



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

RAFAELA SPESSEMILLE VALOTTO

**CARACTERIZAÇÃO DE ANTÍGENOS E PRODUÇÃO DE
ANTICORPOS ANTI-PEPTÍDEOS DOS VÍRUS DENGUE, ZIKA E
CHIKUNGUNYA**

VITÓRIA, ES

2021

RAFAELA SPESSEMILLE VALOTTO

**CARACTERIZAÇÃO DE ANTÍGENOS E PRODUÇÃO DE
ANTICORPOS ANTI-PEPTÍDEOS DOS VÍRUS DENGUE, ZIKA E
CHIKUNGUNYA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Marco Cesar
Cunegundes Guimarães

VITÓRIA, ES

2021

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

V198c Valotto, Rafaela Spessemille, 1996-
Caracterização de antígenos e produção de anticorpos anti peptídeos dos vírus dengue, Zika e chikungunya. / Rafaela Spessemille Valotto. - 2021.
70 f. : il.

Orientador: Marco Cesar Cunegundes Guimarães.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Imunologia. 2. Bioinformática. 3. Peptídeos. 4. Dengue. 5. Vírus da Zika. 6. Chikungunya. I. Guimarães, Marco Cesar Cunegundes. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

RAFAELA SPESSEMILLE VALOTTO

**CARACTERIZAÇÃO DE ANTÍGENOS E PRODUÇÃO DE
ANTICORPOS ANTI-PEPTÍDEOS DOS VÍRUS DENGUE, ZIKA E
CHIKUNGUNYA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 07 de outubro de 2021.

**Prof. Marco Cesar Cunegundes
Guimarães**

**Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador**

Prof. Daniel de Oliveira Gomes

Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Ricardo Andrez Machado de Ávila

**Universidade do Extremo Sul
Catarinense**

VITÓRIA, ES

2021

À todos os profissionais da
saúde e pesquisadores, pela
luta contra a COVID-19.

AGRADECIMENTOS

À minha família, Helena (*in memoriam*), Carlos e Romanélia, por me mostrarem o caminho a ser seguido e por me ajudarem incansavelmente a permanecer nele. Sou muito grata por tudo que foi feito para que eu chegasse aqui.

Ao meu namorado Lukas, por estar ao meu lado ao longo dessa caminhada. Seu apoio foi e ainda é fundamental para que eu alcance todos os meus objetivos em minha vida. Os problemas são muito mais fáceis de serem vencidos tendo você como parceiro.

Ao professor Marco Guimarães, por me guiar na pesquisa de forma paciente e entusiasmada. Sua orientação e confiança foram importantes em todos os momentos.

Aos professores Ricardo Andrez e Daniel Gomes, por aceitarem contribuir com este trabalho.

Aos professores Ricardo Andrez, Itabajara Vaz, Jones Bernardes, Maria Juliano e Flávio Guimarães, por contribuírem de maneira contundente neste estudo, com discussões e apoio no desenvolvimento de experimentos em seus laboratórios. Em meio à uma pandemia com diversas restrições físicas, o suporte dos senhores foi fundamental para a realização deste estudo.

Aos professores Jairo Oliveira e Breno Valentim, por sempre estarem presentes, se preocupando, conversando, tirando dúvidas e fazendo com que o laboratório fosse um ambiente de discussões produtivas, mas ao mesmo tempo leve e divertido.

À todos os companheiros e ex-companheiros de laboratório, em especial Flávio, Wanderson, Paulo, Laryssa, Beto, Tadeu, Ariany, Gabriel, Bruno, Natane, Sady e Rafaella, pela convivência, brincadeiras, companheirismo, discussões e contribuições. O dia a dia se tornou mais leve tendo vocês como colegas.

Aos colegas da turma de mestrado, pela convivência durante as disciplinas, parcerias nos seminários, lanches nos intervalos e almoços. Os dias foram mais alegres com vocês.

Aos laboratórios parceiros, Laboratório de Nanomateriais Funcionais (UFES), LUCCAR (UFES), Laboratório de Fisiopatologia Experimental (UNESC), Escola de Medicina (UNIFESP), Laboratório de Imunologia Aplicada à Sanidade Animal (UFRGS), Laboratório de Virologia Molecular e Aplicada (UFMG) e LETC (UFES).

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela oportunidade de obtenção deste título.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Federal do Espírito Santo, pelo apoio institucional e auxílios financeiros concedidos.

RESUMO

VALOTTO, R. S. **Caracterização de antígenos e produção de anticorpos anti-peptídeos dos vírus dengue, Zika e chikungunya.** 2021. 70f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

Dengue, Zika e chikungunya são responsáveis por epidemias em diversos países. No Brasil, a população já enfrentou epidemias simultâneas dessas doenças. As formas de diagnóstico são semelhantes entre elas, podendo variar entre testes sorológicos, RT-PCR e testes de captura de antígeno. Atualmente, parte dos esforços se concentram no desenvolvimento de testes de baixo custo, com resultado rápido e que não demandem estrutura laboratorial, facilitando assim sua execução em regiões com poucos recursos. Nesse cenário, o teste de captura de antígeno é um ótimo candidato, aparecendo como uma alternativa aos testes já estabelecidos. A NS1 do DENV, a NS1 do ZIKV e a E2 do CHIKV são proteínas virais que recebem destaque nos estudos para o desenvolvimento de kits de captura de antígeno, pois são mais facilmente detectadas em amostras infectadas em comparação à outras proteínas. Pensando nisso, realizaram-se predições *in silico* utilizando ferramentas de bioinformática a fim de saber quais regiões dessas proteínas eram antigênicas, correspondiam à um epítipo, eram acessíveis, hidrofílicas e não estavam presentes em uma volta- β . Os 2 peptídeos preditos de cada proteína que atenderam ao maior número de características desejadas foram sintetizados e passaram por caracterização em HPLC e espectrometria de massas. Em seguida, foram inoculados em coelhos para produção de anticorpos contra cada antígeno. Os soros foram coletados, e *Dot blots* e *Western blots* foram realizados. Os peptídeos preditos foram ¹⁰³SLRPQPTELKY¹¹³ da NS1 DENV-2, ¹¹¹YKYSWKSWGKA¹²¹ da NS1 DENV-1, ²³⁸ESDLIIPKSLAGPLSH²⁵³ e ⁸³GVQLTVVVGSG⁹² da NS1 ZIKV, e ²⁴EGHSCHSPVAL³⁴ e ¹⁴⁷HGKELPCSTYVQS¹⁵⁹ da E2 CHIKV. A partir dos resultados do *Dot blot*, pôde-se perceber que todos os soros produzidos apresentaram anticorpos anti-peptídeos, pois todos mostraram interação com os peptídeos. Como no *Western blot* utilizaram-se as proteínas completas no lugar dos peptídeos, alguns resultados divergiram do anterior. De todos os soros produzidos, o anti-SLR, anti-YKY e anti-ESD apresentaram interação com as proteínas completas expressas em *Escherichia coli* e células HEK293, com exceção dos soros contra peptídeos da E2 CHIKV, que foram testados apenas com a proteína expressa em células de inseto contendo baculovírus recombinante, e o soro anti-EGH reagiu à proteína.

Palavras-chave: Dengue. Zika. Chikungunya. Bioinformática. Peptídeos.

ABSTRACT

VALOTTO, R. S. **Antigen characterization and production of antipeptide antibodies against dengue, Zika and chikungunya virus.** 2021. 70f. Dissertation (Master in Biotechnology) - Postgraduation Biotechnological Programme, UFES, Espírito Santo. Brazil.

Dengue, Zika and chikungunya viruses are responsible for outbreaks in several countries. In Brazil, the population has already faced simultaneous epidemics of these diseases. Diagnosis type are similar between diseases and may range between serological tests, RT-PCR and antigen tests. Currently, part of the efforts are focused on the development of low-cost tests, with quick results and that not require a laboratory structure, thus facilitating their execution in regions with few resources. Therefore, the antigen test is a great candidate, appearing as an alternative to established tests. DENV NS1, ZIKV NS1 and CHIKV E2 are viral proteins that are the focus of studies for the development of antigen detection kits, as they are more easily detected in infected samples compared to other proteins. Thus, *in silico* predictions were performed using bioinformatics tools in order to know which regions of these proteins were antigenic, corresponding to an epitope, were accessible, hydrophilic and were not present in a β -turn. The 2 predicted peptides of each protein that achieved the greatest number of desired characteristics were synthesized and characterized by HPLC and mass spectrometry. Then, they were inoculated into rabbits to produce antibodies against each antigen. Sera were collected, and Dot blots and Western blots were performed. The predicted peptides were ¹⁰³SLRPQPTELKY¹¹³ (DENV-2 NS1), ¹¹¹YKYSWKS WGKA¹²¹ (DENV-1 NS1), ²³⁸ESDLIIPKSLAGPLSH²⁵³ and ⁸³GVQLTVVVG S⁹² (ZIKV NS1), ²⁴EGHSCHSPVAL³⁴ and ¹⁴⁷HGKELPCSTYVQS¹⁵⁹ (CHIKV E2). From Dot blot results it could be seen that all sera produced presented antipeptide antibodies, seeing that all showed interaction with the peptides. As the Western blot used full length proteins instead of peptides, some results diverged from the previous one. Of all produced sera, anti-SLR, anti-YKY and anti-ESD showed interaction with full length proteins expressed in *Escherichia coli* and HEK293 cells, with the exception of sera against CHIKV E2 peptides, which were tested only with the expressed protein in insect cells containing recombinant baculovirus, and the anti-EGH serum reacted to protein.

Key words: Dengue. Zika. Chikungunya. Bioinformatics. Peptides.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Estruturas virais atômicas do DENV (A), ZIKV (B) e CHIKV (C) geradas por microscopia crioeletrônica. Em (A) e (B) é possível visualizar as proteínas do envelope em amarelo e rosa. Os pontos vermelhos em (A) e azuis em (B) representam as glicosilações. Em (C) a proteína do envelope 1 aparece em azul escuro e a proteína do envelope 2 em azul claro (DENGUE, 2008; ZIKA, 2016; SUN *et al.*, 2013).....22
- Figura 2. Organização genômica do DENV e ZIKV (A), e do CHIKV (B), demonstrando as proteínas resultantes da tradução. (Adaptado de ONG; LUM; NG, 2014).....23
- Figura 3. Alinhamento da NS1 DENV-1 com a isoforma 3 da proteína associada à espermatíde, com 2 matches e o máximo de 4 aminoácidos em sequência.....42
- Figura 4. Alinhamento da NS1 DENV-4 com a isoforma 3 da proteína dedo de zinco 26, com 1 match e o máximo de 4 aminoácidos em sequência.....43
- Figura 5. Alinhamento da NS1 ZIKV com a isoforma 1 da miosina não-convencional XVI, com 2 matches e o máximo de 2 aminoácidos em sequência.....43
- Figura 6. Níveis de antigenicidade e hidrofobicidade ao longo dos peptídeos, gerados pelo recurso PROTEAN 3D, hospedado no *software* DNASTAR 17. Cada conjunto de análises é referente ao epítipo melhor classificado de cada sorotipo do DENV de acordo com as características desejadas. Assim, as sequências analisadas foram as seguintes: (A) ¹¹¹YKYSWKS₁₂₁ da NS1 DENV-1, (B) ¹⁰³SLRPQPTELKY¹¹³ da NS1 DENV-2, (C) ²⁴¹MIIPKSLAGP²⁵⁰ da NS1 DENV-3 e (D) ⁸⁴HDLTVVAGDVKGVLT⁹⁸ da NS1 DENV-4.....47
- Tabela 7. Alinhamentos das sequências ¹¹¹YKYSWKS₁₂₁ da NS1 DENV-1 (A) e ¹⁰³SLRPQPTELKY¹¹³ da NS1 DENV-2 (B) com os mesmos intervalos nos outros sorotipos do DENV, obtidos no *software* Jalview 2.11.1.4. As setas indicam os peptídeos inicialmente preditos pelos *softwares* online Immunomedicine Group e IEDB and Analysis Resource. A partir dos alinhamentos é possível verificar o nível

de consenso entre os peptídeos, ou seja, a porcentagem de aparecimento de cada aminoácido em uma determinada posição.....48

Figura 8. Conformação 3D dos epítomos ¹¹¹YKYSWKS WGKA¹²¹ da NS1 DENV-1 e ¹⁰³SLRPQPTELKY¹¹³ da NS1 DENV-2 nos 4 sorotipos do DENV. As estruturas quaternárias foram geradas pelo *software* Chimera 1.13. (A) DENV-1; (B) DENV-2; (C) DENV-3; (D) DENV-4.....49

Figura 9. Epítomos ²³⁸ESDLIIPKSLAGPLSH²⁵³ e ⁸³GVQLTVVVG S⁹² da NS1 ZIKV selecionados na estrutura quaternária da proteína.....51

Figura 10. Alinhamentos das sequências selecionadas da NS1 DENV e da NS1 ZIKV. (A) ²³⁸ESDLIIPKSLAGPLSH²⁵³ (ZIKV) e ¹¹¹YKYSWKS WGKA¹²¹ (DENV-1); (B) ²³⁸ESDLIIPKSLAGPLSH²⁵³ (ZIKV) e ¹⁰³SLRPQPTELKY¹¹³ (DENV-2); (C) ⁸³GVQLTVVVG S⁹² (ZIKV) e ¹¹¹YKYSWKS WGKA¹²¹ (DENV-1); (D) ⁸³GVQLTVVVG S⁹² (ZIKV) e ¹⁰³SLRPQPTELKY¹¹³ (DENV-2).....51

Figura 11. Epítomos ²⁴EGHSCHSPVAL³⁴ e ¹⁴⁷HGKELPCSTYVQS¹⁵⁹ da E2 CHIKV dispostos na proteína em 3D.....53

Figura 12. Análise por HPLC e espectrometria de massas dos peptídeos da NS1 DENV. HPLC (A) e gráfico de massa (B) do ¹⁰³SLRPQPTELKY¹¹³ (NS1 DENV-2). HPLC (C) e gráfico de massa (D) do ¹¹¹YKYSWKS WGKA¹²¹ (NS1 DENV-1). Gráficos gerados pelo *software* LC Solution (Shimadzu).....54

Figura 13. Cromatogramas e gráfico do espectro de massas dos peptídeos da NS1 ZIKV. HPLC (A) e espectrometria de massas (B) do ²³⁸ESDLIIPKSLAGPLSH²⁵³. HPLC (C) e espectrometria de massas (D) do ⁸³GVQLTVVVG S⁹².....55

Figura 14. Perfil cromatográfico e gráficos do espectro de massas dos peptídeos da E2 CHIKV. HPLC (A) e espectrometria de massas (B) de ²⁴EGHSCHSPVAL³⁴. HPLC (C) e espectrometria de massas (D) de ¹⁴⁷HGKELPCSTYVQS¹⁵⁹.....56

Figura 15. *Dot blot* de todos os peptídeos e soros produzidos. Para efeitos de visualização foram adotados os aminoácidos iniciais de cada peptídeo para sua identificação. Os soros utilizados como anticorpo primário estão nomeados abaixo

de cada conjunto de figuras e os valores 1:2000 e 1:8000 referem-se às diluições utilizadas. (A) ¹⁰³SLRPQPTTELKY¹¹³ e ¹¹¹YKYSWKS WGKA¹²¹ da NS1 DENV; (B) ²³⁸ESDLIIPKSLAGPLSH²⁵³ e ⁸³GVQLTVVVG S⁹² da NS1 ZIKV; (C) ²⁴EGHSCHSPVAL³⁴ e ¹⁴⁷HGKELPCSTYVQS¹⁵⁹ da E2 CHIKV.....57

Figura 16. *Western blot* com as proteínas NS1 DENV e NS1 ZIKV produzidas em *E. coli*. Para efeitos de visualização colocou-se no topo das membranas apenas os nomes do vírus aos quais as proteínas pertencem. As imagens foram geradas no fotodocumentador ChemiDoc™ XRS+ e tratadas no software Image Lab™59

Figura 17. *Western blot* com as proteínas NS1 DENV e NS1 ZIKV produzidas em células HEK293, e E2 CHIKV produzida em células de inseto contendo baculovírus recombinante.....60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Proteínas do ser humano que apresentaram correspondência com as proteínas virais. Alinhamentos realizados por meio do BLAST.....	41
Tabela 2. Predições da proteína NS1 DENV-1. Peptídeos classificados por ordem do maior número de características desejadas alcançadas. As predições foram feitas nos softwares online Immunomedicine Group e IEDB and Analysis Resource, com base nos seguintes métodos: Kolaskar e Tongaonkar (Antigenicidade), Jespersen et al. (Epítipo), Emini et al. (Acessibilidade), Parker, Guo e Hodges (Hidrofilicidade), Chou e Fasman (Volta- β). *Sequências dos epítipos preditos, podendo ser correspondentes ou não à sequência completa do peptídeo.....	44
Tabela 3. Predições da proteína NS1 DENV-2. Peptídeos classificados por ordem do maior número de características desejadas alcançadas.....	44
Tabela 4. Predições da proteína NS1 DENV-3. Peptídeos classificados por ordem do maior número de características desejadas alcançadas.....	45
Tabela 5. Predições da proteína NS1 DENV-4. Peptídeos classificados por ordem do maior número de características desejadas alcançadas.....	45
Tabela 6. Predições da proteína NS1 ZIKV. Peptídeos classificados por ordem do maior número de características desejadas alcançadas.....	50
Tabela 7. Predições da proteína E2 CHIKV. Peptídeos classificados por ordem do maior número de características desejadas alcançadas.....	52

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
Å	Ångström
BLAST	Ferramenta de Busca de Alinhamento Local Básico (do inglês <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)
BSA	Albumina do Soro Bovino (do inglês <i>Bovine Serum Albumine</i>)
β	Beta
C	Proteína do Capsídeo (do inglês <i>Capsid protein</i>)
CHIKV	Vírus chikungunya (do inglês <i>Chikungunya Virus</i>)
Da	Dalton
DENV	Vírus dengue (do inglês <i>Dengue Virus</i>)
E1	Proteína do Envelope 1 (do inglês <i>Envelope protein 1</i>)
E2	Proteína do Envelope 2 (do inglês <i>Envelope protein 2</i>)
E3	Proteína do Envelope 3 (do inglês <i>Envelope protein 3</i>)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IEDB	Base de Dados de Epítomos Imunogênicos (do inglês <i>Immune Epitope Database</i>)
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
JEV	Vírus da Encefalite Japonesa (do inglês <i>Japanese Encephalitis Virus</i>)

kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
kg	Kilograma
KLH	Hemocianina de Lapa Tipo Buraco de Fechadura (do inglês <i>Keyhole Limpet Hemocyanin</i>)
M	Molar
mA	Miliampère
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica (do inglês <i>National Center for Biotechnology Information</i>)
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
NS1	Proteína Não Estrutural 1 (do inglês <i>Nonstructural protein 1</i>)
NS2A	Proteína Não Estrutural 2A (do inglês <i>Nonstructural protein 2A</i>)
NS2B	Proteína Não Estrutural 2B (do inglês <i>Nonstructural protein 2B</i>)
NS3	Proteína Não Estrutural 3 (do inglês <i>Nonstructural protein 3</i>)
NS4A	Proteína Não Estrutural 4A (do inglês <i>Nonstructural protein 4A</i>)

