



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – UniCEUB
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

Mariana Batista Caixeta Ferreira

Desenvolvimento de insumos para diagnóstico e/ou vacina do vírus
chikungunya (CHIKV)

BRASÍLIA - DF
2020

Mariana Batista Caixeta Ferreira

Desenvolvimento de insumos para diagnóstico e/ou vacina do vírus
chikungunya (CHIKV)

Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica
apresentado à Assessoria de PósGraduação e Pesquisa
pela Faculdade de Ciências da Educação e da Saúde –
FACES.

Orientadora: Dr^a. Anabele Azevedo Lima.

BRASÍLIA – DF
2020

DESENVOLVIMENTO DE INSUMOS PARA DIAGNÓSTICO E/OU VACINA DO VÍRUS CHIKUNGUNYA (CHIKV)

Mariana Batista Caixeta Ferreira – **UniCEUB, PIBIC-FAP/DF**, aluna bolsista
mariana.bf@sempreceub.com

Profª Dra Anabele Azevedo Lima – **UniCEUB**, professora orientadora
anabele.lima@ceub.edu.br

Dyéferson Kened da Silva Coelho Guimarães – **UniCEUB**, aluno bolsista
dyeferson.guimaraes@sempreceub.com

Profº titular Dr Bergmann Morais Ribeiro – **UNB**, professor colaborador
bergmann@unb.br

Dr Leonardo Assis da Silva – **UNB**, Pós doutorando
leocbq@yahoo.com.br

RESUMO

A febre chikungunya é uma doença causada pelo vírus chikungunya (CHIKV). É um arbovírus pertencente ao gênero Alphavírus dentro da família Togaviridae que foi disseminado por várias regiões do globo, inclusive, bem recorrente no Brasil. Segundo o boletim epidemiológico do Ministério da Saúde (2020), foram relatados cerca de 132.205 casos possíveis e 92 óbitos de Chikungunya até Janeiro de 2020 no Brasil. Esse vírus é transmitido por vetores artrópodes *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. Dados epidemiológicos descrevem que a incidência dessa doença vem crescendo no Brasil, juntamente a outras arboviroses. As consequências da febre Chikungunya pode perdurar por mais de dois anos na pessoa infectada, causando doença crônica da poliartralgia. O CHIKV é um alfavírus envelopado, com RNA de fita simples de senso positivo, possuindo cerca de 60–70 nm de diâmetro, com proteínas estruturais e não estruturais, onde E2 e NSP3 promovem a interação e replicação, logo, são proteínas importantes para atuação do sistema imune. O baculovírus é um vírus que infecta células de inseto e proporciona níveis considerados de expressão de proteína heteróloga, por isso, é muito usado como biotecnologia. Dessa forma, este projeto teve como objetivo expressar proteínas do vírus CHIKV fusionadas a proteína poliedrina do baculovírus AcMNPV com intuito de obter antígenos específicos para análises futuras quanto a ativação da resposta imune. Dessa forma, foram criados oligonucleotídeos com esses epítomos virais fusionados a poliedrina do baculovírus AcMNPV para produzir e obter glicoproteínas recombinantes. A estratégia R1, repetições das regiões antigênicas (E2-E2-NSP3), foi expressa e purificada para futuras análises imunológicas. A estratégia R2 ainda não foi possível cloná-la. As estratégias estabelecidas podem ser um aporte para futuros estudos envolvendo vacina, já que não há um tratamento específico para febre chikungunya, e ainda, a produção de um kit diagnóstico rápido.

Palavras-chave: Chikungunya, Baculovírus recombinante, Expressão de proteínas heterólogas.

Sumário

1. Introdução	5
2. Fundamentação teórica	6
3. Metodologia	10
3.1. Células	10
3.2. Plasmídeos e bactérias.....	10
3.3. Isolamento e identificação do gene de interesse.....	10
3.4. Construção do vetor para expressão de proteínas heterólogas (R1 e R2) no corpo de oclusão do baculovírus AcMNPV	11
3.5. Construção de baculovírus recombinantes contendo regiões do CHIKV.....	12
3.6. Purificação de proteínas recombinantes e análise da expressão das proteínas do vírus da CHIKV por SDS-PAGE e Western-blot.....	13
4. Resultados	13
4.1. Resultados da estratégia R1.....	13
4.2. Resultados da estratégia R2.....	18
5. Discussão	18
6. Conclusão	22
7. Referências Bibliográficas	23

1 Introdução

O vírus *Chikungunya* (CHIKV) causador da febre *Chikungunya* pertence ao gênero *Alphavirus* dentro da família *Togaviridae*. Os primeiros relatos dessa febre foi em 1952–1953 no leste da África na região da Tanzânia, onde se deu o nome de Chikungunya, deriva do verbo *kungunyala* da língua *Makonde*, que significa “torna-se curvado”, referente as dores severas sentidas pelo portador da doença. Hoje, destaca-se três linhagens de CHIKV, sendo elas a linhagem África Ocidental, Asiática e Leste/Central/ Sul Africano. Cada linhagem tem uma ligação específica com o vetor, tendo assim, diferentes graus e consequentemente, causando diferentes respostas imunes e o período de incubação do vírus perdura de 4 a 12 dias (SOUZA et al. 2019. LUMSDEN, 1955. CARRILLO et al. 2019. SCHWARTZ; ALBERT. 2010. RUDOLPH et al 2014).

CHIKV é transmitido pela picada do mosquito infectado em um animal. Esse vetor artrópode é do gênero *Aedes*, e dentre as diversas espécies desse gênero, encontra-se o *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, que por sua vez, são responsáveis por transmitir e disseminar arboviroses de suma importância, tais como, chikungunya, dengue, zika, febre amarela e mayaro (TJADEN et al. 2017. TANABE et al. 2018). Segundo o boletim epidemiológico do Ministério da Saúde (2020), foram relatados cerca de 132.205 casos possíveis de Chikungunya até 2020 no Brasil.

Esse vetor é cosmopolita e trata-se de um mosquito invasor presente em toda extensão do território brasileiro. Hoje, temos diversos fatores que podem contribuir para a proliferação dessas arboviroses, tais como, trânsitos aéreos, oceânicos, aumento da população, falta de saneamento básico, e talvez o mais importante, a rápida reprodução desses vetores de transmissão. Existem algumas propostas para explicar o alto poder de replicação do *Aedes*: a rápida aclimação deste ao meio que vive, a aceleração da urbanização sem planejamento, desmatamento e o aumento da temperatura global e a resistências dos seus ovos que podem durar mais de um ano sem eclodir. Isso devido (CAMARA, 2016. MARSTON et al. 2014. MORDECAI et al, 2017. RIEMERSMA et al. 2019. TANABE et al. 2018). MOULAY et al. (2011) relatou que os artrópodes do gênero *Aedes* estão cada vez mais adaptados às regiões de clima temperado e tropical, e com isso, a tendência de propagação do vírus Chikungunya e das demais doenças associadas é aumentar.

A febre chikungunya é de grande importância socioeconômica devido a alta disseminação da doença. Não há tratamento específico anti-CHIKV e nem uma vacina no mercado. O que se tem hoje, é o desenvolvimento de uma vacina em potencial que começou a ser testada em 2020. A falta de saneamento e a consciência da população interfere diretamente na proliferação dos vetores, e conseqüentemente, no número de casos. A conscientização se faz necessária para tentar amenizar a disseminação dessa arbovirose (DEEBA et al. 2015. CHEN et al. 2020. CAMARA. 2016.).

O vírus Chikungunya apresenta proteínas estruturais e não estruturais que ajudam na entrada, replicação e saída dos vírus das células hospedeiras. O material genético é composto por RNA de cadeia simples e é suscetível a interferon. CHIKV pode replicar em células epiteliais e endoteliais em macrófagos e fibroblastos. (REMENYI et al. 2018. SOURISSEAU et al. 2007)

Por não haver tratamento específico ou vacina de comprovação efetiva, é de suma importância estudos que investiguem novos mecanismos de ação de proteínas virais, desenvolvimento de novas biotecnologias para diagnóstico e potenciais provedores de vacinas. Com isso, um grande aliado nos dias de hoje, é a produção de proteínas específicas e/ou recombinante em sistemas de expressão em bactérias e em outros organismos, como por exemplo, o baculovírus. Esse tipo de sistema proporciona níveis consideráveis de expressão de proteínas, melhorando a eficiência do códon (SAITO et al. 2019).

