de experimentação para a validação dos estudos pré-clínicos. Desta forma, os candidatos vacinais aqui propostos poderão futuramente fazer parte de

estudos clínicos em humanos, para somarmos esforços aos estudos de desenvolvimento e validação de vacinas contra a Chikungunya.

8 CONCLUSÕES

- As construções codificantes das vacinas de DNA baseadas em DBE2 selvagem e DBE2 fusionada à LAMP, para expressão em camundongos e humanos, foram obtidas com êxito;
- As proteínas recombinantes DBE2 selvagem e DBE2/LAMP foram satisfatoriamente expressas, em linhagens de células humanas;
- DBE2 selvagem apresentou o padrão reticular de expressão citoplasmática esperado, enquanto DBE2/LAMP também apresentou o padrão esperado reticular de expressão citoplasmática, sendo que com maior sobreposição aos compartimentos precursores lisossomais;
- A vacina de DNA codificante de DBE2/LAMP foi capaz de induzir um título de 82% de capacidade de neutralização viral, após a terceira dose, sendo comparável ao título de 92% induzido pelo vírus Chikungunya inativado;
- Apesar dos altos títulos de anticorpos neutralizantes obtidos, nenhuma das formulações vacinais obtidas foi capaz de proteger os camundongos imunizados frente aos ensaios de desafio letal;
- Faz-se necessário a realização de novos testes de experimentação animal, incluindo ajustes de dose de carga viral (nos ensaios de desafio letal) e utilização de outros modelos animais, para a validação pré-clínica das vacinais de DNA aqui propostas.

REFERÊNCIAS

- ABDELNABI, R.; NEYTS, J.; DELANG, L. Towards antivirals against chikungunya virus. **Antiviral Research**, v. 121, n. June, p. 59–68, 2015.
- AGGARWAL, M. et al. Kinetic characterization of trans-proteolytic activity of Chikungunya virus capsid protease and development of a FRET-based HTS assay. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 1–12, 2015.
- AKAHATA, W.; NABEL, G. J. A Specific Domain of the Chikungunya Virus E2 Protein Regulates Particle Formation in Human Cells: Implications for Alphavirus Vaccine Design. **Journal of Virology**, v. 86, n. 16, p. 8879–8883, 2012.
- ALBUQUERQUE, I. G. C. DE et al. Chikungunya virus infection: report of the first case diagnosed in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 1, p. 128–129, 2012.
- ALFONSO J. RODRÍGUEZ-MORALES, JAIME A. CARDONA-OSPINA, SIVIA FERNANDA URBANO-GARZÓN, J. S. H.-Z. Prevalence of post-Chikungunya Chronic Inflammatory Rheumatism: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Arthritis Care & Research**, v. 68, p. 1849–1858, 2016.
- AN, W. et al. Recent progress on chikungunya virus research. **Virologica Sinica**, v. 32, n. 6, p. 441–453, 2017.
- ANWAR, A. et al. West Nile premembrane-envelope genetic vaccine encoded as a chimera containing the transmembrane and cytoplasmic domains of a lysosome-associated membrane protein: increased cellular concentration of the transgene product, targeting to the MHC II compartm. **Virology**, v. 332, n. 1, p. 66–77, 2005.
- ARANKALLE, V. A. et al. Genetic divergence of Chikungunya viruses in India (1963–2006) with special reference to the 2005–2006 explosive epidemic. **Journal of General Virology**, v. 88, n. 7, p. 1967–1976, 2007.
- AZAMI, N. A. M.; MOI, M. L.; TAKASAKI, T. Neutralization assay for chikungunya virus infection: Plaque reduction neutralization test. **Methods in Molecular Biology**, v. 1426, p. 273–282, 2016.
- BANDEIRA, A. C. et al. Neonatal encephalitis due to Chikungunya vertical

transmission: First report in Brazil. **IDCases**, v. 5, p. 57–59, 2016.

BRASIL, M. DA S. Epidemiológico. **Boletim Epidemiológico**, v. 45, p. 1–7, 2014.

BRASIL, M. DA S. Epidemiológico. **Boletim Epidemiológico**, v. 46, p. 1–9, 2015.

BRASIL, M. DA S. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 49, 2016. **Boletim Epidemiológico**, v. 47, n. 38; ISSN 2358-9450, p. 1–10, 2016.

BRASIL, M. DA S. Boletim Epidemiológico. **Boletim Epidemiológico Arboviroses**, v. 49, n. Tabela 1, p. 1–14, 2018.

BRASIL, M. DA S. Boletim Epidemiológico 13: Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, chikungunya e Zika) até a Semana Epidemiológica 12 de 2019. **Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Brasil.**, v. 50, n. 10, p. 1–13, 2019a.

BRASIL, M. DA S. Vigilância em saúde no Brasil 2003 - 2019: criação da Secretaria de Vigilância em Saúde aos dias atuais. **Secretaria de Vigilância**, n. 50 (n.esp), 2019b.

BRASIL, M. DA S. Monitoramento dos casos de arboviroses Epidemiológicas 01 a 52, 2019. **Boletim Epidemiológico Arboviroses**, v. 51, n. 24, p. 1–13, 2020a.

BRASIL, M. DA S. Monitoramento dos casos de arboviroses (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 46, 2020. **Boletim Epidemiológico**, v. 51 Nº 4, n. 24, p. 11–19, 2020b.

BRASIL, M. DA S. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos por Aedes (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 53, 2020. **Boletim Epidemiológico**, v. 52, n. 03, p. 1–31, 2021a.

BRASIL, M. DA S. Monitoramento dos casos de arboviroses pelo mosquito Aedes (dengue, chikungunya urbanas causados por vírus transmitidos e zika), semanas epidemiológicas 1 a 21, 2021. **Boletim Epidemiológico**, v. 52, n. 03, p. 1–31, 2021b.

BRASIL, M. DA S. Boletim Epidemiológico Vol. 52 - Nº 33. **Mortalidade por suicídio**

e notificações de lesões autoprovocadas no Brasil, v. 52, p. 1–17, 2021c.

BRASIL, M. DA S. Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 52 de 2022. **Ministério da Saúde - Boletim Epidemiológico**, v. 54, p. 1–14, 2023.

BROWN, R. S.; WAN, J. J.; KIELIAN, M. The alphavirus exit pathway: What we know and what we wish we knew. **Viruses**, v. 10, n. 2, 2018.

BURT, F. J. et al. Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 4, p. e107–e117, 2017.

BUTANTAN, I. **VACINA DO BUTANTAN CONTRA A CHIKUNGUNYA**. Disponível em: <<https://chikungunya.butantan.gov.br/>>.

CAI, X. et al. Infectious disease mRNA vaccines and a review on epitope prediction for vaccine design. **Briefings in Functional Genomics**, v. 20, n. 5, p. 289–303, 2021.

CAREY, D. E. Chikungunya and dengue: a case of mistaken identity? **Journal of the history of medicine and allied sciences**, v. 26, n. 3, p. 243–262, 1971.

CDC. Center for Disease Control and Prevention|Geographic Distribution | Chikungunya virus. 2019.

CHUA, C. L. et al. Antigenic Variation of East/Central/South African and Asian Chikungunya Virus Genotypes in Neutralization by Immune Sera. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 8, p. 1–22, 2016.

CHUNG, E. H. Vaccine allergies. **Clinical and Experimental Vaccine Research**, v. 3, n. 1, p. 50, 2014.

COFFEY, L. L.; FAILLOUX, A.-B.; WEAVER, S. C. Chikungunya virus–vector interactions. **Viruses**, v. 6, n. 11, p. 4628–4663, 2014.

DE BRITO, C. A. A. Alert: Severe cases and deaths associated with Chikungunya in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 585–589, 2017.

DE CURTIS, I.; SIMONS, K. Dissection of Semliki Forest virus glycoprotein delivery from the trans-Golgi network to the cell surface in permeabilized BHK cells.

Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 85, n. 21, p. 8052–8056, 1988.

DEGALLIER, N. et al. Avaliação do risco de transmissão silvestre da dengue no Brasil. **Informe Epidemiológico do SUS**, v. 10, p. 13–15, 2001.

DHALIA, R. et al. Membrane and envelope virus proteins co-expressed as lysosome associated membrane protein (LAMP) fused antigens: A potential tool to develop DNA vaccines against flaviviruses. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, n. 4, p. 663–669, 2009.

DIALLO, D. et al. Landscape ecology of sylvatic chikungunya virus and mosquito vectors in southeastern Senegal. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 6, p. e1649, 2012.

DIALLO, D. et al. Bloodfeeding patterns of sylvatic arbovirus vectors in southeastern Senegal. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 107, n. 3, p. 200–203, 2013.

DIALLO, M. et al. Vectors of Chikungunya virus in Senegal: current data and transmission cycles. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 60, n. 2, p. 281–286, 1999.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A. P. B. VON. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Revista de saude publica**, v. 51, p. 30, 2017.

DONG, Y. et al. A systematic review of SARS-CoV-2 vaccine candidates. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, 2020.

ELDRED, B. E. et al. Vaccine components and constituents: responding to consumer concerns. **CLINICAL UPDATE**, v. 184, n. 4, 2006.

FENNER, F. et al. Early efforts at control: variolation, vaccination, and isolation and quarantine. **History of International Public Health**, v. 6, p. 245–276, 1988.

FERNANDES, J. et al. **Vacinas**. 23. ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2021.

FIOCRUZ, B.-M. **Vacinas: as origens, a importância e os novos debates sobre**

seu uso. Disponível em: <<https://www.bio.fiocruz.br/index.php/br/noticias/1263-vacinas-as-origens-a-importancia-e-os-novos-debates-sobre-seuuso?showall=1&limitstart=>>>.