NS4B	Proteína Não Estrutural 4B (do inglês <i>Nonstructural protein 4B</i>)
NS5	Proteína Não Estrutural 5 (do inglês <i>Nonstructural protein 5</i>)
NSP1	Proteína Não Estrutural P1 (do inglês <i>Nonstructural protein P1</i>)
NSP2	Proteína Não Estrutural P2 (do inglês <i>Nonstructural protein P2</i>)
NSP3	Proteína Não Estrutural P3 (do inglês <i>Nonstructural protein P3</i>)
NSP4	Proteína Não Estrutural P4 (do inglês <i>Nonstructural protein P4</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão Salina-Fosfato (do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PDB	Banco de Dados de Proteínas (do inglês <i>Protein Data Bank</i>)
PrM	Proteína Pré-Membrana (do inglês <i>Pre-Membrane protein</i>)
RNA	Ácido Ribonucleico (do inglês <i>Ribonucleic Acid</i>)
RT-PCR	Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês <i>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>)
SDS	Dodecilsulfato de Sódio (do inglês <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecilsulfato de Sódio (do inglês <i>Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
TBS	Tampão Tris Salina (do inglês <i>Tris-Buffered Saline</i>)
TBS-T	Tampão Tris Salina com Tween 20 (do inglês <i>Tris-Buffered Saline with Tween 20</i>)
TFA	Ácido Trifluoroacético (do inglês <i>Trifluoroacetic Acid</i>)
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UNESC Universidade do Extremo Sul Catarinense

UNIFESP Universidade Federal de São Paulo

UV-Vis Ultravioleta-Visível

V Volt

ZIKV Vírus Zika (do inglês *Zika Virus*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 OS VÍRUS E SEUS TRANSMISSORES.....	21
2.2 PANORAMA MUNDIAL E BRASILEIRO.....	25
2.3 PROTEÍNAS VIRAIS UTILIZADAS EM DIAGNÓSTICO.....	26
2.4 BIOINFORMÁTICA.....	27
3 OBJETIVOS	31
3.1 OBJETIVO GERAL.....	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 ANÁLISES <i>IN SILICO</i> DAS PROTEÍNAS.....	32
4.1.1 Alinhamento.....	32
4.1.2 Predições.....	33
4.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS.....	35
4.3 PRODUÇÃO DE SOROS.....	37
4.4 IMUNOENSAIOS.....	37
4.4.1 <i>Dot blotting</i>	37
4.4.2 <i>Western blotting</i>	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 ANÁLISES <i>IN SILICO</i> DAS PROTEÍNAS.....	41
5.1.1 Alinhamento.....	41
5.1.2 Predições.....	43
5.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS.....	53
5.3 IMUNOENSAIOS.....	57
5.3.1 <i>Dot blotting</i>	57
5.3.2 <i>Western blotting</i>	58
6 CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS	

1 INTRODUÇÃO

Dengue, Zika e chikungunya são arboviroses tropicais que ao longo dos anos se espalharam pelo mundo, causando um espectro de doenças com sintomas à curto e longo prazo. A Zika e a chikungunya em particular, passaram de viroses praticamente desconhecidas para um caso de saúde pública mundial na última década (PUNTASECCA; KING; LABEAUD, 2021). Já a dengue foi responsável por um aumento tão grande de infecções nos últimos 50 anos, que se tornou a infecção viral por arbovírus mais comum no mundo (DENGUE BULLETIN, 2020). As três doenças são transmitidas por mosquitos hematófagos do gênero *Aedes*, com enfoque no *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, o que dificulta ainda mais o combate às doenças, visto que a distribuição destas espécies hoje é a maior já registrada, com populações em todos os continentes (WILDER-SMITH *et al.*, 2017).

Os primeiros relatos de dengue no Brasil datam de 1846, enquanto as primeiras citações na literatura científica são de 1916 (MEIRA, 1916). Os sorotipos 1 e 4 foram os primeiros a serem isolados em território brasileiro, em 1982, quando ocorreu a primeira epidemia da doença no país (OSANAI, 1984). Em contrapartida, o vírus Zika (ZIKV) e o vírus chikungunya (CHIKV) circulam em território brasileiro há menos tempo, mas em seu curto período de ocorrência no país já causaram epidemias com consequências a longo prazo. A primeira ocorrência de Zika nas Américas data de 2015, no Brasil, entretanto, estudos filogenéticos indicam que a introdução do vírus ocorreu em 2013 (ZANLUCA *et al.*, 2015). Enquanto isso, os primeiros casos de chikungunya ocorreram em 2014 (BRASIL, 2014), mas assim como a Zika, pesquisas apontam uma introdução anterior à esse período, datando de 2012 (CHIKUNGUNYA, 2019).

As três doenças podem causar danos neurológicos nos pacientes infectados, como a Síndrome de Guillain-Barré. A infecção por ZIKV também está relacionada à casos de microcefalia (CAO-LORMEAU *et al.*, 2016), enquanto a chikungunya tem relação com doenças do sistema nervoso central e periférico (LEMANT *et al.*, 2008). Além disso, um dos problemas enfrentados pelo Brasil, assim como outros países tropicais, é a ocorrência de epidemias simultâneas dessas doenças, o que dificulta

ainda mais a identificação, o manejo e o tratamento das pessoas infectadas (ESPOSITO; FONSECA, 2016).

As possibilidades de diagnóstico são semelhantes entre as viroses e se dividem em teste sorológico, teste de RT-PCR (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*) e teste de captura de antígenos (CABRAL-CASTRO, 2016). O teste sorológico é responsável por detectar a presença de anticorpos no sangue do paciente. Enquanto a detecção de IgM é possível alguns dias após o contato com o patógeno, a IgG está relacionada à uma proteção mais duradoura, e só aparece na segunda metade do período de infecção. Um dos problemas relacionados à este método de detecção é a possibilidade de reação cruzada entre anticorpos produzidos contra viroses proximamente relacionadas, como a dengue e a Zika. Além disso, não é possível realizar a detecção no estágio inicial da doença (MULLER; DEPELSENAIRE; YOUNG, 2017).

O teste de RT-PCR é capaz de detectar a presença de RNA viral na fase aguda da doença e é considerado o teste de referência dentre esses diagnósticos. Entretanto, necessita de equipamentos e pessoal treinado para sua realização, o que acaba encarecendo o procedimento. Por se tratar de viroses tropicais, dengue, Zika e chikungunya tem a maior parte dos seus casos concentrados em países subdesenvolvidos, que não conseguem dispor de uma quantidade suficiente de recursos para que este teste seja amplamente difundido em todo o território. Por isso, é necessário que existam alternativas de diagnóstico eficientes para localidades que não possuem a capacidade de realizar o teste de RT-PCR de forma ampla (MULLER; DEPELSENAIRE; YOUNG, 2017).

Tentando contornar essas questões, o teste de captura de antígeno é uma forma de diagnóstico mais barata, que detecta a presença de antígenos virais no sangue ou na saliva (MATTIUZZI; HENRY; LIPPI, 2021). Na dengue e Zika, a proteína alvo mais comum é a proteína não estrutural 1 (NS1), pois se apresenta em altos níveis no sangue de indivíduos infectados no estágio inicial da doença, resultado de sua secreção pelas células infectadas (MULLER; DEPELSENAIRE; YOUNG, 2017). Na chikungunya, uma das proteínas que recebe grande atenção é a proteína do

envelope 2 (E2), que junto à proteína do envelope 1 (E1) são as duas maiores responsáveis pela infecção viral (BHATNAGAR *et al.*, 2014).

Atualmente, existem opções de kits diagnósticos comerciais e em desenvolvimento que utilizam anticorpos contra as proteínas completas como parte integrante do teste, atuando como a base de ligação para o alvo. Entretanto, tem sido comprovado que kits dessa natureza diminuem a especificidade de detecção, uma vez que nas flaviviruses, por exemplo, a proteína NS1 se apresenta altamente conservada, podendo assim, um teste desenvolvido para a dengue apontar falsos-positivos quando entrar em contato com amostras provenientes de pacientes com Zika. Por isso, recentemente alguns estudos se voltaram a encontrar epítomos nessas proteínas que compartilhem o menor número de semelhanças possíveis, de forma a evitar a reação cruzada entre viroses proximamente relacionadas (TAN *et al.*, 2020; LEE *et al.*, 2017).

Nesse cenário, esforços são feitos na tentativa de aumentar as possibilidades de diagnóstico, levando em consideração o baixo custo e a facilidade do procedimento (MULLER; DEPELSENAIRE; YOUNG, 2017). Para isso, a bioinformática surge como uma importante ferramenta na busca de regiões proteicas com potencial para serem exploradas, tornando-a mais ágil, econômica e menos dispendiosa.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 OS VÍRUS E SEUS TRANSMISSORES

Dengue, Zika e chikungunya são viroses tropicais transmitidas por mosquitos hematófagos do gênero *Aedes*. O agente etiológico da dengue foi o segundo microorganismo a ser denominado vírus, depois do vírus da febre amarela. O isolamento da primeira cepa do vírus dengue ocorreu em 1943 por Kimura e Hotta, com provável origem asiática. Em 1945, Sabin e Schlesinger isolaram a cepa Havaí, e Sabin nesse mesmo ano identificou outra cepa em Nova Guiné, observando que as cepas possuíam características antigênicas diferentes começou a considerá-las sorotipos do mesmo vírus. Atualmente, existem 4 sorotipos em circulação, denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (BARRETO; TEIXEIRA, 2008).

O vírus Zika foi isolado pela primeira vez em um macaco Rhesus, na Floresta de Zika, em Uganda, em 1947 (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). Durante 50 anos, a Zika foi descrita como causadora de infecções esporádicas na Ásia e África, até 2007, quando a primeira epidemia de Zika ocorreu na Ilha Yap, na Micronésia (DUFFY *et al.*, 2009). Já o vírus chikungunya foi identificado pela primeira vez durante uma epidemia na Tanzânia, em 1952. O nome “chikungunya” refere-se à uma palavra Swahili que significa “aquele que se dobra”, devido à postura curvada dos indivíduos infectados, proveniente da forte dor nas articulações (ROBINSON, 1955).

Ambos os vírus, dengue e Zika, pertencem à família Flaviviridae e ao gênero *Flavivirus*, e por isso compartilham muitas semelhanças, como um grau considerável de homologia entre suas proteínas, por exemplo (LEE *et al.*, 2017). Em contrapartida, o CHIKV é filogeneticamente mais distante, pertencendo à família Togaviridae e ao gênero *Alphavirus* (SUHRBIER; JAFFAR-BANDJEE; GASQUE, 2012). Tanto o vírus dengue (DENV) quando o ZIKV possuem entre 10 e 11 kb, enquanto o CHIKV possui aproximadamente 12 kb (CHAMBERS *et al.*, 1990; BURT *et al.*, 2017). Na Figura 1 pode-se visualizar as estruturas virais.

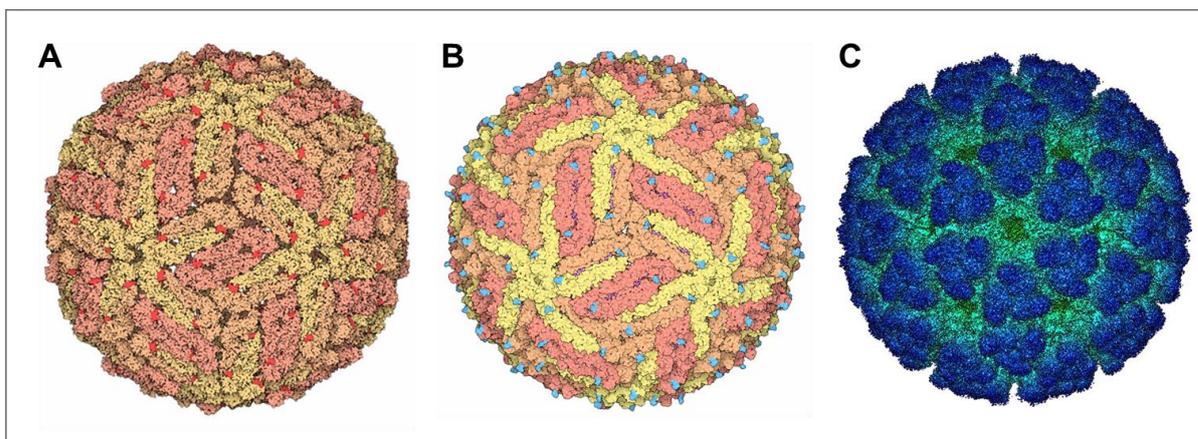


Figura 1. Estruturas virais atômicas do DENV (A), ZIKV (B) e CHIKV (C) geradas por microscopia crioeletrônica. Em (A) e (B) é possível visualizar as proteínas do envelope em amarelo e rosa. Os pontos vermelhos em (A) e azuis em (B) representam as glicosilações. Em (C) a proteína do envelope 1 aparece em azul escuro e a proteína do envelope 2 em azul claro (DENGUE, 2008; ZIKA, 2016; SUN *et al.*, 2013).

Todos são vírus de RNA e possuem proteínas estruturais e não estruturais. DENV e ZIKV apresentam 3 proteínas estruturais, sendo elas, proteína do capsídeo (C), proteína do envelope (E) e proteína pré-membrana/membrana (PrM), além de 7 proteínas não estruturais, proteína não estrutural 1 (NS1), não estrutural 2A (NS2A), não estrutural 2B (NS2B), não estrutural 3 (NS3), não estrutural 4A (NS4A), não estrutural 4B (NS4B) e não estrutural 5 (NS5). No caso da dengue, essas proteínas apresentam propriedades antigênicas distintas de acordo com o sorotipo (CHAMBERS *et al.*, 1990). Já o CHIKV apresenta 5 proteínas estruturais, C, proteína do envelope 1 (E1), proteína do envelope 2 (E2), proteína do envelope 3 (E3) e proteína 6K, além de 4 proteínas não estruturais, não estrutural P1 (NSP1), não estrutural P2 (NSP2), não estrutural P3 (NSP3) e não estrutural P4 (NSP4) (BURT *et al.*, 2017). A organização genômica desses vírus pode ser visualizado na Figura 2.

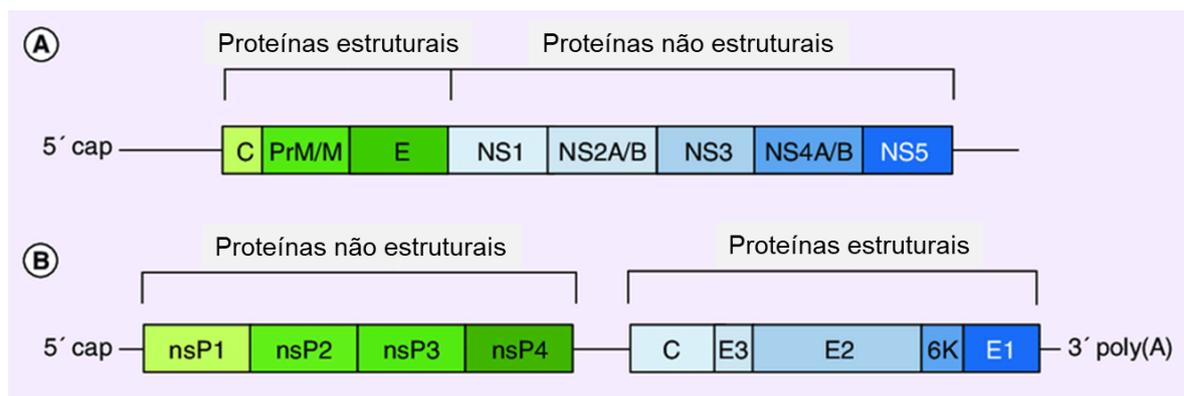


Figura 2. Organização genômica do DENV e ZIKV (A), e do CHIKV (B), demonstrando as proteínas resultantes da tradução. (Adaptado de ONG; LUM; NG, 2014).

A transmissão é feita majoritariamente pela picada de mosquitos infectados do gênero *Aedes*, sendo que o *Aedes aegypti* é o principal transmissor urbano e o *Aedes albopictus* é o principal transmissor rural devido ao ciclo de vida de cada espécie (DENGUE, 2007). Após a picada, as células infectadas pelo vírus dengue migram do local da infecção para os linfonodos, onde os monócitos e macrófagos são recrutados, se tornando o alvo da infecção. Conseqüentemente, o processo inflamatório é amplificado e o vírus é disseminado pelo sistema linfático (MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009). Nesse cenário, os fatores que influenciam o total de células alvo infectadas, e como resultado, o nível de viremia, podem determinar a forma como a resposta inflamatória afeta o sistema hemostático (DURBIN *et al.*, 2008). A nível sistêmico, o fígado é um dos órgãos comumente envolvidos na infecção pelo DENV, com casos de hepatite sendo associados à infecção (FABRE *et al.*, 2001).

A dengue pode se apresentar na forma assintomática ou variando de uma febre baixa até um caso de dengue hemorrágica. O quadro clássico de dengue é uma infecção aguda com manifestação após 4 à 10 dias após a picada do mosquito. São sintomas característicos a temperatura elevada, fortes dores de cabeça, dor retro-orbital, dor muscular e nas articulações, vômitos e irritações na pele (KAUTNER; ROBINSON; KUHNLE, 1997).

O vírus Zika tem uma ação mais direcionada ao sistema nervoso em comparação ao DENV, podendo infectar diretamente populações de células do sistema nervoso periférico, especialmente neurônios (OH *et al.*, 2017). Bido-Medina e colaboradores

(2018) demonstraram através de um estudo de imagem a redução do volume de massa cinzenta em adultos infectados pelo ZIKV com sintomas neurológicos, aumentando assim, a preocupação com os impactos à longo prazo no sistema nervoso central. A infecção das células da placenta ocorre por meio de uma rota transplacentária, resultando na disseminação viral para as vilosidades coriônicas, membranas amniocoriônicas, e da decídua basal para a parietal, podendo além disso, induzir a proliferação e hiperplasia das células de Hofbauer nas vilosidades coriônicas (MINER *et al.*, 2016; TABATA *et al.*, 2016; ROSENBERG *et al.*, 2016). Essas anormalidades de desenvolvimento tendem a ocorrer de forma mais frequente quando a infecção está presente no primeiro trimestre da gestação (DANG *et al.*, 2016).

Assim como a dengue, a Zika também pode se apresentar em sua forma assintomática, mas seus sintomas característicos são febre baixa, conjuntivite, dor de cabeça, mialgia e artralgia com edema nas pequenas articulações e irritação na pele. Além disso, a Zika possui impactos à longo prazo, como o risco de desenvolvimento da Síndrome de Guillain-Barré e da microcefalia fetal (SLAVOV *et al.*, 2016).