O baculovírus é muito citado quando se trata de biotecnologia conhecida, tornando-se hoje um aliado na produção de proteínas, de modificações pós-traducionais e possível vetor de terapia gênica. Trata-se de um vírus que infecta células de inseto, com 134 kb de material genético, de DNA de cadeia fechada, de fita dupla e apresenta capacidade de codificar 154 polipeptídios. Um tipo de baculovírus é o *nucleopolyhedrovirus múltiplo de Autographa californica* (AcMNPV) que é usado para expressão de genes de células de mamíferos (HOFMANN et al.1995. NAIK et al. 2018).

Dessa forma, este projeto teve como objetivo expressar proteínas do vírus CHIKV fusionadas a proteína poliedrina do baculovírus AcMNPV com intuito de obter antígenos específicos para análises futuras quanto a ativação da resposta imune.

2 Fundamentação teórica

O vírus chikungunya começou a ser visado por conta do aumento de casos em diferentes lugares do mundo. CHIKV causa uma doença reemergente, transmitida por artrópodes, sendo eles, *Aedes Aegypti* e *Albopictus*. Em 2006, esse vírus começou a tornar proporções grandiosas, a nível global, e chegar a lugares não endêmicos, configurando, assim, epidemia. Dentre os primeiros relatos e descrições dessa febre, confundia-se muito a dengue, isso devido a apresentação de semelhanças clínicas. Com o tempo e surgimento de vários novos casos, foi percebido que os sintomas de dores articulares persistem por um longo período, maior que o da dengue. Por isso, o nome dado a doença - chikungunya - faz referência as manifestações reumatológicas e a artralgia. O nome deriva do verbo “*kungunyala*”, advinda da língua Makonde, significa “aquilo que se curva” (MAHENDRADAS; AVADHANI; SHETTY, 2013. ROBINSON, 1955. MOHAN, 2010).

Alguns relatos em Outubro do ano de 1952 foram feitos sobre essa doenças segundo ROBINSON (1955) na região da Tanzânia (África), mas foi analisados que sintomas semelhantes já tinham sidos descritos em meados de 1950. ROBINSON (1955) indica que em cada vila cerca de 60 a 80 por cento das pessoas estavam infectadas na época, podendo ser todos de uma única família. Casos corriqueiros apareceram depois, mas com estado clínico melhor em relação aos primeiros casos. Esses primeiros relatos deram o olhar mais minucioso para o local para os estudiosos, percebendo então que a maior proliferação de casos acontecia em ambientes com maior disponibilidade de água. Sabemos hoje que a reprodução dos vetores de transmissão está diretamente ligada a lugares que apresentam água. Sendo, assim, se faz necessário o controlo do vetor disseminador dessas e das outras arboviroses, além de insumos para desenvolver kit diagnóstico e/ou vacina (MAHENDRADAS; AVADHANI; SHETTY, 2013).

As arbovírus presentes no Brasil apresentam sintomas muitos semelhantes com a febre chikungunya. Dentre os sintomas específicos quando a pessoa contrai CHIKV são: manchas avermelhada nos olhos, dor retro-ocular, calafrios, conjuntivite sem secreção e dores forte nas articulações, e por esse último sintoma, pode tornar a pessoa incapacitante, pois as dores se prolongam por um longo período causando doença crônica chamada de poliartralgia. Os outros sintomas são: febre, cefaléia, mialgia, dores musculares severas, náusea, fadiga e exantema (VASCONCELOS et al. 2015. MOIZEIS et al. 2018. BRASIL, 2017).

Existem dois períodos quando se trata de febre Chikungunya, sendo eles fase aguda e crônica. A primeira consiste em alta resposta inflamatória (níveis elevados de mediadores

imunológicos), febre alta e migração das células imunes para articulações e tecidos adjacentes. As dores articulares, que podem ser direcionadas para pequenas e grandes articulações, podem perdurar por meses. Na fase crônica, há uma persistência no quadro de lesões articulares, comete mais pessoas com mais de 45 anos e maior incidência no sexo feminino. As dores articulares podem evoluir e causar limitação de movimento, deformidade e ausência de eritema (VASCONCELOS et al. 2015. MOIZEIS et al. 2018. BRASIL, 2017).

O vírus da chikungunya é um alfavírus envelopado, com RNA de fita simples de senso positivo, portando cerca de 60–70 nm de diâmetro. Apresenta 12kb que contém duas *ORFs* (sequências de leitura abertas) responsáveis por produzir proteínas não estruturais e estruturais. As proteínas não estruturais são representadas por NSP1, NSP2, NSP3 e NSP4, e estruturais por C, E1, E2, E3 e 6K. A E3 e 6k são proteínas associadas a clivagem. As não estruturais formam um complexo proteico para replicação e transcrição viral, sabendo que que a NSP3 persiste por mais tempos nas células hospedeiras. Já as proteínas estruturais, é sabido que a C é a proteína capsídica e as outras são glicoproteínas com cerca de 240 pontos heterodiméricas (SCHWARTZ; ALBERT. 2010. TANABE et al. 2018. REMENYI et al. 2018. HAWMAN. 2017. Weaver et al. 2014. DEEBA et al. 2015)..

CHIKV entra nas células hospedeiras por endocitose através do reconhecimento da proteína E2 com um receptor celular, ou seja, essa proteína tem o papel de ligação viral. É através dela que há um reconhecimento antígeno-anticorpo, posto isso, trata-se de uma proteína com bastante importância para elaboração de uma possível vacina. A proteína E1 é um peptídeo que auxilia na liberação dos nucleocapsídeos no citoplasma, facilita a entrada do vírus na célula hospedeira. Os vírus maduros saem das células infectadas por meio de exocitose por meio de pontos heterodiméricos das proteínas E2 e E1 (SCHWARTZ; ALBERT. 2010. TANABE et al. 2018. REMENYI et al. 2018. HAWMAN. 2017. Weaver et al. 2014. DEEBA et al. 2015).

Hoje sabe-se que dois terços do genoma desse vírus é revertido por guanilato de metila, precursor do conjunto de proteínas não estruturais, referente a primeira *ORF*. A proteína NSP1 tem como função o tamponamento de enzimas, a NSP2 tem dois domínios para atividade de helicase e de protease, a NSP3 responsável pela síntese do material genético viral, e a NSP4 funciona como RNA polimerase. Já a segunda *ORF* tem um terço do genoma e corresponde a proteínas estruturais que são, como já ditas, as glicoproteínas E1 e E2, capsídica e E3 e 6K (peptídeos pequenos) (ABERE et al. 2012. DEEBA et al. 2015).

Os casos de chikungunya são notificados e computados baseados em sintomas na maioria das vezes, mas deveria ser feito por diagnóstico laboratorial para que os dados fossem coletados da melhor forma possível. Quando se trata de diagnóstico laboratorial, geralmente, se faz o isolamento viral em cultura de células para realização de RT-PCR e detecção por anticorpos, como em ensaio imunoenzimático e imunofluorescência indireta. Sabe-se que, por não haver anticorpos específicos para chikungunya, e devido à similaridade com as demais arboviroses, como dengue e zika, muitos diagnósticos ficam inconclusivos, muitas vezes por dar reação cruzada (DEEBA et al. 2015. CAMARA. 2016). A dinâmica do material genético do chikungunya, a reação cruzada e as condições financeiras da população, indica barreiras para um diagnóstico preciso e tratamento específico, tornando-se necessário a criação um diagnóstico rápido específico e acessível, uma vacina e/ou medicamento eficiente (CAMARA, 2016. FAUCI; MORENS, 2012. PERPETUA et al., 2016).