FOX, J. M. et al. Broadly neutralizing alphavirus antibodies bind an epitope on E2 and inhibit entry and egress Julie. **Cell**, v. 163, n. 5, p. 1095–1107, 2015.

FREIRE, M. C. L. C. **Chikv proteins**. Recife: [s.n.].

FUCHES, R. M. M. **Validação de bioensaios para o estudo da imunogenicidade da vacina contra raiva**. [s.l.] Instituto Butantan, 2010.

GÉRARDIN, P. et al. Neurocognitive outcome of children exposed to perinatal mother-to-child Chikungunya virus infection: the CHIMERE cohort study on Reunion Island. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 7, p. e2996, 2014.

GOODMAN, C. H. et al. Development of an algorithm for production of inactivated arbovirus antigens in cell culture. **Journal of Virological Methods**, v. 208, p. 66–78, 2014.

GRUBOR-BAUK, B. et al. NS1 DNA vaccination protects against Zika infection through T cell–mediated immunity in immunocompetent mice. **Science Advances**, v. 5, n. 12, 2019.

HAMMON, W. M.; RUNDNICK, A.; SATHER, G. E. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand. **Science**, v. 131, n. 3407, p. 1102–1103, 1960.

HARRISON, V. R. et al. Production and evaluation of a formalin-killed Chikungunya vaccine. **The Journal of Immunology**, v. 107, n. 3, p. 643–647, 1971.

HIROKI, C. H. et al. Neutrophil Extracellular Traps Effectively Control Acute Chikungunya Virus Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. January, p. 1–11, 2020.

IBMP, I. D. B. M. D. P. **Instruções de uso - KIT BIOMOL ZDC**. 2019

KHAN, B. A. et al. Sub-genomic analysis of chikungunya virus e2 mutations in pakistani isolates potentially modulating b-cell & t-cell immune response. **Pakistan Journal of Medical Sciences**, v. 37, n. 1, p. 1–6, 2020.

KOSE, N. et al. A lipid-encapsulated mRNA encoding a potentially neutralizing human monoclonal antibody protects against chikungunya infection. **Science Immunology**, v. 4, n. 35, 2019.

KRINGELUM, J. V. et al. Reliable B cell epitope predictions: impacts of method development and improved benchmarking. **PLoS computational biology**, v. 8, n. 12, p. e1002829, 2012.

LEMANT, J. et al. Serious acute chikungunya virus infection requiring intensive care during the Reunion Island outbreak in 2005–2006. **Critical care medicine**, v. 36, n. 9, p. 2536–2541, 2008.

LIN, K.-Y. et al. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. **Cancer research**, v. 56, n. 1, p. 21–26, 1996.

LINS, C. R. B. et al. Murine animal models for in vivo studies of Zika and Chikungunya viruses. **Biological Models Research and Technology**, v. 2, p. e00022022, 2022.

LU, Y. et al. Dengue 2 PreM-E/LAMP chimera targeted to the MHC class II compartment elicits long-lasting neutralizing antibodies. **Vaccine**, v. 21, n. 17–18, p. 2178–2189, 2003.

LUMSDEN, W. H. R. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952–1953 II. General description and epidemiology. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 1, p. 33–57, 1955.

LURIE, N. et al. Developing Covid-19 Vaccines at Pandemic Speed. **New England Journal of Medicine**, v. 31, n. 1, p. 1969–73, 2020.

MACHADO, L. C. et al. Genome sequencing reveals coinfection by multiple chikungunya virus genotypes in a recent outbreak in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 5, p. 1–15, 2019.

MACIEL, M. et al. A DNA Vaccine against Yellow Fever Virus: Development and Evaluation. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 4, p. 1–19, 2015.

MIGUEL-HERNÁNDEZ, Á. S.; MIGUEL-RODRÍGUEZ, A. S. Fiebre chikungunya.

Gaceta Medica de Bilbao, v. 112, n. 2, p. 122–126, 2015.

MINER, J. J. et al. Brief report: chikungunya viral arthritis in the United States: a mimic of seronegative rheumatoid arthritis. **Arthritis & rheumatology**, v. 67, n. 5, p. 1214–1220, 2015.

MODIS, Y. Class II fusion proteins. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 790, p. 150–166, 2013.

NUNES, M. R. T. et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC medicine**, v. 13, n. 1, p. 1–11, 2015.

PALMA, M. L. et al. Development of potent class II transactivator gene delivery systems capable of inducing de novo MHC II expression in human cells, in vitro and ex vivo. **Gene Therapy**, v. 24, n. 6, p. 342–352, 2017.

PAREDES, A. M. et al. Structural Localization of the E3 Glycoprotein in Attenuated Sindbis Virus Mutants. **Journal of Virology**, v. 72, n. 2, p. 1534–1541, 1998.

PASTEUR, L. De l'attenuation du virus du cholera des poules. **CR Acad Sci Paris**, v. 91, n. 7, 1880.

PATERSON, H. E.; MCINTOSH, B. M. Further Studies on the Chikungunya Outbreak in Southern Rhodesia in 1962: II.—Transmission Experiments with the Aedes Furcifer-Taylori Group of Mosquitoes and with a Member of the Anopheles Gambiae Complex. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 58, n. 1, p. 52–55, 1964.

PENNINGTON, M. **The Hunt for a Safe, Effective Vaccine**. Disponível em: <<https://www.criver.com/eureka/the-hunt-for-a-safe-effective-vaccine>>.

PERNANBUCO, S. E. DE S. **Arboviroses: crescem os casos de chikungunya**. Disponível em: <<http://portal.saude.pe.gov.br/noticias/secretaria-executiva-de-vigilancia-em-saude/arboviroses-crescem-os-casos-de-chikungunya>>.

PINTO, P. B. A. et al. Combination of E-and NS1-Derived DNA Vaccines: The Immune Response and Protection Elicited in Mice against DENV2. **Viruses**, v. 14, n. 7, 2022.

PLOTKIN, S. A. Vaccines: Past, present and future. **Nature Medicine**, v. 11, n. 4S, p. S5, 2005.

- PLOTKIN, S. L.; PLOTKIN, S. A. A short history of vaccination. **Vaccines**, v. 5, p. 1–16, 2004.
- POLLARD, A. J.; BIJKER, E. M. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. **Nature Reviews Immunology**, v. 21, n. 2, p. 83–100, 2021.
- PONOMARENKO, J. et al. ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. **BMC bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2008.
- POWERS, A. M. et al. Re-emergence of chikungunya and o'nyong-nyong viruses: Evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. **Journal of General Virology**, v. 81, n. 2, p. 471–479, 1 fev. 2000.
- POWERS, A. M. et al. Evolutionary relationships and systematics of the alphaviruses. **Journal of virology**, v. 75, n. 21, p. 10118–10131, 2001.
- POWERS, A. M. Vaccine and therapeutic options to control chikungunya virus. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 1, p. 1–29, 2018.
- POWERS, A. M.; LOGUE, C. H. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. **Journal of General Virology**, v. 88, n. 9, p. 2363–2377, 2007.
- QUINTILIO, W. **Apresentação de antígenos e liberação controlada como ferramentas para melhoramento de vacinas de segunda geração.** [s.l.] UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE QUÍMICA Apresentação, 2005.
- RAJAPAKSE, S.; RODRIGO, C.; RAJAPAKSE, A. Atypical manifestations of chikungunya infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, n. 2, p. 89–96, 2010.
- RAPPUOLI, R.; HANON, E. Sustainable vaccine development: a vaccine manufacturer's perspective. **Elsevier**, v. 53, n. January, p. 111–118, 2018.
- RAVIPRAKASH, K. et al. Synergistic neutralizing antibody response to a dengue virus type 2 DNA vaccine by incorporation of lysosome-associated membrane protein sequences and use of plasmid expressing GM-CSF. **Virology**, v. 290, n. 1, p. 74–82, 2001.
- REZZA, G. et al. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate

region. **The Lancet**, v. 370, n. 9602, p. 1840–1846, 2007.

ROSS, R. W. The Newala epidemic: III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. **Epidemiology & Infection**, v. 54, n. 2, p. 177–191, 1956.

ROSSMANN, M. G. et al. Nucleocapsid and Glycoprotein Organization in an Enveloped Virus. **Selected Papers of Michael G Rossmann with Commentaries**, v. 80, p. 265–274, 2014.

RUBINSTEIN, N. D. et al. Epitopia: a web-server for predicting B-cell epitopes. **BMC bioinformatics**, v. 10, n. 1, p. 1–6, 2009.

SASWAT, T. et al. High rates of co-infection of Dengue and Chikungunya virus in Odisha and Maharashtra, India during 2013. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 35, p. 134–141, 2015.

SCHILTE, C. et al. Chikungunya Virus-associated Long-term Arthralgia: A 36-month Prospective Longitudinal Study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 3, 2013.

SCHUFFENECKER, I. et al. Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. **PLoS medicine**, v. 3, n. 7, p. e263, 2006.

SERGON, K. et al. Seroprevalence of chikungunya virus (CHIKV) infection on Lamu Island, Kenya, October 2004. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 78, n. 2, p. 333–337, 2008.

SHEN, A. K.; CLAY, R.; PABLOS-MENDEZ, A. Global immunization through the lens of development. **Public Health Reports**, v. 129, p. 4–6, 2014.

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, 2012.

SNYDER, J. E. et al. Functional characterization of the alphavirus TF protein. **Journal of virology**, v. 87, n. 15, p. 8511–8523, 2013.

SOLIGNAT, M. et al. Replication cycle of chikungunya: a re-emerging arbovirus. **Virology**, v. 393, n. 2, p. 183–197, 2009.