Na chikungunya, seguindo o início da transmissão, o vírus replica-se na pele e se dissemina para o fígado e articulações através do sangue (TALARMIN *et al.*, 2007). Diferente das típicas encefalites causadas por *Alphavirus*, que infectam neurônios, o CHIKV infecta células estromais do sistema nervoso central, principalmente as células de revestimento do plexo coróide. Além disso, uma das características marcantes da infecção é a linfopenia aguda, sendo provavelmente resultante da indução da morte de linfócitos pelo interferon tipo 1. Na maioria dos indivíduos infectados, a repopulação de linfócitos circulantes ocorre logo após o fim da infecção (SCHWARTZ; ALBERT, 2010). A chikungunya se manifesta de forma parecida com a Zika, mas com algumas diferenças. A mialgia e artralgia permanecem, assim como as irritações cutâneas. Entretanto, neste caso, a irritação pode se espalhar por mais de 90% do corpo e a artralgia pode ser persistente no estado crônico da doença. A febre aparece na forma aguda e em alguns pacientes a dor nas articulações pode permanecer por anos (SUHRBIER; JAFFAR-BANDJEE; GASQUE, 2012).

2.2 PANORAMA MUNDIAL E BRASILEIRO

De acordo com um estudo de Brady e colaboradores (2012), cerca de 3,9 bilhões de pessoas ao redor do mundo vivem sob risco de infecção pelo vírus dengue. O número de casos reportados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) aumentaram consideravelmente nas últimas duas décadas, tendo 505.430 casos em 2000, 2,4 milhões de casos em 2010 e 5,2 milhões em 2019. Antes de 1970, apenas 9 países haviam vivenciado epidemias de dengue. De acordo com dados oficiais, a doença agora é endêmica em mais de 100 países, sendo as Américas, o Sudeste Asiático e o Pacífico as regiões mais preocupantes. Entretanto, estudos com testes laboratoriais indicam que o continente africano já passou por mais de 20 epidemias de dengue após os anos 60, sendo um dos focos mundiais da doença, com o agravante da subnotificação (AMARASINGHE *et al.*, 2011; HUMPHREY *et al.*, 2016). Atualmente, a doença também ocorre na Europa, com casos autóctones sendo observados de forma quase anual em muitos países do continente.

De forma global, o maior número de casos já registrado ocorreu em 2019, com 4,3 milhões de pessoas infectadas, com destaque para o Brasil, que reportou sozinho mais de 2 milhões de casos, sendo o país com o maior número de infecções. Com o início da pandemia de COVID-19, os órgãos de controle têm enfatizado a importância dos países prevenirem e detectarem a presença de arboviroses como a dengue durante este período crucial, uma vez que as populações urbanas estão expostas ao risco de infecção das duas doenças. Essa combinação pode resultar em consequências terríveis para as populações em risco (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

De 1960 à 1980, casos esporádicos de Zika foram registrados na Ásia e na África. Com o passar das décadas, as epidemias da doença se iniciaram, e em 2015, o Brasil reportou uma grande epidemia que preocupou o mundo devido à sua associação com casos de microcefalia e Síndrome de Guillain-Barré. Quando a infecção ocorre em grávidas, além da possibilidade de microcefalia fetal, complicações também podem envolver abortos ou nascimentos prematuros. Até

2018, um total de 86 países reportaram infecção pelo vírus Zika (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

A chikungunya se espalhou rapidamente através do mundo a partir de 2004 e já foi identificada em mais de 60 países. Em 2007 ocorreu a primeira transmissão local na Europa e em 2013 nas Américas. Em 2016, os países americanos que mais reportaram casos foram Brasil, Colômbia e Bolívia, com aproximadamente 300.000 casos suspeitos. Em 2017, o Brasil foi responsável por mais de 90% do casos das Américas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

Em 2021, no Brasil ocorreram 465.897 casos de dengue, 4.272 casos de Zika e 78.847 casos de chikungunya. Das amostras positivas dos exames realizados para detecção do sorotipo da dengue (5.584 amostras), 52% correspondem à DENV-1 e 48% correspondem à DENV-2. As maiores incidências de dengue e Zika foram observadas na região Centro-Oeste, enquanto a chikungunya afetou mais a região Nordeste. 183 óbitos foram causados pela dengue, 8 pela chikungunya, sendo 2 deles no Espírito Santo, e nenhum registro foi feito para a Zika (BRASIL, 2021).

2.3 PROTEÍNAS VIRAIS UTILIZADAS EM DIAGNÓSTICO

Atualmente, existe uma variedade de testes laboratoriais utilizados para detecção de dengue, Zika e chikungunya, como testes sorológicos, detecção viral e detecção de antígenos (CABRAL-CASTRO *et al.*, 2016). Entretanto, o uso desses testes permanece limitado devido a necessidade de pessoal treinado e laboratórios equipados. Levando em consideração localidades com um cenário de recursos limitados, o teste rápido de captura de antígeno é visto como uma alternativa aos kits já difundidos (SA-NGAMUANG *et al.*, 2018; HUIJS *et al.*, 2018; KAM *et al.*, 2019).

A NS1 é um importante marcador dos vírus dengue e Zika, já utilizada em testes de captura de antígeno. É uma proteína de 46-55 kDa, que além de fazer parte do proteoma viral também é secretada pelas células infectadas de mamíferos no início da infecção, podendo assim, ser detectada no sangue do paciente (MULLER;

YOUNG, 2013). Possui 352 aminoácidos e é inicialmente expressa em monômeros nas células infectadas. Após sofrer modificações pós-traducionais no retículo endoplasmático, dímeros são formados, se organizando em arranjos de 3 para formar um hexâmero (AKEY *et al.*, 2014).

Na chikungunya, as proteínas E2 e E1 funcionam como proteína de ligação ao receptor e proteína de fusão, respectivamente. São ancoradas na membrana viral e formam o complexo E2-E1, executando um papel fundamental para a entrada do vírus na célula (SOLIGNATA *et al.*, 2009). Esse complexo é dissociado no momento em que a ligação ao receptor ocorre. As proteínas do envelope já demonstraram indução à resposta imune e a proteína E2 é considerada uma candidata promissora para estudos de diagnóstico e desenvolvimento de vacinas (KAM *et al.*, 2012; TRIPATHI; PRIYA; SHRIVASTAVA, 2014). A E2 é dividida nos domínios C, A e B, possui 52 kDa e 423 aminoácidos (VOSS *et al.*, 2010).

2.4 BIOINFORMÁTICA

A bioinformática é uma área da ciência que engloba diversas disciplinas, como biologia, computação e tecnologia da informação. Essas disciplinas convergem a fim de organizar e armazenar uma quantidade gigantesca de dados sobre biologia gerados pelo avanço na genética, biologia molecular e biotecnologia (LESK, 2002). Um dos objetivos da bioinformática é interpretar de forma rápida e efetiva informações provenientes do genoma, transcriptoma e proteoma (BRUSIC; FLOWER, 2004). Estes estudos muitas vezes são voltados à área da saúde, identificando regiões de interesse para o desenvolvimento de vacinas, por exemplo (SORIA-GUERRA *et al.*, 2015).

Dentre as várias funcionalidades, as ferramentas de bioinformática permitem a varredura de antígenos em busca de epítomos candidatos, poupando tempo e custo, fatores importantes em localidades com recursos limitados (KHAN *et al.*, 2006). Nessas ocasiões, a busca por epítomos se faz mais interessante do que a utilização da proteína completa, visto que diminui o custo de produção do produto final. Além disso, a descoberta de novas regiões antigênicas é fundamental para o avanço

dessa área como um todo (LEE *et al.*, 2010). Para a seleção de peptídeos com potencial de síntese e produção de anticorpos, são realizadas múltiplas predições *in silico* de forma a obter sequências antigênicas, acessíveis, hidrofílicas e que não pertençam a uma volta beta (β).

A antigenicidade de uma sequência é essencial para que ela seja reconhecida por seu anticorpo correspondente e por isso, a presença dessa propriedade em um peptídeo se torna indispensável para a continuidade das predições, sendo ela o filtro inicial (REGENMORTEL, 2001). O site *Immunomedicine Group* fornece a possibilidade de identificar as sequências antigênicas presentes nas proteínas por meio de uma ferramenta online (disponível em: <<http://imed.med.ucm.es/Home/index.html>>). O método de predição utilizado pelo *software* é o descrito por Kolaskar e Tongaonkar (1990), no qual os autores fazem uma correlação entre a ocorrência de resíduos hidrofóbicos, como cisteína, leucina e valina, na superfície de proteínas e uma alta probabilidade deles fazerem parte de sequências antigênicas. É um método semi-empírico que pode prever determinantes antigênicos com uma precisão de 75%, se mostrando melhor do que outros métodos existentes.

A ferramenta online *Immune Epitope Database (IEDB) and Analysis Resource* (disponível em: <<http://tools.iedb.org/bcell/>>) hospeda diversas possibilidades de predições baseadas em diferentes metodologias, sendo responsável assim, por prever se determinados peptídeos são equivalentes à epítopos, se estão em um local acessível na proteína, se são hidrofílicos e se estão localizados fora de uma volta β .

As células (ou linfócitos) B são consideradas componentes centrais do sistema imunológico adaptativo, uma vez que possuem a capacidade de reconhecer e promover uma proteção duradoura contra patógenos e células cancerígenas. Estas funções são exercidas por meio da produção de anticorpos, que reconhecem o antígeno (alvo molecular) se ligando a uma parte dele, o epítipo. Os epítopos de célula B são classificados em lineares e conformacionais, sendo os lineares fragmentos de aminoácidos contínuos, enquanto os conformacionais consistem em resíduos de aminoácidos que podem estar separados na sequência linear, mas

apresentam proximidade devido o dobramento proteico (EL-MANZALAWY; DOBBS; HONAVAR, 2017).

O método baseado no servidor online BepiPred-2.0, proposto por Jespersen e colaboradores (2017) é utilizado para identificar os epítomos lineares de célula B presentes nas proteínas. Para a construção da metodologia, estruturas cristalinas de complexos antígeno-anticorpo foram obtidas na base de dados *Protein Data Bank* (PDB; disponível em: <<https://www.rcsb.org/>>). A partir destas estruturas, consideraram-se aminoácidos pertencentes à epítomos aqueles que apresentaram raio de 4 Å em relação à qualquer átomo de um aminoácido do anticorpo.

A metodologia proposta por Emini e colaboradores (1985) é responsável por prever quais peptídeos estão localizados em regiões acessíveis das proteínas, onde a partir de dados estruturais provenientes de 28 proteínas, determinou-se que um aminoácido de superfície é aquele com mais de 20 Å de superfície acessível à água. A partir dos cálculos desenvolvidos utilizando estas probabilidades de superfície fracionárias para aminoácidos tem-se a probabilidade de toda a sequência.

A hidrofobicidade de um peptídeo pode ser predita utilizando-se o método proposto por Parker; Guo; Hodges (1986), que consiste em uma escala hidrofílica construída a partir dos tempos de retenção de 20 modelos de peptídeos sintéticos durante a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Assumiu-se assim, que o tempo de retenção de um peptídeo estava diretamente relacionado com a hidrofobicidade e hidrofobicidade somadas dos resíduos de aminoácidos que o compõem.

Para a identificação de pertencimento ou não a uma volta β , o método proposto por Chou e Fasman (1978) utiliza um valor de corte determinado por cálculos de probabilidade e previsões anteriores. Calculou-se a frequência de ocorrência dos 20 aminoácidos em 408 voltas β já conhecidas de proteínas escolhidas. Os dados obtidos dessa análise foram extrapolados para todas as proteínas. Os peptídeos que apresentaram um valor acima do valor de corte proposto foram considerados pertencentes à uma volta β .

Assim como o *IEDB and Analysis Resource*, a ferramenta Protean 3D também pode ser utilizada para realizar predições. Neste *software* os níveis de antigenicidade e hidrofiliçidade são mais detalhados e apresentados em gráficos, além de adotarem metodologias diferentes da ferramenta anterior. Para a predição de antigenicidade, o método utilizado é o proposto por Jameson e Wolf (1988), que reflete a influência de diferentes parâmetros no cálculo final. Nele, são considerados a hidrofiliçidade/acessibilidade e a flexibilidade, representando 45% e 55% do valor de antigenicidade calculado, respectivamente. A tiorredoxina oxidada (S2) proveniente da *Escherichia coli* foi utilizada como proteína modelo para testar a capacidade preditiva do índice antigênico proposto.

Para a hidrofiliçidade, a predição adotada foi a de Kyte e Doolittle (1982), na qual os autores compuseram uma escala de hidrofobicidade com base nas cadeias laterais dos 20 aminoácidos. A abordagem utilizada determina continuamente a hidrofobicidade média de um segmento de aminoácidos de tamanho predeterminado à medida que ele avança da porção amino(N)-terminal para a carboxi(C)-terminal da sequência. De caráter confirmatório, os autores realizaram comparações entre os valores adquiridos por predição e estruturas proteicas conhecidas por cristalografia.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Produzir anticorpos anti-peptídeos dos vírus dengue, Zika e chikungunya, e avaliar sua reatividade contra antígenos sintéticos e proteínas comerciais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Alinhar a sequência de aminoácidos das proteínas NS1 do vírus dengue tipo 1, 2, 3 e 4, NS1 do vírus Zika e E2 do vírus chikungunya com o proteoma humano e do coelho;
- Predizer *in silico* as sequências antigênicas das proteínas e as características desejadas dessas sequências por meio de ferramentas de bioinformática;
- Gerar modelos tridimensionais (3D) das proteínas para marcar as sequências definidas;
- Sintetizar e caracterizar os peptídeos preditos;
- Produzir anticorpos policlonais contra os antígenos sintetizados;
- Analisar por meio de imunoenaios a reatividade dos anticorpos contra os antígenos sintéticos e contra as proteínas completas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a construção da base deste estudo, foram utilizadas ferramentas de bioinformática para o alinhamento das sequências de aminoácidos, para as predições envolvendo os peptídeos e para a geração dos modelos 3D. A partir destes resultados, selecionaram-se os peptídeos mais adequados para produção de acordo com as características desejadas. As sequências foram então produzidas e caracterizadas, e a produção dos soros contra elas foi induzida em coelhos. Por fim, os soros obtidos passaram por imunoenaios de *Dot blot* e *Western blotting* de forma a identificar se os anticorpos presentes nos soros são capazes de reconhecer os peptídeos sintéticos e as proteínas nativas comerciais.

4.1 ANÁLISES *IN SILICO* DAS PROTEÍNAS

4.1.1 Alinhamento

As sequências lineares de aminoácidos das proteínas NS1 do DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, NS1 do ZIKV e E2 do CHIKV foram obtidas do banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>). Em seguida, com o intuito de identificar se essas sequências possuem homologias com o proteoma do ser humano e do coelho, animal utilizado para a produção dos soros, elas foram alinhadas utilizando o *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST; disponível em: <<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>).

O cenário ideal neste caso é que não existam similaridades, ou se existirem que não sejam significativas, ocorrendo assim em proteínas que não sejam representativas para este estudo e/ou apresentando poucas correspondências com curtas sequências de aminoácidos seguidos. Dessa forma, as possibilidades de ligação cruzada com proteínas humanas no produto final seriam mínimas ou nulas, evitando resultados falso-positivo no caso do desenvolvimento de um sensor para

diagnóstico. Em relação às proteínas do coelho, evitaria interações inespecíficas no momento da produção dos soros.

4.1.2 Predições

Para identificar as sequências antigênicas presentes nos peptídeos mencionados no item anterior, todos foram submetidos à ferramenta online presente no site *Immunomedicine Group*, baseada no método de Kolaskar e Tongaonkar (1990). Ao submeter cada proteína para análise, o site fornece uma tabela com as sequências antigênicas identificadas. A partir do resultado obtido pelo *software*, foram selecionadas aquelas sequências que possuíam entre 10 e 20 aminoácidos para dar prosseguimento às predições, uma vez que esse tamanho é suficiente para provocar resposta imune, além de diminuir os problemas que podem ocorrer na síntese, diminuir o custo de produção e diminuir o risco de perda de especificidade, o que ocorre em peptídeos maiores (LEE *et al.*, 2016).

A partir disso, as sequências selecionadas foram analisadas no *software* online *IEDB and Analysis Resource* com o intuito de prever se elas são equivalentes à epítomos, se estão em um local acessível na proteína, se são hidrofílicas e se estão localizadas fora de uma volta β , sendo que cada uma dessas predições é baseada em um método diferente. Além disso, selecionou-se preferencialmente peptídeos que possuísem uma ou nenhuma cisteína, de forma a evitar a formação de pontes dissulfeto e auxiliando assim, a preservar a pureza de cada peptídeo no momento da síntese. Quanto maior a quantidade desse aminoácido em um peptídeo, maior a probabilidade deles formarem dímeros por oxidação dos tióis de sua cadeia lateral, ligando assim duas cadeias por uma ponte dissulfeto (LEE *et al.*, 2016).

Para identificar os epítomos lineares de células B presentes nas proteínas utilizou-se o método baseado no servidor online BepiPred-2.0, proposto por Jespersen e colaboradores (2017). Nesta predição o limiar para detecção foi mantido em 0,5 para todas as proteínas. A janela manteve-se em 7 para todas as predições realizadas no *IEDB and Analysis Resource*.

Para prever quais peptídeos estavam em regiões acessíveis das proteínas, a metodologia utilizada foi a proposta por Emini e colaboradores (1985). Nela, o *software* atribui pontuações aos peptídeos, e aqueles com a pontuação acima de 1 (valor do limiar) apresentam um aumento na possibilidade do mesmo estar localizado na superfície da proteína. Essa exposição é necessária para que no momento da síntese dos anticorpos contra os antígenos selecionados, a ligação antígeno-anticorpo ocorra de forma eficiente, sem barreiras físicas ou químicas que a prejudiquem (LEE *et al.*, 2010).

A fim de identificar se os epítomos encontrados eram hidrofílicos, utilizou-se o método proposto por Parker; Guo; Hodges (1986). Parte-se da ideia de que peptídeos antigênicos geralmente estão localizados em regiões com aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos, entretanto é desejável que o peptídeo seja o mais hidrofílico possível a fim de que sua produção e manipulação no meio aquoso seja possível (LEE *et al.*, 2010). Nesta predição o limiar foi mantido em 1,5 para todas as proteínas.

De forma a identificar se os epítomos faziam parte ou não de uma volta β utilizou-se o método proposto por Chou e Fasman (1978). Essa identificação se faz necessária, uma vez que peptídeos que estejam nessa região passam por um processo de formação incompleta durante a síntese e tornam difícil a ligação do anticorpo (LEE *et al.*, 2010). Para esta predição o limiar foi mantido em 1 em todas as análises.