CHIKV sofreu mutações nas proteínas estruturais E1 e E2 que, por sua vez, ocasionou consequências. A glicoproteína E1 teve alteração na porção 226, fazendo que o aminoácido alanina (A226) fosse trocado por valina (V226), e devido a essa nova conformação estrutural, novos casos dessa doença foram aparecendo em meados de 2006. Outra mutação muito significativa foi na proteína E2, onde o aminoácido na posição 252 foi convertido de lisina (K252) para glutamina (Q252), e a partir dessa condição, a interação anticorpo-antígeno foi muito maior, tornando o principal alvo da célula de defesa (PARDO et al. 2016. MAHENDRADAS; AVADHANI; SHETTY, 2013. KAM et al, 2012).

O baculovírus é um vírus que infecta somente células de inseto, ou seja, interação entre receptor da célula hospedeira e viral são específicos para essa classe. Esse vírus é da família Baculoviridae, apresenta cerca 80 a 200 mil pares de base, 25 genes ortólogos e tem capsídeo em forma de bastonete. O baculovírus possui dois diferentes fenótipos: *budded virus* (BV) e *occlusion-derived virus* (ODV). O fenótipo BV é o vírus extracelular que causa a infecção de células do mesmo organismo (infecção sistêmica). Já o ODV, é caracterizado pela oclusão dos vírions, ou seja, apresenta uma camada proteína que protege do ambiente externo para proliferação em depois organismos. Esse vírus é muito utilizado como ferramenta biotecnológica para expressão de proteínas heterólogas, e como exemplo, estudos o apontam como possível vetor de terapia gênica. Além disto, o baculovírus é muito usado, no controle biológico de pragas (HOFMANN et al.1995. NAIK et al. 2018. ROHRMANN, 2011. JE et al. 2003).

3 Materiais e métodos

O estudo foi realizado no laboratório de Virologia e Biologia Molecular do Instituto de Biologia – IB na Universidade de Brasília (UnB) sob orientação do Prof^o Titular Dr. Bergmann Morais Ribeiro, Prof^a Dra Anabele de Azevedo Lima e colaboradores. O projeto foi financiado pela Fundação de apoio à pesquisa do Distrito Federal (FAPDF), e teve colaboração da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e do Centro Universitário de Brasília (UniCEUB).

3.1 Células

Utilizou-se células de inseto IPLB-Sf21AE (VAUGHN et al., 1977), células de *Spodoptera frugiperda*, e BTI-Tn-5B1-4 (Granados et. al., 1994), células de *Trichoplusia ni*, mantidas em temperatura de 27°C no meio TC-100 (Gibco-BRL) suplementado com 10% de soro bovino fetal.

3.2 Plasmídeos e Bactérias

A expressão dos plasmídeos construídos foi feita com bactérias *Escherichia coli* da linhagem DH10Bac (Invitrogen). Os plasmídeos utilizados foram previamente construídos e usados para clonar os genes de interesse.

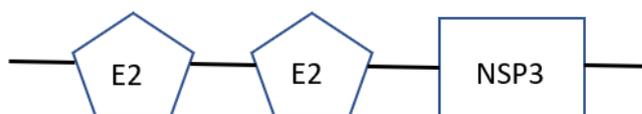
3.3 Isolamento e identificação do gene de interesse

Segundo Yiu-Wing Kam et al. (2012), as proteínas E2 (glicoproteína) e NSP3 (proteína não estrutural), duas das que compõem o vírus da Chikungunya, são responsáveis por apresentarem uma alta eficiência na produção de anticorpos. À vista disso, foram estabelecidas estratégias *in silico* para que essas regiões imunogênicas fossem sintetizadas. A partir da escolha das proteínas E2 e NSP3, foram desenhados oligonucleotídeos específicos para amplificar o fragmento de interesse, que por sua vez, foi sintetizado pela empresa IDT (integrated DNA technologies®). As extremidades dessa região de epítipo apresentam sítios para ação da enzima de restrição de NcoI, utilizada para reação de digestão e purificação do fragmento. Os oligonucleotídeos foram produzidos pela empresa Biomatters.

Foram sintetizadas três sequências de oligonucleotídeos (CHIKV-F, CHIKV-R1 e CHIKV-R2), sendo CHIKV-F e CHIKV-R1 referente a estratégia R1, um multiepítipo baseado na repetição de duas proteínas E2 e uma repetição de NSP3 (E2- E2-NSP3), e a segunda é a estratégia R2 que configura-se em multiepítipo com as mesmas proteínas da R1, porém com

três repetições de E2 e uma de RUSSEL (E2- E2-NSP3- E2) (figura 01). Ambos apresentam cauda de histidina.

Estratégia R1:



Estratégia R2:

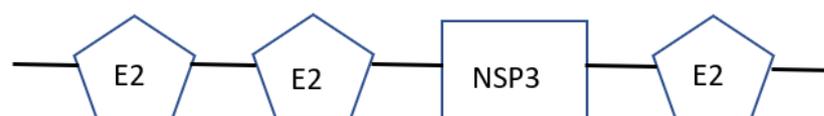


Figura 1 - O esquema refere-se a síntese de dois genes sintéticos que codificam proteínas E2 e NSP3 do vírus CHIKV. A estratégia R1 é um multiepítipo que contém dois epítopos oriundos do gene E2 e um epítipo do gene NSP3. A segunda estratégia (R2) se trata também de um multiepítipo que apresenta três epítopos do gene E2 e um epítipo do gene NSP3. As linhas pretas entre os epítopos são os *linker's* de GGGSGGG. A estratégia R1 e R2 foram desenhados para amplificação dos genes sintéticos pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).

Para amplificação do gene de interesse foi feita a técnica de PCR. A regulação do termociclador foi configurada conforme as instruções dos oligonucleotídeos. Para análise da amplificação, as amostras foram submetidas a técnica de eletroforese com gel de agarose a 1% e tampão TBE 0,5X e a leitura foi feita, a partir da coloração com brometo de etídeo, em luz UV. Todas as fases seguintes estabelecidas para ambas estratégias (R1 e R2).

3.4 Construção do vetor para expressão de proteínas heterólogas (R1 e R2) no corpo de oclusão do baculovírus AcMNPV

Na primeira fase do estudo, o gene de cada estratégia foi amplificado e analisado em gel de agarose 1%, foi eluído pelo kit comercial DNA Gel Band Purification Kit (Illustra GFX PCR - GE Healthcare) e clonado no vetor pGEM-T easy (Promega), que apresentam genes de resistência a ampicilina. A reação de ligação inserto-vetor, foi feita por meio dos comandos conforme as instruções do fabricante (Promega), utilizado a enzima T4 DNA ligase e em uma proporção de 3:1 (inserto:vetor). Essa reação perdurou por 12h a 4°C. Após a reação, a ligação foi transformada em células DH10 β por eletroporação, permaneceram em agitação por 1

horas a 37°C (com meio suplementado e oxigenação para crescimento das bactérias) e plaqueada com ampicilina, X Gal, IPTG em LB sólido.

A partir do crescimento das bactérias recombinantes, as colônias que apresentam coloração esbranquiçada, passaram por um processo de purificação de plasmídeo por meio do kit comercial Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) conforme estabelecido no protocolo do fabricante. Em seguida, o produto dessa purificação foi digerido pela enzima NcoI para haver a liberação o fragmento da estratégia R1 (205 pb) e estratégia R2 (450 pb). A confirmação veio por meio da realização de PCR utilizando os respectivos oligonucleotídeos e análise do gel de agarose a 1%.

Por sequencia, o produto da etapa anterior foi colocado em reação com a enzima de restrição NcoI e ligado ao vetor de transferência pFastBac1® (Invitrogen) e submetido a eletroporação em células DH10β. Esse vetor de transferência (pFastBac1-AMINO) tem o códon de terminação natural da deletado e um sítio de restrição para enzima de NcoI e permite que o gene de interesse se ligue a porção amino-terminal da poliedrina do *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) (ARAÚJO, 2012). Depois da ligação, as bactérias foram plaqueadas em meio LB sólido, com ampicilina e gentamicina. A configuração desse plasmídeo apresenta genes de resistência a ampicilina, gentamicina e cassetes de expressão Tn7 (marcadores de transposon bacteriano). A confirmação veio por meio de PCR usando os oligonucleotídeos específicos e preparados para sequenciado (Macrogen, Coréia do Sul).