STERN, P. L. Key steps in vaccine development. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 125, n. 1, p. 17–27, 2020.

STRAUSS, J. H.; STRAUSS, E. G. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. **Microbiological reviews**, v. 58, n. 3, p. 491–562, 1994.

TAHIR UL QAMAR, M. et al. Peptide vaccine against chikungunya virus: Immunoinformatics combined with molecular docking approach. **Journal of Translational Medicine**, v. 16, n. 1, p. 1–14, 2018.

TANABE, I. S. B. et al. Cellular and Molecular Immune Response to Chikungunya Virus Infection. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 8, n. October, p. 345, 2018.

THIBOUTOT, M. M. et al. Chikungunya: A potentially emerging epidemic? **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 4, 2010.

VETTER, V. et al. Understanding modern-day vaccines: what you need to know. **Annals of Medicine**, v. 50, n. 2, p. 110–120, 2018.

VOLK, S. M. et al. Genome-scale phylogenetic analyses of chikungunya virus reveal independent emergences of recent epidemics and various evolutionary rates. **Journal of virology**, v. 84, n. 13, p. 6497–6504, 2010.

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.

WAGNER, J. M. et al. Enhanced production of Chikungunya virus-like particles using a high-pH adapted *Spodoptera frugiperda* insect cell line. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. 1–14, 2014.

WAHID, B. et al. Global expansion of chikungunya virus: mapping the 64-year history. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 58, p. 69–76, 2017.

WEAVER, S. C. Arrival of chikungunya virus in the new world: prospects for spread and impact on public health. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 6, p. e2921, 2014.

WEAVER, S. C.; FORRESTER, N. L. Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread. **Antiviral Research**, v. 120, p. 32–39, 2015a.

- WEAVER, S. C.; FORRESTER, N. L. Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread. **Antiviral research**, v. 120, p. 32–39, 2015b.
- WEBER, C. et al. Identification of Functional Determinants in the Chikungunya Virus E2 Protein. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 1, p. 1–19, 2017.
- 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, 2015.
- WEINBREN, M. P.; HADDOW, A. J.; WILLIAMS, M. C. The occurrence of chikungunya virus in Uganda I. Isolation from mosquitoes. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 52, n. 3, p. 253–262, 1958.
- WHITE, S. K. et al. A new "American" subgroup of African-lineage Chikungunya virus detected in and isolated from mosquitoes collected in Haiti, 2016. **PloS one**, v. 13, n. 5, p. e0196857, 2018.
- WHO. The Global Vaccine Action Plan and the Decade of Vaccines Review and Lessons Learned. **World Health Organization**, v. 01, n. 01, p. 1689–1699, 2013.
- WHO. World Health Organization | Chikungunya and Dengue in the south west Indian Ocean. **WHO**, 2015.
- WHO. **Child mortality and causes of death**. Disponível em: <<https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/topic-details/GHO/child-mortality-and-causes-of-death>>.
- WU, T.-C. et al. Engineering an intracellular pathway for major histocompatibility complex class II presentation of antigens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 25, p. 11671–11675, 1995.
- ZHANG, R. et al. 4.4 Å cryo-EM structure of an enveloped alphavirus Venezuelan equine encephalitis virus. **EMBO Journal**, v. 30, n. 18, p. 3854–3863, 2011.
- ZHANG, R. et al. Mxra8 is a receptor for multiple arthritogenic alphaviruses. **HHS Public Access**, v. 557, n. 7706, p. 570–574, 2018.
- ZHANG, X. et al. Furin processing and proteolytic activation of Semliki Forest virus. **Journal of Virology**, v. 77, n. 5, p. 2981–2989, 2003.

ZHANG, X.; KIELIAN, M. Mutations that promote furin-independent growth of Semliki Forest virus affect p62–E1 interactions and membrane fusion. **Virology**, v. 327, n. 2, p. 287–296, 2004.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



A U T O R I Z A Ç Ã O

A CEUA-FMRP autoriza a execução do projeto intitulado: “*Desenvolvimento e avaliação de uma vacina de DNA contra o vírus Chikungunya*”, registrado com o número de protocolo **166/2019**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O Protocolo foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em reunião de 25 de novembro de 2019.

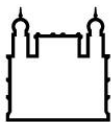
Colaboradores: Irassandra Rooze Pereira Uchôa Cavalcanti de Aquino
Rafael Freitas de Oliveira Franca
Conceição Elidianne Anibal Silva

Lembramos da obrigatoriedade de apresentação do Relatório Final, em modelo da CEUA, para emissão do Certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

Finalidade		() Ensino (X) Pesquisa Científica		
Vigência da autorização		25/11/2019 a 20/10/2023		
Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso/Idade	Sexo	Origem
Camundongo / C57Bl 6	36	20g / 42 dias	Macho	Serviço de Biotério
Camundongo / IFN? KO	65	20g / 42 dias	Fêmea	Centro de Criação de Camundongos Especiais

Ribeirão Preto, 25 de novembro de 2019

Prof. Dra. Katiuchia Uzzun Sales
Coordenadora da CEUA-FMRP-USP



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Aggeu Magalhães

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificado de Aprovação

Certificamos que o projeto intitulado “**Avaliação de uma vacina de DNA contra o vírus Chikungunya em modelo animal**” protocolado sob nº **174/2021** pelo pesquisador **Rafael Dhalia**, está de acordo com a Lei 11.794/2008 do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, e todos os protocolos experimentais foram aprovados pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) do Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/IAM). Na presente versão, este projeto está licenciado e tem **validade até 01 de dezembro de 2024** com a finalidade de **pesquisa científica**. É responsabilidade do coordenador do projeto notificar à CEUA sobre acidentes ou intercorrências com os animais, bem como a necessidade de quaisquer alterações em relação ao projeto. O coordenador concorda que nenhuma dessas mudanças serão implementadas antes de serem aprovadas pela CEUA/IAM.

Quantitativo de Animais Aprovados								
Animal	Espécie e linhagem	Quant. (total)	Sexo			Idade	Peso	Origem
			♂	♀	Ambos			
Camundongo Knockout	IFNAR BI/6	150	150			6-8 semanas	20 g	IAM
Total		150						

Recife, 18 de fevereiro de 2022

Virgínia Maria Barros de Lorena
Coordenadora CEUA/IAM
Mat. Siape 1984445

REVIEW ARTICLE

Murine animal models for *in vivo* studies of Zika and Chikungunya viruses

Carlos Ralph Batista Lins^{1,2*}, Clintiano da Silva Curvêlo³, Daniele Barbosa de Almeida Medeiros⁴, Irassandra Rooze Pereira Uchôa Cavalcanti de Aquino^{3,5}, Rafael Dhalia⁵, Sérgio Crovella⁶

¹Postgraduate Program in Biology Applied to Health, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

²Keizo Asami Immunopathology Laboratory – LIKA, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

³Laboratory of Virology and Experimental Therapy – LAVITE, Aggeu Magalhães Research Institute, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE, Brasil.

⁴Laboratory of Arbovirology and Hemorrhagic Fever, Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, PA, Brasil.

⁵Postgraduate Program in Biosciences and Biotechnology in Health, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE, Brasil.

⁶Department of Biological and Environmental Sciences, Qatar University, Doha, State of Qatar.

How to cite: Lins CRB, Curvêlo CS, Medeiros DBA, Aquino IRPUC, Dhalia R, Crovella S. Murine animal models for *in vivo* studies of Zika and Chikungunya viruses. *Bio M Res Tech.* 2022;2:e00022022. <https://doi.org/10.4322/2675-9225.00022022>

Abstract

Arboviruses are worldwide distributed arthropod-borne viruses representing a constant threat to public health. Among these arboviruses, the Chikungunya (CHIKV) and Zika (ZIKV) viruses have a high prevalence in Brazil being responsible for recent outbreaks resulting mainly in irreparable socioeconomic damages such as the high rate of cases of comorbidities and microcephaly in newborns, respectively. Therefore, it is necessary to understand the biology of these arboviruses and develop effective treatments against them; moreover, appropriate mice animal models are strongly encouraged. Here we reviewed the scientific literature aiming to improve the search for the best murine animal model, specific for the arboviruses, specifically, CHIKV and ZIKV. In this way, we performed a comparison between the various mice models currently available, among them: genetically modified immunosuppressed animals, as the A129 and AG129 which are knockout animals for the α/β and $\alpha/\beta/\gamma$ receptors, respectively, neonatal immunocompetent models C57BL/6 strains used between 6-8 days old for neuropathogenesis studies or 1 day old for vaccine safety studies and finally immunosuppressed induced by dexamethasone or interferon 1 blocker for pathogenesis studies. Mice models are the first option after *in vitro* analysis, as they are small animals, which facilitates handling and maintenance, in addition to being more inexpensive and abundantly available in different genetic strains, both wild and modified. If the results of this stage are promising, the studies move forward to the use of models with animals of greater complexity, such as rats, non-human primates and finally humans. For this review, we searched through articles in PubMed, Scopus and ScienceDirect databases using the criteria of date publications, titles, abstracts and complete manuscripts. The correct choice of these models during experimental planning is essential, since increases the confidence and the rational use of animals in experimentation in accordance to current bioethics guidelines.

Keywords: alphavirus, animal models, CHIKV, flavivirus, viral pathogenesis, ZIKV.

INTRODUCTION

Arboviruses are arthropod-borne viruses that have worldwide distribution and represent a constant threat to public health. Among the arboviruses, the Chikungunya virus (CHIKV), belongs to genus *Alphavirus*, family *Togaviridae*, is a positive-sense RNA virus transmitted by mosquitoes of the *Aedes* genus with a great impact on human health¹. This virus causes the Chikungunya fever, mainly characterized by fever, intense arthralgia, headache, swelling and/or rash. These symptoms,

*Corresponding author: carlos.lins@fiocruz.br

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Received: January 20, 2022. Accepted: April 06, 2022.