Ao fim de todas as predições, os peptídeos foram selecionados de acordo com as características desejadas já descritas, respeitando a seguinte ordem: 1) Antigenicidade; 2) Tamanho; 3) Equivalente e/ou pertencente à um epítomo; 4) Número de cisteínas; 5) Acessibilidade; 6) Hidrofilicidade; 7) Ocorrência fora de uma volta β . De forma complementar e de caráter confirmatório, algumas sequências selecionadas como adequadas ao estudo por meio dos servidores online *Immunomedicine Group* e *IEDB and Analysis Resource* passaram por nova análise no *software* DNASTAR 17, utilizando o recurso Protean 3D.

Neste segundo momento, as predições de acessibilidade e ocorrência fora de uma volta β seguiram as mesmas metodologias do servidor anterior, tendo sido propostas assim por Emini e colaboradores (1985), e Chou e Fasman (1978), respectivamente.

Em contrapartida, o Protean 3D apresentou métodos diferentes para as análises de antigenicidade e hidrofiliçidade, seguindo as metodologias propostas por Jameson e Wolf (1988), e Kyte e Doolittle (1982).

Após as predições em todos os *softwares*, os peptídeos selecionados de cada proteína foram classificados em uma ordem, onde o primeiro atendia à todos os critérios estabelecidos e o último atendia ao menor número de critérios dentre os selecionados. As sequências lineares escolhidas da NS1 DENV e NS1 ZIKV foram alinhadas por meio do *software* Jalview 2.11.1.4, de forma a esclarecer as homologias e diferenças entre elas. A estrutura primária de cada proteína foi inserida no servidor online SWISS-MODEL (disponível em: <<https://swissmodel.expasy.org>>), que forneceu as conformações 3D e os arquivos com a extensão em .pdb (*Program Database*). Estes arquivos foram carregados no *software* Chimera 1.13 a fim de que os modelos proteicos pudessem ser modificados.

4.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS

Os peptídeos selecionados foram sintetizados em parceria com a Escola de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e com o Laboratório de Fisiopatologia Experimental, da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC). A produção ocorreu por síntese química de peptídeos em fase sólida, utilizando aminoácidos com grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonil (Fmoc), seguindo os protocolos propostos por Merrifield (1963) e Atherton e colaboradores (1978).

Neste processo, o aminoácido pertencente à porção C-terminal tem seu grupo α -amino ligado à um protetor temporário (Fmoc) e sua cadeia lateral ligada à um protetor semipermanente. Este aminoácido é acoplado à uma resina que se dilata na presença de solventes orgânicos e se expande conforme o peptídeo cresce. Além de suas propriedades expansivas, a resina é equipada com um ligante bifuncional, o que permite sua separação do produto final após a síntese. Após o acoplamento do primeiro aminoácido à resina, o grupo Fmoc é removido e a síntese continua em direção à porção N-terminal até que o peptídeo completo seja obtido. A sequência

completa é então clivada da resina simultaneamente aos grupos de proteção da cadeia lateral.

Os peptídeos sintetizados foram analisados em parceria com a Escola de Medicina da UNIFESP por HPLC acoplada à um espectrômetro de massas (LC/MS-2010) com ionização por *electrospray* (ESI-MS), da empresa Shimadzu. Os peptídeos foram carregados em uma coluna C18 Ultrasphere (5 μ M, 4.6 mm x 250 mm) e o conteúdo foi eluído em um sistema de dois solventes: ácido trifluoroacético em água (TFA/H₂O, 1:1000) e ácido trifluoroacético em acetonitrila com água (TFA/ACN/H₂O, 1:900:100). As moléculas hidrofílicas saem primeiro da coluna, seguidas das moléculas com polaridade mais baixa e, por fim, as moléculas hidrofóbicas (MCMaster, 2007). A cromatografia foi realizada acompanhando as amostras através de um detector ultravioleta-visível (UV-Vis), com leitura em 220 e 365 nm, modelo Shimadzu UV-Vis SPD-20AV e um detector por fluorescência (FL), com leitura em 320 e 420 nm, modelo Shimadzu RF-6000. O sinal gerado pelo detector foi captado pelo *software* LC Solution (Shimadzu) e o cromatograma foi gerado, mostrando a variação do sinal do detector em função do tempo de análise.

As amostras eluídas nos solventes foram pressurizadas em um tubo capilar, que recebeu uma voltagem entre 3000 e 5000 V. O líquido que emergiu do capilar na forma de aerossol teve suas gotículas dessolvatadas, formando partículas carregadas positiva ou negativamente, avançando em seguida para o espectrômetro de massas pelo efeito da atração eletrostática e pelo vácuo. Os íons da amostra foram separados levando em consideração sua razão massa/carga (m/z). Assim, o detector registra a carga que é produzida quando o íon atinge ou atravessa a superfície, obtendo-se deste modo, o espectro de massas (MCMaster, 2007). Os dados foram processados utilizando o *software* LC Solution (Shimadzu). Após esta etapa de análise, os peptídeos foram liofilizados para serem transportados e utilizados na inoculação. A liofilização foi realizada no equipamento FreeZone 4,5 liter Benchtop Freeze Dry System (Labconco).

4.3 PRODUÇÃO DE SOROS

Para a produção dos anticorpos, os antígenos sintetizados foram inoculados em coelhos em parceria com o Laboratório de Imunologia Aplicada à Sanidade Animal, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Utilizaram-se 6 coelhos da linhagem *New Zeland White*, com 2 meses de idade, oriundos de um criatório comercial, localizado em Eldorado do Sul, no Rio Grande do Sul. A produção de soros está registrada no comitê de ética da universidade (CEUA-UFRGS) sob número 38748.

Como os peptídeos utilizados são formados por uma curta sequência de aminoácidos e possuem baixo peso molecular, realizou-se a conjugação com uma proteína carreadora capaz de aumentar a resposta imune e conseqüentemente o título de anticorpos produzidos pelo animal. Cada indivíduo recebeu por via subcutânea o preparado de 1 mg de antígeno + 1 mg de KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*) emulsificado em igual volume de adjuvante de Freund. A proteína KLH possui propriedades altamente imunogênicas, além de um grande número de lisinas disponíveis para modificação (LEE *et al.*, 2010). Foram realizadas 3 inoculações com um intervalo de 15 dias entre cada e nas duas últimas aplicou-se apenas o antígeno + adjuvante. Dez dias após a última dose, os coelhos foram eutanasiados por anestesia com tiopental intraperitoneal (100 mg/kg) e os soros foram coletados.

4.4 IMUNOENSAIOS

4.4.1 *Dot blotting*

Logo após a coleta dos soros, em parceria com o Laboratório de Imunologia Aplicada à Sanidade Animal (UFRGS) realizou-se o *Dot blotting* (ou *Dot blot*) para triagem de anticorpos produzidos contra cada antígeno. Neste ensaio, os antígenos são depositados em uma membrana de nitrocelulose em forma de pontos (*dots*) e incubados, primeiramente com os anticorpos produzidos (primário) e em seguida com o anticorpo secundário conjugado à uma enzima peroxidase ou fosfatase. A

reação positiva consiste em um ponto cinza contra o fundo branco da membrana (HAWKES; NIDAY; GORDON, 1982).

Dessa forma, aproximadamente 0,5 µg de cada antígeno (peptídeo) foi aplicado em 12 membranas de nitrocelulose com porosidade de 0,45 µm, permanecendo em repouso por 30 min para secar em temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram bloqueadas com solução de bloqueio por 1 h e incubadas por 2 h com os soros em duas concentrações (1:2000 e 1:8000). Cada membrana recebeu um soro diferente, sendo que 6 receberam na concentração 1:2000 e as outras 6, na concentração 1:8000. Todas as diluições foram feitas em tampão bloqueador BLOTTO 5%. Após esta etapa, as membranas foram lavadas 3 vezes por 10 min com a mesma solução e incubadas por 1h em temperatura ambiente com conjugado anti-IgG de coelho-fosfatase diluído em 1:5000 em BLOTTO 5%. Realizou-se a última lavagem com PBS (*Phosphate-Buffered Saline*), 3 vezes durante 10 min cada, seguida da revelação dos resultados. Esta por sua vez, foi realizada em câmara escura mediante a adição de 5 mL de solução reveladora, contendo 0,5 mL de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato), 0,5 mL de NBT (cloreto de azul de nitrotetrazólio) e 4 mL de TBS (*Tris-Buffered Saline*). Com o aparecimento dos pontos, a solução foi retirada e as membranas lavadas com TBS.

4.4.2 Western blotting

Uma vez que o *Dot blot* foi realizado para confirmar a formação de anticorpos nos soros contra os peptídeos produzidos, faz-se necessária a testagem desses mesmos soros com as proteínas completas por meio do *Western blotting* (*Western blot* ou WB). Ao pensar nas futuras aplicações desses anticorpos é importante que se saiba não somente sua capacidade de reconhecer os respectivos peptídeos, mas também a possibilidade de interação com as proteínas originárias das sequências, uma vez que elas são o alvo de reação encontrados nas amostras de pacientes infectados.

Para a confirmação da capacidade de interação dos anticorpos com as proteínas completas, realizou-se ensaios de WB utilizando as proteínas recombinantes NS1 DENV-1, NS1 DENV-2, NS1 DENV-3, NS1 DENV-4 e NS1 ZIKV produzidas por sistema de expressão heteróloga em *Escherichia coli* e em células de mamíferos HEK293, além da E2 CHIKV produzida por sistema de expressão heteróloga em células de inseto contendo baculovírus recombinante. As primeiras, produzidas em *E. coli*, foram gentilmente doadas pelo Laboratório de Virologia Molecular e Aplicada, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e as últimas, produzidas em HEK293 e baculovírus-células de inseto foram adquiridas comercialmente da empresa Sino Biological sob os números de catálogo em ordem 40527-V07H, 40263-V07H, 40528-V07H, 40529-V07H, 40544-V07H, 40440-V08B. Para a realização dos ensaios, as proteínas foram dissolvidas em PBS.

Inicialmente as proteínas foram desnaturadas por calor, passando por uma fervura de 20 min em água à 100°C e seguiram para uma eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), baseada no protocolo proposto por Laemmli (1970), estando o gel de entrada à uma concentração de 5,36% e o gel de corrida à 15%. Utilizou-se o pente Mini-PROTEAN® da Bio-Rad para 10 poços, de 1 mm. Após a polimerização dos géis, em cada poço foram depositados 25 ng de proteína, respeitando o volume total de 10 µL por poço, sendo 8 µL de proteína e 2 µL de tampão de amostra 5x (Tris base-HCl 0,5 M pH 6,8; SDS 10%; β-mercaptoetanol; glicerol; azul de bromofenol), além de 2 µL de padrão de corrida (Bio-Rad Precision Plus Protein™) no primeiro poço de cada gel. Os géis foram posicionados dentro das cubas (Bio-Rad Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell) e imersos em tampão de corrida (Tris base; glicina; SDS 10%; água destilada). A fonte de eletroforese utilizada foi a Bio-Rad PowerPac™ HC e a corrida foi realizada com 7 mA e voltagem livre.

Após a migração das proteínas, realizou-se a montagem dos “sanduíches” de transferência para o início do *Western blot*, posicionando dentro de cada aparato um gel e uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, 0,2 µm). O protocolo teve como base o estudo de Burnette (1981). Depois de prontos, os “sanduíches” foram colocados dentro das cubas e imersos em tampão de transferência (Tris-base;

glicina; água destilada; metanol). A voltagem foi fixada em 100 V e a amperagem permaneceu livre, tendo a transferência o total de 2 horas. Com o final desta etapa, as membranas foram armazenadas à -20°C para posterior revelação.

No dia seguinte as membranas foram retiradas do congelador (-20°C) e colocadas na geladeira (4°C) durante 10 min. O processo de revelação seguiu-se alternando lavagens e incubações, estando as membranas em agitação constante no agitador de oscilação. A primeira lavagem foi feita com 5 mL de TBS durante 10 min, seguida do bloqueio por 1 h com 10 mL de leite em pó desnatado 5% em TBS-T (*Tris-Buffered Saline with Tween 20*). Ao fim do bloqueio realizou-se uma lavagem com 5 mL de TBS-T durante 10 min, seguida da incubação por 2 h com 5 mL do anticorpo primário. Neste caso, utilizou-se o soro dos coelhos na diluição de 1:1000 em uma solução de BSA (*Bovine Serum Albumin*) 3% em TBS-T. Após a incubação, foram feitas 3 lavagens com 5 mL de TBS-T durante 10 min cada, em seguida as membranas foram incubadas com 5 mL de anticorpo secundário (IgG de cabra anti-coelho, Bio-Rad) a uma diluição de 1:1000 na solução de BSA 3% em TBS-T durante 1 h. Retirado o anticorpo secundário, as membranas foram lavadas novamente 3 vezes com 5 mL de TBS-T durante 10 min cada.

Por fim, a revelação ocorreu em câmara escura mediante a adição de 5 mL de solução reveladora, contendo 0,5 mL de BCIP, 0,5 mL de NBT e 4 mL de TBS. Com o aparecimento das bandas, a solução foi retirada e as membranas lavadas com TBS. Após a secagem, utilizou-se o fotodocumentador ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad) para a criação de imagens das membranas e o *software* Image Lab™ Bio-Rad para o tratamento das imagens.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISES *IN SILICO* DAS PROTEÍNAS

5.1.1 Alinhamento

Os códigos das proteínas completas obtidas pelo NCBI foram os seguintes: AMO26075.1 (NS1 DENV-1), AAD11533.1 (NS1 DENV-2), AAB52247.1 (NS1 DENV-3), AHK09949.1 (NS1 DENV-4), YP_009430301.1 (NS1 ZIKV) e AEJ18140.1 (E2 CHIKV). Entre as 6 proteínas analisadas no BLAST, ocorreram correspondências com o proteoma humano em 3. As proteínas, humanas e virais, envolvidas nos alinhamentos estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Proteínas do ser humano que apresentaram correspondência com as proteínas virais. Alinhamentos realizados por meio do BLAST.

NS1 DENV-1	NS1 DENV-4	NS1 ZIKV
Isoforma X1 da proteína associada à espermátide	Isoforma X1 da proteína dedo de zinco 26	Isoforma 1 da miosina não convencional XVI
Isoforma 1 da proteína associada à espermátide	Isoforma X2 da proteína dedo de zinco 26	Isoforma 2 da miosina não convencional XVI
Isoforma 2 da proteína associada à espermátide	Isoforma 2 da proteína dedo de zinco 26	-
Isoforma 3 da proteína associada à espermátide	Isoforma 3 da proteína dedo de zinco 26	-
-	Isoforma 4 da proteína dedo de zinco 26	-
-	Precursor da isoforma 1 da proteína dedo de zinco 26	-
-	Precursor da isoforma 1 do fator de crescimento do hepatócito	-
-	Precursor da isoforma 2 do fator de crescimento do hepatócito	-

Nas Figuras 3, 4 e 5 tem-se alguns dos alinhamentos realizados. No caso das correspondências envolvendo a NS1 DENV-1 e as isoformas da proteína associada à espermátide, e a NS1 ZIKV com as isoformas da miosina não convencional XVI,

não há literatura que indique correlação entre essas sequências. Em relação à NS1 DENV-4, Chiu e colaboradores (2018) relataram que a proteína antiviral dedo de zinco (ZAP) apresenta ação antiviral contra o vírus da encefalite japonesa (JEV), pertencente à família Flaviviridae. Mesmo pertencendo à mesma família, isso não se mantém para o vírus da dengue. Além disso, o fato da proteína dedo de zinco presente no alinhamento diferir da citada na literatura é somado à ocorrência de poucas correspondências e poucos aminoácidos seguidos, não havendo assim, significância. Ainda em relação à NS1 DENV-4, Voraphani e colaboradores (2010) demonstraram que no estágio inicial da dengue, os níveis do fator de crescimento do hepatócito se apresentam acima do normal devido ao dano hepático causado pela doença. Entretanto, considerando que no alinhamento envolvendo esta proteína houve a correspondência de no máximo 3 aminoácidos em sequência, tem-se que ele não foi significativo para este estudo.

```
Alignments:
>spermatid-associated protein isoform 3 [Homo sapiens]
Sequence ID: NP_001273271.1 Length: 412
Range 1: 23 to 132

Score:32.0 bits(71), Expect:2.3,
Method:Compositional matrix adjust.,
Identities:25/110(23%), Positives:45/110(40%), Gaps:16/110(14%)

Query 225 WPKSHTLWSNGVLESEMIIPKIYGGPISQHNYPGYFTQTA-----GPWHLGKLELDFD- 278
          +P+ H L+S      + +P++      SQH+Y  F+          P    LELD++
Sbjct  23  FPRLHNLYSTPRCAQQAALPRLSRRMASQHSYPLNRFSSVPLDPMERPMSQADLELDYNP  82

Query 279 ----LCEGTTW-----VDEHCGNRGPSLR-TTIVTGKIIHEWCCRCTL 318
          L +  V      V+E+C + P    + +  K+ H+  + C L
Sbjct  83  PRVQLSDEMVFVQDGRWVNENCRLQSPYFSPSASFHHLHHKRLAKECML 132
```

Figura 3. Alinhamento da NS1 DENV-1 com a isoforma 3 da proteína associada à espermátide, com 2 correspondências e o máximo de 4 aminoácidos em sequência.

```

>zinc finger protein 26 isoform 3 [Homo sapiens]
Sequence ID: NP_001243209.1 Length: 501
Range 1: 139 to 189

Score:30.8 bits(68), Expect:6.4,
Method:Compositional matrix adjust.,
Identities:17/51(33%), Positives:24/51(47%), Gaps:0/51(0%)

Query 1   DMGCVSWNGKELKCGSGIFVVDNVHTWTEQYKFPESPARLASAILNAHK 51
          + CV S GK +C S + V +HT Y+ A A + LNAH+
Sbjct 139 EKNCVCSECGKAFRCKSQLIVHLRIHTGERPYECSK CERAFSAKSNLNAHQ 189

```

Figura 4. Alinhamento da NS1 DENV-4 com a isoforma 3 da proteína dedo de zinco 26, com 1 correspondência e o máximo de 4 aminoácidos em sequência.

```

>unconventional myosin-XVI isoform 1 [Homo sapiens]
Sequence ID: NP_001185879.1 Length: 1880
Range 1: 1214 to 1281

Score:30.4 bits(67), Expect:9.5,
Method:Composition-based stats.,
Identities:21/72(29%), Positives:39/72(54%), Gaps:6/72(8%)

Query 235  GIEESDLIIPKSLAGPLSHHNTREGYRTQMKGPWHSEEELEIRFEPCPGTKVHVEETCGTR 294
          G++ D ++ ++ A ++ N R R++M P+H E+LE+R + G+K ++ G R
Sbjct 1214  GLKTYDALVIQN-ASDIARENDR--LRSEMNPYHKEKLEVRNMQEESK-RTDDKSGPR 1269

Query 295  --GPSLRSTTAS 304
          PS S A+
Sbjct 1270  HFPSSMSVCAA 1281

```

Figura 5. Alinhamento da NS1 ZIKV com a isoforma 1 da miosina não-convencional XVI, com 2 correspondências e o máximo de 2 aminoácidos em sequência.