3.5 Construção de baculovírus recombinantes contendo regiões do CHIKV

Os vetores de transferência com os genes de interesse foram introduzidos em células DH10Bac (Invitrogen) que contém o bacmídeo, genoma do baculovírus AcMNPV sem o gene da poliedrina. Durante essa reação, por meio de choque elétrico, houve a transposição dos genes multiepítotos para a região de Tn7 (lócus da poliedrina). As colônias que apresentam coloração esbranquiçada (o gene lacZ foi interrompido) foram coletadas e colocadas em meio líquido de LB com canamicina, gentamicina e tetraciclina, e permaneceu em agitação por 12 horas. A extração do DNA plasmidial foi feita por meio de lise alcalina como dito no manual do kit Bac-to-Bac (Invitrogen).. Para confirmação, foi feita PCR com os primers M13R 5'-AGCGGATAACAATTTACACAGG-3', M13F 5'CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3' e CHIKV-F, sendo estes os oligonucleotídeos aconselhado pela Invitrogen. Os vírus recombinantes foram isolados conforme o manual do kit Bac-to-Bac determinou (Invitrogen).

3.6. Purificação de proteínas recombinantes e análise da expressão das proteínas do vírus da CHIKV por SDS-PAGE e Western-blot.

O vírus recombinante com o multiepitopo de CHIKV fusionado a genes do AcMNPV foi encapsulado por lipossomos artificiais após lavagens com SDS 0.5% para purificar (Cellfectin II, INVITROGEN). Esse produto foi transfectado em cultura de BTI-Tn-5B1-4 e mantido a 27°C. (Granados et. al., 1994). Com 72 horas pós infecção, as células foram coletadas, centrifugadas por 5 minutos a 7000 rpm e passadas com Triton 0,25% para ter como produto a purificação dos poliedros. Foi feito o gel de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE) para analisar a marcação proteica, e para tal técnica foi usado solução de 40% de metanol, 10% de ácido acético e Coomassie blue 0,1%, submetidos a 16 horas com leve agitação para corar. Foi descorado em solução de 40% de metanol e 10% de ácido acético por 2 horas, sob leve agitação. Por seguinte, foi realizado a técnica de Western-blot (Hampton et al. (1990), onde as proteínas foram transferidas com o aparato de transferência da Bio-Rad (Trans-Blot® SD – Semi Dry Transfer Cell, para transferência semi-seca) para membrana de PVDF (Millipore) seguindo o protocolo do fabricante e com tampão de transferência (25mM de Tris; 192 mM glicina; 20% metanol, pH 8,2). A membrana foi bloqueada com 3% de albumina e PBS 1X por 16 h, que por sua vez, foi processada e revelada usando o Kit Western Breeze® *Chromogenic Immunodetection Protocol* (Invitrogen), conforme protocolo fornecido pelo fabricante. Usou-se anti-histidina no processo da técnica de Western-blot. A purificação das proteínas foi feita pelo gradiente de sacarose usando 5 ml para cada fase, sendo 5 ml da amostra com as proteínas, e mais 5 concentrações de sacarose a porcentagens diferentes, com a maior concentração de 19,5g de sacarose e a menor de 17,55g de sacarose (JE et al. 2003).

4 Resultados

4.1 Resultados da estratégia R1

Como proposto, o inserto R1 foi amplificado através do uso dos oligonucleotídeos (CHIKV-R1 e CHIKV-F), submetido a um gel de agarose 1% por meio da técnica de eletroforese, e por consequência, apresentou a banda específica de R1 que se aproximava de 205 pares de base (pb) (figura 2).

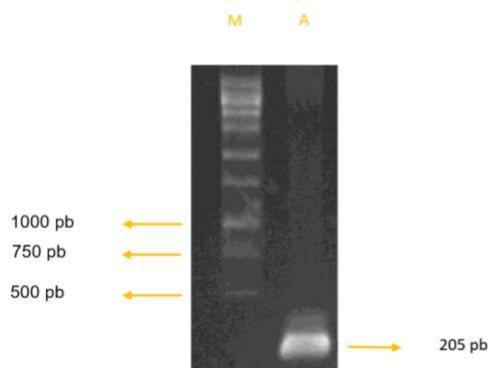


Figura 2 - Confirmação do inserto R1 com o tamanho de 205 pb em gel de agarose 1%, sendo o poço M referente ao marcador molecular 1kb DNA ladder (Promega) e o poço A representando a amostra amplificada por PCR.

Posteriormente, o produto da amplificação foi ligado ao vetor pGEM-T easy e transformado, a partir a cepa de *E. coli* DH10 β , em clones de interesse. Os clones foram comprovados através do gel de agarose 1% que exibiu uma banda referente a 3.220 pb e outra banda para comprar com a primeira, no intuito de confirmação. Essa segunda banda correspondente ao vetor linearizado por causa a enzima de digestão NcoI e apresentou cerca de 3.015 pb (figura 3). Após a confirmação da clonagem como visualizado no gel (figura 3), foi utilizado a enzima de restrição NcoI para digerir e liberar o fragmento 3015 pb.

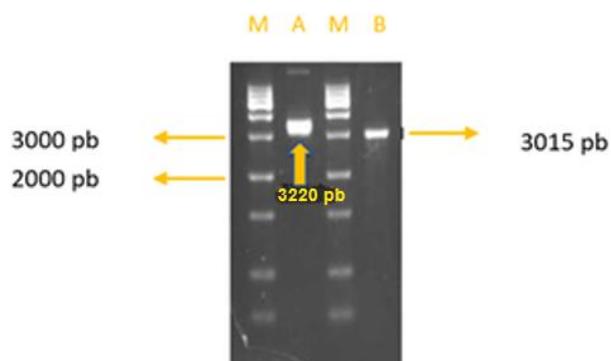


Figura 3 - Gel de agarose 1% onde M é o marcador molecular 1 kb DNA ladder (Promega), A é o poço é referente ao plasmídeo comercial fusionado ao inserto de interesse (R1) correspondendo a 3220, e o poço B é o vetor digerido pela enzima de restrição NcoI com cerca de 3015 pb.

O produto do de interesse, o gene sintético do R1, foi retirado do plasmídeo recombinante e passado para o vetor de transmissão pFast-Amino, que por sua vez, foi clonado com sucesso e apareceu no gel de agarose após a realização da técnica. A visualização da banda ficou próximo de 991 pb (figura 4).

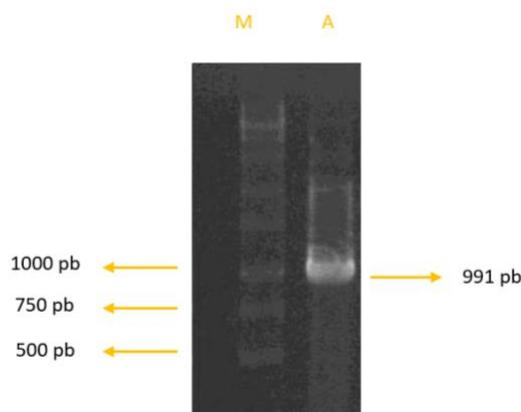


Figura 4 - Registro do gel de agarose 1% referente a ligação entre o pFast-AMINO com o inserto R1, com o poço M sendo o marcador molecular 1kb DNA ladder (Promega) e o poço A correspondente a amostra vinda da amplificação por PCR com a banda de 991 pb.

Uma das primeiras etapas para confirmação dos clones é a coloração esbranquiçada das colônias, visto que há uma interrupção do gene *lacZ*, com o uso dos antibióticos já citados. Depois dessa análise, a confirmação mais exata foi feita por meio da reação de PCR, utilizando os oligonucleotídeos M13 e CHIKV-F. Esses oligonucleotídeos, após a amplificação, nos mostra o sucesso da transposição das regiões alvo da bactéria para o bacmídeo recombinante (figura 5).