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

despite being similar to other arboviruses, stands out in CHIKV infection, as they usually cause partial or severe disability for years, which can lead to a significant reduction in the quality of life of those infected^{2,3} can also infect other species, such as non-human primates (NHP), and maintain a wild enzootic transmission cycle involving the *Aedes* mosquitoes that live in the forest. Mice animal models can be used to better understand the immunological and chronification mechanisms that influence CHIKV infection^{4,5}.

Another arbovirus of great relevance on human health is the Zika virus (ZIKV)⁶. ZIKV has been associated to neurological injury such as Guillain-Barré syndrome, neuropathy and myelitis, particularly in adults as well as pregnancy complications such as fetal loss, stillbirth, preterm birth and a distinct pattern of birth defects and disabilities, called congenital Zika syndrome (CZS)⁷. This virus belongs to the *Flavivirus* genus, family *Flaviviridae* and has a positive-sense single-stranded RNA genome⁸.

ZIKV is mainly transmitted to humans through the bite of some species of infected mosquitoes. However, the virus can also be transmitted by blood transfusion, transplacentally, perinatally and sexually⁷. To study the clinical manifestations of ZIKV infection in humans, several *in vitro* and *in vivo* models have been designed with the aim of discovering the mechanisms of ZIKV pathogenesis and transmission, also contributing to stimulate the development of vaccines and antivirals⁸.

When considering the desirable characteristics of the animal model to be chosen, for in example, for vaccine development studies, the model must present: robust and reproducible viremia, be immunocompetent and have pathological and clinical signs similar to those found in the human host. However, at present time, there is no model that meets all these criteria^{4,9-12}.

So, to understand the biology of arboviruses during infection and to develop an effective treatment against them, an appropriate animal model for these studies is needed. It is noteworthy that the use of these animals requires careful interpretation of results due to differences in the biology of mice and humans, in addition to differences in immune status when using wild and knockout mice¹³. Thus, this study aims to carry out a literature review in order to assist the scientific community in the search for the best animal model, specific for the purpose of each study, involving arboviruses, in particular, ZIKV and CHIKV.

MATERIALS AND METHODS

This work is a literature review based on the search, through the adoption of methodological criteria, of scientific articles available in the following databases: PubMed, Scopus and ScienceDirect. For this, the descriptors were selected as follows; "Descriptors in Health Science - DeHS", comprising the following terms: animal models, *in vivo*, ZIKV, CHIKV and viral pathogenesis crossed with each other through the Boolean operator "AND". A total of 775 articles were screened, according to the selection, of which 65 were selected according to the evaluation criteria (Figure 1).

As a first evaluation, articles published in English with dates between the years 2015-2021 were selected. However, a total of 26 studies outside this range were also cited for better support of some articles used. The works resulting from this selection were submitted to the second evaluation criterion: title readings, in which articles that did not involve murine animal models used in studies of the Chikungunya or Zika virus were excluded.

The selected articles were submitted to the third evaluative criterion, based on the reading of the abstracts. At this stage, the authors of the research based themselves more precisely on reading encyclopedias, book chapters, reviews and works carried out that associated the use of murine animal models in studies involving the arboviruses under study.

Finally, the articles that met the adopted inclusion criteria were submitted to the fourth evaluative criterion: full reading, and articles that were indexed in more than one database were excluded, and only one of them was selected (Figure 1).

LITERATURE REVIEW

Chikungunya virus

Chikungunya virus (CHIKV) is an alphavirus belonging to the *Togaviridae* family, firstly isolated from a human patient in Tanzania in 1952¹⁴. CHIKV is mainly transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes*

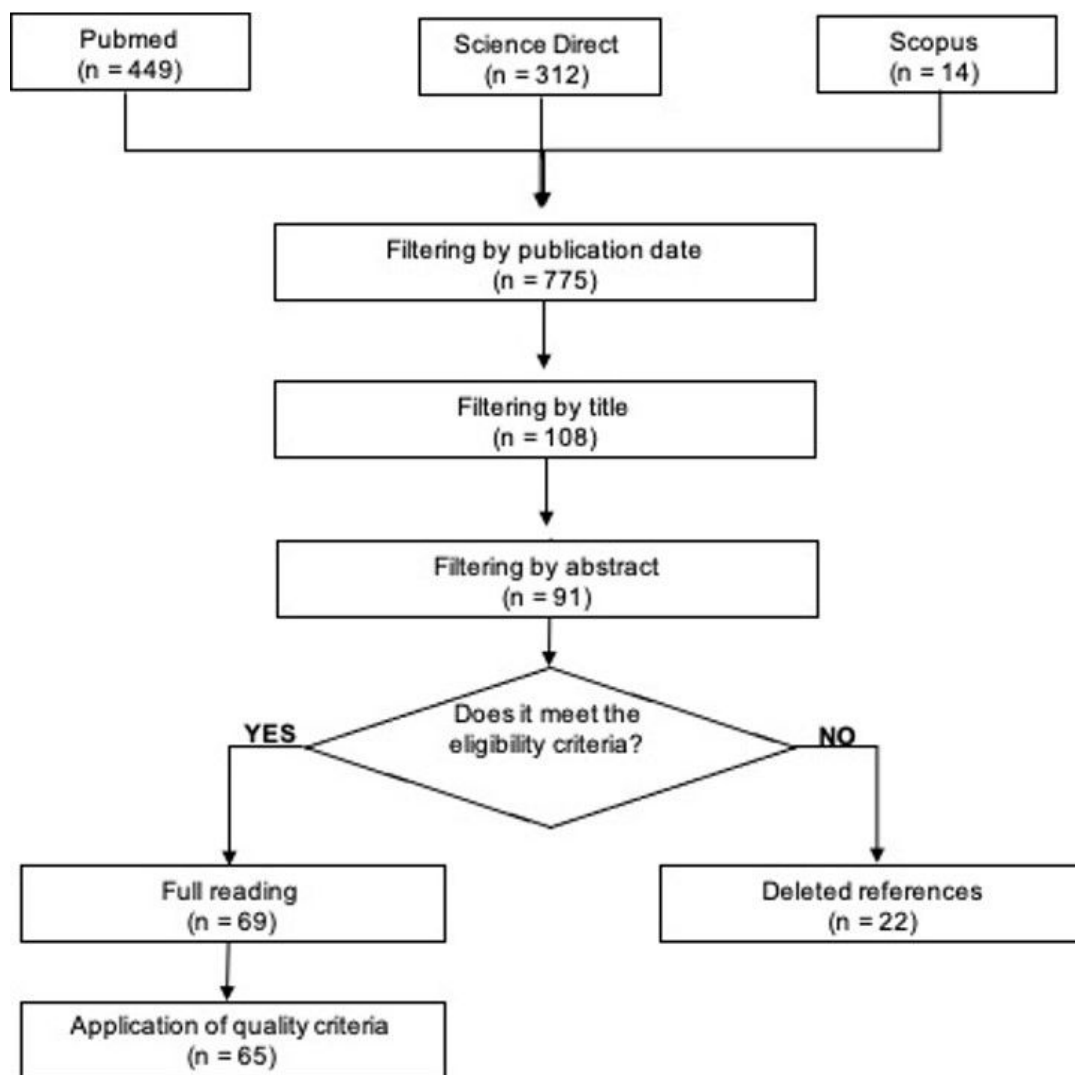


Figure 1. Total articles selected according to each criterion chosen for this study. Trials of the four determining criteria for the choice of articles using Pubmed, Science Direct and Scopus databases: publication date between 2015-2021 (n=775), title (n=108), abstract (n=91) and complete reading (n=69). At the end, 65 references were selected according to the application of the quality criteria and 22 were deleted. Additional older articles were intentionally cited, in order to better support the choice of selected articles.

*albopictus*¹⁵. Genetic analysis identified four distinct strains of CHIKV: the West African (WAF) strain, the East-Central-South African (ECSA) strain, the Asian and Indian Ocean strain (IOL)¹⁶.

In Brazil, Chikungunya fever was firstly detected in August 2010 and the number of cases of the disease has increased since then. According to data from the Ministry of Health (2016; 2020), in 2015, 38,499 thousand probable cases were distributed in 704 municipalities. Compared to 2016, of the 271,824 thousand probable cases in 2,829 Brazilian municipalities, 151,318 were confirmed. Of these, there were 196 deaths, with the highest number occurring in Pernambuco. In 2019, 132,205 probable cases were reported in the country. The Southeast and Northeast regions had the highest incidence rates, 104.6 cases/100 thousand inhabitants and 59.4 cases/100 thousand inhabitants, respectively. The states of Rio de Janeiro and Rio Grande do Norte concentrate 75.6% of probable cases^{17,18}.

One goal of vaccine and therapeutic efforts against viruses is the development of broadly neutralizing antibodies that inhibit most strains within a genetically diverse virus family¹⁹. Although there are currently no licensed vaccines or therapies available for CHIKV or any other Alphavirus,

studies have demonstrated the importance of protection mediated by neutralizing antibodies that bind to conserved epitopes of domain B, glycoprotein E2, and inhibit the entry or exit of the virus in the cell²⁰.

Zika virus

ZIKV was first isolated from a Rhesus monkey (*Macaca mulatta*), as sentinel, in the Zika forest of Uganda in 1947. Historically, human cases have rarely been reported, being misdiagnosed as dengue virus infections, however, as of 2007 in the Yap Islands in Micronesia²¹ and later in 2013 in French Polynesia the epidemiology of ZIKV has changed, with higher rates of symptomatic disease, including an association with Guillain-Barré syndrome in adults, and evidence of epidemic transmission²².