Nenhuma correspondência foi encontrada entre o proteoma do coelho e as proteínas virais.

5.1.2 Predições

Após a inserção das sequências de aminoácidos completas das proteínas nos *softwares*, os epítomos preditos foram organizados de acordo com as características desejadas, como já descrito, sendo classificados em ordem de prioridade para síntese. Nas Tabelas 2, 3, 4 e 5 são apresentados os resultados das predições para as proteínas NS1 DENV-1, NS1 DENV-2, NS1 DENV-3 e NS1 DENV-4, respectivamente.

Tabela 2. Predições da proteína NS1 DENV-1. Peptídeos classificados por ordem do maior número de características desejadas alcançadas. As predições foram feitas nos *softwares* online *Immunomedicine Group* e *IEDB and Analysis Resource*, com base nos seguintes métodos: Kolaskar e Tongaonkar (Antigenicidade), Jespersen *et al.* (Epítopo), Emini *et al.* (Acessibilidade), Parker, Guo e Hodges (Hidrofilicidade), Chou e Fasman (Volta- β). *Sequências dos epítomos preditos, podendo ser correspondentes ou não à sequência completa do peptídeo.

Peptídeo	Antigenicidade	Epítopo*	Número de cisteínas	Acessibilidade	Hidrofilicidade	Volta- β
¹¹¹ YKYSWKS ¹²¹ WGKA	Antigênico	111-121	0	Alta	Sim	Não
¹¹ RELKCGSGIFVTN ²³	Antigênico	11-23	1	Alta	Sim	Não
⁸⁵ KFTVVVG ⁹⁸ DVAGILA	Antigênico	85-92	0	Alta	Sim	Não
¹⁸⁷ AIKDSKAVHA ¹⁹⁶	Antigênico	187-196	0	Baixa	Sim	Não
¹⁶⁷ IWLKLRDSY ¹⁸¹ TQVCDH	Antigênico	170-181	1	Baixa	Sim	Não
²¹² LARASFIEVK ²²⁹ KCIWPKSH	Antigênico	212-229	1	Baixa	Não	Não

Tabela 3. Predições da proteína NS1 DENV-2. Peptídeos classificados por ordem do maior número de características desejadas alcançadas.

Peptídeo	Antigenicidade	Epítopo	Número de cisteínas	Acessibilidade	Hidrofilicidade	Volta- β
¹⁰³ SLRPQPTELKY ¹¹³	Antigênico	103-113	0	Alta	Sim	Não
³⁸ SPSKLASAIQ ⁴⁷	Antigênico	38-47	0	Baixa	Sim	Não
⁵¹ EEGICGIRSVTR ⁶²	Antigênico	51-62	1	Baixa	Sim	Não
²⁴³ IPKNLAGPVSQH ²⁵⁴	Antigênico	243-254	0	Baixa	Sim	Não
²¹⁶ SFIEVK ²²⁹ NCHWPKSH	Antigênico	218-229	1	Baixa	Sim	Não

Tabela 4. Predições da proteína NS1 DENV-3. Peptídeos classificados por ordem do maior número de características desejadas alcançadas.

Peptídeo	Antigenicidade	Epítopo	Número de cisteínas	Acessibilidade	Hidrofilicidade	Volta-β
²⁴¹ MIIPKSLAGP ²⁵⁰	Antigênico	241-245	0	Alta	Sim	Não
⁸⁴ IKLTVVVGDI ⁹⁸	Antigênico	84-98	0	Alta	Sim	Não
¹⁸³ LMSAAVKDERAVHA ¹⁹⁶	Antigênico	183-196	0	Baixa	Sim	Não
²¹³ EKASLIEVKTCTW ²²⁵	Antigênico	213-225	1	Baixa	Sim	Não

Tabela 5. Predições da proteína NS1 DENV-4. Peptídeos classificados por ordem do maior número de características desejadas alcançadas.

Peptídeo	Antigenicidade	Epítopo	Número de cisteínas	Acessibilidade	Hidrofilicidade	Volta-β
⁸⁴ HDLTVVAGDVKGVLT ⁹⁸	Antigênico	84-98	0	Alta	Sim	Não
²³² WSNGVLESQMLIPRSYAGP ²⁵⁰	Antigênico	232-244	0	Alta	Sim	Não
¹⁸⁷ AIKDQKAVHA ¹⁹⁶	Antigênico	187-196	0	Baixa	Sim	Não
²¹³ EKASLIEVKTCLWPKTH ²²⁹	Antigênico	213-229	1	Baixa	Sim	Não
¹¹ KELKCGSGIFVVDN ²⁴	Antigênico	11-24	1	Baixa	Não	Não

Seguindo a classificação e pensando na forma do produto final, dois peptídeos da NS1 DENV foram direcionados para a síntese. A seleção destas sequências seguiu a ideia de que não é de interesse deste estudo identificar a dengue por sorotipos, pois futuramente não seria viável incluir a detecção de todos os sorotipos em um kit diagnóstico, juntamente à detecção da NS1 ZIKV e da E2 CHIKV. Por isso, para a dengue optou-se pela seleção de apenas 2 peptídeos para o total dos 4 sorotipos, tendo em vista que quanto mais conservadas entre todas as NS1 DENV essas sequências fossem, maior a chance de detecção de qualquer sorotipo no produto final.

Apesar de todos os peptídeos analisados serem antigênicos, foi necessária uma análise mais criteriosa em relação a esta propriedade de forma a distingui-los de

acordo com o nível de antigenicidade (Figura 6), visto que seriam produzidos apenas dois peptídeos de cada proteína. Para uma escolha mais fundamentada, outros pontos também foram levados em consideração, como o índice de hidrofobicidade (Figura 6) e a homologia das sequências escolhidas entre os sorotipos do DENV (Figura 7), além da diferença dos peptídeos do DENV para o ZIKV, de forma a dificultar a formação de anticorpos inespecíficos entre as flaviviroses nas etapas posteriores.

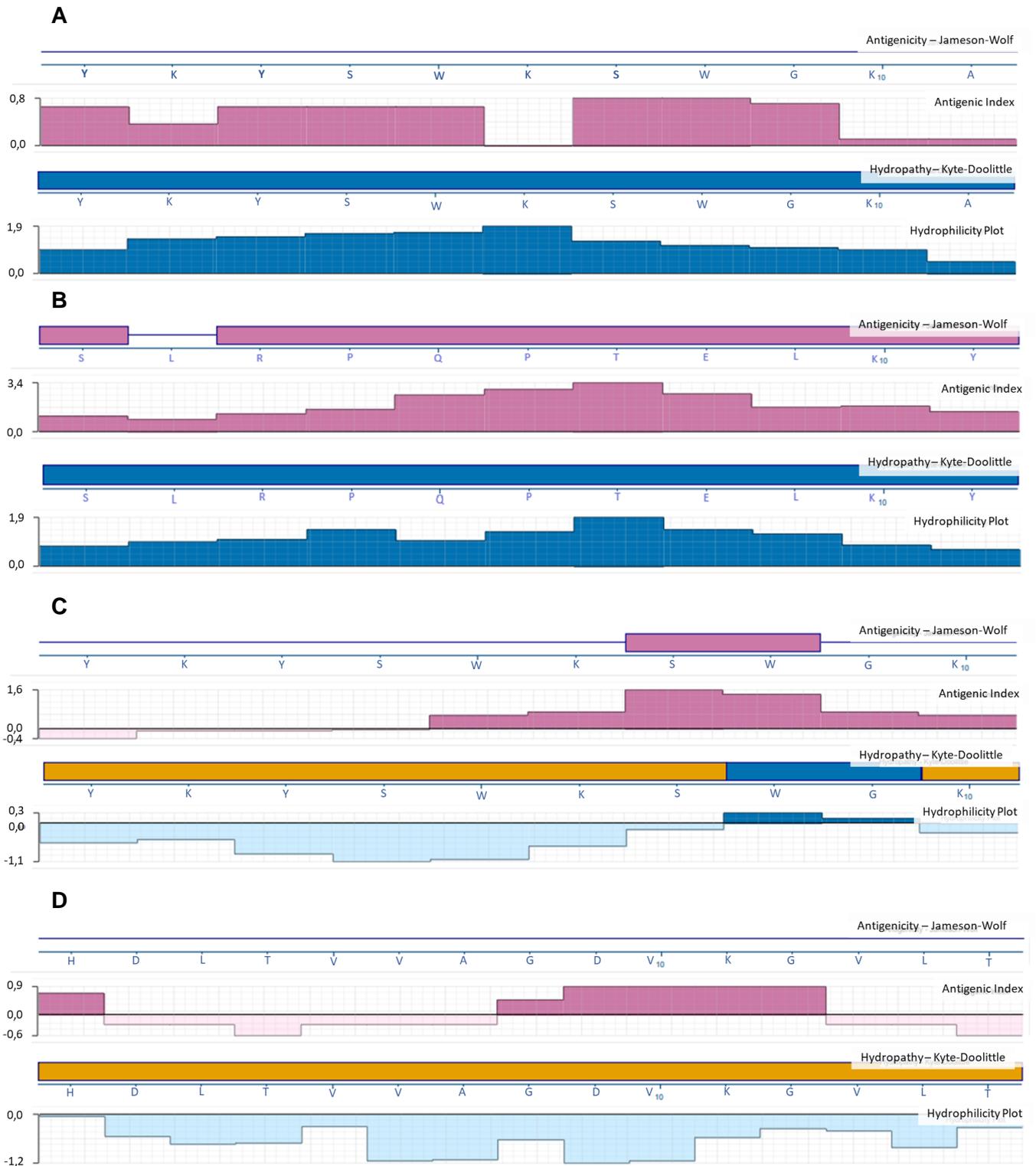


Figura 6. Níveis de antigenicidade e hidrofiliidade ao longo dos peptídeos, gerados pelo recurso PROTEAN 3D, hospedado no *software* DNASTAR 17. Cada conjunto de análises é referente ao epítipo melhor classificado de cada sorotipo do DENV de acordo com as características desejadas. Assim, as sequências analisadas foram as seguintes: (A) ¹¹¹YKYSWKS WGKA¹²¹ da NS1 DENV-1, (B) ¹⁰³SLRPQPT ELKY¹¹³ da NS1 DENV-2, (C) ²⁴¹MIIPKSLAGP²⁵⁰ da NS1 DENV-3 e (D) ⁸⁴HDLTVVAGDV KGVLT⁹⁸ da NS1 DENV-4.

Para representar os 4 sorotipos do DENV, 2 epítomos foram selecionados dentre todos os preditos. Foram eles o $^{103}\text{SLRPQPTELKY}^{113}$ da NS1 DENV-2 e o $^{111}\text{YKYSWKSWSGKA}^{121}$ da NS1 DENV-1. Ambos atenderam à todas as características desejadas, como pôde-se verificar nas Tabelas 2 e 3, possuem nível de antigenicidade alto e contínuo pela maior parte do peptídeo quando comparados aos epítomos dos outros sorotipos que também atenderam à todos os requisitos necessários e são os únicos totalmente hidrofílicos. Peptídeos da NS1 DENV com resposta imunogênica já foram descritos por Jones e colaboradores (2017), Rocha e colaboradores (2017) e Masrinoul e colaboradores (2011). Entretanto, as sequências selecionadas aqui não aparecem em nenhum destes estudos, evidenciando a possibilidade de descoberta de peptídeos imunogênicos ainda não testados.

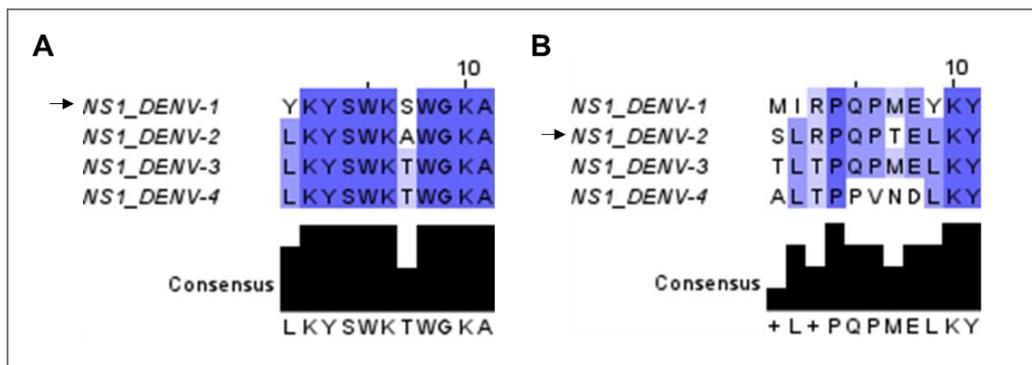


Figura 7. Alinhamentos das sequências $^{111}\text{YKYSWKSWSGKA}^{121}$ da NS1 DENV-1 (A) e $^{103}\text{SLRPQPTELKY}^{113}$ da NS1 DENV-2 (B) com os mesmos intervalos nos outros sorotipos do DENV, obtidos no software Jalview 2.11.1.4. As setas indicam os peptídeos inicialmente preditos pelos softwares online *Immunomedicine Group* e *IEDB and Analysis Resource*. A partir dos alinhamentos é possível verificar o nível de consenso entre os peptídeos, ou seja, a porcentagem de aparecimento de cada aminoácido em uma determinada posição.

A Figura 7 indica o alto nível de similaridade dos dois peptídeos em relação aos 4 sorotipos do DENV, corroborando sua escolha. A conservação das sequências entre os vírus da dengue é uma característica fundamental para aumentar as chances de reconhecimento de todos os sorotipos pelos anticorpos produzidos adiante (WIDAYANTI; DEWI; PAMBUDI, 2018; JONES *et al.*, 2017). A comparação entre os epítomos também pode ser visualizado espacialmente na Figura 8, onde os dois peptídeos preditos do DENV estão marcados nos quatro sorotipos em modelos 3D.

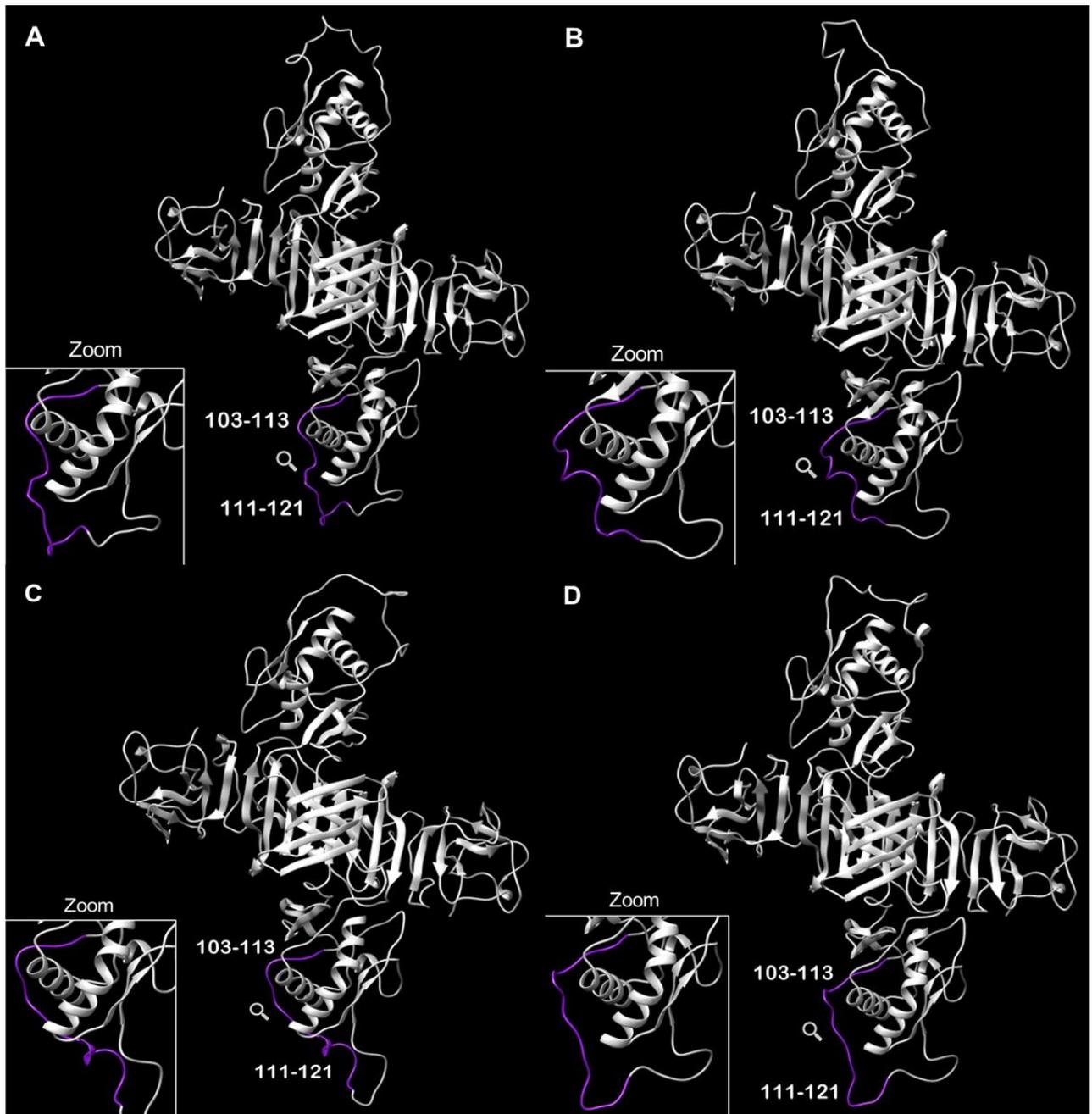


Figura 8. Conformação 3D dos epítomos $^{111}\text{YKYSWKSWGKA}^{121}$ da NS1 DENV-1 e $^{103}\text{SLRPQPTTELKY}^{113}$ da NS1 DENV-2 nos 4 sorotipos do DENV. As estruturas quaternárias foram geradas pelo *software* Chimera 1.13. (A) DENV-1; (B) DENV-2; (C) DENV-3; (D) DENV-4.

De forma contrária, no caso da relação entre o DENV e o ZIKV, o intuito é que as sequências compartilhem o mínimo de similaridades possíveis, na tentativa de evitar as reações inespecíficas entre os anticorpos e os peptídeos das duas flaviviruses (KAM *et al.*, 2019). A Tabela 6 mostra as predições da proteína NS1 do vírus Zika.

Tabela 6. Predições da proteína NS1 ZIKV. Peptídeos classificados por ordem do maior número de características desejadas alcançadas.