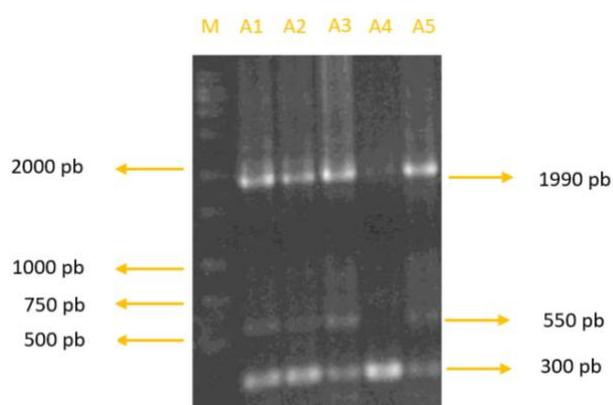


Figura 5 - O gel de agarose 1% nos mostra que as respectivas amostras (A1, A2, A3, A4 e A5) tiveram resultados satisfatórios, visto que, teve a amplificação com os oligonucleotídeos M13 apontou o fragmento na altura de 1900 pb, como proposto no protocolo do fabricante, e a banda de 550 pb referente ao oligonucleotídeos CHIKV-F. O DNA que amplificou na região de 300 pb se refere as colônias que não aderiram o inserto R1, e o poço M é referente ao marcador molecular 1kb DNA ladder (Promega).

Os bacmídeos recombinantes foram purificados após a análise da amplificação do fragmento pela técnica de PCR, como mostrado na figura 4, por um kit já mencionado anteriormente. Mediante a isso, o produto da purificação foi transfectado em células de

inseto BTI-Tn-5B1-4 para a visualização e o acompanhamento o processo citopatológico por 72h. Essa perspectiva nos mostra a evolução da infecção das partículas virais com 24 h.p.i., 48 h.p.i. e 72 h.p.i., sendo que, na última visualização, os poliedros estavam notoriamente visíveis e diferenciáveis de formação de massa proteica (figura 6).

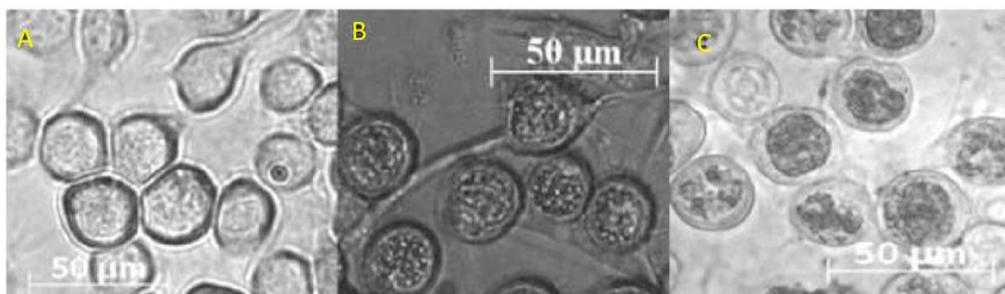


Figura 6 - Foto de microscopia eletrônica das células de *Trichoplusia ni* infectadas com o baculovírus recombinante, sendo A referindo-se a 24 h.p.i, o B a 48 h.p.i e C 72 h.p.i.

Após a obtenção dos poliedros, resultado da infecção dos vírus recombinantes nas células de inseto, estes apresentaram o tamanho de 37 kDa como o esperado. Essas proteínas recombinantes foram submetidas ao processo de eletroforese em poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE) para analisadas conforme o número de horas após a infecção (figura 7).

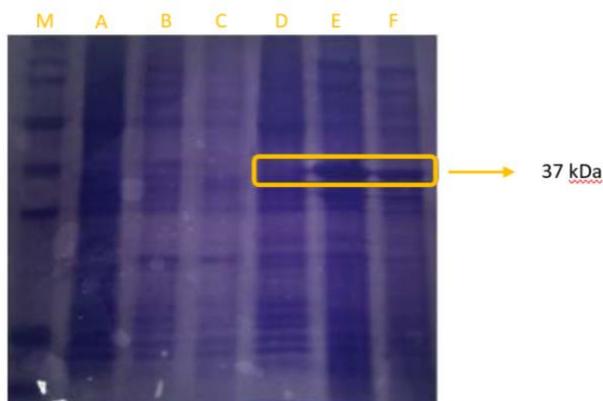


Figura 7 - Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) apresenta as seguintes marcações: M referente ao marcador de peso molecular, A correspondente ao Mock de extrato de células de BTI-Tn-5B1-4 não infectadas, B são as células BTI-Tn-5B1-4 infectadas com AcMNPV selvagem, C é referente as células BTI-Tn-5B1-4 infectadas com AcMNPV fusionado com o pFast-Amino, D configura-se pela fusão do fragmento R1 mais a poliedrina com 24 h.p.i., E configura-se pela fusão do fragmento R1 mais a poliedrina com 48 h.p.i., F configura-se pela fusão do fragmento R1 mais a poliedrina com 72 h.p.i. Os poços das amostras E e F apresentam o tamanho de 37 kDa. No caso dos poços B e C, não foi possível a visualização das proteínas, pois foram perdidas na fase de semi-purificação.

Essas proteínas foram transferidas membrana de nitrocelulose para realização Western blot, que acrescentado imuno marcadores de anti-histidina e anti-mouse. Mediante a isso, foi confirmada a expressão de proteínas heterólogas em células infectadas (figura 8).

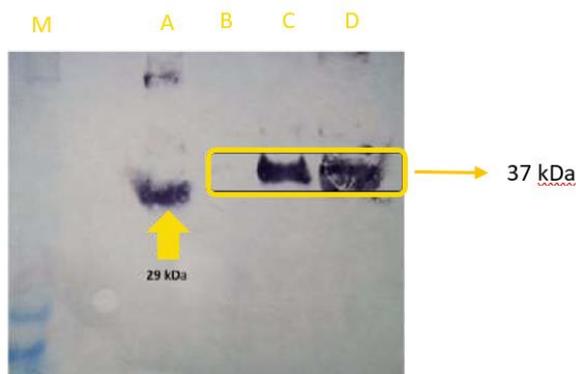
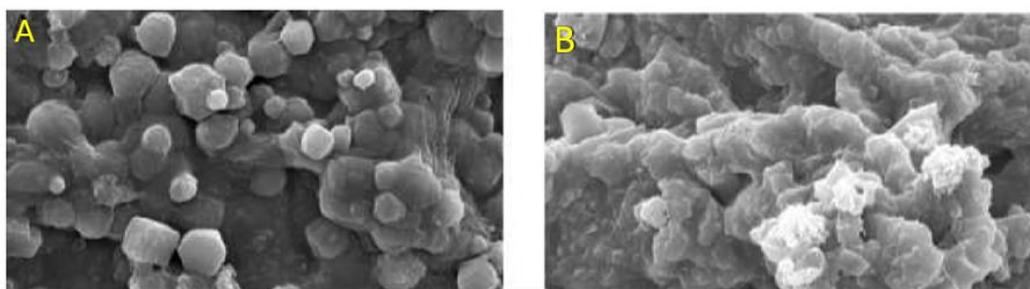


Figura 8 - Técnica de Western blot com os anticorpos (anti-histidina e anti-mouse), sendo M referente ao marcador de peso molecular, A é o controle de células BTI-Tn-5B1-4 infectadas com AcMNPV selvagem com o tamanho de 29 kDa, B representa a purificação dos poliedros fusionadas ao fragmento R1 com 24 h.p.i, C representa a purificação dos poliedros fusionadas ao fragmento R1 com 48 h.p.i, D representa a purificação dos poliedros fusionadas ao fragmento R1 com 72 h.p.i. Tanto o poço C e D apresentam o mesmo tamanho em kDa, sendo ele de 37 kDa.

Por meio da microscopia eletrônica de varredura, e referente a análise comparativa entre poliedros fusionados a proteína interesse e os poliedros fusionados ao vetor pFast-Amino, podemos afirmar que os cristais protéicos apresentam uma diferença morfológica mesmo que o tamanho molecular seja semelhante. Dentre as diferenças, nota-se que os cristais recombinantes são menores e formam grumos proteicos, ao mesmo tempo que, os cristais fusionados com o pFast-Amino formam uma configuração bem definidas e não apresentam grumos (figura 9).