ZIKV emerged in the Western Hemisphere in 2015 and caused epidemics in Central and South America as well as in the Caribbean islands²³. During its spread throughout the Americas, ZIKV became a public health problem due to its ability to cross the placental barrier and infect neuroprogenitor cells in the fetal brain, leading to microcephaly, congenital abnormalities, premature birth and death²⁴.

In response to the ZIKV pandemic and congenital disease outbreak, animal models were developed to study the pathogenesis of ZIKV and evaluate countermeasures, including new vaccines and targeted therapies. Thus, researchers were allowed to confirm the teratogenic effects of ZIKV infection²⁵. So, animal models could provide a mean to evaluate new interventions, such as the pathogenicity of different strains and the effects of their mutations²⁶.

Murine models

Mice are the animals most used as models for viral infections in humans. Its low cost, short breeding time, large and easy-to-handle litters make it easy to use on a large scale. They reproduce important aspects of human diseases, including viral and bacterial infections²⁷. They also contributed to elucidating several aspects of ZIKV pathogenesis, including the link between ZIKV infection in pregnant women and birth defects²⁸.

Mice have also been a valuable model for the evaluation of vaccine and antiviral candidates⁸. In addition, they have the ability to be genetically manipulated (transgenes, CRISPR-Cas9 mutations, homologous recombination and conditional deletions) to examine how specific genes influence infection and in immunity, this makes them a preferred model for many *in vivo* studies²⁵.

However, there are still cases in which these animals do not reproduce specific aspects of human ZIKV and CHIKV infection, due to the lack of functional conservation between mouse and human genes⁴. Therefore, several mice animal models, both immunocompetent and immunodeficient, have been used to better elucidate the pathogenesis and other biological aspects involving these arboviruses (Tables 1 and 2).

Immunocompetent mouse models for the study of CHIKV

Initial evidence of neural tropism was demonstrated in newborn mice after CHIKV intracerebral inoculation, which leads to lethality, severe necrosis and leptomenigeal infiltration²⁹. In newborn mice, CHIKV spreads to the brain after initial virus replication and is usually cleared from this site by day 10 post infection (dpi)^{58,59}, suggesting that young age is a factor of high susceptibility to infection in this model of CHIKV infection⁶⁰.

In addition to their usefulness as models of pathogenesis, newborn mice are sensitive tools for testing the efficacy of polyclonal and monoclonal antibodies specific for CHIKV (mAbs). However, because of their immature immune system, they cannot be used to directly test vaccine efficacy, although they are useful for testing the safety of live attenuated vaccines⁶¹.

Subcutaneous inoculation by CHIKV in the plantar region of the paw of wild-type C57BL/6 mice resulted in a bilateral edematous response in the inoculated paw, with peaks occurring at approximately 3 and 7 dpi⁶². These animals cleared the infection with undetectable serum viral titers at all time intervals tested¹³.

Table 1. Animal models of immunocompetent mice used for studies of Zika and Chikungunya viruses

Mice strains	Clinical Signs	References
SWISS	Necrosis of the cerebrum, lethargy, loss of balance and difficulty walking, dragging of the hind limbs, hair loss around the inoculation site, microcephaly and other neurodevelopmental disorders.	29-34
C57BL/6J	Weight loss, swelling of the inoculated limb, severe malformations, severe CNS damage and high viremia, with or without immunosuppression.	35-40
BALB/c	High viral load and development of various inflammations in organic tissues with immunosuppression.	41
Humanized mouse (hSTAT2 KI)	Spread of virus to placenta, spleen and fetal brain.	42
129 Sv/Ev	No develop clinical symptoms or histological changes, despite the viral RNA being detectable in the blood, spleen and ovaries.	43

Table 2. Animal models of immunodeficient mice used for studies of Zika and Chikungunya viruses

Mice strains	Clinical Signs	References
A129 (IFN α and β receptors)	High levels of viremia in the spleen, signs of neurological disease, including tremors, weight loss and death.	43-45
AG129 (IFN α / β and γ 0 receptors)	Viremic spread observed in visceral organs and brain with associated serious pathologies only in the brain and muscles.	8,46-48
Irf3 ^{-/-} · Irf5 ^{-/-} · Irf7 ^{-/-} (Transcription factors - interferon pathway)	Signs of neurological disease, including hind limb weakness and paralysis.	49,50
IFNAR1 ^{-/-} (IFN α and β receptors)	High viral load in the central nervous system (CNS), transplacental transmission, neuroinvasion, consequences of neurological diseases and death.	13,51-56
Rag1 ^{-/-} (T and B cell responses)	Dramatic weight loss, infection in the brain and testes.	57

Immunocompetent mice for study of ZIKV

ZIKV infection in immunocompetent C57BL/6, BALB/c, CD-1 mice, pregnant or not, subcutaneously, intraperitoneally or intravenously, did not result in a clinical sign of the disease and there was little viral replication⁶³. One of the reasons for this phenotype is the ability of ZIKV to degrade STAT2, an IFN-regulated transcriptional activator in humans, but not in mice⁶⁴. However, on deeper analysis it was revealed that some viral replication occurs in these mice and that under certain circumstances, vertical transmission and associated fetal abnormalities may occur⁶⁵.

In order to optimize ZIKV infection in these animals, it is known that they are sensitive to the action of IFN types I, II and III, and the blockade of IFN receptors has been used to develop models of susceptible mice^{49,66}. Lazear and colleagues used an IFNAR1 blocking monoclonal antibody (MAR1-5A3) in C57BL/6 mice to make them susceptible to ZIKV infection. Although these animals did not develop neurological manifestations, they had a milder disease phenotype than the one observed in IFNAR1^{-/-} mice⁴⁹.

This model was used for vertical transmission studies in which females and wild males of the C57BL/6 lineage were mated, and the mothers were treated with the anti-IFNAR1 antibody immediately before ZIKV infection. Moreover, the vertical transmission of the virus reaching the fetal brain was demonstrated⁶⁷. The use of this model is suggested to define the transplacental transmission mechanisms of ZIKV to the fetus⁵¹.

This model also allowed further investigation on the pathogenesis and persistence of ZIKV in the male reproductive tract⁵¹. ZIKV has been detected in several cells, including spermatogonia, spermatocytes, mature sperm and Sertoli cells, in addition to testes and epididymis⁶⁸.

Five-week-old C57BL/6 mice previously treated with anti-IFNAR1 antibodies and later infected with the DAKAR 41519 strain showed a survival rate of almost 20%⁶⁹. In routine use, they cannot completely deplete the IFN response⁷⁰. Alternative ways to develop immunocompromised models should be explored⁸.

Infection of 7- to 8-day-old C57BL/6 with this strain or ZIKV H/PF/2013 by subcutaneous or intraperitoneal injection resulted in central nervous system pathology and partial lethality⁴⁹. The use of newborn animals may be useful, as the main processes of brain development in rodents occur after birth⁷¹. Animals inoculated with the DAKAR strain, either subcutaneously or intraperitoneally, had mortality rates of 40 and 100%, respectively³⁵.

One or three-day-old neonatal Swiss mice inoculated subcutaneously or intracranially with strain of ZIKV⁷², also exhibited lethargy, ataxia, paralysis, microcephaly and other neurodevelopmental disorders with evidence of ZIKV infection in the brain^{30,65}. The use of this model whose portion survives may allow the assessment of long-term neurological and behavioral sequelae associated with ZIKV infection in the maturing brain⁵¹.

In the context of pregnancy, there are advantages and disadvantages to using mice to study human infections and diseases, for example, in mice the gestation period is shorter compared to humans, only 20 days, in addition the placental structure is different^{49,73}. Interestingly, pregnant SJL mice, when inoculated intravenously with a high dose of 1010 to 1012 PFU of ZIKV, generated offspring that presented neurological and ophthalmologic malformations similar to those observed in humans, in addition to intrauterine growth retardation⁶⁵. When CD1 mice were challenged intracranially with the MR766 ZIKV strain, they exhibited an 80-100% mortality rate regardless of age. Intraperitoneal inoculation with the same strain generated signs of morbidity, but no dose-dependent mortality⁷⁴.

The use of a humanized mouse model in which gene manipulation techniques are used to produce knock-in animals (KI) with modification of human STAT2 at the mouse STAT2 locus (hSTAT2 KI) generated a fully immunocompetent animal model. The infection of these pregnant animals, performed by a highly virulent adapted strain, resulted in viral dissemination to the placenta and fetal brain⁷⁵.

A hematogenous infection model was designed to assess the effects of this ZIKV infection on embryonic and fetal development using FBV/NJ and C57BL/6J mice. These early infections caused growth restriction and severe malformations in infected embryos³⁶.

In a recent study with intravaginally infected C57BL/6 females, high rates of long-term viral replication were observed. Furthermore, fetuses of pregnant females inoculated by this route developed brain infection and intrauterine growth retardation⁷⁶. Thus, this model will likely have additional usefulness to test whether candidate countermeasures can prevent congenital malformations or fetal injury in the context of sexual transmission of ZIKV⁵¹.

Immunocompetent mice have been used to assess the immunogenicity of candidate vaccines, as well as their protective efficacy against viremia⁵¹. Thus, one study used BALB/c and SJL mice to test a DNA vaccine encoding the ZIKV M and E proteins with immunization intramuscularly and prevented viremia after intravenous inoculation of Brazilian or Puerto Rican strains of ZIKV⁷⁷. In analogous studies, immunization with a purified and inactivated ZIKV vaccine intramuscularly or subcutaneously in BALB/c mice also prevented viremia. In both cases, protection was mediated by specific antibodies to ZIKV⁷⁷.