Peptídeo	Antigenicidade	Epítipo	Número de cisteínas	Acessibilidade	Hidrofilicidade	Volta-β
²³⁸ ESDLIIPKSLAGPLSH ²⁵³	Antigênico	238-256	0	Alta	Sim	Não
⁸³ GVQLTVVVG ⁹²	Antigênico	83-92	0	Alta	Não	Não
¹⁸⁹ KGKEAVHSDLGY ²⁰⁰	Antigênico	189-200	0	Baixa	Sim	Não
¹⁷⁵ YSLECDPAVIGT ¹⁸⁶	Antigênico	175-186	1	Baixa	Sim	Não

Para esta proteína foram escolhidos os peptídeos com alta acessibilidade ²³⁸ESDLIIPKSLAGPLSH²⁵³ e ⁸³GVQLTVVVG⁹². Apesar do último ser hidrofóbico, levou-se em consideração seu nível de acessibilidade quando comparado às outras sequências, um fator fundamental no sucesso do reconhecimento do peptídeo pelo anticorpo produzido (LEE *et al.*, 2010). Na Figura 9 é possível visualizar a localização espacial dos peptídeos selecionados na proteína como predito anteriormente. Outro ponto decisivo nessa escolha foi a diferença entre as sequências da NS1 ZIKV e as da NS1 DENV, como pode-se visualizar na Figura 10.

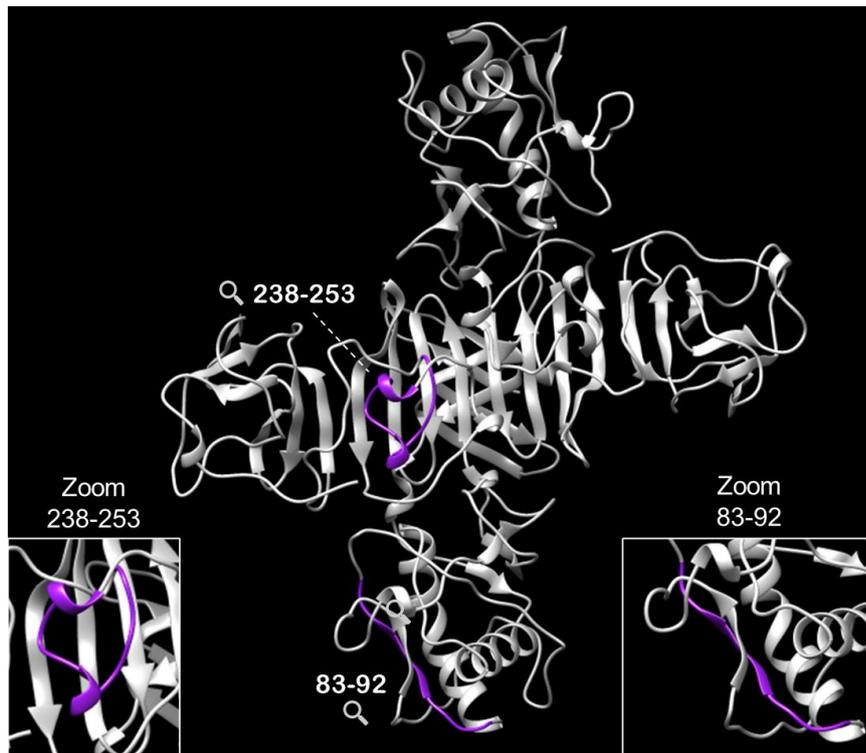


Figura 9. Epítotos $^{238}\text{ESDLIIPKSLAGPLSH}^{253}$ e $^{83}\text{GVQLTVVVG}^{92}$ da NS1 ZIKV selecionados na estrutura quaternária da proteína.

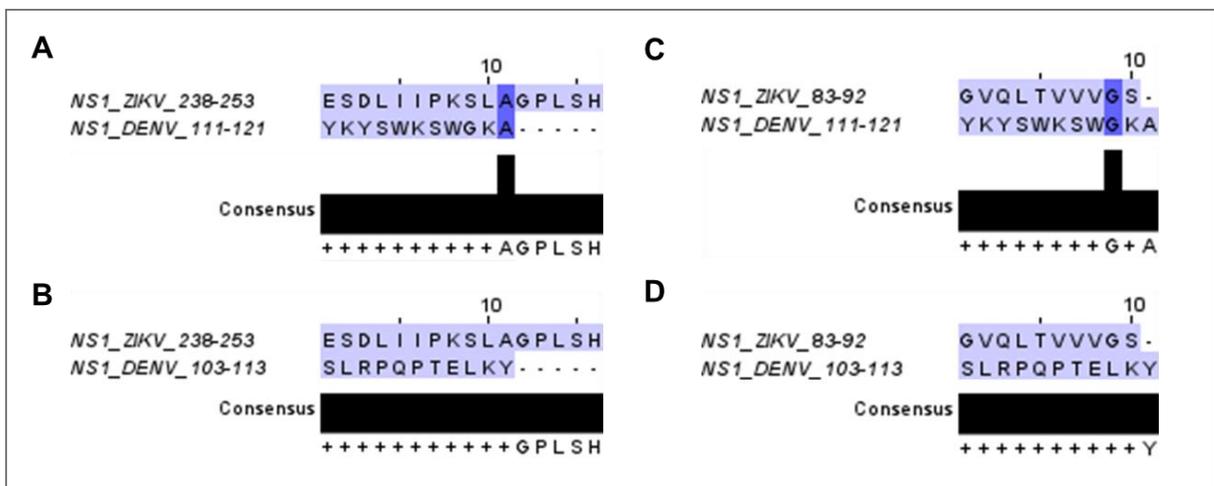


Figura 10. Alinhamentos das seqüências selecionadas da NS1 DENV e da NS1 ZIKV. (A) $^{238}\text{ESDLIIPKSLAGPLSH}^{253}$ (ZIKV) e $^{111}\text{YKYSWKSWGKA}^{121}$ (DENV-1); (B) $^{238}\text{ESDLIIPKSLAGPLSH}^{253}$ (ZIKV) e $^{103}\text{SLRPQPTELKY}^{113}$ (DENV-2); (C) $^{83}\text{GVQLTVVVG}^{92}$ (ZIKV) e $^{111}\text{YKYSWKSWGKA}^{121}$ (DENV-1); (D) $^{83}\text{GVQLTVVVG}^{92}$ (ZIKV) e $^{103}\text{SLRPQPTELKY}^{113}$ (DENV-2).

Kam e colaboradores (2019), Freire e colaboradores (2017), Hanajiri e colaboradores (2019) e Campbell e colaboradores (2020) já reportaram peptídeos da NS1 ZIKV com resposta imunogênica. No último, uma das seqüências publicadas

tem como parte o epítopo ⁸³GVQLTVVVG⁹² descrito neste trabalho. Ainda sim, é importante que se continue com a investigação proposta, visto que o peptídeo já descrito é ligeiramente maior do que o deste estudo, tendo um total de 20 aminoácidos. Como consequência, a diferença de tamanho e de aminoácidos presentes nas sequências pode acarretar em alguma influência na geração dos anticorpos mais adiante. Já em relação à proteína E2 CHIKV, as predições apontaram os seguintes peptídeos (Tabela 7).

Tabela 7. Predições da proteína E2 CHIKV. Peptídeos classificados por ordem do maior número de características desejadas alcançadas.

Peptídeo	Antigenicidade	Epítopo	Número de cisteínas	Acessibilidade	Hidrofilicidade	Volta-β
²⁴ EGHSCHSPVAL ³⁴	Antigênico	24-31	1	Alta	Sim	Não
¹⁴⁷ HGKELPCSTYVQS ¹⁵⁹	Antigênico	147-159	1	Alta	Sim	Não
¹⁸⁴ QSGNVKITVNG ¹⁹⁴	Antigênico	184-194	0	Alta	Não	Não
³¹³ HKKEVLTVPTEGLE ³²⁷	Antigênico	313-327	0	Alta	Sim	Sim
³⁶⁴ PTMTVVVSVATFILLSMV ³⁸²	Antigênico	367-382	0	Alta	Não	Sim

As sequências escolhidas foram ²⁴EGHSCHSPVAL³⁴ e ¹⁴⁷HGKELPCSTYVQS¹⁵⁹, pois diferente das demais, atenderam aos requisitos necessários para síntese. Na Figura 11 pode-se visualizar estes peptídeos destacados na estrutura 3D da proteína.

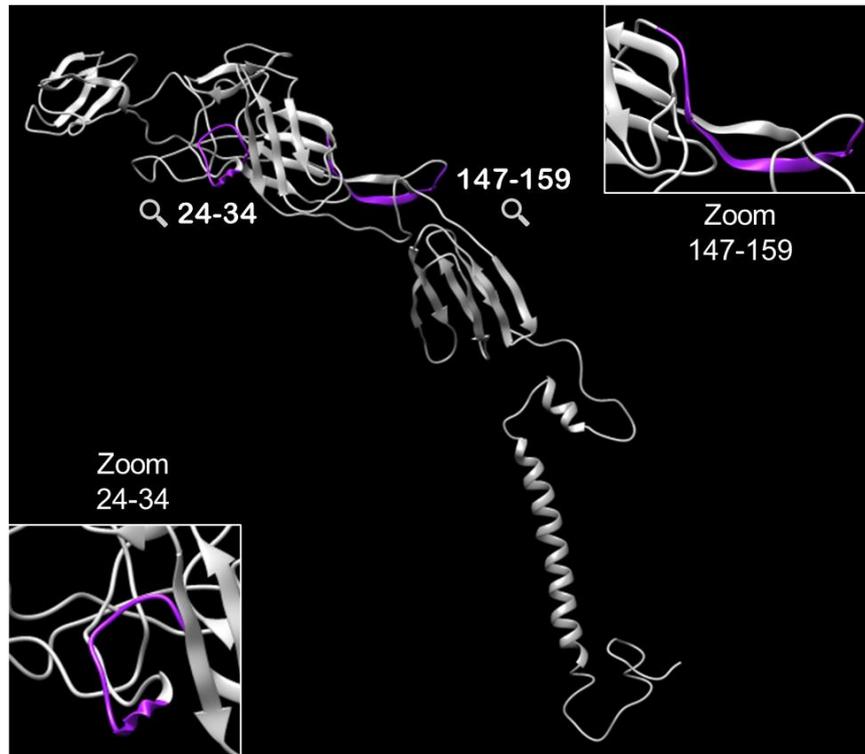


Figura 11. Epítomos $^{24}\text{EGHSCHSPVAL}^{34}$ e $^{147}\text{HGKELPCSTYVQS}^{159}$ da E2 CHIKV dispostos na proteína em 3D.

Peptídeos imunogênicos da E2 CHIKV já foram reportados por Bhatnagar e colaboradores (2014), Nagar e colaboradores (2016), Chua; Chan; Sam (2014). No último estudo, um dos epítomos publicados divide parte de sua sequência de aminoácidos com o peptídeo $^{24}\text{EGHSCHSPVAL}^{34}$. Como são 12 aminoácidos de diferença, é importante que a sequência acima permaneça como alvo da pesquisa em virtude da possibilidade de resultados diferentes dos já encontrados.

5.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS

Ao fim de todas as análises *in silico*, os peptídeos sintetizados foram os seguintes: $^{103}\text{SLRPQPTTELKY}^{113}$ da NS1 DENV-2, $^{111}\text{YKYSWKS WGKA}^{121}$ da NS1 DENV-1, $^{238}\text{ESDLIIPKSLAGPLSH}^{253}$ e $^{83}\text{GVQLTVV VGS}^{92}$ da NS1 ZIKV, e $^{24}\text{EGHSCHSPVAL}^{34}$ e $^{147}\text{HGKELPCSTYVQS}^{159}$ da E2 CHIKV. A caracterização por cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas após a síntese gerou os gráficos adiante.

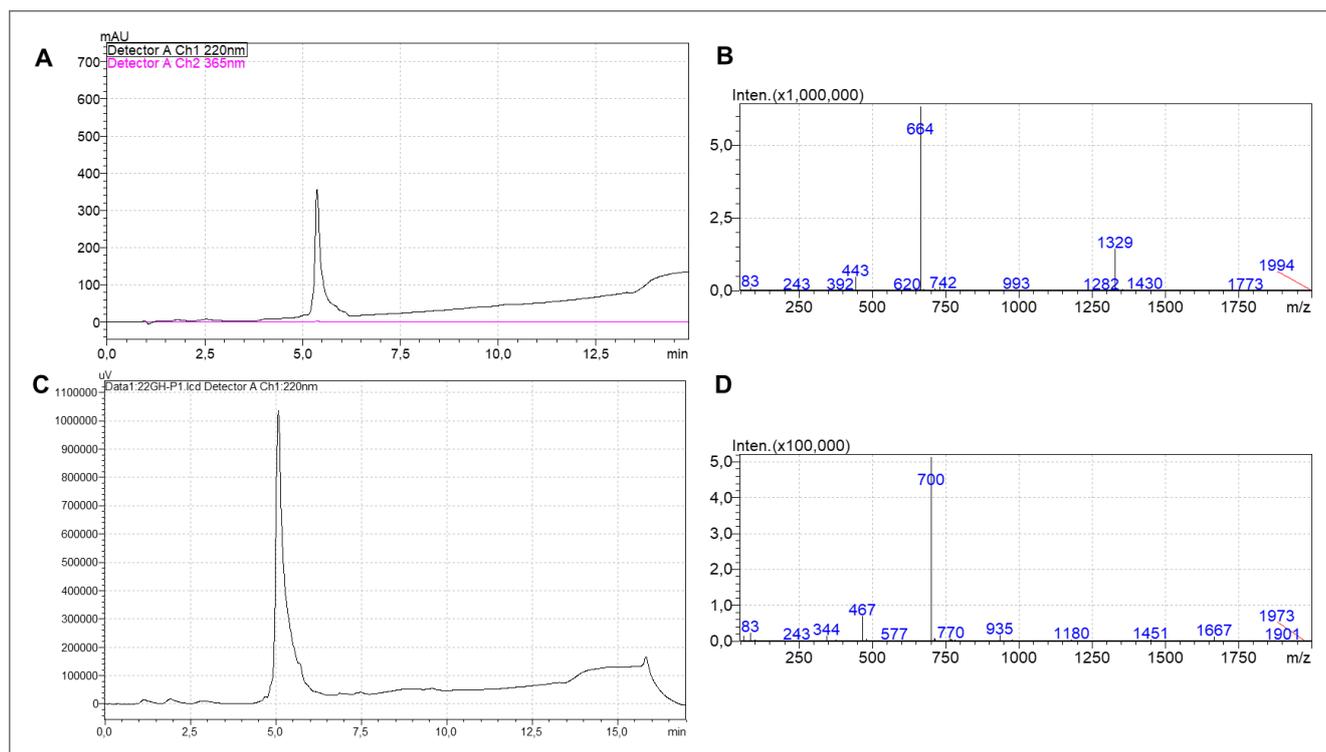


Figura 12. Análise por HPLC e espectrometria de massas dos peptídeos da NS1 DENV. HPLC (A) e gráfico de massa (B) do $^{103}\text{SLRPQPTTELKY}^{113}$ (NS1 DENV-2). HPLC (C) e gráfico de massa (D) do $^{111}\text{YKYSWKSWGKA}^{121}$ (NS1 DENV-1). Gráficos gerados pelo *software* LC Solution (Shimadzu).

Na Figura 12 tem-se os gráficos resultantes das análises por HPLC e espectrometria de massas dos peptídeos da NS1 DENV. O tempo de retenção da cromatografia para os dois peptídeos foi de aproximadamente 5 min, sendo visualizado pelo pico nos cromatogramas 12.A e 12.C. Ambas as leituras também apresentam uma leve detecção por volta dos 15 min, podendo ser decorrente da presença de alguma impureza no produto sintetizado, como um aminoácido livre, por exemplo (MANT *et al.*, 2007). Soma-se à isso, o fato de que a maioria das leituras foram feitas utilizando o detector UV-Vis com leitura em 220 nm, sendo este mais sensível à resíduos em comparação ao detector com leitura em 365 nm (EL-KIMARY, 2016; LEE *et al.*, 2021).

Nos gráficos de massas 12.B e 12.D, ambos apresentam dois picos referentes à leitura do material. Essa duplicidade de picos se repete em outras leituras, sendo atribuída ao aparecimento dos peptídeos na análise na forma duplamente carregada. Dessa forma, o pico de maior valor e menos intenso refere-se à massa íntegra do peptídeo, enquanto o de menor valor e mais intenso refere-se ao íon

duplamente carregado, e por isso um valor é aproximadamente o dobro do outro. Além disso, sabe-se que a técnica de ionização por *electrospray*, utilizada nestas leituras, favorece a aquisição de diferentes cargas por parte do peptídeo, propiciando o aparecimento de diferentes picos, referentes à detecção desses íons (DOLE *et al.*, 1968). Na Figura 12.B verifica-se que a massa do peptídeo $^{103}\text{SLRPQPTTELKY}^{113}$ é 1329 Da. Já na Figura 12.D, o pico referente à massa íntegra do peptídeo $^{111}\text{YKYSWKSWGKA}^{121}$ não aparece, apenas sua forma duplamente carregada em 700 Da, sendo possível assim, calcular que sua massa íntegra seja de 1400 Da. Em ambos os peptídeos a massa experimental equivale à massa teórica.

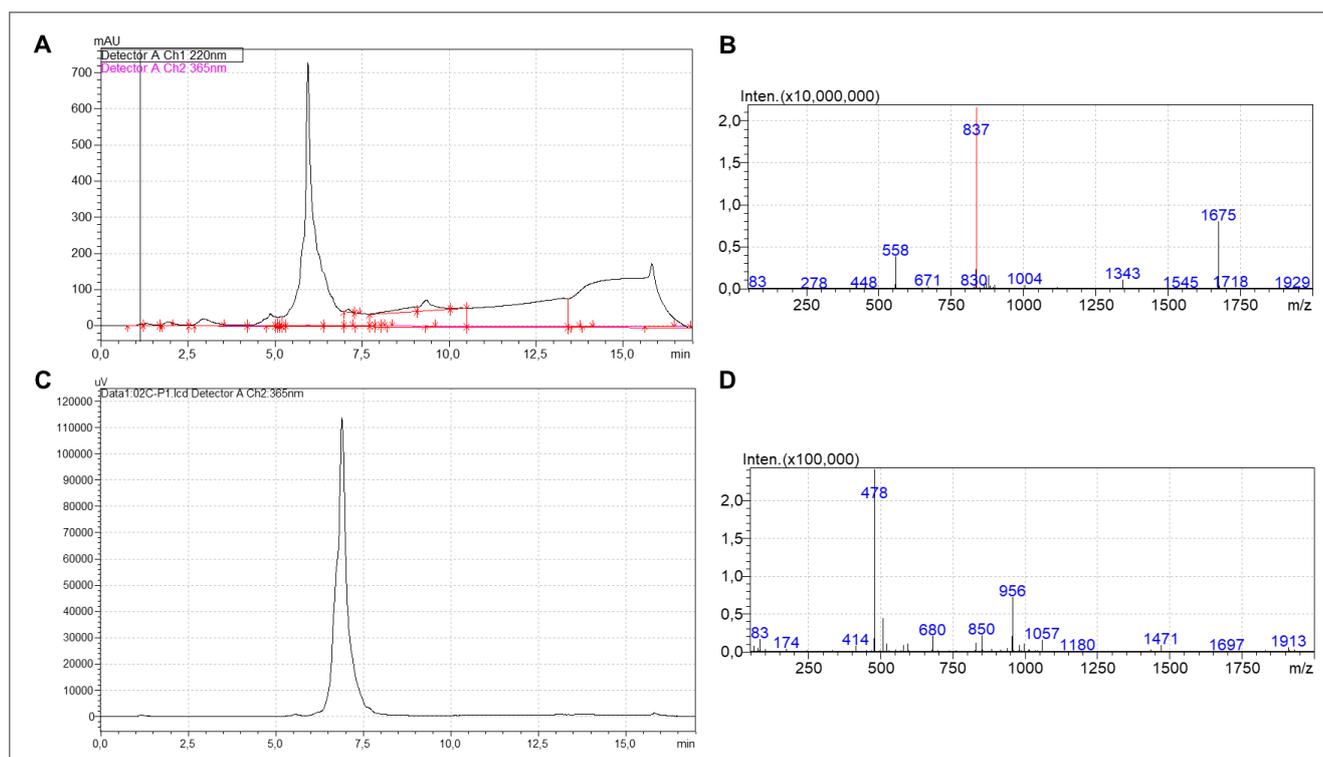


Figura 13. Cromatogramas e gráfico do espectro de massas dos peptídeos da NS1 ZIKV. HPLC (A) e espectrometria de massas (B) do $^{238}\text{ESDLIIPKSLAGPLSH}^{253}$. HPLC (C) e espectrometria de massas (D) do $^{83}\text{GVQLTVVVG}^{92}$.