Figura 9 - Foto dos cristais de proteína de baculovírus recombinante, sendo A cristais de



poliedros fusionados ao vetor comercial pFast-Amino e B referente aos os poliedros fusionados ao gene sintético R1. As fotos feitas por microscopia eletrônica de varredura.

4.2 Resultados da estratégia R2

O inserto R2 foi amplificado através do uso dos oligonucleotídeos (CHIKV-R2 e CHIKV-F), submetido a um gel de agarose 1% por meio da técnica de eletroforese, e por consequência, apresentou a banda específica de R1 que estava próximo de 450 pares de base (figura 10).

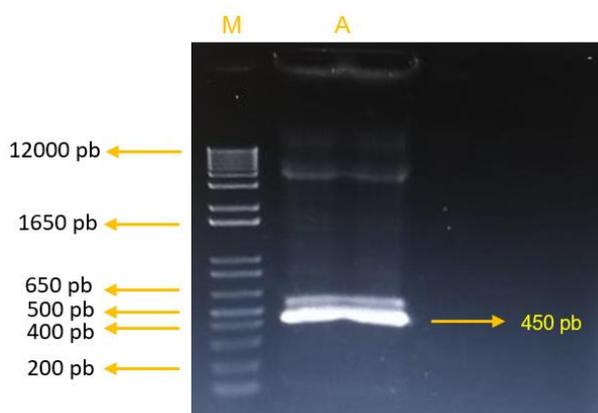


Figura 10 - Gel de agarose 1% confirmando o inserto R2 com o tamanho de 450 pb, sendo o poço M referente ao marcador molecular 1kb Plus DNA Ladder (Promega) e o poço A representando a amostra amplificada por PCR.

Em seguida, o resultado da amplificação foi ligado ao vetor pGEM-T easy e transformado, a partir a cepa de *E. coli* DH10 β por meio de eletroporação. Essa primeira etapa de clonagem ainda não foi feita com sucesso. Depois de algumas tentativas, foi sabido que o lote do pGEM-T easy utilizado estava alterado, e devido a isso, houve um atraso nos experimentos. Logo depois dessa dificuldade, veio a pandemia e todo o processo dessa fase da pesquisa teve que ser suspenso até o retorno normal das atividades.

5 Discussão

Vários casos foram descritos depois do surto em 2016 causado pela infecção do CHIKV. A partir daí, o Brasil e outros lugares afetados deram um grande foco a essa e as arboviroses reemergente. Dentre esses casos descritos, muitos deles tiveram laudos inconclusivos ou eram apenas marcados por sintomas clínicos, e poucos com testes moleculares específicos para diagnóstico eficaz. Sem contar, com os enfermos que não procuraram atendimento. Os testes que presentes hoje tem uma alta reações cruzadas com as demais arboviroses. Devido a isso, é de grande importância desenvolvido de métodos de diagnóstico rápido e eficiente para identificação e benefício da população brasileira e dos países que sofrem com esse

alphavírus. O diagnóstico de precisão nos possibilita agir de forma assertiva, além de oferecer para o governo dados para traçar planos para diminuição da doença (FAUCI; MORENS, 2012. HONÓRIO, 2015. Strauss; Strauss, 1994. WEAVER, 2014).

A partir dessa perspectiva, este trabalho propôs a elaboração de insumos que podem viabilizar a construção de ferramentas para dar aporte contra essa doença. Assim, foi feita a expressão de glicoproteínas do vírus chikungunya a partir de células de insetos por meio da transfecção e sequências de infecção com baculovírus recombinante, este que é muito utilizados como ferramenta biotecnológica, visando a em trabalhos futuros envolvendo vacina e/ ou diagnóstico rápido.

A formação das estratégias deste trabalho foi realizada levando em conta os resultados apresentados no estudo de Kam (2012), Weber (2017) e Bhatnagar (2015), sobre o papel das proteínas E2 e NSP3 na infecção por meio do CHIKV. O estudo aponta, respectivamente, que uma proteína é responsável pela entrada do vírus na células e outra persiste por mais tempo no meio citoplasmático, tornando-se um peça fundamental na quando se trata da transcrição viral. Tais dados suscitou na elaboração da estratégia R1 e R2 a fim de obter, como produto final, proteínas quiméricas que são responsáveis pela acentuação da resposta imune. Assim, os oligonucleotídeos sintetizados foram usados para amplificação dos genes de interesse que produziram a proteína alvo.

Hoje é muito utilizado cromossomo artificial de bactérias (BAC) para técnicas de clonagem de proteínas recombinantes, sendo ele um eficiente sistema de vetor para estudos de biologia molecular. Esses estudos começaram nos anos 70 usando a enzima ligase para fazer a ligação do inserto alvo no DNA bacteriano (MYERS, 1999). No presente trabalho, foram usados o pGEM e o pFastBac1 para clonagem dos genes de interesse. A estratégia R1 obteve sucesso em todas as etapas de clonagem, porém, na estratégia R2 foi amplificada, mas ainda não foi possível cloná-la.

A estratégia R1, após a clonagem no pGEM e confirmação, foi usado o plasmídeo pFastBac1 que apresenta um gene que codifica a produção da enzima β -galactosidase. Esse gene é chamado de lacZ e tem um importante papel de regulação da expressão gênica (JUERS; MATHEWS; HUBER, 2012. RUSSEL; SAMBROOK, 2001). Visto isso, a fácil detecção de colônias que aderiram ou não o inserto (seleção prévia com confirmação a partir da PCR), já que a *E. coli* DH10Bac possui um gene do lacZ e geralmente só é clivado quando o inserto se adere ao plasmídeo, ou seja, quando a coloração da colônia está da cor azul, estas são descartadas.

O pFAST-amino é um vetor comercial que apresenta promotor da poliedrina do AcMNPV e, por conta desse promotor, consegue expressar proteínas heterólogas. A bactéria *E. coli* DH10BAC tem o genoma completo do baculovírus AcMNPV, logo, possui o sítio de transposição Tn7. Sabendo disso, há uma transferência do pFAST-amino contendo a estratégia R1 para esse sítio de transposição Tn7, e a partir desse processo, foi construído o bacmídeo recombinante com o inserto R1 (RIBEIRO et al., 2015).

As proteínas usadas vêm do fracionamento por meio de eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE). A técnica de Western blot é uma técnica específica e elaborada, pois utiliza detecta anticorpo contra antígenos alvo, ou seja, é um procedimento para confirmação e quantificação da proteína alvo, de processo longo e caro. (BRUNETTE, 1981). Após a infecção das células de inseto com os baculovírus recombinantes associado ao inserto R1, os possíveis corpos de oclusão foram purificados e analisados por microscopia eletrônica, SDS-PAGE e Western blot. Os epítomos detectados por anticorpos específicos na técnica de Western blot mostrou a expressão da proteína e a fusão da poliedrina na banda de 37 kDa o que confirma a formação da proteína quimera de interesse.

Segundo HAWKMAN (2017), uma mutação no E2 (K200R) e a deleção de 3'-UTR contribuíram causar uma nova forma de virulência, causando um patologia mais aguda e crônicas. Alguns estudos mostraram que a proteína E2 é de grande relevância imunológica, mostram ela como um atuante unitária, mas no estudo propomos um multiepítomo com repetições de E2 e NSP3 tentando potencializar a resposta imunitária.

Vários estudos apontam que o uso de baculovírus é uma ferramenta biotecnológica e importantíssima, que não infectam células humanas e são utilizadas como sistema de expressão de proteínas heterólogas, assim como, possíveis vetores para terapia gênica, e para expressar tais genes neles (ROHRMANN, 2011. QUEIROZ, 2017). Mediante ao exposto, os genes de interesse foram expressos pelo promotor polh do AcMNPV, tendo em vista que em outros estudos essa técnica mostrou eficiente na expressão dos genes heterólogos e, além de facilitar a purificação da glicoproteína recombinante em corpos de oclusão do baculovírus.