The technique of intracranial inoculation via the post-glenoid foramen used by Iwami et. al., in the implant of intracerebral cancer cells, with the advantage of not compromising the cranial vault of adult mice⁷⁸. It was used, in another study, for the infection of mice with a relatively low dose of ZIKV MR766, in which animals of the C57BL/6 lineage were used between 8 and 20 weeks immunocompetent resulting in lethal encephalitis⁷⁹.

Immunodeficient strains for the study of CHIKV and ZIKV

In the early 1990s, Muller and collaborators generated interferon receptor (IFNARs) type I, IFN- α/β and IFNAR $^{-/-}$, deficient mice by homologous recombination in embryonic stem cells. Although

these transgenic mice showed no obvious abnormalities at six months of age and were fertile, the animals were totally devoid of the effects of type I IFNs⁸⁰.

The role of INF against viral diseases has been widely studied, as well as the strategies developed by the viruses to antagonize the effects of these IFNs. Both type I and II IFNs were correlated in host antiviral defense and immunomodulatory functions during infection⁸¹. The IFNAR^{-/-} receptor knockout mouse model was used to study infection, disease, pathogenesis and vaccine testing against several arbovirus families, such as *Togaviridae*, *Bunyaviridae*, *Flaviviridae*, *Rhabdoviridae*, *Orthomyxoviridae* and *Reoviridae*¹³.

The susceptibility of IFNAR^{-/-} mice, as well as the role of IFNAR receptors in the control and elimination of CHIKV were studied. A dose of 10² PFU injected intradermally (id) was sufficient to kill the IFNAR^{-/-} mice and the injection of 10⁶ PFU resulted in even faster death⁸². The maternal-fetal transmission of CHIKV in IFNAR^{-/-} pregnant mice was also analyzed. However, CHIKV has been shown to be unable to cross the placental barrier from mother to fetus in mice⁸³.

The main disadvantage of immunocompromised mice is the lack of essential components of the immune response, which may underestimate the efficacy of some vaccine candidates, in addition to not expressing the pathogenesis of the disease accurately in these hosts. However, these models have been successfully used for preclinical evaluation of vaccines and antivirals against these arboviruses⁸⁴⁻⁸⁷. Although they are deficient in the innate interferon response, they retain their adaptive immunity²⁶.

In a study using SCID mice (deficient in T and B lymphocytes), it was observed that the animals developed the disease severely, but were more resistant to infection than the AG129 model, reinforcing the thesis that ZIKV infection in mice is mainly controlled by the innate immune response mediated by IFNs and not by the adaptive response mediated by T cells⁸⁸.

Mice of the A129 strain were one of the first models used to characterize ZIKV infection, although already been used in studies of other viruses, such as CHIKV and the yellow fever virus (YFV)^{26,89}. Younger (3 weeks) mice they are good models for testing antiviral compounds in preventing weight loss, neurological disease, viremia and death. This strain can also be used in vaccine trials aged 3-4 weeks approximately to measure its protection and challenged at 7-8 weeks or more. In this model, vaccine efficacy evaluations can include protection against weight loss and clinical signs of the disease, as well as reduction or not of viremia^{12,63}.

AG129 mice have double knockout for IFN $\alpha/\beta/\gamma$ receptors and are more susceptible to ZIKV-induced disease than A129 mice. Although the kinetics of ZIKV infection in AG129 mice are similar to that of A129, disease signs are more severe in AG129, especially due to the severity of neurological manifestations, probably because of the immune-protective role of IFN γ ^{46,63}. These observations suggest the relevance of these strains for the study of the pathogenesis of human diseases, including Guillain-Barré syndrome and microcephaly⁸. Studies with CHIKV were also carried out using this animal model⁴⁷.

IFNAR1^{-/-} mice infected with ZIKV strains from French Polynesia or Brazilian developed conjunctivitis and panuveitis, these disease manifestations were associated with ZIKV RNA in the cornea, iris, optic nerve and retinal ganglion and bipolar cells⁹⁰. Thus, IFNAR1^{-/-} mice may be useful to investigate the pathogenesis of ocular disease associated with ZIKV infection⁵¹.

Irf3^{-/-}, Irf5^{-/-} and Irf7^{-/-} mice represent a relevant model since that have the C57BL/6 genetic background and are triple knockout (TKO) for interferon transcription regulatory factors 3, 5 and 7, respectively⁹¹. This strain has been used to study the impact of ZIKV on the CNS, where high levels of viral RNA were detected in tissues after infection and severe signs of neurological disease could be observed⁴⁹.

Another strategy for infection in immunocompetent animals would be the administration of immunosuppressive drugs. As described in a study using BALB/c mice immunocompromised with dexamethasone. In which high viral replication was obtained in several organs, inflammation and slight weight loss after ZIKV infection, intraperitoneally⁴¹. By using this model, the authors showed that administration of exogenous type I IFN can improve clinical outcome⁵¹.

Several evidences of immunological pathology come from animal models⁹². CHIKV causes inflammatory arthritis and myositis in both mice and non-human primates⁹³. Components of the innate and adaptive immune system contribute to alphavirus-induced arthritis and myositis⁹². Both

monocytes and macrophages participate in arthritis or myositis caused by CHIKV in mouse models, and the reduction of these cells results in reduced signs of disease⁹⁴.

Given the importance of monocytes and macrophages in the pathogenesis of CHIKV, studies have evaluated the potential of monocyte inhibitors as therapies for alphavirus-induced arthritis⁹². When genetically deficient mice were used for an inhibitor of monocyte chemotactic proteins (CCL2) that acts as a receptor for several chemokines, including CCL2, showed a more severe picture of arthritis characterized by neutrophil infiltration in joint tissues⁹⁵.

CONCLUSION

We can conclude that there is a wide variety of mice animal models for studying CHIKV and ZIKV. Among these models, the most used are the knockouts of alpha and beta interferon receptors, but controversial findings have been reported for these models, leading to eventually underestimate vaccine efficacy tests, in addition to having a higher cost and little availability. In this way, there is a gap for new immunocompetent models to be developed in the future. However, it is worth emphasizing the importance of choosing these models correctly during experimental planning, in order to avoid economic losses and unnecessary use of animals.

REFERENCES

1. Pingen M, Schmid MA, Harris E, McKimmie CS. Mosquito biting modulates skin response to virus infection. *Trends Parasitol.* 2017;33(8):645-57. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2017.04.003>. PMID:28495485.
2. Bandeira AC, Campos GS, Sardi SI, Rocha VFD, Rocha GCM. Neonatal encephalitis due to Chikungunya vertical transmission: first report in Brazil. *IDCases.* 2016;5:57-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idcr.2016.07.008>. PMID:27500084.
3. Gérardin P, Sampéris S, Ramful D, et al. Neurocognitive outcome of children exposed to perinatal mother-to-child chikungunya virus infection: the CHIMERE Cohort Study on Reunion Island. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(7):e2996. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002996>. PMID:25033077.
4. Haese NN, Broeckel RM, Hawman DW, Heise MT, Morrison TE, Streblow DN. Animal models of chikungunya virus infection and disease. *J Infect Dis.* 2016;214(Suppl. 5):S482-7. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiw284>. PMID:27920178.
5. Tanabe ISB, Tanabe ELL, Santos EC, et al. Cellular and molecular immune response to chikungunya virus infection. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:345. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2018.00345>. PMID:30364124.
6. Göertz GP, Abbo SR, Fros JJ, Pijlman GP. Functional RNA during Zika virus infection. *Virus Res.* 2018;254:41-53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2017.08.015>. PMID:28864425.
7. Rodriguez-Morales AJ, Bandeira AC, Franco-Paredes C. The expanding spectrum of modes of transmission of Zika virus: a global concern. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2016;15(1):13. <http://dx.doi.org/10.1186/s12941-016-0128-2>. PMID:26939897.
8. Pena LJ, Miranda Guarines K, Duarte Silva AJ, et al. In vitro and in vivo models for studying Zika virus biology. *J Gen Virol.* 2018;99(12):1529-50. <http://dx.doi.org/10.1099/jgv.0.001153>. PMID:30325302.
9. Wang Y, Swiecki M, Cella M, et al. Timing and magnitude of type I interferon responses by distinct sensors impact CD8 T cell exhaustion and chronic viral infection. *Cell Host Microbe.* 2012;11(6):631-42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2012.05.003>. PMID:22704623.
10. Hugo LE, Prow NA, Tang B, Devine G, Suhrbier A. Chikungunya virus transmission between *Aedes albopictus* and laboratory mice. *Parasit Vectors.* 2016;9(1):555. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1838-1>. PMID:27760560.
11. Ganesan VK, Duan B, Reid SP. Chikungunya virus: pathophysiology, mechanism, and modeling. *Viruses.* 2017;9(12):1-14. <http://dx.doi.org/10.3390/v9120368>. PMID:29194359.
12. Chattopadhyay A, Aguilar PV, Bopp NE, Yarovinsky TO, Weaver SC, Rose JK. A recombinant virus vaccine that protects against both Chikungunya and Zika virus infections. *Vaccine.* 2018;36(27):3894-900. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.05.095>. PMID:29807712.
13. Marín-Lopez A, Calvo-Pinilla E, Moreno S, et al. Modeling arboviral infection in mice lacking the interferon alpha/beta receptor. *Viruses.* 2019;11(1):1-25. <http://dx.doi.org/10.3390/v11010035>. PMID:30625992.
14. Strauss JH, Strauss EG. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol Rev.* 1994;58(3):491-