A Figura 13 refere-se às análises dos peptídeos da NS1 ZIKV. No cromatograma 13.A pode-se observar o pico indicando um tempo de retenção próximo a 6 min, com uma leve proeminência em torno de 15 min, da mesma forma que os gráficos 13.A e 13.C. Já a análise do espectro de massas 13.B informa a massa de 1675 Da para o

peptídeo $^{238}\text{ESDLIIPKSLAGPLSH}^{253}$, enquanto sua forma duplamente carregada aparece em 837 Da. No cromatograma de $^{83}\text{GVQLTVVVG}^{92}$ (13.B) o tempo de retenção foi deslocado para 7 min, e a proeminência que aparece por volta de 15 min nos outros gráficos não é observada. Isto porque, diferente dos demais, o detector UV-Vis utilizado possui leitura em 365 nm, sendo menos sensível neste caso e detectando assim, menos resíduos avulsos provenientes da síntese. Já a espectrometria de massas (13.D) indica o peso molecular de 956 Da. Assim como nos peptídeos anteriores, ambos apresentaram a massa experimental equivalente à massa teórica.

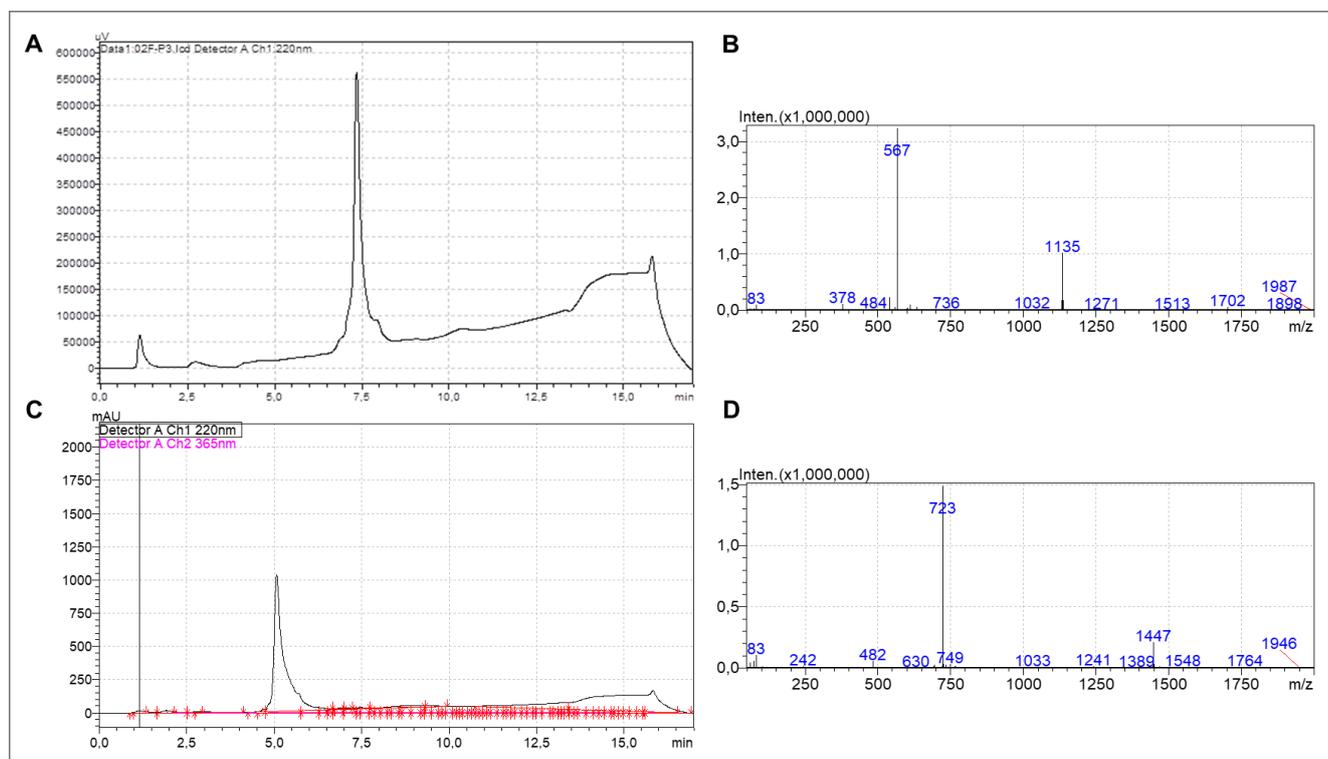


Figura 14. Perfil cromatográfico e gráficos do espectro de massas dos peptídeos da E2 CHIKV. HPLC (A) e espectrometria de massas (B) de $^{24}\text{EGHSCHSPVAL}^{34}$. HPLC (C) e espectrometria de massas (D) de $^{147}\text{HGKELPCSTYVQS}^{159}$.

As análises dos peptídeos da E2 CHIKV estão dispostas na Figura 14. No cromatograma 14.A verifica-se a presença do pico em torno de 7,5 min referente ao tempo de retenção do peptídeo $^{24}\text{EGHSCHSPVAL}^{34}$, enquanto uma elevação menor é observada em torno de 15 min, assim como nos cromatogramas anteriores. Ainda para este material, o gráfico de massas (14.B) indica o peso molecular de 1135 Da,

enquanto seu íon duplamente carregado aparece no pico mais intenso, com massa de 567 Da. Para o peptídeo $^{147}\text{HGKELPCSTYVQS}^{159}$, o tempo de retenção foi equivalente à 5 min (14.C) e o peso molecular foi de 1447 Da (14.D). Seu íon duplamente carregado apareceu no pico de 723 Da. Os dois peptídeos apresentaram a massa experimental equivalente à massa teórica.

5.3 IMUNOENSAIOS

5.3.1 *Dot blotting*

Os soros produzidos foram testados com seus respectivos peptídeos alvo com o intuito de informar se houve a formação de anticorpos contra estes peptídeos. A maioria dos soros foram capazes de reconhecer de forma clara seus respectivos alvos. Em outros casos, a interação ocorreu de forma fraca ou não foi possível visualizar. Na Figura 15, o *Dot blot* realizado mostra todas as interações.

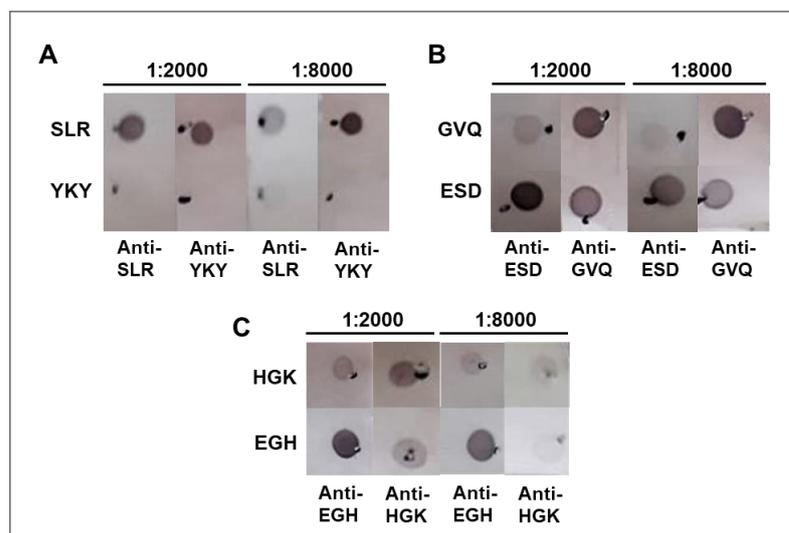


Figura 15. *Dot blot* de todos os peptídeos e soros produzidos. Para efeitos de visualização foram adotados os aminoácidos iniciais de cada peptídeo para sua identificação. Os soros utilizados como anticorpo primário estão nomeados abaixo de cada conjunto de figuras e os valores 1:2000 e 1:8000 referem-se às diluições utilizadas. (A) $^{103}\text{SLRPQPTLKY}^{113}$ e $^{111}\text{YKYSWKSWGKA}^{121}$ da NS1 DENV; (B) $^{238}\text{ESDLIIPKSLAGPLSH}^{253}$ e $^{83}\text{GVQLTVVVGGS}^{92}$ da NS1 ZIKV; (C) $^{24}\text{EGHSCHSPVAL}^{34}$ e $^{147}\text{HGKELPCSTYVQS}^{159}$ da E2 CHIKV.

Na Figura 15.A o soro anti-SLR reconheceu seu peptídeo alvo nas duas diluições propostas, porém em 1:8000 sua reatividade se mostrou mais fraca, exibindo um ponto mais claro como resultado. Já o soro anti-YKY foi capaz de marcar o peptídeo SLR em ambas as diluições, apresentando um sinal forte, mas não mostrou interação com seu próprio alvo. Da mesma forma, o soro anti-SLR também não reagiu com o peptídeo YKY de uma forma clara, apenas na diluição 1:8000 com um sinal muito fraco, indicando assim, que possa ter ocorrido alguma falha em sua manipulação, ocasionando a falta de interação entre o soro e seu alvo.

Na Figura 15.B todos os soros reconheceram todos os peptídeos. Tanto o anti-ESD quanto o anti-GVQ apresentaram o mesmo padrão de reação, com uma interação forte com seu alvo e mais fraca com o outro peptídeo, mas ainda sim presente. O padrão foi mantido nas duas diluições e o sinal dos soros se mantiveram altos mesmo em 1:8000, indicando que houve alta produção de anticorpos. Na Figura 15.C o padrão anterior se repetiu, com o anti-HGK e o anti-EGH apresentando interações mais fortes com seus alvos do que com o outro peptídeo. Entretanto, neste caso, observa-se um sinal mais forte do anti-EGH em comparação ao anti-HGK nas duas diluições, indicando que esse soro possui uma concentração mais elevada de anticorpos do que o anti-HGK.

5.3.2 Western blotting

Uma vez realizado o *Dot blot* com os peptídeos, iniciou-se o *Western blot* com as proteínas completas produzidas por sistema de expressão heteróloga em bactérias e em células de mamífero. As membranas observadas na Figura 16 são resultantes da incubação das proteínas completas expressas em *E. coli* com os soros anti-peptídeo produzidos anteriormente. Mesmo com a ausência da proteína E2 CHIKV nesta etapa, as análises foram realizadas a fim de se ter um resultado comparativo ao da incubação das proteínas expressas em células HEK293.

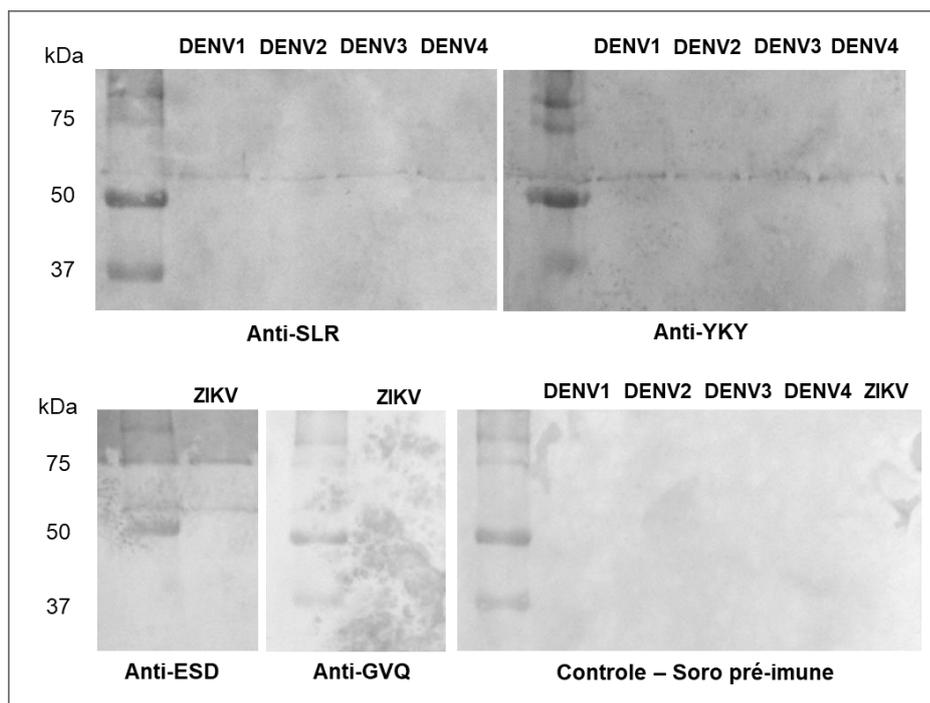


Figura 16. Western blot com as proteínas NS1 DENV e NS1 ZIKV produzidas em *E. coli*. Para efeitos de visualização colocou-se no topo das membranas apenas os nomes do vírus aos quais as proteínas pertencem. As imagens foram geradas no fotodocumentador ChemiDoc™ XRS+ e tratadas no software Image Lab™.

A banda próxima aos 50 kDa visualizada na maioria das membranas é indicativo do reconhecimento das proteínas pelos soros (KUNO *et al.*, 1990). Nas incubações com os soros da NS1 DENV pode-se observar que as proteínas de todos os sorotipos foram marcadas, tanto para o soro anti-SLR, quanto para o anti-YKY. Atendendo assim, às expectativas de que os soros pudessem reconhecer o maior número de sorotipos e de forma mais igualitária possível. Para a NS1 ZIKV, apenas o soro anti-ESD foi bem sucedido em reconhecer a proteína nesta fase do teste. Apesar da membrana incubada com o soro anti-GVQ ter sido mais degradada no processo de revelação, não houve em nenhum momento a formação de bandas. Além disso, na incubação com o soro anti-ESD pode-se visualizar uma banda presente também em 75 kDa de natureza desconhecida, podendo ser resultado de uma falha na desnaturação realizada antes da eletroforese (SORNJAI *et al.*, 2019). O controle não apresentou interação com as proteínas, confirmando que as bandas visualizadas são resultado dos anticorpos produzidos a partir da inoculação dos peptídeos nos animais.

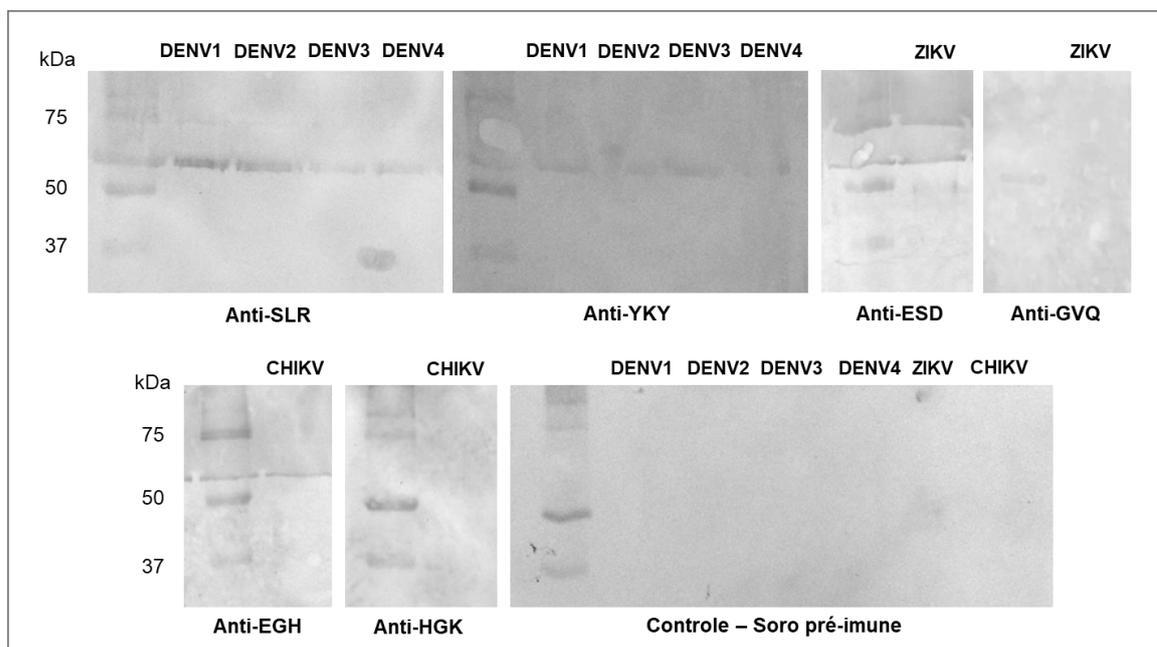


Figura 17. *Western blot* com as proteínas NS1 DENV e NS1 ZIKV produzidas em células HEK293, e E2 CHIKV produzida em células de inseto contendo baculovírus recombinante.

As membranas da Figura 17 mostram a interação entre as proteínas expressas em células de mamífero HEK293 e células de inseto contendo baculovírus recombinante, e os soros anti-peptídeo produzidos neste estudo. A marcação das bandas seguiu um padrão similar ao visto na Figura 16. Ambos os soros anti-peptídeo da NS1 DENV reconheceram todos os sorotipos, entretanto, diferente do observado anteriormente, a marcação se manteve forte apenas no soro anti-SLR, enquanto no anti-YKY as bandas apresentaram um sinal mais fraco. Além disso, o anti-SLR reconheceu de forma mais clara os sorotipos 1 e 2.