O baculovírus é muito utilizado como vetor de expressão em vários estudos, isso porque apresentam uma gama de vantagens e é configurado como um modelo simples. Essas vantagens são: os receptores de interação célula hospedeira e baculovírus são altamente específicos, tornando-o seguro; apresenta um grande potencial na hora de expressar proteínas heterólogas; consegue clonar fragmentos longos, além de expressar mais de dois

genes; consegue expressão de proteínas complexas de eucarioto; têm promotores que permanecem ativos mesmo na fase tarde, e assim, não interrompe o ciclo viral; mecanismos simples de manipulação. A utilização desse vetor permite a troca entre o gene da poliedrina do baculovírus e o gene heterólogo de interesse que será expressa por meio do promotor da poliedrina, mas sem a formação de poliedrina. Essa troca resultará na formação dos corpos de oclusão, logo, acarretará na produção do vírus recombinante com epítomos específicos de CHIKV em baculovírus AcMNPV.

A expressão dessas proteínas alvo nas células de inseto - expressão em eucarioto - proporcionam um ambiente similar às células de mamífero por apresentarem vias de glicosilação de proteínas, condições para que ocorra o dobramento adequado a estrutura proteica, oligomerização e modificações pós-transducionais. Dessa forma, as proteínas se tornam mais aptas e menos susceptíveis a mutação ou a falha na função proteína (MARTINS; FILHO. 2010. BLAKE et al. 2003).

Algumas técnicas de diagnóstico são utilizadas para detecção do vírus Chikungunya, sendo elas RT-PCR (*Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction*) e o qRT-PCR (*Real Time RT-PCR*), ELISA. No caso do do ELISA, acontece de não ter a sensibilidade necessária para diferenciação entre as arboviroses recorrentes, isso porque essas viroses apresentam estruturas de reconhecimento anticorpo-antígeno similares. Se faz necessário a utilização de epítomos específicos para diminuir ao máximo ou anular essa similaridade, deixando específico o teste usado (RUSSELL et al. 2016. MOIZEIS et al. 2018). Desse modo, o presente estudo expressou um multiepítomo de CHIKV com intuito de aumentar a especificidade da glicoproteína para que, em estudos futuros, kits de diagnóstico sejam produzidos, a fim de resposta rápida e específica.

As vacinas têm um grande papel na constância da espécie humana e em outras, e a partir delas diversas doenças foram erradicadas. Esses últimos anos, novas descobertas por meio da pesquisa trouxeram alguns métodos na produção delas, sendo vacina inativada, vacina vírus vivo atenuado, vacina de subunidade, vacina de vírus recombinante, vacina quimérica, vacina com partícula viral (VLP) e vacina de ácido nucleico (GAO; SONG; ZHANG, 2019.).

Hoje, há uma vacina em processo de testagem na fase dois para CHIKV com índices significativos de resposta imune. Essa vacina é de vírus recombinante por meio de vetor associada ao vírus do sarampo. Nesse, estudo foram feitos três vírus recombinantes excluindo

a proteína E1 ou E3 para desempenhar a expressão de diversos antígenos combinando um deles com E2 e 6K. Como já dito, o NSP3 foi testado e apresentou uma titulação elevada de anticorpos por persistir por mais tempo nas células hospedeiras, além de fazer parte na composição do complexo proteico que responsável pela replicação e transcrição viral. A E2 é estrutural e de grande importância, porque está associada a ligação antígeno-anticorpo. Então a viabilidade das estratégias desenvolvidas nesse trabalho são coerentes com estudos que estão sendo testados e desenvolvidos na atualidade (GAO; SONG; ZHANG, 2019. Kay et al. 2019).

Uma vacina é considerada bem-sucedida quando está ligado com a capacidade aumentada de resposta do sistema imune e que a memória celular perdura a longo prazo, além de ter efeitos colaterais mínimos. Estudos apontam que as vacinais que obtiveram maior sucesso foram com fragmento glicoconjugados (Kay et al. 2019). A vacina de vírus recombinante dispõe de algumas vantagens: a produção em larga escala que oferece um custo menor, a eficiência é maior, não de um ambiente resfriado, induz produção de resposta celular, não são afetados por anticorpos maternos e por ser co-administrada para multiepítomos de um patógeno (KANO et al. 2007. COX, 2012). A conjugação dos epítomos específicos E2 e NSP3 do CHIKV pode trazer uma resposta imune maior que a maioria, por aumentar essa comunicação antígeno-anticorpo.

6 Conclusão

Nesse estudo, foi criada uma nova estratégia, chamada de R1, onde os epítomos específicos de chikungunya foram fusionados a poliedrina e expressos em AcMNPV formando o vírus recombinante. Essa expressão originou as proteínas recombinantes específicas que podem possibilitar, em estudos futuros, a produção de um kit diagnóstico rápido e um produto para produção de vacina. Já a estratégia R2, devido aos imprevistos, serão feitos experimentos para elaboração de baculovírus recombinante com inserto R2 pretendendo obter resposta imune para comparar com a estratégia R1 e, a partir daí, trilhar novos caminhos tendo em vista o melhor desempenho para um kit diagnóstico e/ou vacina.

Referências

- ABERE, Bizunesh et al. Proteomic Analysis of Chikungunya Virus Infected Microglial Cells. **Plos One**. v. 7, n.4, p.1-11 Abr, 2012.
- ARAÚJO, DANIEL. **Baculovírus recombinantes expressando toxina inseticida de aranha caranguejeira causam morte celular precoce durante infecção in vitro**. 2012. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular)— Universidade de Brasília, Brasília.
- BHATNAGAR, S., et al., Evaluation of multiple antigenic peptides based on the Chikungunya E2 protein for improved serological diagnosis of infection. **Viral Immunol**, v.28, n.2, Mar, 2015.
- BLAKE, William et al. Noise in eukaryotic gene expression. **Nature: Scientific Reports**. v. 422, p. 633-637 Abr, 2003.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em Saúde. **Chikungunya: Manejo Clínico**. Brasília, DF, Fev,2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em Saúde. **Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, chikungunya e Zika), Semanas Epidemiológicas 01 a 52**. Brasília, DF, v.51, Jan, 2020.
- BRUNETTE, Neal. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. **Analytical Biochemistry**. v. 112, p. 195-203, Abr, 1981.
- CAMARA, Tamara. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. **Revista Saúde Pública**. v. 50, n.36, p. 1-7. Mar, 2016.
- CARRILLO, Fausto et al. Epidemiological Evidence for Lineage-Specific Differences in the Risk of Inapparent Chikungunya Virus Infection. **Journal of Virology**. v. 93, Fev, 2019.
- CHEN, Grace et al. Effect of a Chikungunya Virus–Like Particle Vaccine on Safety and Tolerability Outcomes. **JAMA**. v.323, p. 1369-1377, Apr, 2020.
- COX, Manon. Recombinant protein vaccines produced in insect cells. **Elsevier Vaccine**. v. 30. p. 1759-1766. Fev, 2012.
- DEEBA, Farah et al. Chikungunya virus: recent advances in epidemiology, host pathogen interaction and vaccine strategies. **Oxford Academic: Pathogens and Disease**. v. 74, n. 3, Abr, 2015.

FAUCI, Anthony; MORENS, David. The Perpetual Challenge of Infectious Diseases. **The New England Journal of Medicine**. v.366, p. 454-461, Fev, 2012.

GAO, Shan; SONG, Siqi; ZHANG, Leiliang. Recent Progress in Vaccine Development Against Chikungunya Virus. **Frontiers in Microbiology**. v.10, p. 2881, Dec. 2019.

HONÓRIO, Nildimar et al. Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. **Caderno Saúde Pública**, v.31, p. 1-3, Mai, 2015.

GRANADOS, R. R.; GUOXIN, L.; DERKSEN, C. G. & MCKENNA, K. A. A. A new insect cell line from *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4) susceptible to *Trichoplusia ni* single enveloped nuclear polyhedrosis virus. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 64 , p. 260- 266, Nov, 1994

HAWMAN, David et al. Mutations in the E2 Glycoprotein and the 3' Untranslated Region Enhance Chikungunya Virus Virulence in Mice. **Journal of Virology**. v. 91, p. 1-17, Out, 2017.

HOFMANN, C. et al. Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.92, p. 10009-10103. Out, 1995.