562. <http://dx.doi.org/10.1128/mr.58.3.491-562.1994>. PMID:7968923.
15. Powers AM, Logue CH. Changing patterns of chikunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. *J Gen Virol*. 2007;88(Pt 9):2363-77. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.82858-0>. PMID:17698645.
 16. Wahid B, Ali A, Rafique S, Idrees M. Global expansion of chikungunya virus: mapping the 64-year history. *Int J Infect Dis*. 2017;58:69-76. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2017.03.006>. PMID:28288924.
 17. Brasil. Ministério da Saúde. Protocolo de investigação de óbitos por arbovírus urbanos no Brasil: dengue, Chikungunya e Zika. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde; 2016. 35 p.
 18. Brasil. Ministério da Saúde. Boletim epidemiológico 20. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde; 2020. 47 p. (vol. 51).
 19. Corti D, Lanzavecchia A. Broadly neutralizing antiviral antibodies. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:705-42. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095916>. PMID:23330954.
 20. Fox JM, Long F, Edeling MA, et al. Broadly neutralizing alphavirus antibodies bind an epitope on E2 and inhibit entry and egress. *Cell*. 2015;163(5):1095-107. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.050>. PMID:26553503.
 21. Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *The New England Journal of Medicine*.
 22. Wiwanitkit V. Guillain-Barré syndrome and Zika virus infection. *Arq Neuropsiquiatr*. 2016;74(8):692. <http://dx.doi.org/10.1590/0004-282X20160089>. PMID:27556383.
 23. Hennessey M, Fischer M, Staples JE. Zika virus spreads to new areas: region of the Americas, May 2015-January 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2016;65(3):55. <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm6503e1er>. PMID:26820163.
 24. Brasil P, Pereira JP Jr, Moreira ME, et al. Zika virus infection in pregnant women in rio de janeiro. *N Engl J Med*. 2016;375(24):2321-34. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1602412>. PMID:26943629.
 25. Caine EA, Jagger BW, Diamond MS. Animal models of zika virus infection during pregnancy. *Viruses*. 2018;10(11):1-21. <http://dx.doi.org/10.3390/v10110598>. PMID:30384472.
 26. Dowall SD, Graham VA, Rayner E, et al. A susceptible mouse model for zika virus infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(5):e0004658. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0004658>. PMID:27149521.
 27. Kamiyama N, Soma R, Hidano S, et al. Ribavirin inhibits Zika virus (ZIKV) replication *in vitro* and suppresses viremia in ZIKV-infected STAT1-deficient mice. *Antiviral Res*. 2017;146:1-11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.08.007>. PMID:28818572.
 28. Tang H, Hammack C, Ogden SC, et al. Zika virus infects human cortical neural progenitors and attenuates their growth. *Cell Stem Cell*. 2016;18(5):587-90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2016.02.016>. PMID:26952870.
 29. Suckling AJ, Jagelman S, Webb HE. A comparison of brain lysosomal enzyme activities in four experimental togavirus encephalitides. *J Neurol Sci*. 1978;35(2-3):355-64. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-510X\(78\)90015-1](http://dx.doi.org/10.1016/0022-510X(78)90015-1). PMID:204753.
 30. Oliveira Souza IN, et al. Acute and chronic neurological consequences of early-life zika virus infection in mice. *Sci Transl Med*. 2018;10(444):1-11. <http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.aar2749>. PMID:29875203.
 31. Duggal NK, Ritter JM, McDonald EM, et al. Differential neurovirulence of African and Asian genotype Zika virus isolates in outbred immunocompetent mice. *Am J Trop Med Hyg*. 2017;97(5):1410-7. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.17-0263>. PMID:28820694.
 32. Fernandes NCCA, Nogueira JS, Réssio RA, et al. Experimental Zika virus infection induces spinal cord injury and encephalitis in newborn Swiss mice. *Exp Toxicol Pathol*. 2017;69(2):63-71. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etp.2016.11.004>. PMID:27899230.
 33. Ziegler SA, Lu L, Rosa AP, Xiao SY, Tesh RB. An animal model for studying the pathogenesis of chikungunya virus infection. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;79(1):133-9. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2008.79.133>. PMID:18606777.
 34. Levitt NH, Ramsburg HH, Hasty SE, Repik PM, Cole FE Jr, Lupton HW. Development of an attenuated strain of chikungunya virus for use in vaccine production. *Vaccine*. 1986;4(3):157-62. [http://dx.doi.org/10.1016/0264-410X\(86\)90003-4](http://dx.doi.org/10.1016/0264-410X(86)90003-4). PMID:3020820.
 35. Smith DR, Hollidge B, Daye S, et al. Neuropathogenesis of Zika virus in a highly susceptible immunocompetent mouse model after antibody blockade of type I Interferon. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(1):e0005296. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0005296>. PMID:28068342.
 36. Xavier-Neto J, Carvalho M, Pascoalino BD, et al. Hydrocephalus and arthrogryposis in an immunocompetent

- mouse model of ZIKA teratogeny: a developmental study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(2):e0005363. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0005363>. PMID:28231241.
37. Morrison TE, Oko L, Montgomery SA, et al. A mouse model of chikungunya virus-induced musculoskeletal inflammatory disease: evidence of arthritis, tenosynovitis, myositis, and persistence. *Am J Pathol*. 2011;178(1):32-40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.11.018>. PMID:21224040.
 38. Lazear HM, Govero J, Smith AM, et al. A mouse model of Zika virus pathogenesis. *Cell Host Microbe*. 2016;19(5):720-30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2016.03.010>. PMID:27066744.
 39. Zheng S, Chan WS, Leung SH, Xue Q. Broadband Butler matrix with flat coupling. *Electron Lett*. 2007;43(10):576-7. <http://dx.doi.org/10.1049/el:20070274>.
 40. Bullard-Feibelman KM, Govero J, Zhu Z, et al. The FDA-approved drug sofosbuvir inhibits Zika virus infection. *Antiviral Res*. 2017;137:134-40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.11.023>. PMID:27902933.
 41. Chan JFW, Zhang AJ, Chan CC, et al. Zika virus infection in dexamethasone-immunosuppressed mice demonstrating disseminated infection with multi-organ involvement including orchitis effectively treated by recombinant type I interferons. *EBioMedicine*. 2016;14:112-22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.11.017>. PMID:27884655.
 42. Gorman MJ, Caine EA, Zaitsev K, et al. An immunocompetent mouse model of Zika virus infection. *Cell Host Microbe*. 2018;23(5):672-685.e6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2018.04.003>. PMID:29746837.
 43. Dowall SD, Graham VA, Rayner E, et al. A susceptible mouse model for Zika virus infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(5):e0004658. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0004658>. PMID:27149521.
 44. Rossi SL, Tesh RB, Azar SR, et al. Characterization of a novel murine model to study zika virus. *Am J Trop Med Hyg*. 2016;94(6):1362-9. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.16-0111>. PMID:27022155.
 45. Chattopadhyay A, Aguilar PV, Bopp NE, Yarovinsky TO, Weaver SC, Rose JK. A recombinant virus vaccine that protects against both Chikungunya and Zika virus infections. *Vaccine*. 2018;36(27):3894-900. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.05.095>. PMID:29807712.
 46. Aliota MT, Caine EA, Walker EC, Larkin KE, Camacho E, Osorio JE. Characterization of lethal Zika virus infection in AG129 mice. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(4):e0004682. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0004682>.
 47. Kose N, Fox JM, Sapparapu G, et al. A lipid-encapsulated mRNA encoding a potently neutralizing human monoclonal antibody protects against chikungunya infection. *Sci Immunol*. 2019;4(35):eaaw6647. <http://dx.doi.org/10.1126/sciimmunol.aaw6647>. PMID:31101672.
 48. Zmurko J, Marques RE, Schols D, Verbeken E, Kaptein SJ, Neyts J. The viral polymerase inhibitor 7-Deaza-2'-C-methyladenosine is a potent inhibitor of *in vitro* Zika virus replication and delays disease progression in a robust mouse infection model. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(5):e0004695. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0004695>. PMID:27163257.
 49. Lazear HM, Govero J, Smith AM, et al. A mouse model of zika virus pathogenesis. *Cell Host Microbe*. 2016;19(5):720-30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2016.03.010>. PMID:27066744.
 50. Li H, Saucedo-Cuevas L, Regla-Nava JA, et al. Zika virus infects neural progenitors in the adult mouse brain and alters proliferation. *Cell Stem Cell*. 2016;19(5):593-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2016.08.005>. PMID:27545505.
 51. Morrison TE, Diamond MS. Animal models of zika virus infection, pathogenesis, and immunity. *J Virol*. 2017;91(8):e00009-17. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00009-17>. PMID:28148798.
 52. Staeheli P, Danielson P, Haller O, Sutcliffe JG. Transcriptional activation of the mouse Mx gene by type I interferon. *Mol Cell Biol*. 1986;6(12):4770-4. PMID:3796617.
 53. Lee AJ, Ashkar AA. The dual nature of type I and type II interferons. *Front Immunol*. 2018;9:2061. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2018.02061>. PMID:30254639.
 54. Couderc T, Chrétien F, Schilte C, et al. A mouse model for Chikungunya: young age and inefficient type-I interferon signaling are risk factors for severe disease. *PLoS Pathog*. 2008;4(2):e29. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.0040029>. PMID:18282093.
 55. Schilte C, Couderc T, Chretien F, et al. Type I IFN controls chikungunya virus via its action on nonhematopoietic cells. *J Exp Med*. 2010;207(2):429-42. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20090851>. PMID:20123960.
 56. Miner JJ, Sene A, Richner JM, et al. Zika Virus infection in mice causes panuveitis with shedding of virus in tears. *Cell Rep*. 2016;16(12):3208-18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08.079>. PMID:27612415.
 57. Winkler CW, Myers LM, Woods TA, et al. Adaptive immune responses to Zika virus are important for controlling virus infection and preventing infection in brain and testes. *J Immunol*. 2017;198(9):3526-35. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jix001>.