Para os soros da NS1 ZIKV observou-se o mesmo que na figura anterior, com o soro anti-ESD sendo eficiente no reconhecimento da proteína NS1, mas o soro anti-GVQ não. Na reação com o primeiro soro também é possível visualizar o aparecimento da banda na região de 75 kDa, que não aparece na incubação com o segundo soro. Em complemento à Figura 16, tem-se aqui a análise da proteína E2 CHIKV, onde o soro anti-EGH foi capaz de interagir com a proteína, mas o soro anti-HGK não. O controle, assim como na análise anterior, não mostrou reação com nenhuma proteína. Levando em consideração as análises com os dois tipos de proteínas, expressas em bactérias e em células HEK293, é possível inferir que a produção de

anticorpos foi bem sucedida nos soros da NS1 DENV, e dos peptídeos ²³⁸ESDLIIPKSLAGPLSH²⁵³ da NS1 ZIKV e ²⁴EGHSCCHSPVAL³⁴ da E2 CHIKV.

6 CONCLUSÕES

Para a síntese de peptídeos com a maior chance de sucesso na indução da formação de anticorpos possível, ferramentas de bioinformáticas foram utilizadas para a realização de análises *in silico* das proteínas NS1 do vírus dengue, NS1 do vírus Zika e E2 do vírus chikungunya. Um dos fatores fundamentais para a indução da produção anticorpos ao qual esta pesquisa se ateve é a antigenicidade, e juntamente à isso, outras características desejáveis, como tamanho de 10-20 aminoácidos, fazer parte de um epítipo linear, possuir uma ou nenhuma cisteína, acessibilidade, hidrofiliçidade e não estar presente em uma volta- β (LEE *et al.*, 2010).

As metodologias de predição aplicadas foram capazes de guiar a síntese de peptídeos de forma que fossem reconhecidos por seus respectivos soros, e além disso, provocarem uma resposta imune considerável nos animais quando inoculados. O título de anticorpos de 8000 testado no *Dot blot* informa que a maior parte dos soros se manteve com sinal forte de ligação antígeno-anticorpo mesmo na diluição mais elevada (CLEMENTS *et al.*, 2010). Pode-se considerar assim, que todos os soros, com exceção do anti-HGK apresentaram alta concentração de anticorpos.

A maior parte dos soros também foi bem sucedida no reconhecimento das proteínas completas. Os soros anti-GVQ (NS1 ZIKV) e anti-HGK (E2 CHIKV) não mostraram interação com as proteínas, apesar de terem reagido com seus peptídeos alvo. Enquanto isso, o anti-SLR e anti-YKY foram capazes de reconhecer a NS1 dos quatro sorotipos do vírus dengue. Assim, os soros anti-SLR (NS1 DENV), anti-YKY (NS1 DENV) e anti-ESD (NS1 ZIKV) reagiram à presença das proteínas completas expressas em *E. coli* e HEK293, exceto o anti-EGH e anti-HGK da E2 CHIKV, que foram testados com a proteína completa expressa em células de inseto contendo baculovírus recombinante, onde apenas o anti-EGH reagiu. Esse resultado abre caminho para futuras aplicações, como em sensores para diagnóstico ou no desenvolvimento de vacinas.

REFERÊNCIAS

- AKEY, A. D. L. *et al.* Flavivirus NS1 crystal structures reveal a surface for membrane association and regions of interaction with the immune system. **Science**, v. 343, p. 1-31, 2014.
- AMARASINGHE, A. *et al.* Dengue virus infection in Africa. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, p. 1349-1354, 2011.
- ATHERTON, E. *et al.* A mild procedure for solid phase peptide synthesis: Use of fluorenylmethoxycarbonylamino-acids. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, v. 13, p. 537-539, 1978.
- BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G. Dengue no Brasil: Situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. **Epidemics Dossier**, v. 22, n. 64, p. 53-72, 2008.
- BHATNAGAR, S. *et al.* Evaluation of multiple antigenic peptides based on the chikungunya E2 protein for improved serological diagnosis of infection. **Viral Immunology**, v. 28, n. 2, p.107-112, 2014.
- BIDO-MEDINA, R. *et al.* Impact of Zika virus on adult human brain structure and functional organization. **Annals of Clinical and Translational Neurology**, v. 5, n. 6, p. 752-762, 2018.
- BRADY, O. J. *et al.* Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 8, p. 1-15, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim epidemiológico 32**: Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos pelo mosquito *Aedes* (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 35, 2021. Brasília, v. 52, 2021.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças Transmissíveis. **Plano de contingência nacional para a febre de chikungunya**. Brasília, 2014.
- BRUSIC, V.; FLOWER, D. Bioinformatics tools for identifying T-cell epitopes. **Drug Disc. Today**, v. 2, p. 8-23, 2004.
- BURNETTE, W. N. 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, 1981.
- BURT, F. J. *et al.* Chikungunya virus: An update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, p. 107-117, 2017.

CABRAL-CASTRO, M. J. *et al.* Molecular and serological techniques to detect co-circulation of DENV, ZIKV and CHIKV in suspected dengue-like syndrome patients. **Journal of Clinical Virology**, v. 82, p. 108-111, 2016.

CAMPBELL, V. L. *et al.* Proteome-wide Zika virus CD4 T cell epitope and HLA restriction determination. **ImmunoHorizons**, v. 4, n. 8, p. 444-453, 2020.

CAO-LORMEAU, V.-M. *et al.* Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: A case-control study. **The Lancet**, v. 387, n. 10027, p. 1531-1539, 2016.

CHAMBERS, T. J. *et al.* Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 44, p. 649-688, 1990.

CHIKUNGUNYA entrou no Brasil um ano antes do previsto. 2019. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/noticia/chikungunya-entrou-no-brasil-um-ano-antes-do-previsto>>. Acesso em: 27 set. 2021.

CHIU, H.-P. *et al.* Inhibition of Japanese encephalitis virus infection by the host zinc-finger antiviral protein. **PLOS Pathogens**, v. 14, n. 7, p. 1-23, 2018.

CHOU, P. Y.; FASMAN, G. D. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v. 47, p. 45-148, 1978.

CHUA, C. L.; CHAN, Y. F.; SAM, I.-C. Characterisation of mouse monoclonal antibodies targeting linear epitopes on Chikungunya virus E2 glycoprotein. **Journal of Virological Methods**, v. 195, p. 126-133, 2014.

CLEMENTS, D. E. *et al.* Development of a recombinant tetravalent dengue virus vaccine: Immunogenicity and efficacy studies in mice and monkeys. **Vaccine**, v. 28, p. 2705-2715, 2010.

DANG, J. *et al.* Zika virus depletes neural progenitors in human cerebral organoids through activation of the innate immune receptor TLR3. **Cell Stem Cell.**, v. 19, p. 258-265, 2016.

DENGUE BULLETIN, New Delhi, v. 41, p. 1-202, 2020.

DENGUE Virus, Molecule of the month. Disponível em: <<https://pdb101.rcsb.org/motm/103>>. Acesso em: 28 set. 2021.

DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509-520, 1952.

DOLE, M. *et al.* Molecular beams of macroions. **The Journal of Chemical Physics**, v. 49, n. 5, p. 2240-2249, 1968.

DUFFY, M. R. *et al.* Zika Virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **The New England Journal of Medicine**, v. 360, p. 2536-2543, 2009.

DURBIN, A. P. *et al.* Phenotyping of peripheral blood mononuclear cells during acute dengue illness demonstrates infection and increased activation of monocytes in severe cases compared to classic dengue fever. **Virology**, v. 376, n. 2, p. 429-435, 2008.

EL-KIMARY, E. I. Stability-indicating HPLC–DAD method development, validation, and stress degradation studies for triamterene and xipamide in their combined tablet dosage form. **Acta Chromatographica**, v. 28, n. 1, p. 79-98, 2016.

EL-MANZALAWY, Y.; DOBBS, D.; HONAVAR, V. G. In silico prediction of linear B-cell epitopes on proteins. In: ZHOU, Y. *et al.* **Prediction of protein secondary structure**. New York: Humana Press, 2017.

EMINI, E. A. *et al.* Induction of hepatitis a virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. **Journal of Virology**, v. 55, n. 3, p. 836-839, 1985.

ESPOSITO, D. L. A.; FONSECA, B. A. L. Zika and chikungunya infections in Brazil: reviewing the epidemic and treatment options. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 49, n. 5, p. 535-536, 2016.

FABRE, A. *et al.* Dengue virus induced hepatitis with chronic calcific changes. **Gut**, v. 49, n. 6, p. 864-865, 2001.

FREIRE, M. C. L. C. *et al.* Mapping putative B-cell Zika virus NS1 epitopes provides molecular basis for anti-NS1 antibody discrimination between Zika and dengue viruses. **American Chemical Society**, v. 2, p. 3913-3920, 2017.

HALSTEAD, S. B. Dengue. **The Lancet**, v. 370, p. 1644-1652, 2007.

HANAJIRI, R. *et al.* Generation of Zika virus-specific T cells from seropositive and virus-naïve donors for potential use as an autologous or “off-the-shelf” immunotherapeutic. **Cytotherapy**, v. 21, n. 8, p. 840-855, 2019.

HAWKES, R.; NIDAY, E.; GORDON, J. A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. **Analytical Biochemistry**, v. 119, n. 1, p. 142-147, 1982.

HUITS, R. *et al.* Diagnostic accuracy of a rapid E1-antigen test for chikungunya virus infection in a reference setting. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, p. 78-81, 2018.

HUMPHREY, J. M. *et al.* Dengue in the Middle East and North Africa: A systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 12, p. 1-31, 2016.

JAMESON, B. A.; WOLF, H. The antigenic index: A novel algorithm for predicting antigenic determinants. **Comput. Appl. Biosci.**, v. 4, n. 1, p. 181-186, 1988.

JESPERSEN, M. C. *et al.* BepiPred-2.0: Improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. **Nucleic Acids Research**, v. 45, p. 24-29, 2017.

JONES, M. L. *et al.* Computational identification of antibody epitopes on the dengue virus NS1 protein. **Molecules**, v. 22, n. 4, p. 607-628, 2017.

KAM, Y.-W. *et al.* Early neutralizing IgG response to chikungunya virus in infected patients targets a dominant linear epitope on the E2 glycoprotein. **EMBO Mol. Med.**, v. 4, p. 330-343, 2012.

KAM, Y.-W. *et al.* ZIKV-specific NS1 epitopes as serological markers of acute Zika virus infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 220, n. 2, p. 203-212, 2019.

KAUTNER, I.; ROBINSON, M. J.; KUHNLE, U. Dengue virus infection: Epidemiology, pathogenesis, clinical presentation, diagnosis, and prevention. **J. Pediatr.**, v. 131, p. 516-524, 1997.

KHAN, A. M. *et al.* A systematic bioinformatics approach for selection of epitope-based vaccine targets. **Cellular Immunology**, v. 244, n. 2, p. 141-147, 2006.

KOLASKAR, A. S.; TONGAONKAR, P. C. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. **FEBS Letters**, v. 276, n. 1-2, p. 172-174, 1990.

KUNO, G. *et al.* Study of anti-dengue NS1 antibody by Western blot. **Journal of Medical Virology**, v. 32, p. 102-108, 1990.

KYTE, J.; DOOLITTLE, R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. **J. Mol. Biol.**, v. 157, n. 1, p.105-132, 1982.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEE, A. J. *et al.* Identification of diagnostic peptide regions that distinguish Zika virus from related mosquito-borne Flaviviruses. **PLOS One**, v. 12, n. 5, p. 1-18, 2017.

LEE, B.-S. *et al.* Antibody production with synthetic peptides. In: SCHWARTZBACH, S. D.; SKALLI, O.; SCHIKORSKI, T. **High-Resolution imaging of cellular proteins: Methods and protocols**. New York: Humana Press, 2016. p. 25-47.

LEE, B.-S. *et al.* Production of antipeptide antibodies. In: SCHWARTZBACH, S. D.; OSAFUNE, T. **Immunoelectron microscopy: Methods and protocols**. New York: Humana Press, 2010. p. 93-108.

LEE, J. *et al.* Quantification of teicoplanin using the HPLC-UV method for clinical applications in critically ill patients in Korea. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 572, p. 1-10, 2021.

LEMANT, J. M. D. *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.

LESK, Arthur M. **Introduction to Bioinformatics**. 5^a ed. New York: Oxford University Press, 2002.

MANT, C. T. *et al.* HPLC analysis and purification of peptides. In: FIELDS, G. B. **Peptide Characterization and Application Protocols**. New York: Humana Press, 2007. p. 3-55.

MARTINA, B. E. E.; KORAKA, P.; OSTERHAUS, A. D. M. E. Dengue virus pathogenesis: An integrated view. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 4, p. 564-581, 2009.

MASRINOUL, P. *et al.* Highly conserved region 141–168 of the NS1 protein is a new common epitope region of dengue virus. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 64, n. 2, p. 109-115, 2011.

MATTIUZZI, C.; HENRY, B. M.; LIPPI, G. Making sense of rapid antigen testing in severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) diagnostics. **Diagnosis**, v. 8, n. 1, p. 27-31, 2021.

MCMASTER, Marvin C. **HPLC: A practical user's guide**. 2nd ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2007.

MEIRA, R. "Urucubaca" gripe ou dengue? Dengue. In:_____. **Clínica Médica**. São Paulo: Gráfica O Estado de São Paulo, 1916. p. 273-285.

MERRIFIELD, R. B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 85, n. 14, p. 2149-2154, 1963.

MINER, J. J. *et al.* Zika virus infection during pregnancy in mice causes placental damage and fetal demise. **Cell**, v. 165, p. 1081-1091, 2016.

MULLER, D. A.; DEPELSENAIRE, A. C. I.; YOUNG, P. R. Clinical and laboratory diagnosis of dengue virus infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 215, p. 89-95, 2017.

MULLER, D. A.; YOUNG, P. R. The flavivirus NS1 protein: Molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. **Antivir. Res.**, v. 98, p. 192-208, 2013.

NAGAR, P. K. *et al.* Mapping and immunological response of immunodominant B and T cell epitopes of E2 glycoprotein of chikungunya virus. **MOJ Immunol.**, v. 4, n. 1, p. 1-10, 2016.

OH, Y. *et al.* Zika virus directly infects peripheral neurons and induces cell death. **Nat. Neurosci.**, v. 20, n. 9, p. 1209-1212, 2017.

ONG, R.-Y.; LUM, F.-M.; NG, L. F. P. The fine line between protection and pathology in neurotropic flavivirus and alphavirus infections. **Future Virology**, v. 9, n. 3, p. 313-330, 2014.

OSANAI, Carlos Hiroyuki. **A Epidemia de dengue em Boa Vista, território federal de Roraima, 1981-1982**. 1984. 127 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1984.

PARKER, J. M. R.; GUO, D.; HODGES, R. S. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: Correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. **Biochemistry**, v. 25, n. 19, p. 5425-5432, 1986.

PUNTASECCA, C. J.; KING, C. H.; LABEAUD, A. D. Measuring the global burden of chikungunya and Zika viruses: A systematic review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 3, p. 1-18, 2021.

REGENMORTEL, M. H. V. V. Antigenicity and immunogenicity of synthetic peptides. **Biologicals**, v. 29, p. 209-213, 2001.

ROBINSON, M. C. 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, 1955.

ROCHA, L. B. *et al.* Epitope sequences in dengue virus NS1 protein identified by monoclonal antibodies. **Antibodies**, v. 6, n. 14, p. 1-13, 2017.

ROSENBERG, A. Z. *et al.* Placental pathology of Zika virus: Viral infection of the placenta induces villous stromal macrophage (Hofbauer cell) proliferation and hyperplasia. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 141, p. 43-48, 2016.

SA-NGAMUANG, C. *et al.* Accuracy of dengue clinical diagnosis with and without NS1 antigen rapid test: Comparison between human and Bayesian network model decision. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 6, p. 1-14, 2018.

SCHWARTZ, O.; ALBERT, M. L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 491-500, 2010.

SLAVOV, S. N. *et al.* Overview of Zika virus (ZIKV) infection in regards to the brazilian epidemic. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 5, p. 1-11, 2016.

SOLIGNATA, M. *et al.* Replication cycle of chikungunya: A reemerging arbovirus. **Virology**, v. 393, p. 183-197, 2009.

SORIA-GUERRA, R. E. *et al.* An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: Implications on vaccine development. **Journal of Biomedical Informatics**, v. 53, p. 405-414, 2015.

SORNJAI, W. *et al.* High correlation between Zika virus NS1 antibodies and neutralizing antibodies in selected serum samples from normal healthy Thais. **Scientific Reports**, v. 9, p. 1-10, 2019.

SUHRBIER, A.; JAFFAR-BANDJEE, M.-C.; GASQUE, P. Arthritogenic alphaviruses - An overview. **Nat. Rev. Rheumatol.**, v. 8, p. 420-429, 2012.

SUN, S. *et al.* Structural analyses at pseudo atomic resolution of Chikungunya virus and antibodies show mechanisms of neutralization. **eLife**, v. 2, p. 1-27, 2013.

TABATA, T. *et al.* Zika virus targets different primary human placental cells, suggesting two routes for vertical transmission. **Cell Host Microbe**, v. 20, p. 155-166, 2016.

TALARMIN, F. *et al.* Skin and mucosal manifestations of chikungunya virus infection in adults in Reunion Island. **Med. Trop.**, v. 67, p. 167-173, 2007.

TAN, L. K. *et al.* Flavivirus cross-reactivity to dengue nonstructural protein 1 antigen detection assays. **Diagnostics**, v. 10, n. 11, p. 1-12, 2020.

TRIPATHI, N. K.; PRIYA, R.; SHRIVASTAVA, A. Immunogenicity of *Escherichia coli* expressed envelope 2 protein of chikungunya virus. **Bioengineered**, v. 5, p. 198-203, 2014.

VORAPHANI, N. *et al.* Increased level of hepatocyte growth factor in children with dengue virus infection. **Annals of Tropical Paediatrics**, v. 30, p. 213-218, 2010.

VOSS, J. E. *et al.* Glycoprotein organization of chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. **Nature**, v. 468, p. 709-712, 2010.

WIDAYANTI, T.; DEWI, B. E.; PAMBUDI, S. Production of monoclonal antibody anti-NS1 induced by DENV3 indonesian clinical isolate to detect native NS1 antigen of all DENV serotypes. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 12, n. 10, p. 5-8, 2018.

WILDER-SMITH, A. *et al.* Epidemic arboviral diseases: Priorities for research and public health. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. 101-106, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chikungunya**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya>>. Acesso em: 29 set. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue and severe dengue**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>>. Acesso em: 29 set. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Zika virus**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus>>. Acesso em: 29 set. 2021.

ZANLUCA, C. *et al.* First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569-572, 2015.

ZIKA Virus, Molecule of the month. Disponível em: <<https://pdb101.rcsb.org/motm/197>>. Acesso em: 28 set. 2021.