JE, Yeon et al. Baculovirus expression vectors that incorporate the foreign protein into viral occlusion bodies. **Biotechniques**, v.34, n.1, p. 81-87, Jan, 2003.

Jl, Xiaoyun et al. How baculovirus polyhedra fit square pegs into round holes to robustly package viruses. **The EMBO Journal**. v. 29, p. 505-514. Jan, 2010.

JUERS, Douglas; MATHEWS, Brian; HUBER, Reuben. LacZ β -galactosidase: Structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. **Protein Science**. v. 21, p. 1792–1807, Nov, 2012.

KAM, Yiu-Wing et al. Longitudinal Analysis of the Human Antibody Response to Chikungunya Virus Infection: Implications for Serodiagnosis and Vaccine Development. **Journal of Virology**, v. 86, p. 13005-13015, Dez, 2012.

KANO, Flora et al. DNA vaccines: general concerns and its applications in human and veterinary medicine. *Semina*. v. 28, p. 709-726. Dezembro, 2007.

KAY, Emily; CUCCUI, Jon; WREN, Brendan. Recent advances in the production of recombinant glycoconjugate vaccines. **Nature Partner Journals Vaccines**. v. 16, p. 1-8. Mai, 2019.

LUMSDEN, W. 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, p. 33-57, Jan, 1955.

- MAHENDRADAS, Padmamalini; AVADHANI, Kavitha; SHETTY, Rohit. Chikungunya and the eye: a review. **Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection**. v.3, n.35, p.1-9, Fev, 2013.
- MARSTON, Hilary et al. Emerging Viral Diseases: Confronting Threats with New Technologies. **Science Translational Medicine**, v. 6, 10, Set, 2014.
- MARTINS, Emerson; FILHO, Paulo. Mecanismo de expressão gênica em eucarioto. **Revista da biologia - USP**. v.4, p.1-5, Jun, 2010.
- MOHAMED, Souand et al. Evolution of Chikungunya virus in mosquito cells. **Nature: Scientific Reports**. v. 8, Nov, 2018.
- MOHAN, Alladi et al. Epidemiology, clinical manifestations, and diagnosis of chikungunya fever: lessons learned from the re-emerging epidemic. **Indian Journal of Dermatology**. v.55, n.1, p.54-63. Mar, 2010.
- MOIZEIS, Raiza et al. Chikungunya fever: a threat to global public health. **Pathogens and Global Health**. v.4, p.182–194. Jun, 2018.
- MORDECAI, Erin et al. Detecting the impact of temperature on transmission of Zika, dengue, and chikungunya using mechanistic models. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v. 11, p. 1-18, Abr, 2017.
- MOULAY, D. et al. The chikungunya disease: Modeling, vector and transmission global dynamics. **Elsevier: Mathematical Biosciences**, v. 229, p. 50-63, Jan, 2011.
- MUYRERS, Joep et al. Rapid modification of bacterial artificial chromosomes by ET-recombination. **Nucleic Acids Research**, v.27, p.1555–1557, Mar, 1999.
- NAIK, Nenavath et al. Baculovirus as an efficient vector for gene delivery into mosquitoes. **Nature: Scientific Report**. v. 8, p. 1-14. Dez, 2018.
- PARDO, Lissethe et al. Análisis filogenético del virus del chikungunya en Colombia: evidencia de selección purificadora en el gen E1. **Biomédica: Revista del Instituto Nacional de Salud** v. 36, n.2, p.25-34, Ago, 2016.
- PERPETUA, A. et al. Chikungunya: a visão do clínico de dor. **Revista Dor**. v.17, n.4, p.229-302. Out, 2016.
- QUEIROZ, Jackson et al. Design and Validation of Primers In Silico for Detection of Human Respiratory Syncytial Virus. **Revista FIMCA**, v. 4, p. 17-30, Dez, 2017.
- REMENYI, Roland et al. Persistent Replication of a Chikungunya Virus Replicon in Human Cells Is Associated with Presence of Stable Cytoplasmic Granules Containing Nonstructural Protein 3. **Journal of Virology**. v. 92, p. 1-24, Jul, 2018.

RIEMERSMA, Kasen et al. Chikungunya Virus Fidelity Variants Exhibit Differential Attenuation and Population Diversity in Cell Culture and Adult Mice. **Journal of Virology**, v.93, p.1-19, Feb, 2019.

RIBEIRO, Bergmann et al. **Baculovirus para expressão de proteínas recombinantes em células de insetos**. In: Rodrigo Ribeiro Resende; Carlos Ricardo Soccol. (Org.). *Biotecnologia Aplicada à Saúde - Volume 2*. 1 ed. São Paulo: Blucher., v. 2, p. 255-306, 2015.

RIBEIRO, Bergmann et al. Characterization of a baculovirus infecting the passion fruit caterpillar *Dione juno juno*. **Biocell**. v.21, p.71-82, Jan, 1997.V

ROBINSON, Marion. An epidemic of virus disease in southern province, tanganyika territory, in 1952-53. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**. v. 49, n. 1. p. 28-32, jan, 1955.

ROHRMANN, George. **Baculovirus Molecular Biology**. 3.ed. National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda (MD), Jan, 2011.

RUDOLPH, Kara. Incubation Periods of Mosquito-Borne Viral Infections: A Systematic Review. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**. v. 90, p. 882-891, Mai, 2014.

RUSSEL, Bertrand; SAMBROOK, Joseph. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3. Ed. New York: Cold Spring Harbor, v.1, 2001.

SAITO, Yutaka et al. Developing a codon optimization method for improved expression of recombinant proteins in actinobacteria. **Nature: Scientific Reports**. v. 9, p. 1-10, Jun, 2019.

SCHWARTZ, Olivier; ALBERT, Matthew. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. **Nature: Reviews Microbiology**, v. 8, p. 491–500, Jul, 2010.

SHRESTHA, Binesh et al. Baculovirus expression vector system: an emerging host for high-throughput eukaryotic protein expression. **Methods in Molecular Biology**. v. 439, p. 269-289, Out, 2008.

SILVA, LEONARDO ASSIS DA. **Expressão de antígenos virais fusionados a uma proteína formadora de corpos de oclusão de um vírus de inseto**. 2016. Tese (Doutorado em Patologia Molecular) – Universidade de Brasília - Brasília.

SMITH, G. E.; VLAK, J. M.; SUMMERS, M. D. Physical analysis of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus transcripts for polyhedron and 10.000 molecular weight protein. **Journal of Virology**. v. 45, n. 1, p. 215-25, Jan 1983.

SOURISSEAU, Marion et al. Characterization of reemerging chikungunya virus. **Plos Pathogens**. v. 3. n.6, p.804-817, Jun, 2007.

SOUZA, Thiago et al. Emergence of the East-Central-South-African genotype of Chikungunya virus in Brazil and the city of Rio de Janeiro may have occurred years before surveillance detection. **Nature: *Scientific Reports***, v. 9, p. 1-7. Fev, 2019.

STRAUSS JH, STRAUSS EG. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. **Microbiol. Rev.** v.58, p.491–562, Sep, 1994.

TANABE, Ithallo et al. Cellular and Molecular Immune Response to Chikungunya Virus Infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 8, p. 1-15, Out, 2018.

TJADEN, Nils et al. Modelling the effects of global climate change on Chikungunya transmission in the 21st century. **Nature: *Scientific Reports***, v. 7, p. 1-11, Jun, 2017.

VAUGHN, J. et al. The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). **In vitro**. v. 13, p. 213-217, Abr, 1977.

VASCONCELOS, Pedro et al. Chikungunya risk for Brazil. **Revista de Saúde Pública**. v. 49, p. 1-6. Mar, 2015.

Weaver, Scott. Arrival of Chikungunya Virus in the New World: Prospects for Spread and Impact on Public Health. **Plos Neglected Tropical Diseases**. v.8, n.6, p.1-4, Jun, 2014.

WEBER, C. et al. Identification of Functional Determinants in the Chikungunya Virus E2 Protein. **PLoS Negl Trop Dis**. v.11, p. 1-19, Jan, 2017.