- org/10.4049/jimmunol.1601949. PMID:28330900.
58. Schwartz O, Albert ML. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(7):491-500. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2368>. PMID:20551973.
 59. Kam YW, Ong EKS, Rénia L, Tong JC, Ng LFP. Immuno-biology of Chikungunya and implications for disease intervention. *Microbes Infect.* 2009;11(14-15):1186-96. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2009.09.003>. PMID:19737625.
 60. Ng LFP. Immunopathology of chikungunya virus infection: lessons learned from patients and animal models. *Annu Rev Virol.* 2017;4(1):413-27. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-virology-101416-041808>. PMID:28637387.
 61. Levitt NH, Ramsburg HH, Hasty SE, Repik PM, Cole FE Jr, Lupton HW. Development of an attenuated strain of chikungunya virus for use in vaccine production. *Vaccine.* 1986;4(3):157-62. [http://dx.doi.org/10.1016/0264-410X\(86\)90003-4](http://dx.doi.org/10.1016/0264-410X(86)90003-4). PMID:3020820.
 62. Morrison TE, Oko L, Montgomery SA, et al. A mouse model of chikungunya virus-induced musculoskeletal inflammatory disease: evidence of arthritis, tenosynovitis, myositis, and persistence. *Am J Pathol.* 2011;178(1):32-40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.11.018>. PMID:21224040.
 63. Rossi SL, Tesh RB, Azar SR, et al. Characterization of a novel murine model to study zika virus. *Am J Trop Med Hyg.* 2016;94(6):1362-9. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.16-0111>. PMID:27022155.
 64. Grant A, Ponia SS, Tripathi S, et al. Zika virus targets human STAT2 to inhibit type I interferon signaling. *Cell Host Microbe.* 2016;19(6):882-90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2016.05.009>. PMID:27212660.
 65. Cugola FR, Fernandes IR, Russo FB, et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature.* 2016;534(7606):267-71. <http://dx.doi.org/10.1038/nature18296>. PMID:27279226.
 66. Bayer A, Lennemann NJ, Ouyang Y, et al. Type III interferons produced by human placental trophoblasts confer protection against Zika virus infection. *Cell Host Microbe.* 2016;19(5):705-12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2016.03.008>. PMID:27066743.
 67. Miner JJ, Cao B, Govero J, et al. Zika virus infection during pregnancy in mice causes placental damage and fetal demise. *Cell.* 2016;165(5):1081-91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.008>. PMID:27180225.
 68. Govero J, Esakky P, Scheaffer SM, et al. Zika virus infection damages the testes in mice. *Nature.* 2016;540(7633):438-42. <http://dx.doi.org/10.1038/nature20556>. PMID:27798603.
 69. Zhao H, Fernandez E, Dowd KA, et al. Structural basis of Zika virus-specific antibody protection. *Cell.* 2016;166(4):1016-27. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.020>. PMID:27475895.
 70. Bullard-Feibelman KM, Govero J, Zhu Z, et al. The FDA-approved drug sofosbuvir inhibits Zika virus infection. *Antiviral Res.* 2017;137:134-40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.11.023>. PMID:27902933.
 71. Semple BD, Blomgren K, Gimlin K, Ferriero DM, Noble-Haeusslein LJ. Brain development in rodents and humans: identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol.* 2013;106-107:1-16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.04.001>. PMID:23583307.
 72. Cunha MS, Esposito DL, Rocco IM, et al. First complete genome sequence of Zika virus (Flaviviridae, Flavivirus) from an autochthonous transmission in Brazil. *Genome Announc.* 2016;4(2):e00032-16. <http://dx.doi.org/10.1128/genomeA.00032-16>. PMID:26941134.
 73. Coyne CB, Lazear HM. Zika virus-reigniting the TORCH. *Nat Rev Microbiol.* 2016;14(11):707-15. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2016.125>. PMID:27573577.
 74. Duggal NK, Ritter JM, McDonald EM, et al. Differential neurovirulence of African and Asian genotype Zika virus isolates in outbred immunocompetent mice. *Am J Trop Med Hyg.* 2017;97(5):1410-7. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.17-0263>. PMID:28820694.
 75. Gorman MJ, Caine EA, Zaitsev K, et al. An immunocompetent mouse model of Zika virus infection. *Cell Host Microbe.* 2018;23(5):672-685.e6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2018.04.003>. PMID:29746837.
 76. Yockey LJ, Varela L, Rakib T, et al. Vaginal exposure to Zika virus during pregnancy leads to fetal brain infection. *Cell.* 2016;166(5):1247-1256.e4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.004>. PMID:27565347.
 77. Larocca RA, Abbink P, Peron JPS, et al. Vaccine protection against Zika virus from Brazil. *Nature.* 2016;536(7617):474-8. <http://dx.doi.org/10.1038/nature18952>. PMID:27355570.
 78. Iwami K, Momota H, Natsume A, Kinjo S, Nagatani T, Wakabayashi T. A novel method of intracranial injection via the postglenoid foramen for brain tumor mouse models: laboratory investigation. *J Neurosurg.* 2012;116(3):630-5. <http://dx.doi.org/10.3171/2011.10.JNS11852>. PMID:22149378.
 79. Hayashida E, Ling ZL, Ashhurst TM, et al. Zika virus encephalitis in immunocompetent mice is dominated by innate

- immune cells and does not require T or B cells. *J Neuroinflammation*. 2019;16(1):177. <http://dx.doi.org/10.1186/s12974-019-1566-5>. PMID:31511023.
80. Staeheli P, Danielson P, Haller O, Sutcliffe JG. Transcriptional activation of the mouse Mx gene by type I interferon. *Mol Cell Biol*. 1986;6(12):4770-4. PMID:3796617.
81. Lee AJ, Ashkar AA. The dual nature of type I and type II interferons. *Front Immunol*. 2018;9:2061. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2018.02061>. PMID:30254639.
82. Schilte C, Couderc T, Chretien F, et al. Type I IFN controls chikungunya virus via its action on nonhematopoietic cells. *J Exp Med*. 2010;207(2):429-42. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20090851>. PMID:20123960.
83. Couderc T, Chrétien F, Schilte C, et al. A mouse model for Chikungunya: young age and inefficient type-I interferon signaling are risk factors for severe disease. *PLoS Pathog*. 2008;4(2):e29. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.0040029>. PMID:18282093.
84. Zhang Y-N, Deng CL, Li JQ, et al. Infectious Chikungunya Virus (CHIKV) with a complete capsid deletion: a new approach for a CHIKV vaccine. *J Virol*. 2019;93(15):1-16. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00504-19>. PMID:31092567.
85. Chattopadhyay A, Aguilar PV, Bopp NE, Yarovinsky TO, Weaver SC, Rose JK. A recombinant virus vaccine that protects against both Chikungunya and Zika virus infections. *Vaccine*. 2018;36(27):3894-900. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.05.095>. PMID:29807712.
86. Shan C, Muruato AE, Nunes BT, et al. A live-attenuated Zika virus vaccine candidate induces sterilizing immunity in mouse models. *Nat Med*. 2017;23(6):763-7. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.4322>. PMID:28394328.
87. Yu Y, Deng YQ, Zou P, et al. A peptide-based viral inactivator inhibits Zika virus infection in pregnant mice and fetuses. *Nat Commun*. 2017;8(1):15672. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms15672>. PMID:28742068.
88. Zmurko J, Marques RE, Schols D, Verbeken E, Kaptein SJ, Neyts J. The viral polymerase inhibitor 7-Deaza-2'-C-methyladenosine is a potent inhibitor of *in vitro* Zika virus replication and delays disease progression in a robust mouse infection model. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(5):e0004695. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0004695>. PMID:27163257.
89. Meier KC, Gardner CL, Khoretonenko MV, Klimstra WB, Ryman KD. A mouse model for studying viscerotropic disease caused by yellow fever virus infection. *PLoS Pathog*. 2009;5(10):e1000614. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000614>. PMID:19816561.
90. Miner JJ, Sene A, Richner JM, et al. Zika virus infection in mice causes panuveitis with shedding of virus in tears. *Cell Rep*. 2016;16(12):3208-18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08.079>. PMID:27612415.
91. Li H, Saucedo-Cuevas L, Regla-Nava JA, et al. Zika virus infects neural progenitors in the adult mouse brain and alters proliferation. *Cell Stem Cell*. 2016;19(5):593-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2016.08.005>. PMID:27545505.
92. Baxter VK, Heise MT. Immunopathogenesis of alphaviruses. *Physiol Behav*. 2020;176:315-82.
93. Haese NN, Broeckel RM, Hawman DW, Heise MT, Morrison TE, Streblow DN. Animal models of Chikungunya virus infection and disease. *J Infect Dis*. 2016;214(5, Suppl. 5):S482-7. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiw284>.
94. Lidbury BA, Simeonovic C, Maxwell GE, Marshall ID, Hapel AJ. Macrophage-induced muscle pathology results in morbidity and mortality for Ross River virus-infected mice. *J Infect Dis*. 2000;181(1):27-34. <http://dx.doi.org/10.1086/315164>. PMID:10608747.
95. Poo YS, Nakaya H, Gardner J, et al. CCR2 deficiency promotes exacerbated chronic erosive neutrophil-dominated chikungunya virus arthritis. *J Virol*. 2014;88(12):6862-72. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.03364-13>. PMID:24696480.